



Strukturelle Untersuchungen zur Substratspezifität von Ribonuclease T1

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Rico Czaja
aus Leipzig

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von April 2001 bis Juli 2005 am Institut für Biochemie der Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, sowie in der Abteilung Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn durchgeführt.

Gutachter:

Herr Prof. Dr. Ulrich Hahn

Herr Prof. Dr. Dr. Christian Betzel

Bibliographische Beschreibung

Czaja, Rico

Strukturelle Untersuchungen zur Substratspezifität von Ribonuclease T1

Universität Hamburg, Dissertation

52 Seiten, 52 Zitate, 7 Abbildungen, 1 Tabelle, 3 Publikationen

Zusammenfassung

Ribonuclease T1, produziert von dem Schimmelpilz *Aspergillus oryzae*, ist ein sehr gut untersuchtes Enzym und wird daher schon lange als Modell verwendet, um ein größeres Verständnis für die Funktion von Proteinen bzw. Enzymen zu erhalten. Das Enzym spaltet einzelsträngige Ribonucleinsäuren mit sehr hoher Spezifität nach Guanosinresten. Aufgrund zahlreicher bekannter Kristallstrukturen im Komplex mit Substrat- und Produktanaloga ist der Mechanismus dieser hohen Spezifität sehr gut verstanden, wobei die Glutaminsäure in Position 46 eine Schlüsselrolle in der Substraterkennung einnimmt. Trotz dieser umfangreichen Kenntnisse war es bisher weder auf rationalem noch auf randomisiertem Wege möglich die Substratspezifität dieses Enzyms zu verändern. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Darstellung und Charakterisierung von RNase T1 Varianten, die eine signifikant veränderte Substratspezifität im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Mit den beiden purinspezifischen RNase T1 Varianten RV und R2 ist es erstmalig gelungen, auch enzymkinetische Parameter für die Hydrolyse des Minimalsubstrates Adenylyl-3',5'-cytidin für RNase T1 Varianten zu bestimmen. Das Verhältnis der Spezifitätskoeffizienten ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$) für die Hydrolyse der beiden Minimalsubstrate Adenylyl- und Guanylyl-3',5'-cytidin konnte um mehr als das 7000-fache erhöht werden. Das ist für die Variante R2 – die aktivere der beiden – auf eine ≈ 320 -fache Erhöhung der ApC-Hydrolyseaktivität und gleichzeitig ≈ 22 -fache Verringerung der GpC-Hydrolyseaktivität zurückzuführen. Beide Varianten konnten auch kristallisiert und die Kristallstruktur bis zu einer Auflösung von 1,7 Å (RV – 1Q9E.pdb) und 2,1 Å (R2 – 1TTO.pdb) gelöst werden. Mit Hilfe dieser beiden Kristallstrukturen konnte ein Modell vorgeschlagen werden, wie eine mögliche spezifische Interaktion zwischen dem Protein und der Nucleobase Adenin aussieht.

Ein weiterer Ansatz zur Änderung der Substratspezifität war die Randomisierung der Aminosäureposition 100. In der bekannten fast inaktiven Variante Glu46Gln, für die theoretisch eine Adenosinspezifität vorhergesagt worden war, ist in der Kristallstruktur das Glutamin 46, durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur Position 100 in seiner Konformation fixiert und daher nicht an der Substraterkennung beteiligt. Die Randomisierung der Aminosäureposition 100 sollte zur Schwächung oder Aufhebung dieser Wasserstoffbrückenbindungen führen. Eine Änderung der Spezifität, wenn auch bei sehr niedrigen Enzymaktivitäten, konnte sowohl für die Variante Glu46Gln/Phe100Val, als auch für die Einzelvariante Glu46Gln gezeigt werden, wobei eine Spaltung nach Adenosinresten für diese Einzelvariante bisher noch nicht nachgewiesen worden war.

Summary

Ribonuclease T1, which is produced by the mold *Aspergillus oryzae*, is a very good characterized enzyme and has been used as a model to get better insights into the functions of proteins and enzymes. Ribonuclease T1 hydrolyzes single stranded ribonucleic acids after guanosine residues with very high specificity. On the basis of a number of known crystal structures in complex with substrate or product analogs the mechanism of this high specificity is very well understood. The glutamic acid in position 46 plays thereby a key role in substrate recognition. Despite this knowledge it was not possible so far to alter the substrate specificity of this enzyme neither with rational nor with random approaches. The present work describes the construction and characterization of variants of RNase T1 with significant changed substrate specificity compared to the wildtype enzyme. So it was possible for the first time to measure kinetic parameters of the purine-specific RNase T1 variants RV and R2 for the hydrolysis of the minimal substrate adenylyl-3',5'-cytidine. The ratio of the specificity coefficients ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) for the hydrolysis of both minimal substrates adenylyl- and guanylyl-3',5'-cytidine was increased more than 7000-fold. This increase is – considering RNase T1 R2, which is the more active one of both variants – due to the ≈ 320 -fold increase of the ApC hydrolysis activity together with the ≈ 22 -fold decrease of GpC hydrolysis activity. Both variants were also crystallized and the crystal structure has been refined at 1,7 Å (RV – 1Q9E.pdb) and 2,1 Å (R2 - 1TTO.pdb) respectively. On the basis of these crystal structures a model of a possible specific interaction between the protein and the nucleobase adenine was proposed.

Another approach for changing the substrate specificity was the randomization of the amino acid in position 100. In the known almost inactive variant Glu46Gln, which was proposed to be adenosine-specific using molecular dynamics calculations, in the crystal structure the glutamine is fixed in its conformation due to two hydrogen bonds with the amino acid in position 100. This amino acid is therefore not involved in substrate recognition. It was proposed that randomization of the amino acid in position 100 lead to a weakening or break of these hydrogen bonds. An alteration in substrate specificity could be shown for variant Glu46Gln/Phe100Val as well as for the single variant Glu46Gln, even though the enzymatic activity was very low. However it should be considered that a cleavage after adenosine residues has not been shown for this variant so far.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ribonuclease T1 als Modellsystem	2
1.1.1	Reaktionsmechanismus und katalytisches Zentrum	4
1.1.2	Primäre Bindungstasche	5
1.1.3	Änderung der Substratspezifität	6
1.2	Röntgenkristallstrukturanalyse	11
1.3	Problemstellung	15
2	Veröffentlichungen	16
	Biochemistry 2004	16
	ChemBioChem 2004	26
	Biochem Biophys Res Commun 2005	33
3	Diskussion und Ausblick	42
	Literatur	48
A	Anhang	53

1 Einleitung

Bei allen biologischen Funktionen spielen Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen, wie zum Beispiel Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Wechselwirkungen eine zentrale Rolle. Um diese Wechselwirkungen auch auf molekularer Ebene verstehen zu können, ist die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der interagierenden Moleküle von entscheidender Bedeutung. Die spezifische Funktion von Biomakromolekülen, wie von Proteinen oder auch Nucleinsäuren ist unabdingbar mit deren dreidimensionalen Struktur verknüpft. Eine Grundvoraussetzung, um einerseits die Funktion besser zu verstehen und andererseits um durch gezielte Eingriffe in die Struktur spezifisch die Funktion eines Biomoleküls verändern zu können, ist daher die Kenntnis der dreidimensionalen molekularen Struktur der Biomoleküle. Diese dreidimensionale Struktur, die sogenannte Tertiärstruktur wird von der Primärstruktur, das heißt von der Sequenz der monomeren Bausteine, wie Aminosäuren oder Nucleotiden, determiniert. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte in der Bioinformatik hinsichtlich simulierter Proteinfaltung gemacht worden sind, ist es zur Zeit noch nicht möglich, allein aus der Primärstruktur eines Proteins oder einer Nucleinsäure deren dreidimensionale Struktur *in silico* zu ermitteln. Zur Zeit gibt es sowohl für Protein-, als auch für Nucleinsäurestrukturen Ansätze, ausgehend von bekannten Kristallstrukturen Datenbanken mit Strukturmotiven aufzubauen, mit deren Hilfe auch komplexere Strukturen allein aus der Sequenz vorhergesagt werden könnten (Hays et al., 2005; Zhang & Skolnick, 2005).

Die Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen ist eng mit Ribonucleasen (RNasen) verknüpft. Ribonucleasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die Phosphodiester-Bindungen in RNA spalten. Die immer detailliertere Aufklärung des komplexen RNA-Metabolismus in den letzten Jahren führte zur Entdeckung vieler RNA-Typen, unterschiedlicher Reaktionen und natürlich auch einer Vielzahl von Enzymen, die diese Reaktionen katalysieren. Ribonucleasen spielen eine Schlüsselrolle bei vielen zellulären Funktionen, wie zum Beispiel bei der Transkription, der RNA-Prozessierung, dem Splicing, dem RNA-Editing oder der Translationskontrolle.

Die meisten der klassischen einzelstrangspezifischen RNasen können in drei Familien eingeteilt werden – RNase A-, RNase T1- und RNase T2-Familie (Raines, 1998; Yoshida, 2001; Deshpande & Shankar, 2002). Diese Enzyme katalysieren die Spaltung von RNA zu Mono- oder Oligonucleotiden mit einem 3'-Phosphat über ein 2',3'-cyclisches Phosphat als Intermediat. Ribonucleasen der RNase A-Familie sind pyrimidinspezifische Enzyme, die in Vertebraten gefunden werden, während Enzyme der T1-Familie mikrobieller Herkunft und hauptsächlich guanosinspezifisch sind. Die RNase T2-Familie bildet eine relativ heterogene Gruppe mit sowohl mikrobiellen Vertretern, als auch Vertretern in höheren Organismen, wie Pflanzen oder Tieren. Die RNasen der T2-Familie sind meist unspezifisch. Hauptvertreter dieser Familien, wie zum Beispiel die Namensgeber RNase A und RNase T1, aber auch Barnase, gehören zu den am besten untersuchten Enzymen hinsichtlich Struktur, Faltung und enzymatischer Aktivität. Die Bedeutung von RNasen wird auch schon daran deutlich, dass vier Forscher Nobelpreise aufgrund von Arbeiten mit diesen Enzymen erhalten haben (Anfinsen, 1973; Moore & Stein, 1973; Merrifield, 1986).

1.1 Ribonuclease T1 als Modellsystem

Ribonuclease T1 (RNase T1; EC 3.1.27.3) (Sato & Egami, 1957; Takahashi et al., 1970) ist der bekannteste Vertreter einer Gruppe mikrobieller, extrazellulärer RNasen, die aufgrund von Strukturhomologien zur Ribonuclease T1-Familie zusammengefaßt werden (Hartley, 1980; Hill et al., 1983; Yoshida, 2001). Zu dieser Gruppe gehören etwa 25 verschiedene Enzyme mit sowohl eukaryotischem, als auch prokaryotischem Ursprung. RNase T1 ist ein relativ kleines Eindomänenprotein, bestehend aus 104 Aminosäuren, woraus sich ein relatives Molekulargewicht von etwa 11089 Da ergibt. Das Enzym wird von dem Schimmelpilz *Aspergillus oryzae* gebildet und konnte erstmalig aus Takadiastase isoliert werden (Sato & Egami, 1957). Takadiastase ist ein Enzymextrakt, der aus dem Kulturüberstand des Pilzes gewonnen werden kann.

