

Summary

Helicases are ubiquitous motor proteins essential in key biological processes which require single-stranded DNA (ssDNA) such as DNA replication, transcription, repair and recombination. In this thesis, various methods have been used to study the properties of the enzyme RepA and its function and mechanism.

RepA is the first intact hexameric replicative DNA helicase (from plasmid RSF1010) whose three-dimensional structure is known in detail. The six ATP binding sites of RepA are each located at the interfaces between two adjacent monomers and belong to Walker A and B-motifs, corresponding to motifs H1 and H2 of the DnaB-like helicase family. They are defined by the consensus sequence for the P loop ⁴⁰GAGKS⁴⁴ and residues Asp140, Glu77, His179 (belonging to the same monomer) and Arg207 (from the adjacent monomer).

Nucleotide binding to RepA shows a strong negative cooperativity. Although there are six potential ATP binding sites in the RepA hexamer, fluorescence measurements show that only three sites can be occupied by the ATP analogue TNP-ATP. RepA is more stable in the presence of ATP γ S than in the presence of ADP ($\Delta\Delta G = 0,29$ kcal/mol), indicating that the additional phosphate group in ATP γ S has a significant influence on RepA structure.

Circular dichroism, X-ray and electron microscopic studies show that nucleotide binding to RepA induces conformational changes. Fluorescence depolarization measurements further show dynamic segment movements around the ATP active site upon ATP binding, hydrolysis and ssDNA binding.

ssDNA stimulates RepA ATPase activity optimally at acidic pH 5.3-6.0. The sigmoidal kinetic curves both in the absence and presence of ssDNA show strong positive cooperativity for ATP hydrolysis, with oligonucleotides longer than 10mer optimal for ssDNA stimulated ATPase activity.

Mutation of Lys43 (Walker A motif) to alanine abolishes ATP binding and hydrolysis activity, indicating that this lysine is essential in the Walker A motif in DnaB-like helicase family.

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and analytic ultracentrifugation were used to characterize the interaction of fluorescence labeled ssDNA with RepA. Equilibrium binding of ssDNA to RepA was only optimal in the presence ATP γ S at pH 5.8. In the absence of ATP γ S or at pH 7.6, complex formation between ssDNA and RepA was rather weak. Binding curves are compatible with one binding site for ssDNA present on RepA, with no indication of cooperativity.

Protein-DNA photo-crosslinking studies further show that only one subunit from the hexamer helicase is involved in the interaction with ssDNA at the same time and preclude the possibility of extensive wrapping of the ssDNA around the hexamer and formation of the complex in which all six protomers are simultaneously bound to ssDNA.

RepA served as a model helicase to search for inhibitory compounds. The commercially available flavone derivatives luteolin, morin, myricetin and dimyricetin (an oxidation product of myricetin) inhibit the ATPase and dsDNA unwinding activities of RepA. Dimyricetin was the most effective inhibitor for both activities. Single-stranded DNA-dependent RepA ATPase activity is inhibited noncompetitively by all four compounds. Myricetin also inhibited the growth of a Gram-positive and a Gram-negative bacterial species and these flavones may provide lead structures for the design of molecules helpful for unraveling the mechanism of helicase action and for the design of novel pharmacologically useful molecules.

A model is proposed in which RepA helicase sequentially hydrolyses ATP, translocates on ssDNA and unwinds DNA.

Zusammenfassung

Helikasen sind ubiquitäre Motorproteine. Sie sind unentbehrlich für essentielle biologische Prozesse mit Beteiligung einzelsträngiger DNA (ssDNA) wie DNA-Replikation, -Reparatur und -Rekombination. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Funktion und Reaktionsmechanismen der Helikase RepA mit Hilfe unterschiedlicher Methoden untersucht.

