

Beobachtung von ssDNA-Bindung an die DnaB-Helikase von *Helicobacter pylori* mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie

Thomas Wiegand, Riccardo Cadalbert, Carole Gardiennet, Joanna Timmins, Laurent Terradot,*
Anja Böckmann* und Beat H. Meier*

Abstract: DnaB-Helikasen sind ATP-getriebene bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA während der DNA-Replikation entwinden. In dieser Arbeit untersuchen wir das sequentielle Binden des „nicht-hydrolyzierbaren“ ATP-Analogs AMP-PNP und von einfachsträngiger (ss) DNA an die dodekaedrische DnaB-Helikase von *Helicobacter pylori* mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie. Mithilfe von Phosphorkreuzpolarisationsexperimenten wird das Binden von AMP-PNP und DNA an die Helikase beobachtet, während Veränderungen in den ¹³C-chemischen Verschiebungen (chemical-shift perturbations, CSPs) Konformationsänderungen des Proteins detektieren. Durch Zugabe von AMP-PNP geht die Helikase in eine Konformation über, welche ssDNA bindet, wohingegen AMP-PNP hydrolysiert und bei DNA-Bindung freigesetzt wird. Unsere Beobachtungen geben Aufschluss über die Konformationsänderungen, die durch Wechselwirkung mit AMP-PNP ausgelöst werden und die Voraussetzung für das Binden von ssDNA an *H. pylori* DnaB in vitro sind. Ferner zeigen sie den Grad an Details, welchen die Festkörper-NMR zur Charakterisierung von Protein-DNA-Wechselwirkungen und dem Zusammenspiel mit ATP oder seinen Analoga zu liefern vermag.

Die Replikation von genomischer DNA ist eine zentrale Aufgabe einer Zelle^[1] und wird durch das Replisom, einen Multiproteinkomplex bestehend aus einer Helikase, einer Polymerase und einem *clamp loader* (Klammerlader),^[2] durchgeführt. Das Replisom assoziiert sich auf der Replikationsgabel der DNA, an der doppelsträngige DNA (dsDNA)

in einzelsträngige DNA (ssDNA) separiert wird. Das Entwinden von dsDNA erfolgt durch DnaB-Helikasen^[3] und die zwei resultierenden ssDNA-Stränge (Leit- und Folgestrang) dienen als Templat für die Synthese von Tochtersträngen.

Bakterielle DnaB-Helikasen bilden häufig hexamere, ringförmige Anordnungen,^[4,5] wohingegen die Helikase von *Helicobacter pylori* als ein Dodekamer mit zwei übereinander gestapelten Hexameren vorliegt.^[6,7] Es wird angenommen, dass die ringförmigen Helikasen dsDNA durch einen Strangaußschlussmechanismus entwinden: Ein Strang der DNA verläuft durch die zentrale Öffnung der Helikase, wohingegen der andere von dieser ausgeschlossen wird. DnaB-Helikasen bewegen sich entlang ssDNA in 5'-nach 3'-Richtung, wobei sie ATP als Energiequelle^[8] verwenden. Die dabei entstehenden Verdrillungen in dem nicht-replizierten DNA-Strang werden von DNA-Topoisomerasen entspannt.^[9,10] Der detaillierte Translokationsmechanismus kann sich von Organismus zu Organismus unterscheiden und bis heute konnte kein allgemeines Modell hierfür etabliert werden.

Strukturell gesehen bestehen DnaB-Helikasen aus zwei Domänen: einer N-terminalen Domäne (NTD) und einer C-terminalen Domäne (CTD). Die CTD ist für das Binden von Nukleotiden und ssDNA verantwortlich,^[11-13] wie in biochemischen^[14] und röntgenographischen Untersuchungen gezeigt werden konnte.^[8,13,15,16] Sämtliche DnaB-Helikasen weisen Walker-A- und Walker-B-Motive auf, welche an der Bindung und der Hydrolyse von Nukleotiden beteiligt sind.^[11,12] Ferner nehmen auch ein Arginin-Finger der Helikase sowie ein katalytisches Glutamat an der Binding des Nukleotids an die Helikase teil.^[8,15] Die Bindung des Nukleotids geht mit dem Binden eines divalenten Metallions, normalerweise Mg²⁺, einher. Konformationsänderungen in DnaB-Helikasen unter Zugabe von Nukleotiden konnten nachgewiesen werden, allerdings ist bis heute kein Bild auf atomarer Ebene verfügbar.

Wir fokussieren uns in dieser Arbeit auf die strukturelle Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen der DnaB-Helikase von *H. pylori* (*HpDnaB*) und dem ATP-Analogon Adenylyimidodiphosphat (AMP-PNP) sowie ssDNA. Alle das Protein beinhaltende Proben wurden durch Sedimentation in einer Ultrazentrifuge erhalten,^[17,18] wodurch der schwierige Kristallisationsschritt in Gegenwart von Nukleotiden und/oder DNA umgangen werden konnte. Dies wurde bereits in einer vorangegangenen NMR-Untersuchung von *HpDnaB*, welches mit *HpDnaG* interagiert, gezeigt.^[19] In den 3.2-mm-Rotoren befinden sich 20 mg Protein, was zu einer Proteinkonzentration von ungefähr 430 mg mL⁻¹ führt.