Das Enzym tritt in zwei verschiedenen Isoformen auf, die sich allerdings in ihrer Aktivität nicht voneinander unterscheiden lassen. Die eine Form trägt an Position 25 einen Glutaminsäure-Rest, während bei der zweiten Isoform diese Aminosäure durch ein Lysin ersetzt ist (Heinemann & Hahn, 1982). Kalorimetrische Studien mit beiden Isoformen haben ergeben, dass die Lys-Form um etwa 3,8 kJ/mol stabiler ist (Shirley et al., 1989).

Wenn in dieser Arbeit von RNase T1 die Rede ist, dann wird immer von der Lysin-Isoform gesprochen. Aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung ist das Enzym ein sehr saures Protein, mit einem isoelektrischen Punkt der bei etwa 3,8 liegt. Wie die meisten Ribonucleasen, so ist auch RNase T1 ein sehr stabiles Enzym. Es behält seine Aktivität über einen sehr weiten pH - und Temperaturbereich. Es ist stabil gegenüber proteolytischem Abbau und auch denaturierenden Reagenzien, wie zum Beispiel Harnstoff. Diese Tatsache macht man sich auch bei der enzymatischen RNA-Sequenzierung zunutze, bei der die Ribonucleinsäuren mit Harnstoff und durch hohe Temperaturen während der Sequenzierung entfaltet werden.

Das Enzym besteht aus einer α -Helix und zwei antiparallelen β -Faltblättern, die durch weite Schleifen miteinander verbunden sind (Abb. 1.1). RNase T1 enthält insgesamt vier Cystein-Reste, die zwei Disulfidbrücken ausbilden und so zur Stabilität des Enzyms beitragen. Die beiden Termini liegen dicht beieinander und sind durch eine Disulfidbrücke, die zwischen den Aminosäuren Cys6 und Cys103 ausgebildet wird, miteinander verbunden.

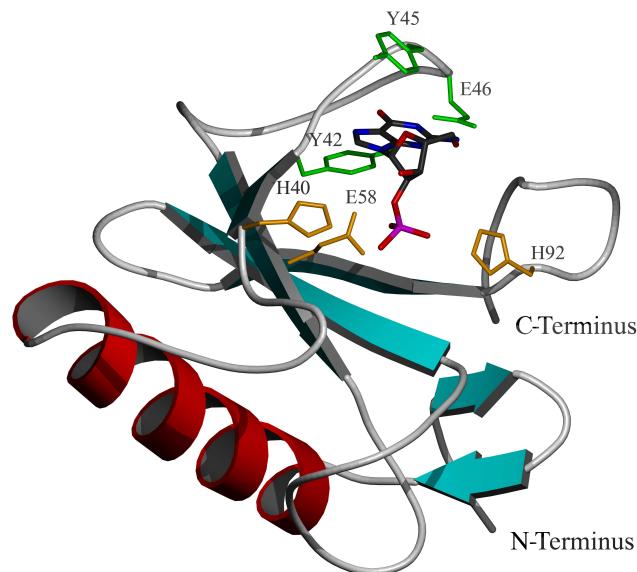


Abbildung 1.1: Sekundärstruktur von RNase T1 im Komplex mit dem Inhibitor 2'-GMP. Katalytisch aktive Aminosäuren sind orange und Aminosäuren, die mit ihrer Seitenkette an der Substratbindung beteiligt sind, sind grün dargestellt

RNase T1 spaltet Phosphodiesterbindungen in einzelsträngigen GpN-Sequenzen mit sehr hoher Spezifität (Walz Jr. et al., 1979). Durch zahlreiche Röntgenkristallstrukturen

konnten die molekularen Mechanismen für diese hohe Spezifität detailliert aufgeklärt werden. Die erste Struktur von RNase T1 im Komplex mit dem Inhibitor Guanosin-2'-monophosphat (2'-GMP) wurde von Heinemann & Saenger (1982) beschrieben. Daraufhin wurden weitere Strukturen im Komplex mit Guanosin-3'-monophosphat (3'-GMP) (Gohda et al., 1994; Heydenreich et al., 1993), Guanosin (Lenz et al., 1991a), Guanosin-3',5'-diphosphat (3',5'-GDP) (Lenz et al., 1991b), Guanylyl-2',5'-guanosin (2',5'-GpG) (Koepke et al., 1989) und Adenosin-2'-monophosphat (2'-AMP) (Ding et al., 1991) gelöst. Neben den genannten sind auch Strukturen von RNase T1 ohne ein gebundenes Nucleotid bekannt (Kostrewa et al., 1989; Martinez-Oyanedel et al., 1991). Nachdem die Primärstruktur des Enzyms schon einige Jahre bekannt war gelang Quaas et al. (1988b) auch die chemische Synthese des RNase T1 Gens so dass die Möglichkeit gegeben war, das Protein in großen Mengen rekombinant herzustellen und zu reinigen (Quaas et al., 1988a). Diese Tatsache, sowie die genaue Kenntnis des molekularen Aufbaus anhand der Kristallstrukturen, erlaubte es auf der Basis gezielter Punktmutationen Struktur-Funktions-Beziehungen an diesem Enzym zu studieren.

1.1.1 Reaktionsmechanismus und katalytisches Zentrum

RNase T1 katalysiert sowohl die Spaltung der P-O^{5'}-Bindung in einzelsträngiger RNA als auch die Hydrolyse der P-O^{2'}-Bindung eines Nucleosid-2',3'-cyclophosphodiesters. Das Enzym ist über einen weiten *pH*-Bereich aktiv und für die Aktivität sind weder Cofaktoren, noch Metall-Ionen notwendig. Der erste Schritt der RNA-Spaltung beinhaltet die Umesterung des 3',5'-Phosphodiesters, wobei die RNA-Kette gespalten wird und ein cyclischer 2',3'-Phosphodiester, sowie ein 5'-Hydroxyl als Intermediate entstehen. Beide Reaktionsprodukte werden zunächst freigesetzt und können nachgewiesen werden. Der cyclische 2',3'-Phosphodiester dann in einer zweiten unabhängigen Reaktion hydrolysiert, wobei das 3'-Phosphat als Endprodukt entsteht (Backmann et al., 1994; Thompson et al., 1994). Die Reaktion wird von RNase T1 in einem allgemeinen Säure-Base-Katalyse-Mechanismus katalysiert, wobei ein Histidin- und ein Glutaminsäure-Rest die katalytisch aktiven Aminosäuren sind. Die Seitenkette des protonierten His92 fungiert als allgemeine Säure, welche den Sauerstoff der 5'-*leaving group* protoniert. Das deprotonierte Glu58 abstrahiert als allgemeine Base das Proton der 2'-Hydroxyl-Gruppe. Das erleichtert den nucleophilen Angriff des 2'-Sauerstoffs auf das Phosphor-Zentrum, wobei ein pentakovalenter Übergangszustand für das Phosphoratom angenommen wird.

Das katalytische Zentrum wird neben den Aminosäuren Glu58 und His92, die direkt an der Katalyse beteiligt sind, zusätzlich durch die Aminosäuren Tyr38, His40, Arg77 und Phe100 gebildet (Steyaert, 1997, und Referenzen darin). Die Seitenkette von His40, für das zunächst auch eine direkte katalytische Rolle angenommen wurde, assistiert Glu58 durch Polarisation der O^{2'}-H-Bindung. Wird jedoch die Seitenkette von Glu58 substituiert, so kann His40 die Aktivität partiell wiederherstellen (Heinemann & Saenger, 1983; Steyaert et al., 1990; Grunert et al., 1991). Der Argininrest scheint zwei Funktionen während der Katalyse zu erfüllen. Zum einen orientiert er die Carboxylgruppe von Glu58 und ermöglicht so die Interaktion mit dem Substrat und zum anderen polarisiert dieser Rest die P–O^{P1} und P–O^{P3} Bindungen, wodurch der Phosphor elektropositiver wird. Diese Positivierung erleichtert wiederum den nucleophilen Angriff des deprotonierten O^{2'}-Atoms (Heydenreich et al., 1993).

1.1.2 Primäre Bindungstasche

Das Substrat von RNase T1 – die RNA – wird in einer Spalte gebunden, die von zwei Schleifen flankiert wird. Die beiden Schleifen werden aus den Aminosäuren 38–55, sowie 92–100 gebildet (siehe Abb. 1.1). Die hohe Substratspezifität des Enzyms liegt in der sogenannten primären Bindungstasche (PRS - *primary recognition site*) begründet. Neben der PRS konnte auch eine 3'-*subsite* identifiziert werden, die eine Präferenz für Cytosinreste zeigt (Walz Jr. et al., 1979; Steyaert et al., 1991). Das heißt, dass RNase T1 bevorzugt ~GpC~ Bindungen in der RNA spaltet.

Die primäre Bindungstasche wird von den Aminosäuren 42–46 (Tyr-Asn-Asn-Tyr-Glu) und Asn98 gebildet. Die beiden Tyrosinreste bilden eine hydrophobe Tasche, in die das aromatische Ringsystem der Guaninbase sandwichartig eingelagert wird. Die spezifische Erkennung durch das Enzym beruht jedoch auf der Ausbildung von insgesamt sechs Wasserstoffbrückenbindungen, mit denen die Base fast vollständig abgesättigt ist (Abb. 1.2). Einzig und allein das N3 des Guanosins bildet keine Wasserstoffbrücke zu Proteinatomen. Vier von diesen Wasserstoffbrücken werden zu Atomen des Proteinrückgrates ausgebildet (Gua N7···Asn43 N, Gua O6···Asn44 N, Gua O6···Tyr45 N, Gua N2···Asn98 O). Die einzige Aminosäure, die mit ihrer Seitenkette mit der Base interagiert, ist Glu46 (Gua N1···Glu46 OE1, Gua N2···Glu46 OE2). Der Vergleich mit verwandten Enzymen der T1-Familie (Tab. 1.1) zeigt eine sehr starke Konservierung dieser Aminosäure und deutet die Wichtigkeit dieser Glutaminsäure an.