Die dreidimensionale Struktur von RepA (aus Plasmid RSF1010) ist bis ins Detail bekannt. RepA war die erste intakte hexamere replikative Helikase, deren Struktur gelöst wurde. RepA besitzt sechs ATP-Bindungsstellen, die auf den Grenzflächen zwischen zwei benachbarten Monomeruntereinheiten liegen. Die ATP-Bindungsstellen gehören zu den Walker A- und B-Motiven und enthalten die H1- und H2- Motive der DnaB-like Familie. Die Motive sind durch die Konsensussequenz für den P-Loop ⁴⁰GAGKS⁴⁴ und die Reste Asp140, Glu77, His179, die alle demselben Monomer angehören, und den Rest Arg207, der auf dem benachbarten Monomer liegt, definiert.

Nukleosidtriphosphate-Bindung durch RepA zeigt eine streng negative Kooperativität. Obwohl es sechs potentielle ATP-Bindungsstellen im RepA-Hexamer vorhanden sind, zeigen Fluoreszenzmessungen, dass lediglich drei von ihnen durch ATP-Analoga besetzt werden. RepA ist in Anwesenheit von ATP γ S stabiler als in Anwesenheit von ADP ($\Delta G = 0,29$ kcal/mol), die zusätzliche Phosphatgruppe in ATP γ S hat einen signifikanten Einfluß auf die RepA-Stabilität.

ZirkularDichroismus, Röntgen- und Elektronmikroskopie zeigen, dass die ATP-Bindung eine Konformationsänderung in RepA bewirkt. Ferner zeigen Messungen der Fluoreszenzdepolarisation Bewegungen eines Segments um die ATP-Bindungsstelle herum während der ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und ssDNA-Bindung.

ssDNA stimuliert die ATPase-Aktivität von RepA unter sauren Bedingungen bei pH 5.3-6.0. Der sigmoidale Verlauf der Bindungskurven in An- und Abwesenheit von ssDNA deuten auf streng positive Kooperativität der ATP-Hydrolyse, wobei die zehn Basen langen Oligonukleotide optimale Stimulatoren der ATPase-Aktivität sind.

Lys43 (Walker A-Motiv) ist ein essentieller Rest bei Enzymen der DnaB-like Helikase-Familie. Der Austausch von Lys43 (Walker A-Motiv) gegen Alanin verhindert die ATP-Bindung und hydrolytische Aktivität.

Die Interaktion von RepA-Hexamer mit fluoreszenzmarkierter ssDNA wurde mit Hilfe von Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) und analytischer Ultrazentrifugation untersucht.

Eine optimale Bindung von ssDNA durch RepA konnte nur in Anwesenheit von ATP γ S und bei pH 5.8 erreicht werden. Ohne ATP γ S oder bei pH 7.6 war die Komplexbildung schwach. Die Bindungskurven zeigten keine Kooperativität und deuteten auf nur eine ssDNA-Bindungsstelle auf RepA.

Protein-DNA Photo-Crosslinking Untersuchungen zeigten ferner, dass nur eine Untereinheit der Helikase zur selben Zeit an der Interaktion mit DNA beteiligt ist. Dies schließt die Möglichkeit extensiver Windung der ssDNA um das Hexamer herum aus. Ein Komplex mit simultaner Bindung der DNA durch alle sechs Untereinheiten konnte nicht beobachtet werden.

RepA diente als Modellhelikase bei der Suche nach Inhibitoren. Kommerziell erhältliche Flavon-Derivate wie Luteolin, Morin, Myricetin und Dimyricetin (ein Oxidationsprodukt von Myricetin) inhibieren die ATPase- und Entwindungsaktivität von RepA. Dimyricetin inhibiert beide Aktivitäten am effektivsten. Alle vier Substanzen inhibieren nicht-kompetitiv die ssDNA-abhängige ATPase-Aktivität vom RepA. Myricetin inhibiert bekanntlich auch das Wachstum grampositiver und gramnegativer Bakterien. Diese Flavone könnten daher als Basisstrukturen für die Entwicklung neuer pharmazeutischer Stoffe dienen.

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Modell der ATP-Hydrolyse, Translokation entlang der ssDNA und Entwindung des DNA Doppelstrangs vorgeschlagen.