Die ³¹P-NMR-Spektroskopie ermöglicht eine Unterscheidung von freiem AMP-PNP und an die Helikase ge-

[*] Dr. T. Wiegand, R. Cadalbert, Prof. Dr. B. H. Meier

Physical Chemistry, ETH Zürich
8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: beme@ethz.ch

Dr. C. Gardiennet, Dr. L. Terradot, Dr. A. Böckmann
Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Molecular Microbiology
and Structural Biochemistry, UMR 5086 CNRS, Université de Lyon
7 passage du Vercors, 69367 Lyon (Frankreich)
E-Mail: laurent.terradot@ibcp.fr
a.bockmann@ibcp.fr

Dr. J. Timmins
Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS
38044 Grenoble (Frankreich)
Dr. C. Gardiennet
Aktuelle Adresse: CRM2, UMR 7036 CNRS/ Université de Lorraine,
Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239
Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy (Frankreich)

 Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID)
 eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201607295> zu finden.

bundenem AMP-PNP: Die freie Spezies ist in ^{31}P -Einpuls-NMR-Experimenten mit einer Repetitionszeit von 10 s sichtbar (unter diesen Bedingungen wird gebundenes AMP-PNP aufgrund dessen langer T_1 -Relaxationszeit herausgefiltert) und die gebundene Spezies kann in ^1H - ^{31}P -KreuzpolarisationsExperimenten (CP)^[20] (in welchen kein Signal für freies AMP-PNP erhalten wird, da die Dipolkopplungen durch die molekularen Taumelbewegungen ausgemittelt werden) detektiert werden. Abbildung 1a zeigt das Referenzspektrum von freiem AMP-PNP in Lösung (Phosphatpuffer und MgCl_2). In Abbildung 1b sind die Signale von freiem AMP-PNP in der flüssigen Phase der $Hp\text{DnaB}:\text{MgCl}_2:\text{AMP-PNP}$ Probe zu sehen, wohingegen Abbildung 1c das CP-Spektrum von gebundenem AMP-PNP darstellt, wodurch belegt wird, dass das ATP-Analogon fest in dessen ursprünglicher, nicht-hydrolysierte Form an die Helikase gebunden wird.

Die für an $Hp\text{DnaB}$ gebundenes AMP-PNP beobachteten Resonanzen sind leicht verbreitert und dispergiert, was auf einen gewissen Freiraum in der Konformation von AMP-PNP bei Bindung an die Helikase hindeutet. Das ^{31}P - ^{31}P -2D-Korrelationsspektrum in Abbildung S1 (siehe Hintergrundinformationen) belegt die Resonanzzuordnung und zeigt, dass

mindestens drei verschiedene Spinsysteme für gebundenes AMP-PNP vorliegen. Dies kann vermutlich auf die zwei leicht verschiedenen Bindungsstellen in dem 3-fach symmetrischen Hexamer zurückgeführt werden und möglicherweise eine Konsequenz von strukturellen Unterschieden zwischen den zwei Hexameren sein, die das Dodekamer bilden.

Die Konformationsänderungen im Protein durch AMP-PNP-Bindung können im ^{13}C -DARR-Spektrum in Abbildung 2a,b und Abbildung S2 beobachtet werden. ^{15}N , ^{13}C -NCA-Spektren sind in Abbildung S3 gegeben. Die ^{13}C -Linienbreite beträgt ca. 0.5 ppm für freies sowie für AMP-PNP-gebundenes Protein, was auf eine wohlgeordnete molekulare Konformation hindeutet. Eine teilweise, sequentielle Resonanzzuordnung von $Hp\text{DnaB}$ wurde auf Basis der Zuordnung der N-terminalen Domäne (NTD)^[22] und durch 3D-Experimente erzielt, wie in den Hintergrundinformationen beschrieben (Abbildung S4).^[22,23] 25 % der Atome des Rückgrates konnten zugeordnet werden, vgl. Tabelle S1.

Signifikante CSPs von > 0.3 ppm und bis zu 1 ppm werden bei Bildung des $Hp\text{DnaB}:\text{MgCl}_2:\text{AMP-PNP}$ -Komplexes beobachtet und sind in dem 2D-DARR-Spektrum in Abbildung 2 durch rote und orangene Pfeile für zugeordnete bzw. nicht zugeordnete Resonanzen hervorgehoben. CSPs in