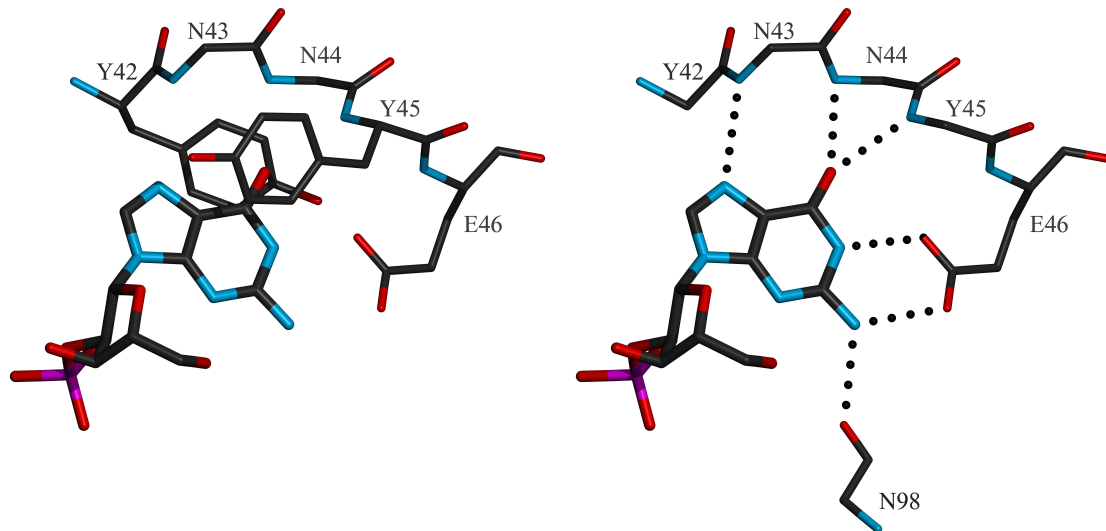


Abbildung 1.2: Interaktion der Guaninbase mit Aminosäuren der primären Bindungstasche von RNase T1. Gezeigt ist das Proteinrückgrat, sowie an der Interaktion beteiligte Seitenketten - links: hydrophobe Interaktion der Base mit den beiden Tyrosinresten, rechts: Wasserstoffbrückenbindungsmuster zwischen der Base und dem Protein

Aufgrund von Kristallstrukturen mit und ohne gebundenem Nucleotid wurde ein *induced fit* für die Substratbindung innerhalb der PRS postuliert (Kostrewa et al., 1989). Wird in der PRS ein Guaninrest gebunden, so kommt es vor allem im Bereich der Aminosäuren 43–46 zu starken Konformationsänderungen. Das Tyrosin 42, welches den Boden der Substratbindungstasche bildet, ist in seiner Konformation relativ starr. Ohne gebundene Base bildet Glu46 Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Amidstickstoff der Peptidbindung von Phe100, sowie dem δ -Amidstickstoff von Asn99. Die Hydroxyphenyl-Gruppe von Tyr45 ist in der nucleotidfreien Struktur in die primäre Bindungstasche gedreht und durch drei Wasserstoffbrückenbindungen, unter anderem zum Rückgrat-Sauerstoff von Asn98, stabilisiert. Die Hydroxygruppe von Tyr45 ersetzt demnach strukturell die Aminogruppe der Guaninbase. Die Peptidbindung zwischen Asn43 und Asn44 ist im Vergleich zum 2'-GMP-Komplex um 140° gedreht (siehe auch Abb. 1.3) und besitzt daher im Enzym ohne gebundenes Substrat eine energetisch günstigere Konformation.

1.1.3 Änderung der Substratspezifität

RNase T1 ist, als ein sehr gut untersuchtes Protein, ein ideales Modell für Proteindesign. Aufgrund der gelösten dreidimensionalen Strukturen sind die Interaktionen des Enzyms mit seinem Substrat in der primären Bindungstasche sehr gut verstanden, so dass die

Tabelle 1.1: Vergleich eines Ausschnitts der Primärsequenzen innerhalb der primären Bindungstasche von RNasen der T1-Familie. Die in allen Enzymen konservierte Glutaminsäure ist rot dargestellt. Die Basenspezifität der jeweiligen RNase steht in Klammern.

T1	<i>Aspergillus oryzae</i>	(G)	YPHKYNNYEGFDFSVSS--PYY-EWPILSSG
C2	<i>Aspergillus clavatus</i>	(G)	YPHQYRNYEGFNFSVPG--NYY-EWPILSSG
Ms	<i>Aspergillus satoi</i>	(N)	YPHEYHDYEGFDFPVGT--SYY-EYPIMSDY
F1	<i>Fusarium moniliforme</i>	(G)	YPHTYNNYEGFDFPVDG--PYQ-EFPIKSGG
Pb1	<i>Penicillium brevicompactum</i>	(G)	YPHEYHNYEGFDFPVFG--TTY-EFPILKSC
Pch1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	(G)	YPHEYRNYEGFDFPVSG--TTY-EFPILRSG
Th1	<i>Trichoderma harzianum</i>	(G)	YPHVYNNYEGFRFKGLS--KPFYEFILSSG
U1	<i>Ustilago sphaerogena</i>	(G)	YPHTYNNYEGFDFSDYC-DGPYK-EYPLKTSS
U2	<i>Ustilago sphaerogena</i>	(R)	YPHQYYD-EASDQITLCCGSGPWSEFPLVYNG
St	<i>Streptomyces erythreus</i>	(G)	DGTVFENREGILPDCAE--GYYHEYTV---
Sa	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	(G)	DGVVFQNRQSVLPTQSY--GYYHEYTV---
Ba	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(N)	GGDIFSNREGKLPKSG--RTWREADI---
Bi	<i>Bacillus intermedius</i>	(N)	GGDVFSNRQGRGPSAGS--RTWREADI---

Herausforderung war, die Substratspezifität von RNase T1 auf rationalem Wege zu verändern. Ziel dieser Studien war die Darstellung einer Spezifitätsvariante, die – anstatt Guanosin – spezifisch Adenosinreste in der RNA erkennen kann. Obwohl die beiden Basen, Adenin und Guanin, sich in Form und Größe sehr ähnlich sind, unterscheiden die meisten nucleotid- und nucleinsäurebindenden Proteine sehr stark zwischen diesen beiden Nucleobasen. Wie bei vielen anderen RNA-Protein-Interaktionen, so sind auch bei RNase T1 in der primären Bindungstasche Wechselwirkungen mit Carbonyl- und Amidgruppen des Proteinrückgrates vorherrschend. Bioinformatische Analysen von vorhandenen Strukturen ergaben, dass Hauptketteninteraktionen bei RNA-Erkennung sehr verbreitet sind und etwa ein Drittel der basenspezifischen Wasserstoffbrückenbindungen ausmachen (Allers & Shamoo, 2001; Treger & Westhof, 2001; Hoffman et al., 2004). Gerade diese Wechselwirkungen fast ausschließlich mit Rückgrat-Atomen machen rationales Proteindesign mit RNase T1 schwierig und somit zur Herausforderung.

Ausgehend von der Kenntnis, dass die Seitenketten der Aminosäuren Tyr42 und Tyr45 durch hydrophobe Interaktionen, sowie Glu46 durch Wasserstoffbrückenbindungen an der Basenerkennung beteiligt sind, waren die genannten Seitenketten die ersten die hinsichtlich rationaler Mutagenesestudien ausgetauscht wurden. Durch Substitutionen der beiden aromatischen Seitenketten ergaben sich Varianten mit veränderten enzymatischen Aktivitäten, wohingegen die Substratspezifität unverändert blieb. So wurden die beiden Tyrosinreste durch Tryptophan ausgetauscht, was im Falle der Tyr45Trp Substitution

zu einer Erhöhung der katalytischen Effizienz führte (Grunert et al., 1993). Diese Erhöhung ist vor allem auf die Erniedrigung des K_M -Wertes zurückzuführen, bei gleichzeitig leichter Verringerung der Katalysekonstante. Diese Effekte sind wahrscheinlich mit einer Verstärkung der hydrophoben Interaktionen mit der Guaninbase durch die Vergrößerung des aromatischen Systems zu erklären. Der gleiche Austausch an Position 42 führte zu einer ähnlichen Verringerung von K_M , während die Katalysekonstante in diesem Fall sehr stark erniedrigt wurde. Da diese Aminosäure Teil des hydrophoben Kerns des Proteins ist (Heinemann & Saenger, 1982) führt eine Vergrößerung zu einer beachtlichen konformellen Veränderung in der Umgebung von Position 42 und somit zu einer partiellen Zerstörung des aktiven Zentrums.

Eine weitere Aminosäure, die aufgrund ihrer Seitenkettenwechselwirkungen mit der Base ins Zentrum des Blickpunktes geriet, ist Glu46. Diese Aminosäure interagiert nicht nur spezifisch mit dem Guanin, sie ist auch innerhalb der fast ausschließlich G-spezifischen RNase T1 Familie hochkonserviert (Tab. 1.1). Die Berechnung der freien Bindungsenergie von 2'-GMP und 2'-AMP für die Bindung an RNase T1 Wildtyp ergab, dass das aktive Zentrum des Enzyms die Bindung von 2'-GMP elektrostatisch um einen Betrag von 184,2 kJ/mol stärker stabilisiert, als die Bindung von 2'-AMP (Hirono & Kollman, 1990). Weiterhin konnte aufgrund dieser Berechnungen gezeigt werden, dass Glu46 die Schlüsselrolle in der Guaninerkennung besitzt. Darauf aufbauend wurden die Varianten Glu46Ala und Glu46Gln vorgeschlagen, die eine höhere relative Affinität zu Adenin im Vergleich zum Wildtyp haben sollten (Hirono & Kollman, 1991). Das aktive Zentrum der vorgeschlagenen Variante Glu46Ala hat eine höhere relative Hydrophobizität und sollte daher eine erhöhte Affinität für Adenin aufgrund der leichteren Desolvatisierung dieser Base haben. Für die zweite Variante Glu46Gln wurde eine leichtere Bindung von 2'-AMP an das aktive Zentrum vorgeschlagen, aufgrund der Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Säureamidbindung und dem 2'-AMP, wohingegen bei Bindung von 2'-GMP abstoßende Interaktionen mit dem N1-H oder N2-H der Guaninbase entstehen würden. Molekulardynamische, sowie *free energy* Perturbations-Berechnungen unterstützten zusätzlich diese Annahmen. Vor allem der negative Wert für die Änderung der freien Bindungsenergie $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ für die Variante Glu46Gln führte zu der Vorhersage einer Substratspezifitätsänderung.

Kinetische Untersuchungen der beiden Varianten, welche die theoretischen Berechnungen belegen sollten, ergaben jedoch gegenteilige Ergebnisse. So zeigte weder die Variante Glu46Gln (Granzin et al., 1992), noch die Variante Glu46Ala (Steyaert et al., 1990) ei-

ne Veränderung in der Substratspezifität. Einzig und allein eine drastisch reduzierte Enzymaktivität von weniger als 1% im Vergleich zum Wildtyp war messbar. Die Kristallstruktur der Variante Glu46Gln (Granzin et al., 1992) im Komplex mit den Nucleotiden 2'-GMP und 2'-AMP zeigte, dass in beiden Fällen die Base nicht in der primären Bindungstasche gebunden war. Die Nucleotide haben in einer Region gebunden, die als 3'-*subsite* postuliert wird. Die Konformation der primären Bindungstasche ähnelt in diesem Fall sehr stark der des Wildtyps, wenn kein Ligand gebunden ist (Abb. 1.3).

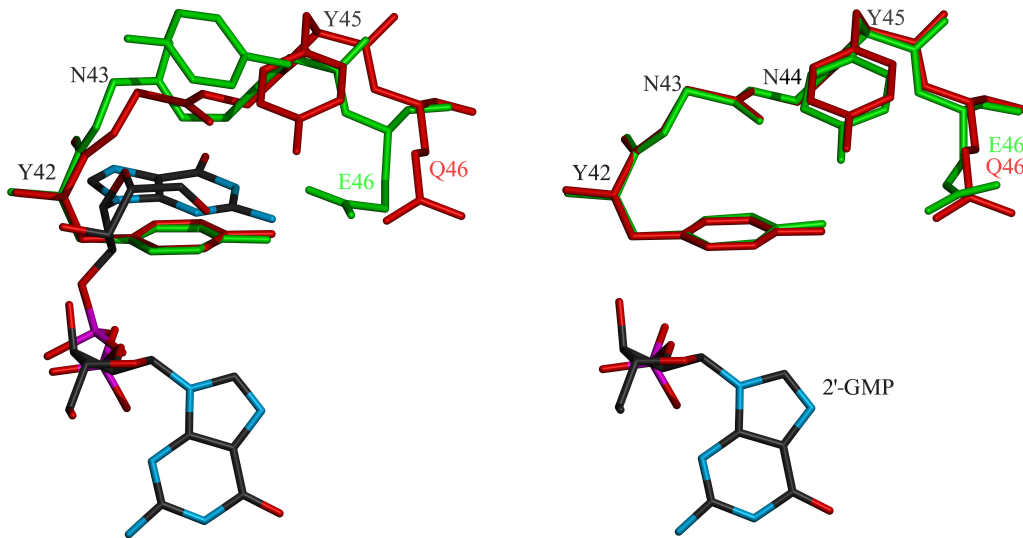


Abbildung 1.3: Überlagerung der primären Bindungstaschen von RNase T1 wt (grün) und der Variante Glu46Gln (rot). Die linke Abbildung zeigt den Wildtyp im Komplex mit 2'-GMP, die rechte ohne gebundenen Ligand

Die Überlagerung der beiden Strukturen zeigt eine fast 100%-ige Übereinstimmung, sowohl in der Konformation der Peptidbindung Asn43-Asn44, als auch in der Konformation der Seitenkette von Tyr45. Der einzige Unterschied ist das Wasserstoffbrückenbindungs-Muster, welches vom Rest in Position 46 (Glu oder Gln) ausgebildet wird. Die Glutaminsäure im Wildtyp ist aus der Bindungstasche herausgeklappt und formt zwischen einem Carboxyl-Sauerstoff und dem Peptid-Stickstoff von Phe100 eine Wasserstoffbrückenbindung. Das zweite Sauerstoffatom ist Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor für zwei Wassermoleküle. Im Gegensatz dazu bildet die Säureamidgruppierung von Glutamin 46 in der Variante Glu46Gln zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der Peptidbindung von Asn99 und Phe100 aus und ist somit in seiner Konformation fixiert. Der *induced fit*, der für den Wildtyp postuliert wird, erfordert dadurch bei dieser Variante einen höheren Energiebetrag, wodurch die verringerte Aktivität zu erklären ist.

Da Versuche, die Substratspezifität durch rationale Mutagenese zu verändern, zu keinen Ergebnissen führten, wurden randomisierte Ansätze gewählt. Dafür wurde unter anderem eine Variantenbibliothek erstellt, deren Aminosäuren in den Positionen 41–46 permutiert worden sind (Hubner et al., 1999). Von den 1,6 Millionen getesteten Varianten zeigten 180 RNA-Hydrolyse-Aktivität. Diese ausgewählten Varianten wurden daraufhin zusätzlich auf Änderung der Substratspezifität untersucht. Die Analyse der Hydrolyseprofile dieser Varianten zeigte, dass nur eine davon Minimalsubstrate entweder mit Guanin oder Adenin in der 5'-Position spalten konnte. Eine enzymkinetische Charakterisierung aufgrund von Initialgeschwindigkeitsmessungen war allerdings nicht möglich. Alle anderen zeigten weiterhin ausschließlich Guanosinaktivität. Eine Sequenzanalyse des randomisierten Bereiches der aktiven Varianten zeigte eine starke Präferenz für eine saure Aminosäure an der hochkonservierten Position 46. In den meisten Fällen wurde diese Position von Glutamatresten und in einigen Fällen auch von Aspartatresten besetzt. Eine einzige aktive Variante jedoch, die sogenannte Variante 9/5 (Lys41Glu Tyr42Phe Asn43Arg Tyr45Trp Glu46Gln), besaß in dieser Position ein Glutaminrest - eine Aminosäure, die in der Einzelvariante zu einem drastischen Aktivitätsverlust führte. Allerdings war auch in diesem Fall keine Änderung der Substratspezifität festzustellen. Die Kristallstruktur dieser Variante im Komplex mit 2'-GMP (Höschler et al., 1999) zeigte keine Änderung der Konformation von Gln46 im Vergleich zur Einzelvariante. Auch in der Variante 9/5 werden die beiden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Amidgruppierung des Glutamins und der Peptidbindung Asn99–Phe100 ausgebildet. Trotz dieser Konformation wird die Guaninbase von der Variante 9/5 innerhalb der PRS gebunden. Wahrscheinlich führen die zusätzlichen Substitutionen zu einer partiellen Wiederherstellung der Aktivität dieser Variante. Im Gegensatz zum Tyr45, welches in der Einzelvariante Glu46Gln aufgrund seiner Konformation die Bindungstasche verschließt, ist das Trp45 der Variante 9/5 in seiner Konformation flexibler und erlaubt die sandwichartige Einbindung der Base. Da aber selbst bei Substratbindung die Interaktion zwischen Gln46 und dem Proteinerückgrat nicht aufgehoben wird, hat diese Aminosäure keinen Einfluss auf die Substraterkennung, so dass eine Änderung der Substratspezifität nicht stattgefunden hat.

In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit wurde anhand der genannten Daten basierend auf der Variante 9/5 eine neue Enzymvariante vorgeschlagen, die anstelle des Glutamins an Position 46 ein Asparaginrest trägt. Ziel war es, die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Positionen 46 und 100 zu brechen oder zumindest abzuschwächen, so dass der *induced fit*, wie er vom Wildtyp bekannt ist, bei Substratbindung stattfinden

kann. Die Darstellung dieser Variante 9/5-Gln46Asn, im folgenden Variante RV genannt, zeigte in der Tat eine Veränderung in der Substratpräferenz (Czaja, 2001, Diplomarbeit). Mit der Variante RV ist es gelungen, das Spezifitätsverhältnis für die Hydrolyse der Minimalsubstrate Guanylyl-3',5'-cytidin (GpC) und Adenylyl-3',5'-cytidin (ApC) von $(k_{\text{kat}}/K_{\text{M}})_{\text{ApC}} : (k_{\text{kat}}/K_{\text{M}})_{\text{GpC}} = 1 : 10^6$ für den Wildtyp auf 1 : 40 zu senken.

Eine anderer Ansatz zur Untersuchung der Substratspezifität wurde in der Arbeit von Kumar & Walz Jr. (2001) gewählt. Hier wurden zwei Bibliotheken untersucht. Zum einen sind die Positionen 43 und 44 (im Wildtyp Asparagin) randomisiert worden und für die zweite Bibliothek wurde die Position 46 (Glutaminsäure im Wildtyp) randomisiert, sowie zusätzlich zwischen Position 46 und 47 eine zufällige Aminosäure eingefügt. Für die meisten der getesteten aktiven Insertionsvarianten konnte eine Erhöhung der Spezifitätskonstante für die Hydrolyse von ApC um eine Größenordnung detektiert werden. Die daraus resultierende jeweilige Änderung des Spezifitätsverhältnisses, die im Bereich von 1 : 10^4 bis 1 : 97 lagen, ergab sich aus der entsprechenden Änderung der GpC-Hydrolyse. Die Varianten Glu46Pro/(insert)47Glu und (insert)47Pro, deren Positionen 46 und 47 genau entgegengesetzt sind, waren besonders interessant. Während die Variante mit dem Glutamatrest an Position 47 eine leicht erhöhte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym zeigte, war bei der anderen eine stark verringerte Aktivität zu beobachten. Weitere Untersuchungen ließen den Schluss zu, dass die Glutaminsäure 46 in der Variante (insert)47Pro nicht mehr mit der Guaninbase interagieren kann, wohingegen im umgekehrten Fall in der Variante Glu46Pro/(insert)47Glu für das in diesem Fall Glu47 eine ähnliche Interaktion wie für Glu46 im Wildtyp angenommen wird. Die Tatsache, dass in allen aktiven Varianten die ApC-Hydrolyse in gleichem Maße im Vergleich zum Wildtyp zunimmt, deutet darauf hin, dass die Vergrößerung der PRS per se die Bindung der Basen erleichtert, allerdings noch keine spezifische Interaktion mit der Adeninbase stattfindet.

1.2 Röntgenkristallstrukturanalyse

Für das Verständnis der Funktion von Biomolekülen ist die Kenntnis über den dreidimensionalen Aufbau dieser Moleküle von entscheidender Bedeutung. Für die Ermittlung der Struktur von Biomakromolekülen werden heutzutage hauptsächlich zwei Methoden angewendet. Das ist zum einen die Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie und zum anderen die Röntgenkristallstrukturanalyse (RKSA). Während für die letztgenannte

Methode die zu untersuchenden Stoffe als Einkristall vorliegen müssen, können NMR-Strukturen von Stoffen im gelösten Zustand ermittelt werden. Limitierende Faktoren für NMR-Untersuchungen sind allerdings zum einen die notwendigen spezifische Markierungen mit Isotopen, wie ^{15}N oder ^{13}C und zum anderen die Größe der zu untersuchenden Moleküle. Im Gegensatz dazu müssen für die strukturelle Untersuchung von Biomolekülen mit Hilfe der RKSA geeignete Kristalle dieser Moleküle vorliegen. Der limitierende Faktor in diesem Fall ist daher die Züchtung der Proteinkristalle. Die Strukturen der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden alle mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse ermittelt. Dabei wird Röntgen- oder Synchrotronstrahlung an Einkristallen gebeugt und anschließend kann aus dem erhaltenen Beugungsmuster die Struktur des Moleküls im atomaren Bereich berechnet werden.

Aufbau von Kristallen

Kristalle sind homogene, anisotrope Festkörper, die aus in allen drei Dimensionen periodisch aufgebauten Struktureinheiten bestehen. Diese Einheiten werden als Einheits- oder Elementarzellen bezeichnet und stellen die kleinste Einheit innerhalb des Kristallgitters dar. Elementarzellen werden durch insgesamt sechs Gitterkonstanten, die Kantenlängen a , b und c , sowie die einschließenden Winkel α , β , und γ , eindeutig beschrieben. Die Elementarzelle enthält alle vorhandenen Symmetrieelemente und kann durch diese weiter in asymmetrische Einheiten zerlegt werden. Eine asymmetrische Einheit wird der Teil der Elementarzelle genannt, der keine kristallographische Eigensymmetrie mehr enthält. Im einfachsten Fall enthält die Elementarzelle bei Proteinkristallen ein einzelnes Molekül, allerdings kann sie auch mehrere unabhängige Proteinketten enthalten, die dann aber nicht durch kristallographische Symmetrieelemente übereinander gelegt werden können.

Die Symmetrien innerhalb des Kristalls werden durch die sogenannten Raumgruppen beschrieben. Für den dreidimensionalen Raum existieren 230 Raumgruppen, in denen Substanzen kristallisieren können. Aufgrund der Chiralität von Biomolekülen, die in der Regel nur in einer Enantiomerenform vorkommen, reduziert sich die Zahl der erlaubten Raumgruppen auf 65, da Symmetrieelemente, wie Inversionszentren, Spiegel- und Gleitspiegelebenen in diesen Fällen nicht enthalten sein können.