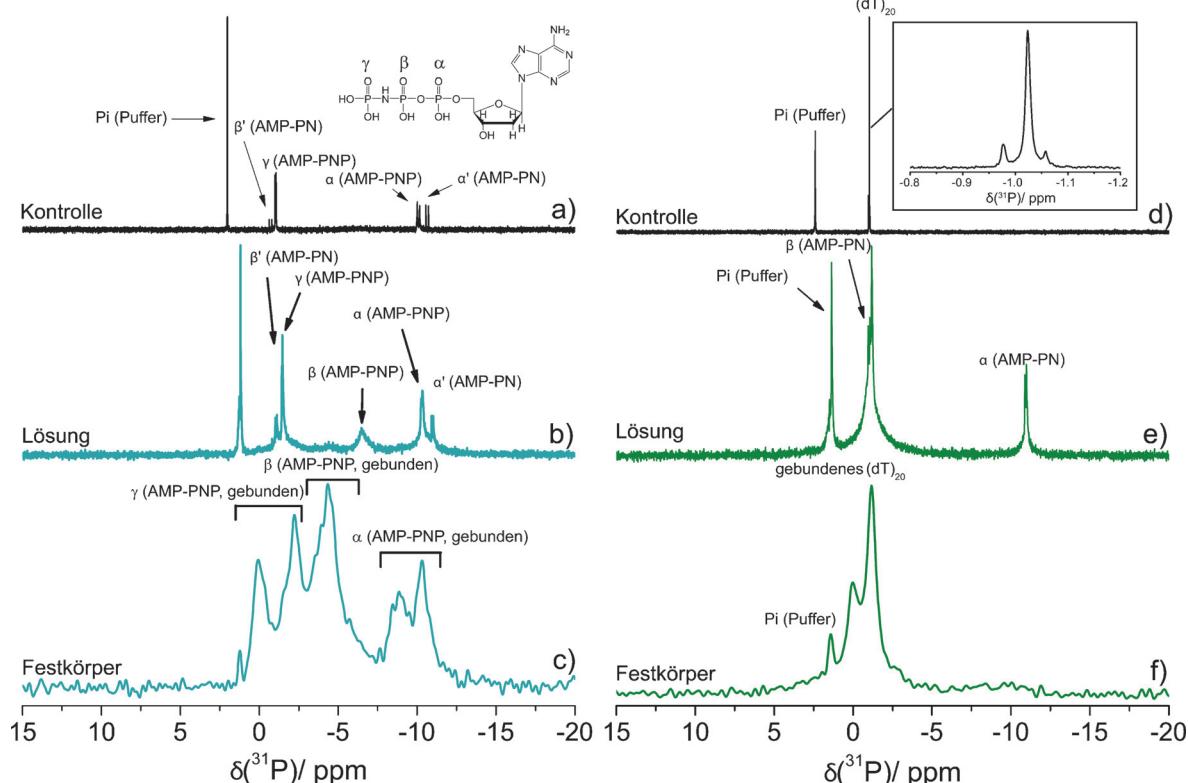


Abbildung 1. Bindung von Nukleotiden und ssDNA an $Hp\text{DnaB}$: a) ^{31}P -Flüssig-NMR-Spektrum einer Lösung von 5 mM AMP-PNP und 5 mM MgCl_2 in Phosphatpuffer als Referenz. b,c) ^{31}P -Flüssig-NMR- (b) und ^1H - ^{31}P -CPMAS-Spektren (c) des $Hp\text{DnaB}:\text{MgCl}_2:\text{AMP-PNP}$ -Komplexes. d) ^{31}P -Flüssig-NMR-Spektrum einer 0.5 mM $(\text{dT})_{20}$ -Lösung in Phosphatpuffer als Referenz. e,f) ^{31}P -Flüssig-NMR- (e) und ^1H - ^{31}P -CPMAS-Spektren (f) des $Hp\text{DnaB}:\text{MgCl}_2:\text{AMP-PNP}$:ssDNA-Komplexes. Das Spektrum in (b) weist einen Satz von Resonanzen bei -1.5, -6.5 und -10.3 ppm (zugeordnet zu AMP-PNP: Mg^{2+}) auf, sowie ein weniger intensives Dublett bei -1.1 und -11.0 ppm ($J(^{31}\text{P}-\text{O}-^{31}\text{P}) \approx 20$ Hz, zugeordnet zu hydrolysiertem AMP-PNP, AMP-PN). Die drei Phosphatgruppen von AMP-PNP können anhand ihrer chemischen Verschiebungen unterschieden werden.^[21] Das Dublett in (a) bei -10.1 ppm ($J(^{31}\text{P}-\text{O}-^{31}\text{P}) \approx 18$ Hz) wird dem α -Phosphat und das Dublett bei -1.0 ppm ($J(^{31}\text{P}-\text{N}-^{31}\text{P}) \approx 8$ Hz) dem γ -Phosphat von AMP-PNP zugeordnet. Die Nummerierung der Phosphatgruppen wird oben gezeigt. Die β -Phosphate sind aufgrund chemischen Austausches nicht sichtbar, können aber in der Abwesenheit von Mg^{2+} beobachtet werden (vgl. Abbildung S9).