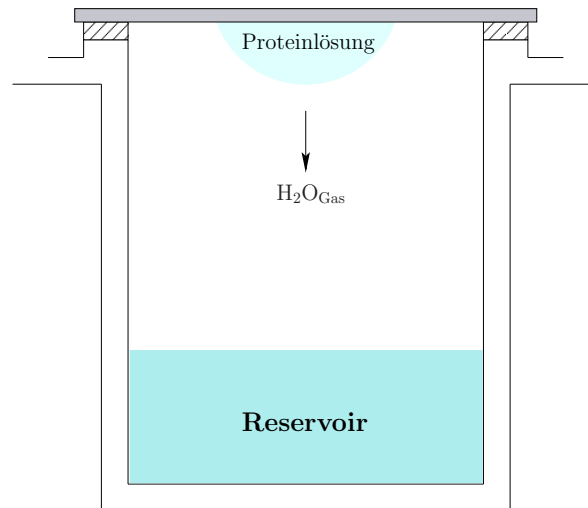


Abbildung 1.4: schematische Darstellung eines Kristallisationsansatzes im „hängenden Tropfen“

Kristallisation

Kristalle von Proteinen entstehen, wenn die Konzentration des zu kristallisierenden Stoffes in einer kurz vor der Übersättigung stehenden Lösung langsam erhöht wird. Der Sättigungspunkt hängt dabei unter anderem von der Konzentration spezifischer Fällungsmittel, der Ionenstärke, der Temperatur, dem Anteil organischer Lösungsmittel und dem *pH*-Wert ab. Diese Parameter müssen für jedes Experiment empirisch durch ein Screening bestimmt werden. Die Standardmethoden zur Kristallisation sind so angelegt, dass die Konzentration an Fällungsmittel langsam erhöht wird. Zum einen wird dadurch die zur Keimbildung nötige Übersättigung erreicht und andererseits wird die durch das Kristallwachstum fallende Konzentration des Biomoleküls durch eine steigende Konzentration des Fällungsmittels wieder ausgeglichen. Die am häufigsten verwendeten Methoden für die Kristallisation sind zum einen die Gleichgewichtsdialyse, hierbei vor allem die Mikrodialyse, sowie Dampfdiffusionsmethoden, wie der „hängende“ oder „sitzende Tropfen“.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Kristallisationsexperimente wurden im hängenden Tropfen angesetzt. Bei dieser Methode ist die Proteinlösung im Tropfen von der Reservoirlösung räumlich getrennt, so dass ein Konzentrationsausgleich ausschließlich über die Dampfphase erfolgen kann. In der Regel sind die verschiedenen Reagenzien im Tropfen geringer konzentriert als in der Reservoirlösung, so dass Wasser über die Dampfphase aus dem Tropfen in die Reservoirlösung diffundiert (Abb. 1.4). Daraus resultiert eine langsame Konzentrationserhöhung der Reagenzien, sowie des Proteins im Tropfen, wodurch

im Idealfall eine Kristallisation einsetzt.

Röntgenbeugung

Wird der Kristall mit monochromatischem Röntgenlicht mit einer Wellenlänge von $\lambda \approx 1\text{\AA}$ bestrahlt, so treten die elektromagnetischen Wellen mit den Elektronen der Moleküle im Kristall in Wechselwirkung, was zur Emission neuer Strahlen führt. Durch die periodische Anordnung der Moleküle im Kristall kommt es zur Interferenz zwischen den emittierten Strahlen, wodurch letztendlich ein spezifisches Beugungsmuster entsteht, welches von einem Detektor aufgezeichnet wird. Diese Beugung der Röntgenstrahlen wird nach dem Bragg'schen Gesetz wie die Spiegelung an einer Ebene behandelt. Für jeden Reflex gilt dabei die Bragg'sche Gleichung: $2d_{hkl} \cdot \sin\Theta = n\lambda$, wobei d_{hkl} der Abstand zwischen den reflektierenden imaginären Netzebenen beschrieben durch die Miller Indizes hkl , λ die Wellenlänge des eingestrahlteten Röntgenlichts, n die Beugungsordnung und Θ der Reflexionswinkel ist. Jeder einzelne Reflex ist durch seine Amplitude und Phase charakterisiert und wird durch den als Strukturfaktor bezeichneten Wellenvektor $F_{hkl} = |F_{hkl}|e^{i\alpha_{hkl}}$ vollständig beschrieben. Aus den gemessenen Diffraktionsdaten ist allerdings nur eine der beiden charakteristischen Parameter zu ermitteln. Mit den verwendeten Detektoren lässt sich für jeden Reflex nur die Intensität ermitteln. Diese ist proportional zur Amplitude des gebeugten Strahls, was mathematisch dem Betrag des Strukturfaktors $|F_{hkl}|$ entspricht. Die notwendige Information über die Phase α geht jedoch verloren. Zur Lösung dieses sogenannten Phasenproblems gibt es mehrere Möglichkeiten.

Handelt es sich um eine völlig unbekannte Struktur, so wird dieses Problem häufig mit der Methode des mehrfachen isomorphen Ersatzes (*multiple isomorphous replacement - MIR*) gelöst. Dabei werden Datensätze des nativen Proteins, sowie eines oder mehrerer Schweratomderivate gesammelt. Die Lage der Schweratome kann anschließend mit Hilfe der Patterson-Methode bestimmt und daraus Phaseninformationen berechnet werden. Die zweite Möglichkeit das Phasenproblem zu lösen, ist der molekulare Ersatz (*molecular replacement*). Voraussetzung für diese Methode ist eine bekannte Struktur, die eine große Ähnlichkeit mit der zu untersuchenden aufweisen muss und als Modell für die Berechnung der Phaseninformationen dient. Dieses sogenannte Startmodell wird durch Rotation und Translation so in der asymmetrischen Einheit platziert, dass es sich mit der unbekannteten Struktur überlagert.

Die berechneten Phasen des bekannten Modells bzw. die aus dem Schweratomersatz

ermittelten, werden anschließend zusammen mit den gemessenen Intensitäten zur Ermittlung der Elektronendichteverteilung verwendet.

1.3 Problemstellung

Die gezielte Veränderung der Substratspezifität ist eine der großen Herausforderungen im Proteindesign. Die RNase T1 Variante RV, eine in der vorangegangenen Diplomarbeit dargestellte purinspezifische Variante sollte im Verlauf dieser Arbeit weiter charakterisiert und der Einfluss einzelner Aminosäuresubstitutionen auf die beobachtete Spezifitätsänderung näher untersucht werden. Ein Ziel dieser Arbeit war dabei, die dreidimensionale Struktur von RNase T1-RV mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse aufzuklären, um darauf aufbauend neue Varianten vorzuschlagen, deren Aktivität einerseits und Spezifitätsverhältnis andererseits im Vergleich zur Variante RV weiter erhöht werden. Ebenso sollte durch eine Permutation des Phenylalanins 100 ausgehend von der Variante Glu46Gln versucht werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die in dieser Variante zwischen Gln46 und Phe100 ausgebildet werden, zu brechen bzw. zu schwächen. Das sollte dann dem Glutamin 46 eine spezifische Basenerkennung, wie von Hirono & Kollman (1991) vorhergesagt, ermöglichen. Die entstehenden Varianten sollten isoliert, kinetisch charakterisiert und gegebenenfalls auch kristallisiert werden.

Die Arbeit von Kumar & Walz Jr. (2001) hatte gezeigt, dass die Varianten, denen zwischen Position 46 und 47 eine weitere Aminosäure inseriert wurde, aufgrund der Vergrößerung der PRS in der Lage sind nach Adenosinresten zu spalten. Desweiteren gab es Hinweise, dass in diesen Varianten ein Glutaminsäurerest in Position 47 die Funktion des wt-Glu46 übernimmt. Ausgehend von diesen Daten sollten daher die Varianten Glu46Pro/(insert)47Gln und Glu46Pro/(insert)47Asn dargestellt und charakterisiert werden, unter der Annahme, dass Gln47 bzw. Asn47 spezifisch mit einer gebundenen Adeninbase interagiert, gleichzeitig aber die Wasserstoffbrückenbindungen mit Phe100 nicht ausgebildet werden können.

Der Großteil der Daten ist in international referierten Journalen publiziert worden. Kopien der einzelnen Artikel folgen und werden anschließend zusammenfassend diskutiert.

RNase T1 Variant RV Cleaves
Single-Stranded RNA after Purines Due to
Specific Recognition by the Asn46 Side
Chain Amide

Rico Czaja, Marc Struhalla, Katja Höschler, Wolfram Saenger,
Norbert Sträter und Ulrich Hahn

Biochemistry, **43**, 2854-2862

RNase T1 Variant RV Cleaves Single-Stranded RNA after Purines Due to Specific Recognition by the Asn46 Side Chain Amide

Rico Czaja,[‡] Marc Struhalla,[‡] Katja Höschler,[‡] Wolfram Saenger,[§] Norbert Sträter,^{||} and Ulrich Hahn^{*:‡}

Department of Chemistry, Division of Biochemistry and Molecular Biology, Hamburg University, Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg, Germany, Institute of Crystallography, Free University of Berlin, Takusstrasse 6, 14195 Berlin, Germany, and Biotechnological and Biomedical Centre, University of Leipzig, Am Deutschen Platz 5, 04103 Leipzig, Germany

Received November 4, 2003; Revised Manuscript Received January 15, 2004

ABSTRACT: Attempts to alter the guanine specificity of ribonuclease T1 (RNase T1) by rational or random mutagenesis have failed so far. The RNase T1 variant RV (Lys41Glu, Tyr42Phe, Asn43Arg, Tyr45Trp, and Glu46Asn) designed by combination of a random and a rational mutagenesis approach, however, exhibits a stronger preference toward adenosine residues than wild-type RNase T1. Steady state kinetics of the cleavage reaction of the two dinucleoside phosphate substrates adenylyl-3',5'-cytidine and guanylyl-3',5'-cytidine revealed that the ApC/GpC ratio of the specificity coefficient (k_{cat}/K_m) was increased ~ 7250 -fold compared to that of the wild-type. The crystal structure of the nucleotide-free RV variant has been refined in space group $P6_1$ to a crystallographic R -factor of 19.9% at 1.7 Å resolution. The primary recognition site of the RV variant adopts a similar conformation as already known from crystal structures of RNase T1 not complexed to any nucleotide. Noteworthy is a high flexibility of Trp45 and Asn46 within the three individual molecules in the asymmetric unit. In addition to the kinetic studies, these data indicate the participation of Asn46 in the specific recognition of the base and therefore a specific binding of adenosine.

Ribonuclease T1 (RNase T1, EC 3.1.27.3) represents an ideal model system for studying structure–function relationships of protein enzymes. RNase T1 is a small globular, well-characterized enzyme from the mold fungus *Aspergillus oryzae*. It is the key member of the so-called RNase T1 family, a group of microbial RNases of fungal and bacterial origin (1, 2). The enzyme consists of 104 amino acid residues with a relative molecular mass of 11 089 Da. It cleaves single-stranded RNA with high specificity at guanylyl residues, yielding new guanosine 3'-phosphates and 5'-OH in a two-step mechanism with guanosine 2',3'-cyclic phosphate as the intermediate (3, 4).