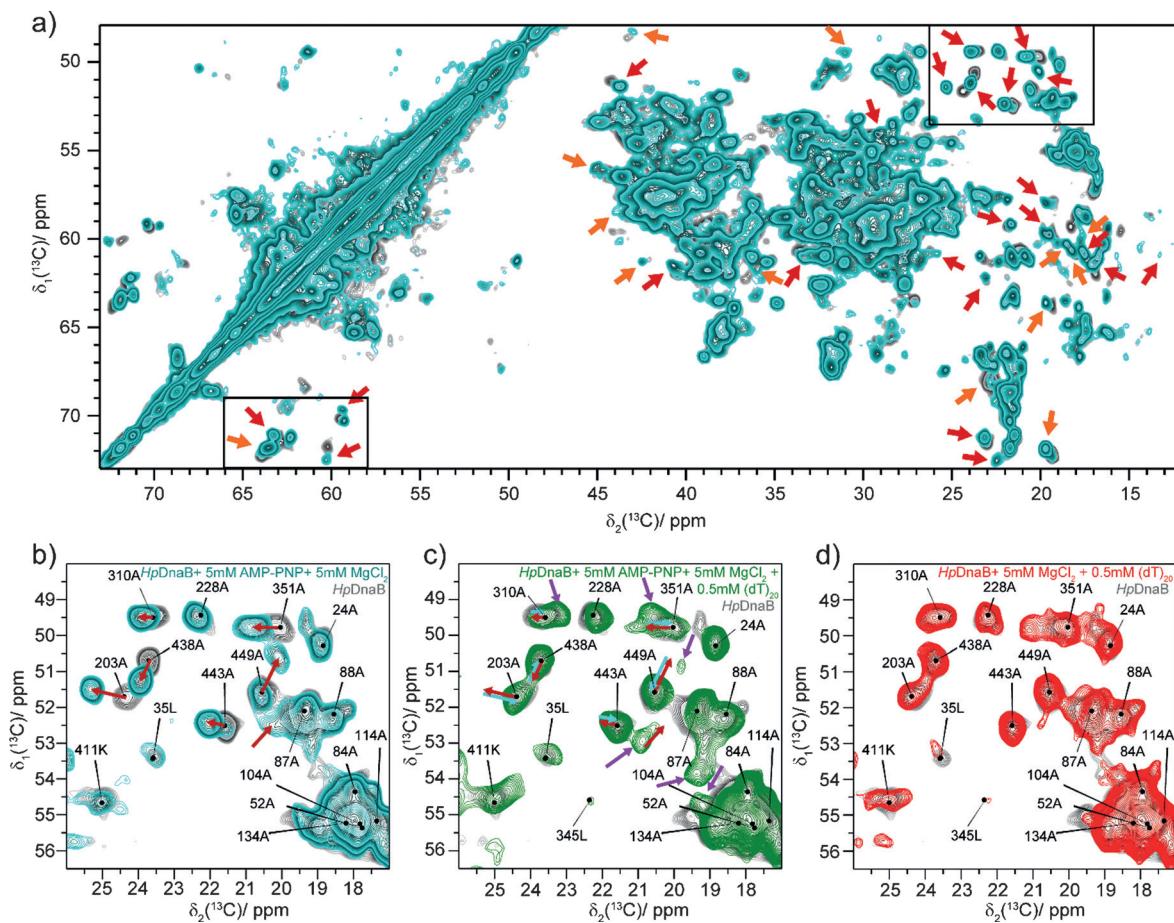


Abbildung 2. CSPs spiegeln Konformationsänderungen in der Helikase durch AMP-PNP-Bindung wider. a) Vergleich von 20 ms ^{13}C - ^{13}C -DARR-Spektren von isoliertem *HpdnaB* (graue Konturen) und vom *HpdnaB*: MgCl_2 :AMP-PNP-Komplex (cyanfarbige Konturen). Verschiebende Peaks im *HpdnaB*: MgCl_2 :AMP-PNP-Spektrum sind durch rote und orangefarbene Pfeile für zugeordnete bzw. nicht zugeordnete Resonanzen markiert. Vergrößerungen in die durch einen schwarzen Rahmen hervorgehobenen Regionen sind in (b) für die Alanin-Region und in Abbildung S2 für die Threonin-Region dargestellt. c) Vergleich von 20 ms ^{13}C - ^{13}C -2D-DARR-Spektren von *HpdnaB* (graue Konturen) und *HpdnaB*: MgCl_2 :AMP-PNP:ssDNA (grüne Konturen). Rote und cyanfarbige Pfeile markieren verschiedene Resonanzen durch AMP-PNP und durch ssDNA-Bindung, violette Pfeile heben neu erscheinende Resonanzen im Spektrum von *HpdnaB*: MgCl_2 :AMP-PNP:ssDNA hervor. d) Vergleich von 20 ms ^{13}C - ^{13}C -2D-DARR-Spektren von isoliertem *HpdnaB* (graue Konturen) und *HpdnaB*: MgCl_2 :ssDNA (rote Konturen). Es sind keine detektierbaren spektralen Veränderungen sichtbar, was auf ein nur sehr schwaches Binden von ssDNA an die Helikase in Abwesenheit von AMP-PNP hindeutet.

dieser Größenordnung implizieren lokale, strukturelle Anpassungen des Proteins, wobei größere strukturelle Reorientierungen (z.B. β -Faltblatt nach α -Helix-Umordnungen) ausgeschlossen werden können. Die Residuen-spezifische Analyse der ^{13}C -CSPs wurde mithilfe von 3D-Spektren durchgeführt (Abbildung S5). Abbildung 3a fasst die zugeordneten CSPs zusammen, welche in Tabelle S2 aufgelistet sind. Die CSPs für die meisten Residuen der NTD sind unterhalb des Schwellenwertes von 0.15 ppm, den wir als nicht signifikant betrachten (und auf experimentelle Unsicherheiten zurückführen). Dies impliziert die strukturelle Beibehaltung dieser Domäne bei AMP-PNP-Bindung. Im Gegensatz dazu weist die CTD signifikante CSPs auf (welche wir allerdings nur für die zugeordneten Resonanzen quantifizieren können), wobei sich viele um die Residuen 432 bis 455 häufen (Residuen 437, 438, 441, 443, 448, 449, 450, 454 und 455 besitzen CSPs > 0.3 ppm), was auf AMP-PNP-Helikase-Wechselwirkungen, sowie allosterische Konformationsänderungen in der Helikase hinweist.

Die Verwendung eines 18-fachen Überschusses von AMP-PNP garantiert eine Besetzung sämtlicher zwölf Nukleotidbindungsstellen eines Dodekamers, was durch die vollständige Verschiebung der Resonanzen zu ihrer neuen chemischen Verschiebungsposition zum Ausdruck gebracht wird (Abbildungen S6 und S7). Eine Ausnahme findet sich für die Residuen 449A und 450T, für welche ein Doppeln der Resonanzen (ungefähr 1:1, siehe auch Abbildungen S7 und S8) beobachtet wurde, wobei jeweils eine Komponente an der ursprünglichen Position verbleibt. Aufgrund der C3-Symmetrie würde man eigentlich ein Doppeln aller Resonanzen in einem Hexamer erwarten, allerdings scheinen für die anderen Residuen diese strukturellen Unterschiede so klein zu sein, dass sie nicht detektiert werden können, was in enger Übereinstimmung mit unseren vorhergehenden Ergebnissen für *HpdnaB* steht.^[23]

Um das Binden von DNA zu untersuchen, wurde der *HpdnaB*: MgCl_2 :AMP-PNP-Komplex mit ssDNA umgesetzt. Biochemische Studien haben gezeigt, dass das polyT 20Mer in

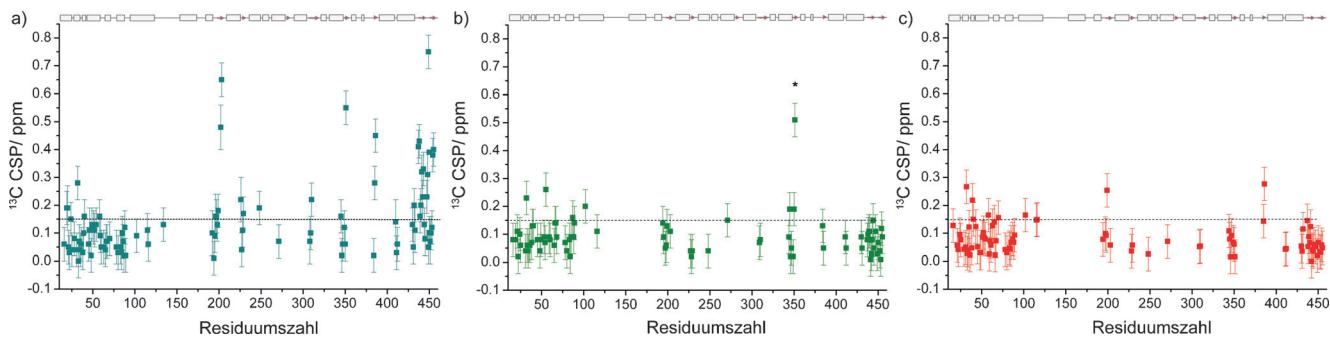


Abbildung 3. Residuen-spezifische ^{13}C CSPs (berechnet gemäß $\text{CSP} = \sqrt{\frac{1}{2}(\Delta\delta(^{13}\text{C}^a)^2 + \Delta\delta(^{13}\text{C}^b)^2)}$, außer für Glycine, für welche die Formel $\text{CSP} = \sqrt{\Delta\delta(^{13}\text{C}^a)^2}$ verwendet wurde) bestimmt mithilfe von 3D-Experimenten für a) $\text{HpDnaB:MgCl}_2\text{:AMP-PNP}$, b) $\text{HpDnaB:MgCl}_2\text{:AMP-PNP:ssDNA}$ und c) $\text{HpDnaB:MgCl}_2\text{:ssDNA}$. Die Fehlerbalken beruhen auf Unterschieden in sieben experimentellen Spektren und werden zu 0.06 ppm für $\text{C}\alpha$ und $\text{C}\beta$ abgeschätzt. Sekundärstrukturelemente, die den pdb-Dateien 3GXV (NTD)^[24] und 4A1F (CTD)^[6] entnommen wurden, sind oben gezeigt. *: Residuum besitzt mehr als eine Resonanz und die Resonanz mit dem größten CSP-Wert ist angegeben.