The crystal structures of the enzyme complexed with the inhibitor 2'-GMP (5, 6), with the cleavage product 3'-GMP (7, 8), with the dinucleoside phosphate inhibitor 2',5'-GpG (9), with 2'-AMP (10), and with an unoccupied recognition site (11, 12) have each been determined at high resolution. These data revealed that the specific recognition of the guanine base by the enzyme is due to interactions between the nucleobase and a protein loop consisting of residues 42–46 together with residue 98. The guanine base is involved in extensive hydrogen bonding with main chain atoms (Asn43 NH \cdots Gua N7, Asn44 NH \cdots Gua O6, and Tyr45 NH \cdots Gua O6), and the GuaN2H forms a hydrogen bond to the peptidic oxygen of Asn98 which is located outside the recognition loop. The only amino acid that interacts with its

side chain with the base is the glutamate in position 46, forming Gua N1H \cdots Glu46 O ϵ 1 and Gua N2H \cdots Glu46 O ϵ 2 bidentate hydrogen bonds (Figure 1a). In addition, the side chains of Tyr42 and Tyr45 form a hydrophobic pocket and sandwich the guanine base, whereby it is thought that Tyr45 acts as a lid covering the base. Within the RNase T1 family, Glu46 is highly conserved. Attempts to design RNase T1 variants with altered specificity were based on the mentioned crystal structures or sequence alignments. Starting points for rational mutagenesis studies were tyrosines 42 and 45 which were involved in guanine recognition by sandwiching the guanine with their side chains as well as Glu46 (13–18). All of these mutations did not alter nucleotide specificity. Substitutions of Tyr42 and Tyr45 led to variants with both increased (14, 17) and decreased (14, 16) catalytic activity. Substitutions of Glu46 also led to variants with extremely decreased catalytic activity (13, 16), although it was suggested that the Glu46Ala and Glu46Gln variants (due to specific possible bidentate hydrogen bond formation with the Gln46 amide and adenine) would have greater relative affinities for adenine than the wild-type as shown in Figure 1b for the Glu46Gln variant (19). The crystal structures of the Glu46Gln variant in complex with both 2'-GMP and 2'-AMP showed that both nucleotides do not bind the enzyme in the guanine recognition site but at the 3'-subsite at His92 (13). The side chain of Gln46 is tightly hydrogen bonded to main chains atoms of Phe100 and locks the guanine binding site, and therefore, this variation does not lead to a change in the RNase T1 specificity but to a significant loss of catalytic activity. Random mutagenesis studies of the complete primary recognition site (20) did also not lead to variants with altered specificity. The complete randomization

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +49 (0) 40-42838 3214. Fax: +49 (0) 40-42838 2848. E-mail: uli.hahn@uni-hamburg.de.

[‡] Hamburg University.

[§] Free University of Berlin.

^{||} University of Leipzig.

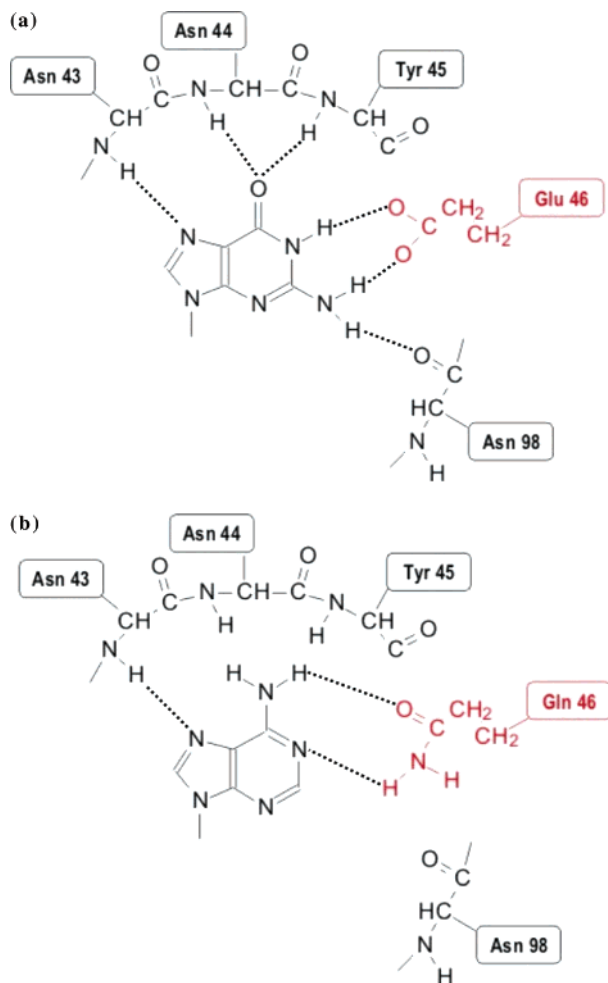


FIGURE 1: Schematic representation of the primary recognition site of (a) RNase T1-wt with a bound guanine base and (b) hypothetical binding of an adenine base to RNase T1 variant E46Q predicted on the basis of theoretical molecular dynamics and free energy perturbation calculations (19). The protein backbone of amino acids 43–45 and 98 and the side chains of Glu46 and Gln46 are shown. Hydrogen bonds are represented with dashed lines.

of this recognition site yielded a combinatorial library of 1.6 million variants. One hundred eighty of these variants exhibited RNA cleaving activity, however, without any change in substrate specificity. Comparisons of the primary structures revealed a conservation of the amino acid in position 46 that was mainly occupied by glutamate or the similar residue aspartate. Only in one active variant was the glutamate substituted with glutamine, a substitution leading to inactivation via a single-point mutation (13). The primary recognition site of this so-called 9/5 variant is completely different from that of the wild-type (wt)¹ and exhibited the 41-GluPheArgAsnTrpGln-46 amino acid sequence instead of the 41-LysTyrAsnAsnTyrGlu-46 amino acid sequence. The crystal structure of this enzyme cocrystallized with 2'-GMP (21) shows that the guanine is bound in a different manner to the recognition site in comparison to the Glu46Gln variant, although the glutamine in position 46 does not participate in guanine recognition because it remains tightly hydrogen bonded to Phe100 like in the Glu46Gln variant. The binding of the guanine base is presumably based on the

increased level of aromatic stacking due to the Tyr45Trp exchange. But as the glutamine does not take part in substrate recognition in variant 9/5 no change in substrate specificity took place. On the basis of these data, it was suggested that the substitution of Gln46 with Asn in variant 9/5 would lead to a variant that could also recognize adenine. Because of the shortening of this amino acid side chain due to one missing methylene group, the two hydrogen bonds to Phe100 would presumably be impossible to form, whereby the amide group of asparagine would be able to recognize adenosine as it is shown for glutamine in Figure 1b. In this work, we report on the RNase T1 RV with the 41-GluPheArgAsnTrpAsn-46 primary recognition site. This variant was created by genetic engineering, and its biochemical characterization indeed resulted in a significantly altered substrate specificity. Here we report also the crystallographic characterization that led to insights into the adenine recognition of RNase T1 RV.

MATERIALS AND METHODS

Guanylyl-3',5'-cytidine (GpC) and adenylyl-3',5'-cytidine (ApC) were from Pharma-Waldhof (Düsseldorf, Germany). Mutagenesis and standard primers were from MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). All other chemicals were from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma (Deisenhofen, Germany).

Site-Directed Mutagenesis and Enzyme Purification

RNase T1 RV was constructed by site-directed mutagenesis using two-step PCR (22). The mutagenesis primer was 5'-CAC AGA GAA ATC AAA ACC GTT CCA GTT GCG GAA TTC GTG TGG GTA AGA ATT GG-3' (base substitutions underlined). Standard primers were A2VO (5'-TAC GGA TTC ACT GGA ACT CTA GA-3') and A2HI (5'-CAT CTT AGC AGC CTG AAC-3'). RNase T1-wt and variant RV were overproduced in *Escherichia coli* XL1 blue harboring the pA2T1 plasmid (23). The enzymes were isolated from the periplasm by osmotic shock and purified by DEAE anion exchange and size exclusion chromatography (24) to homogeneity. Purity and authenticity were judged by SDS-PAGE and MALDI-MS.

Determination of Substrate Specificity

The substrate specificity was tested by cleavage of GpC and ApC. The enzyme (5 μ M) was incubated with GpC or ApC (1 mg/mL, corresponding to 1.65 and 1.75 mM, respectively) in Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.5) containing 1 mM EDTA for 15 min at room temperature. Cleavage products were analyzed by thin-layer chromatography (3).

Enzyme Kinetics

Dinucleoside Phosphate Cleavage. To determine the kinetic parameters for dinucleoside phosphate cleavage, the hyperchromic effect during transesterification was measured spectrophotometrically. The reaction was carried out in a Hewlett-Packard 8425A spectrophotometer in MES buffer (100 mM, pH 6.0) containing 100 mM NaCl and 2 mM EDTA at 25 °C. The initial velocities were measured in triplicate at 280 nm for GpC transesterification using the difference extinction coefficient $\Delta\epsilon_{280}$ [2200 M⁻¹ cm⁻¹ (25)] and at 268 nm for ApC transesterification using the difference extinction coefficient $\Delta\epsilon_{268}$ [2120 M⁻¹ cm⁻¹ (26)] at substrate concentrations between 20 and 625 μ M for GpC hydrolysis

¹ Abbreviations: wt, wild-type; An, amino acid in position n of molecule A in the asymmetric unit.

and between 30 and 370 μM for ApC hydrolysis. The enzyme concentrations were 66 nM for GpC hydrolysis and 500 nM for ApC hydrolysis, depending on the activity. The enzyme concentration was determined spectrophotometrically using a calculated ϵ_{280} extinction coefficient of 21 680 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (27). The mixtures without enzyme were preincubated for ~ 3 min to ensure the absence of autohydrolysis, and reactions were started by adding the enzyme. Michaelis–Menten constants were determined by nonlinear regression using the program GraphPad Prism.

RNA Hydrolysis. Hydrolysis of high-molecular mass RNA was assessed by determining the acid soluble oligonucleotides at 260 nm by a modified test from Anfinsen *et al.* (28). A total volume of 1 mL containing 3 mg of yeast RNA in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 2 mM EDTA was incubated with the enzyme for 15 min at 37 °C. Nonhydrolyzed RNA was precipitated on ice for 20 min after the addition of 250 μL of ice-cold 2.5% lanthane nitrate in 30% perchloric acid. After centrifugation, the extinction of the diluted supernatant (1:20) was determined at 260 nm. The specific activity of the enzyme was calculated using the following equation: specific activity (units per milligram) = $[E_{260} - E_{260(\text{blank})}] \times 25/(\text{milligram of protein})$. To determine the blank, the enzyme was omitted from the solution.