Gegenwart von AMP-PNP mit 3 nm Affinität an die Helikase bindet.^[7] Die ^{31}P -Spektren einer HpDnaB -Probe, in welcher ssDNA gebunden ist, sind in Abbildung 1e,f dargestellt. Aus technischer Sicht wurden diese Experimente wie zuvor für AMP-PNP beschrieben durchgeführt. Das Spektrum der mobilen, flüssigen Phase des Sedimentes (Abbildung 1e) weist Resonanzen des Phosphatpuffers, von ungebundenem (dT)₂₀ sowie von AMP-PN, der hydrolysierten Spezies von AMP-PNP, auf. Das Spektrum in Abbildung 1e wurde direkt nach der Sedimentation aufgenommen und zeigt, dass sämtliches AMP-PNP innerhalb weniger Stunden nach ssDNA-Zugabe zu der Helikase zu AMP-PN hydrolysiert wurde (in Lösung ohne Protein ist AMP-PNP noch nach einer Woche nachweisbar, siehe Abbildung S9). Die Bindung von ssDNA an das Protein kann aus dem ^{31}P -CP-Spektrum in Abbildung 1f geschlussfolgert werden. Die Resonanzen zwischen 0 und 1 ppm repräsentieren gebundenes (dT)₂₀. Die geringfügige Verteilung der Resonanzen könnte erneut auf kleine konformationelle Heterogenitäten der gebundenen ssDNA hinweisen, was nicht weiter verwunderlich ist, da sich die Enden von (dT)₂₀ aus chemischer Sicht von den mittleren Nukleotiden unterscheiden. Besonders hervorzuheben ist, dass das Spektrum nicht länger einen Hinweis auf gebundenes AMP-PNP an die Helikase liefert, was andeutet, dass AMP-PNP vollständig nach Zugabe von ssDNA in seiner hydrolysierten Form freigesetzt wurde. Das ^{31}P -Spektrum von HpDnaB nach Zugabe von ssDNA, jedoch in der Abwesenheit von AMP-PNP (Abbildung S10), weist nur sehr schwache Resonanzen von gebundener ssDNA auf, was die Bedeutung von AMP-PNP für effiziente Bindung von ssDNA hervorhebt.

Die ^{13}C 20 ms DARR-Spektren^[25] des $\text{HpDnaB:MgCl}_2\text{:AMP-PNP:ssDNA}$ -Komplexes sowie des isolierten Proteins sind in Abbildung S11 dargestellt, ein charakteristischer Ausschnitt der Alanin-Region ist in Abbildung 2c (grüne Konturen) gezeigt. Die meisten bei Zugabe von AMP-PNP beobachteten CSPs sind nach Zugabe von ssDNA nicht mehr zu beobachten (wie durch rote und cyanfarbige Pfeile angekennzeichnet), obwohl kleine, spektrale Unterschiede zum Spektrum des isolierten HpDnaB bestehen bleiben. Für die gezeigte spektrale Region ist eine Verschiebung von 310 Å und

351 Å festzustellen und neue, schwache Alaninresonanzen werden detektiert (alle Änderungen sind durch violette Pfeile in Abbildung 2c markiert). 3D-NCACB-Spektren ermöglichen eine Residuum-spezifische Bestimmung von CSPs in Bezug auf das isolierte Protein und zeigen, dass eine Vielzahl von bei Bindung von AMP-PNP beobachteten CSPs (vgl. Abbildung 3a) rückgängig gemacht werden, sobald ssDNA hinzugegeben wird (siehe Abbildung 3b), wohingegen einige neue Änderungen sichtbar werden. Abbildung 2d zeigt ein Kontrollexperiment, in welchem HpDnaB mit MgCl_2 und (dT)₂₀ in der Abwesenheit von AMP-PNP umgesetzt wurde, und welches belegt, dass AMP-PNP zur effizienten Bindung von ssDNA benötigt wird (für die CSPs siehe Abbildung 3c).

Abbildung 4 fasst die Ergebnisse unserer Untersuchungen zusammen. Um die CSPs aus struktureller Sicht zu interpretieren, wurde ein Homologiemodell basierend auf der einzigen verfügbaren Kristallstruktur einer bakteriellen DnaB-Helikase mit einem ATP-Analogon (die Helikase von *Aquifex aeolicus* gebunden an ADP- Mg^{2+})^[15] erstellt und die hier gemessenen ^{13}C -CSP auf diesem Modell eingezeichnet. Nicht zugeordnete Residuen sind in weiß und grau für die zwei Monomere dargestellt. Die größten CSPs (> 0.3 ppm) lassen sich für Residuen an der Grenzfläche zweier benachbarter HpDnaB -Monomere finden (siehe Abbildung 4a), sowohl innerhalb (z. B. 202G, 203A, 351A, 449A), als auch entfernt von der Nukleotidbindungsstelle (z. B. 386L, 437E, 438A, 441I, 455T). Nahezu sämtliche identifizierten CSPs größer als 0.3 ppm (vgl. Tabelle S4) befinden sich in den fünf miteinander verbundenen Strängen des achtsträngigen Halbbetafasses oberhalb dessen sich die Bindungsstelle befindet. Diese Stränge verlaufen zwischen den beiden Nukleotidbindungsstellen (Abbildung 4b) und könnten durch Einlagerung von Nukleotiden leicht verdrillt werden und somit möglicherweise als Ausgangspunkt für die größeren strukturellen Änderungen, wie Ringöffnung/Ringschluss durch Bindung von Nukleotiden, fungieren.^[8]

Es bleibt festzuhalten, dass die Kristallstruktur eines $\text{BstDnaB:GDP:AlF}_4^-$ -ssDNA-Komplexes publiziert wurde,^[8] in welcher nur 5 von 6 Nukleotidbindungsstellen der Helikase (die unter diesen Bedingungen eine nicht-planare, spiralförmige Treppenkonformation einnimmt) durch GDP-Moleküle

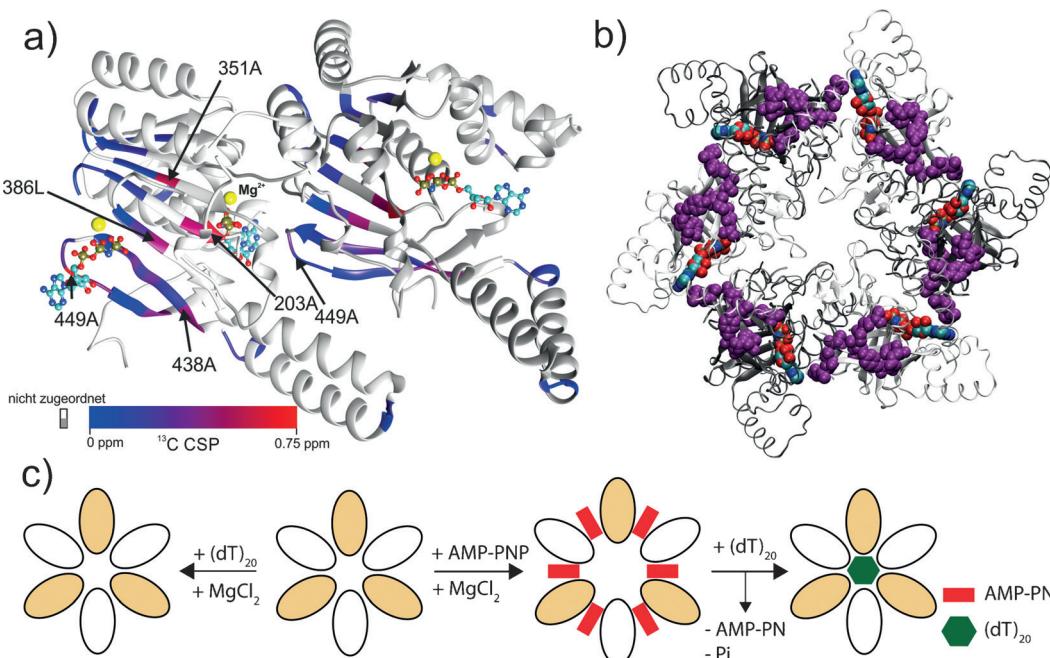


Abbildung 4. a) ^{13}C -CSPs eingezeichnet auf einem Homologiemodell basierend auf der $\text{AaDnaB}:\text{Mg}^{2+}:\text{ADP}$ -Kristallstruktur (pdb 4NMN). Residuen 195–488 der CTD von HpDnaB sind für zwei Monomere gezeigt, in welchen nicht zugeordnete Residuen in weiß bzw. grau dargestellt sind. ADP wurde durch AMP-PNP ersetzt und ist als CPK-Modell dargestellt, die Mg^{2+} Ionen als gelbe Kugeln. Für 449A und 450T sind die CSPs für die verschiebenden Resonanzen von 449A und 450T übereinstimmt. b) ^{13}C -CSPs > 0.3 ppm (Residuen sind als violette van-der-Waals-Kugeln dargestellt). AMP-PNP ist als VDW-Kugeln gezeigt. c) Schematische Darstellung der AMP-PNP- und DNA-Bindung an HpDnaB . Die HpDnaB -Helikase ist als Hexamer gezeigt, da unsere Experimente es nicht ermöglichen, zwischen Hexameren und Dodekameren zu unterscheiden. Die Zugabe eines Überschusses von AMP-PNP und MgCl_2 führt zu einer vollständigen Besetzung der Bindungsstellen, wohingegen AMP-PNP hydrolysiert und als AMP-PN freigesetzt wird, sobald ssDNA an die Helikase bindet. In der Abwesenheit von AMP-PNP bindet ssDNA nur sehr schwach an die Helikase.

in Gegenwart von ssDNA besetzt werden. Der zugängliche Konformationsraum des ssDNA:Helikase-Komplexes scheint recht groß zu sein und inwiefern die beobachteten Unterschiede inhärent mit dem Protein sind oder durch unterschiedliche ATP-Analoga induziert werden, muss in weitergehenden Studien beleuchtet werden.

Das Schema in Abbildung 4c fasst unsere Ergebnisse zusammen: AMP-PNP bindet mit hohen Affinitäten an der Grenzfläche zweier HpDnaB -Monomere. Sämtliche AMP-PNP-Bindungsstellen werden unter Verwendung eines 18-fachen molaren Überschusses des Nukleotids im Komplex besetzt. Zwei unterschiedliche Bindungskonformationen (durch unterschiedliche Färbungen der Ellipsen, welche Monomere repräsentieren, angedeutet) können unterschieden werden, die sich durch einen kleinen, allerdings detektierbaren konformationellen Freiraum von AMP-PNP in gebundener Form an die Helikase auszeichnen. Der gebildete Komplex ist in der Lage, ssDNA zu binden, und wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass AMP-PN bei Bindung von ssDNA freigesetzt wird. ssDNA wird in dem mittleren Hohlraum der Helikase gebunden.^[8] Im Gegensatz dazu wechselwirkt isoliertes HpDnaB in Abwesenheit von AMP-PNP nur schwach mit ssDNA. Unsere Daten zeigen, dass durch die Anwesenheit von AMP-PNP eine Konformationsänderung induziert wird, die Voraussetzung sein könnte, um DNA an die HpDnaB -Helikase zu binden. AMP-PNP wird

bei Bindung von ssDNA entgegen seinem Ruf als nicht-hydrolysierbares ATP-Analogon hydrolysiert und freigesetzt.