Crystallization and Data Collection

The crystals used for data collection were obtained by the hanging drop vapor diffusion method (29). A droplet was prepared by mixing an equal volume of the protein solution containing 2 mM RNase T1 RV in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) and of the reservoir solution containing 100 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0), 200 mM MgCl_2 , and 20–22% PEG4000. Hexagonal crystals grew at 6 °C within 4 or 5 days to dimensions of $\sim 1.5 \text{ mm} \times 0.15 \text{ mm} \times 0.15 \text{ mm}$. For cryoprotection, the crystals were soaked for approximately 30 min in the reservoir solution containing 20% glycerol and then flash-frozen in liquid nitrogen. During data collection, the crystals were cooled in a nitrogen stream at 100 K. Data were processed using the DENZO/SCALEPACK program (30). The crystals belonged to space group $P6_1$ with a and b values of 56.5 Å and a c of 158.7 Å and contained three molecules per asymmetric unit.

Model Building and Refinement

The structure was determined by the molecular replacement method (31) using the program AmoRe (32) of the CCP4 package (33) and RNase T1 9/5 as the search model [Protein Data Bank entry 1CHO (21)] excluding the nucleotide and water molecules. The initial model was refined using CNS (version 1.1) (34) and manually rebuilt using the interactive graphics model building program O (35). The progress of the refinement was monitored by the decrease in R_{free} (36) at each stage of model building, energy minimization, and individual isotropic B -factor refinement.

RESULTS AND DISCUSSION

Crystal Structure Analysis

The crystals of RNase T1 RV belong to hexagonal space group $P6_1$, and the structure was determined by molecular

Table 1: Parameters for Data Collection and Refinement

data collection	
source	BW7B (DESY)
wavelength (Å)	0.8459
no. of reflections (total/unique)	70573/31400
completeness (%)	90.6
R_{sym} (%)	3.7
Ramachandran parameters	
residues in most favored regions	240 (93%)
residues in additional allowed regions	18 (7%)
residues in generously allowed regions	0 (0%)
refinement	
resolution range (Å)	20–1.7
R -factor (%)	19.9
R_{free} (%)	24.4
rms deviations from ideality	
bond lengths (Å)	0.015
bond angles (deg)	1.74
dihedrals (deg)	24.96
improper dihedrals (deg)	1.11
PDB entry	1Q9E

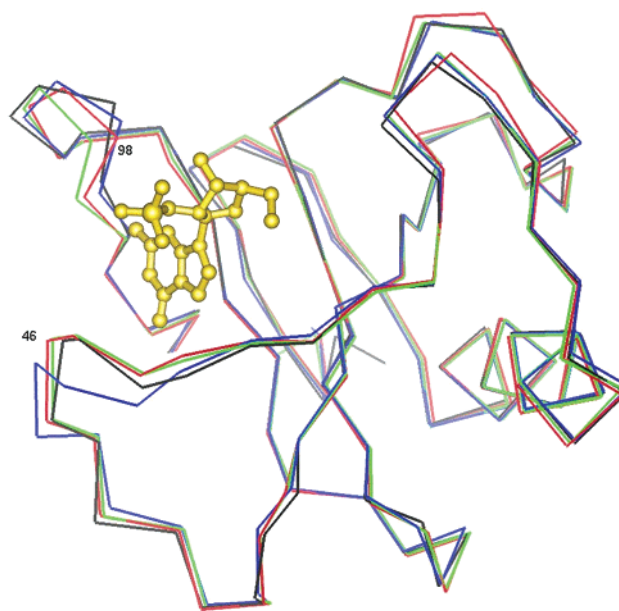


FIGURE 2: Comparison of the three molecules of RNase T1 RV in the asymmetric unit. The protein backbone is shown as a C_{α} representation (molecule A in red, molecule B in green, and molecule C in blue). Also shown in black is the wt enzyme in complex with 2'-GMP (in gold).

replacement using T1 variant 9/5 [PDB entry 1CHO (21)]. The model was refined to an R -factor of 19.9% using X-ray diffraction data to 1.7 Å. The final model consists of 3×104 amino acid residues from three individual molecules (named A, B, and C) in the asymmetric unit, 274 water molecules, and two Tris molecules bound to molecules A and C. The entire molecules are well-defined in the electron density map, and only very few side chains at the protein surface appear to be disordered. The ψ and φ torsion angles of all residues are located in the allowed regions of the Ramachandran plot. Alternative conformations were introduced for residues A17, B17, C17, and C28 and for the Arg43–Asn44 peptide bond in molecule A. The data collection and refinement statistics are summarized in Table 1.

The overall structure of the three molecules of the asymmetric unit is very similar. The rms deviations for the superposition of the C_{α} atoms of molecules B and C onto molecule A are 0.352 and 0.557 Å, respectively, and 0.582 Å for the superposition of molecule B onto molecule C. The

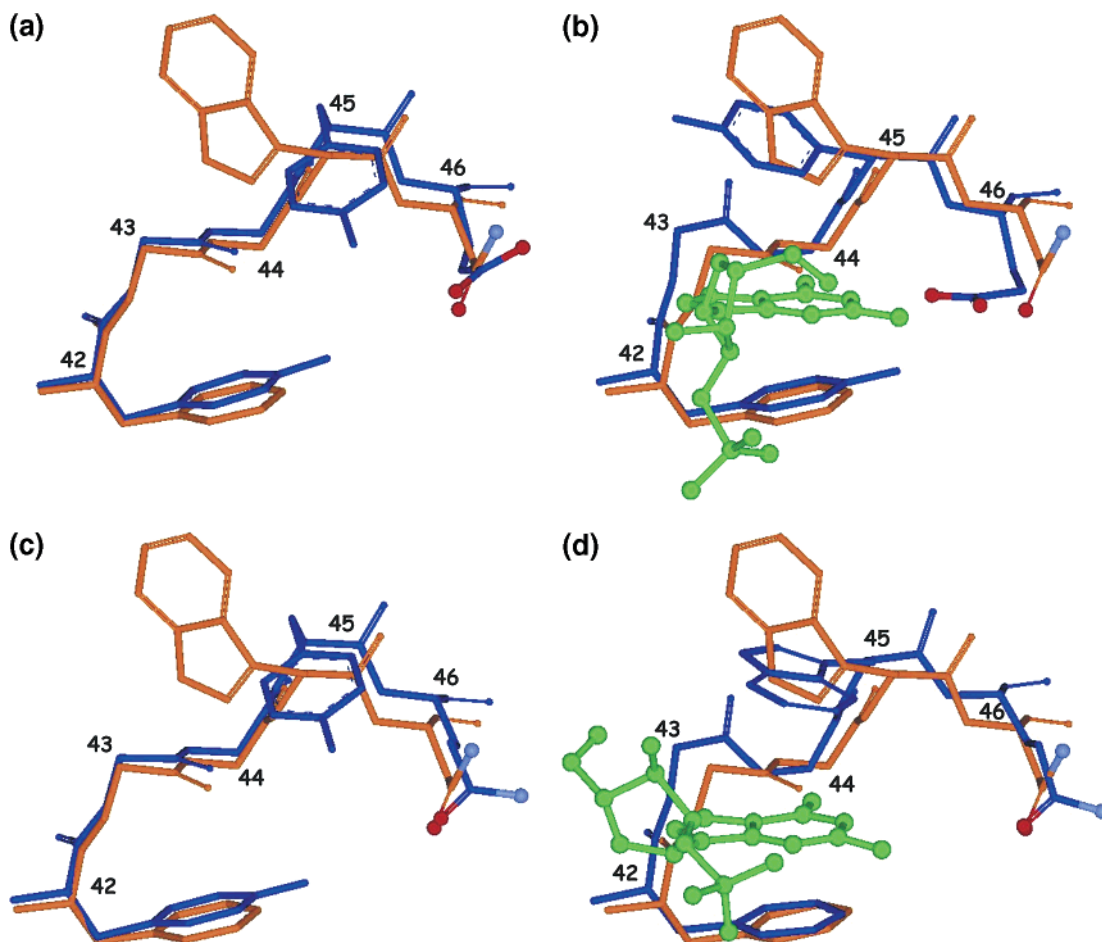


FIGURE 3: Comparison of the primary recognition sites of RNase T1 RV variants (orange) with previously determined structures (blue): (a) unoccupied RNase T1-wt, (b) RNase T1-wt complexed with 2'-GMP (note the change in the Tyr45 side chain relative to the unoccupied enzyme in panel a), (c) variant E46Q complexed with 2'-GMP (nucleotide not shown), and (d) variant 9/5 in complex with 2'-GMP. Amino acid side chains are drawn as sticks and bound 2'-GMP molecules as balls and sticks. The oxygen and nitrogen atoms of amino acid 46 are in red and light blue, respectively.

superposition of these three molecules shown in Figure 2 reveals, above all, significant differences within the nucleotide recognition loop (residues 41–46), indicating different sets of conformations, as the electron density for this region is well-defined in all three molecules. The abnormal disorder of the side chain of Val78 that was described for RNase T1-wt with an unoccupied primary recognition site (10, 12) was not observed for variant RV.

Geometry of the Primary Recognition and Catalytic Site

Primary Recognition Site. The primary nucleotide recognition site of RNase T1 RV adopts a conformation similar to that found in other unoccupied recognition sites in RNase T1 (10–13). The crucial amino acid Glu46 in RNase T1-wt undergoes an induced fit during nucleotide binding. In the enzyme with an unoccupied recognition site, Glu46 is pulled out of this site to form hydrogen bonds with Asn99 and Phe100 (Figures 3a and 4a). In the presence of 2'-GMP in the primary recognition site, Glu46 is hydrogen-bonded to the guanine base (Figures 1a, 3b, and 4b). In the nearly inactive variant Glu46Gln (Figures 3c and 4c) and also in active variant 9/5 (Figures 3d and 4d), the glutamine in position 46 is held in the same conformation as in the uncomplexed wt enzyme. This is probably the result of a tight bidentate hydrogen bonding interaction between Gln46 and the backbone of Phe100, even though 2'-GMP is bound

to the active site of the enzyme in the case of variant 9/5. In variant RV, Asn46 seems to be more flexible than Gln46 in variants Glu46Gln and 9/5. The hydrogen bond network and also the conformation of Asn46 differ slightly between the three RNase T1 RV molecules in the asymmetric unit (see Table 2).

Crystal structure analyses of RNase T1 with unoccupied recognition sites revealed an altered orientation of the peptide bond between asparagines 43 and 44 that flips due to the induced fit if guanine enters the binding site. However, in the structure of RNase T1 RV, both characteristic conformations are realized. In molecule C, this peptide bond adopts a conformation comparable to that of the wild-type enzyme with an unoccupied recognition site, whereas in molecule B, this bond rotates by $\sim 110^\circ$, resembling a conformation that is found in the wild-type with bound 2'-GMP. In molecule A, both possibilities are found as alternative conformations (see the electron density map of this area in molecule A in Figure 5). The primary recognition site of RNase T1 RV is filled with three water molecules that fill the nucleotide binding site and are found in similar positions in RNase T1-wt with an unoccupied recognition site (11) as well as in the wt 2'-AMP complex where the nucleotide is bound to the 3'-subsite and stacks on His92 (10).