In technischer Hinsicht macht unsere Studie deutlich, dass die Festkörper-NMR-Spektroskopie geeignet ist, strukturelle Änderungen zu detektieren und nachzuverfolgen, die durch chemische Reaktionen in einem komplexen, oligomeren Motorprotein des Replisoms ausgelöst werden, wenn es mit dessen „Treibstoff“ AMP-PNP und in einem zweiten Schritt der aktivierte $\text{HpDnaB}:\text{AMP-PNP}$ -Komplex mit ssDNA umgesetzt wird. Vergleichbare Experimente könnten eine breite Anwendung in der Charakterisierung von Protein-Nukleotid-, Protein-DNA- sowie Protein-RNA-Wechselwirkungen finden.

Danksagung

Wir danken Daniel Zindl für die Aufnahme eines Teils der Flüssig-NMR-Spektren. Diese Arbeit wurde durch die Swiss National Science Foundation (Grant 200020_159707 und 200020_146757), die French ANR (ANR-12-BS08-0013-01, ANR-14-CE09-0024B) und ETH Career SEED-69 16-1 unterstützt.

Stichwörter: Festkörper-NMR-Spektroskopie · Helikasen · Magic-Angle-Spinning · Motor-Proteine

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14164–14168
Angew. Chem. **2016**, *128*, 14370–14375

- [1] J. E. Corn, J. M. Berger, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 4082–4088.
- [2] N. Y. Yao, M. O'Donnell, *Cell* **2010**, *141*, 1088–1088.e1081.
- [3] J. H. LeBowitz, R. McMacken, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 4738–4748.
- [4] S. Bailey, W. K. Eliason, T. A. Steitz, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4728–4736.
- [5] S. Bailey, W. K. Eliason, T. A. Steitz, *Science* **2007**, *318*, 459–463.
- [6] M. Stelter, I. Gutsche, U. Kapp, A. Bazin, G. Bajic, G. Goret, M. Jamin, J. Timmins, L. Terradot, *Structure* **2012**, *20*, 554.
- [7] A. Bazin, M. V. Cherrier, I. Gutsche, J. Timmins, L. Terradot, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 8564–8576.
- [8] O. Itsathitphaisarn, R. A. Wing, W. K. Eliason, J. Wang, T. A. Steitz, *Cell* **2012**, *151*, 267–277.
- [9] J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 369–413.
- [10] J. C. Wang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 430–440.
- [11] J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, R. Lutter, J. E. Walker, *Nature* **1994**, *370*, 621–628.
- [12] J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick, N. J. Gay, *EMBO J.* **1982**, *1*, 945–951.
- [13] E. J. Enemark, L. Joshua-Tor, *Nature* **2006**, *442*, 270–275.
- [14] R. K. Soni, P. Mehra, N. R. Choudhury, G. Mukhopadhyay, S. K. Dhar, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6828–6840.
- [15] M. S. Strycharska, E. Arias-Palomo, A. Y. Lyubimov, J. P. Erzberger, V. O'Shea, C. J. Bustamante, J. M. Berger, *Mol. Cell* **2013**, *52*, 844–854.
- [16] N. D. Thomsen, J. M. Berger, *Cell* **2009**, *139*, 523–534.
- [17] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, B. Reif, P. Turano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10396–10399.
- [18] C. Gardiennet, A. K. Schütz, A. Hunkeler, B. Kunert, L. Terradot, A. Böckmann, B. H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7855–7858; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7977–7980.
- [19] C. Gardiennet, T. Wiegand, A. Bazin, R. Cadalbert, B. Kunert, D. Lacabanne, I. Gutsche, L. Terradot, B. H. Meier, A. Böckmann, *J. Biomol. NMR* **2016**, DOI: 10.1007/s10858-016-0018-0010.
- [20] S. R. Hartmann, E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042–2053.
- [21] S. Tran-Dinh, M. Roux, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *76*, 245–249.
- [22] T. Wiegand, C. Gardiennet, F. Ravotti, A. Bazin, B. Kunert, D. Lacabanne, R. Cadalbert, P. Guntert, L. Terradot, A. Böckmann, B. Meier, *Biomol. Eng. Biomol. NMR Assign* **2016**, *10*, 13–23.
- [23] T. Wiegand, C. Gardiennet, R. Cadalbert, D. Lacabanne, B. Kunert, L. Terradot, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Biomol. NMR* **2016**, DOI: 10.1007/s10858-10016-10039-10858.
- [24] T. Kashav, R. Nitharwal, S. A. Abdulrehman, A. Gabdulkhakov, W. Saenger, S. K. Dhar, S. Gourinath, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7515.
- [25] K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *344*, 631–637.

Eingegangen am 28. Juli 2016,
veränderte Fassung am 23. August 2016
Online veröffentlicht am 6. Oktober 2016