In the wt 2'-GMP complex, the side chains of Tyr42 and Tyr45 are positioned such that they could form hydrophobic

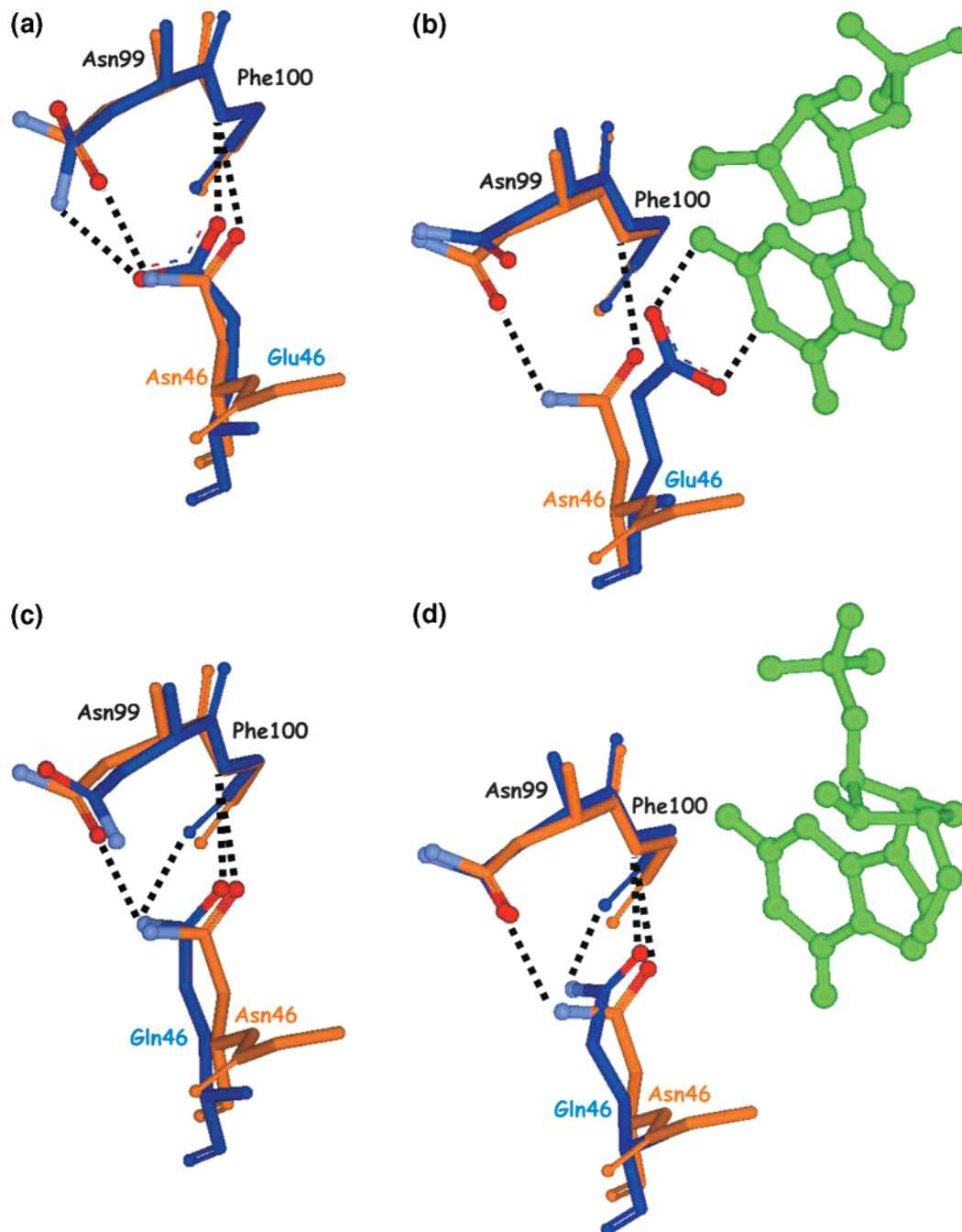


FIGURE 4: Comparison of the interactions of amino acid side chain 46 of RNase T1 RV (orange) with previously determined structures (blue): (a) unoccupied RNase T1-wt, (b) RNase T1-wt complexed with 2'-GMP, (c) variant E46Q complexed with 2'-GMP (nucleotide not shown), and (d) variant 9/5 in complex with 2'-GMP. Amino acid side chains are drawn as sticks and bound 2'-GMP molecules as balls and sticks. The oxygen and nitrogen atoms of amino acid 46 are in red and light blue, respectively.

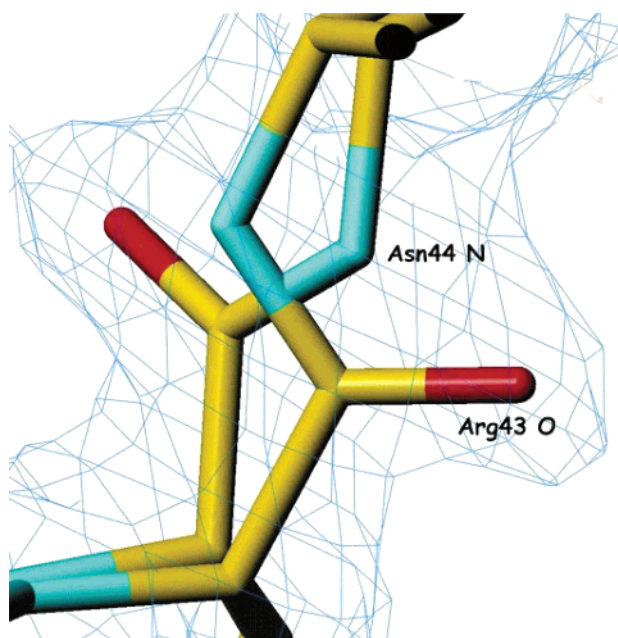
stacking interactions with the guanine. It is supposed that the side chain of Tyr45 acts as a lid that covers the nucleobase (11, 17). Because of the conformation of Glu46 in unoccupied RNase T1-wt, Tyr45 is pulled toward this recognition site (Figure 3a,b). In the nearly inactive variant Glu46Gln, this conformation is locked because of the bidentate hydrogen bond of Gln46, and consequently, the binding of the guanine and also adenine is not possible. In variant RV, the tryptophan at position 45 shows a high flexibility as shown by the different conformations within molecules A–C and by the slight disorder indicated by the electron density of Trp45 in molecules B and C. However, Phe42 as part of the protein core exhibits a rigid conformation. The similar positions of Phe42 in the three molecules

in the T1 RV crystals and of the corresponding Tyr42 in the wt enzyme indicate the importance of the phenyl ring system and its conformational rigidity for RNase T1 activity. The Tyr42Trp substitution led to a variant with a strongly decreased turnover number for GpC cleavage (14).

Catalytic Site. The catalytic site of RNase T1 is formed by Tyr38, His40, Glu58, Arg77, and His92, which bind the phosphate moiety of the nucleotide. In RNase T1 RV at this position, a Tris molecule is bound in molecules A and C (see Figure 6). There is a good superposition of the Tris molecule in variant RV onto the phosphate moiety of 2'-GMP and 3'-GMP in the wt enzyme. All oxygens and the nitrogen of the Tris molecule are engaged in hydrogen bonding (see Table 3). The amino acid side chains of the

Table 2: Possible Hydrogen Bonding Interactions of Asn46 of the Three Molecules

atom of Asn46	hydrogen bonding partner	distance (Å)
Molecule A		
N (main chain)	water91	2.86
Oδ1	F100 N	2.86
	water91	2.85
Nδ2	N99 Oδ1	2.92
	N98 Oδ1	3.14
O (main chain)	N99 Nδ2	2.98
Molecule B		
N (main chain)	water93	2.98
Oδ1	F100 N	3.01
	water93	2.66
Nδ2	N99 Oδ1	3.28
O (main chain)	N99 Nδ2	2.98
Molecule C		
N (main chain)	water57	2.73
Nδ2	water43	3.54
	N66 Oδ1	3.24

FIGURE 5: Electron density map ($2F_o - F_c$) around the Arg43–Asn44 peptide bond showing the alternative conformations of this peptide bond in molecule A. Nitrogen atoms are in cyan, oxygen atoms in red, and carbon atoms in yellow.

catalytic site are not only involved in binding Tris but also engaged in intramolecular hydrogen bonds with His40, His92, and Arg77 stabilized by side chain–main chain interactions and a salt bridge between Arg77 and Glu58 (see Table 3). Similar interactions are also found in uncomplexed RNase T1-wt (12) as well as in the vanadate (11) and 2'-AMP complexes (10), whereas binding of the Tris molecules is similar to the binding of the vanadate ion and the phosphate moiety of 2'-AMP. In the catalytic site of molecule B that has no bound Tris, these interactions are formed with water molecules occupying the corresponding binding sites (see Table 3). The conformations of His40 and His92 involved in catalysis are nearly the same in all variants. However, their imidazole rings are flipped with respect to the RNase T1-wt–2'-GMP complex (6), whereas conformations comparable to those in variant RV are found in the unoccupied RNase T1-wt (12).

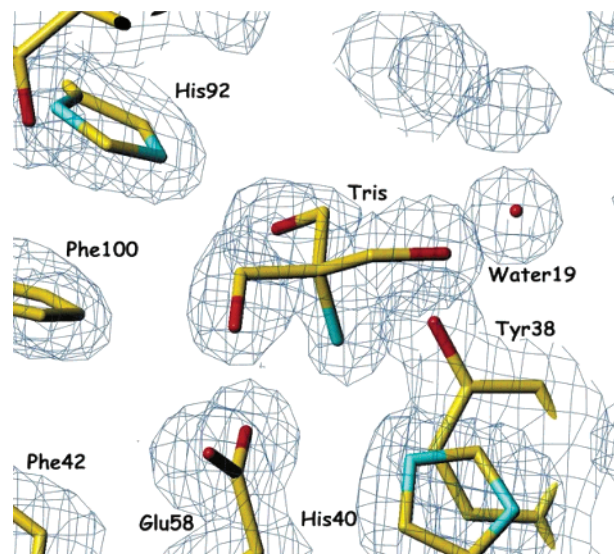
FIGURE 6: Electron density map ($2F_o - F_c$) of the catalytic site of molecule A with the bound Tris molecule. Nitrogen atoms are in cyan, oxygen atoms in red, and carbon atoms in yellow.

Table 3: Possible Hydrogen Bonding Interactions (distances in angstroms) between Catalytic Site Residues within the Three Molecules

		molecule A		molecule B		molecule C
Y38 Oη	water19	2.61	water122	3.33	Tris O2	3.15
	Tris N	2.83	water209	2.65	Tris N	2.90
	R77 Nη2	3.17	R77 Nη2	3.25	R77 Nη2	3.16
H40 Nδ	N36 O	3.03	N36 O	2.91	E41 O	3.06
	S37 O	3.14	S37 O	2.86		
H40 Nε	Tris N	3.05				
E58 Oε1	Tris N	2.66	water122	3.75	Tris O3	3.04
	R77 Nε	3.03	R77 Nε	3.12	water64	2.87
E58 Oε2	Tris O3	2.70	water95	2.64	Tris O2	2.78
	water185	3.75	water108	3.19	R77 Nε	2.71
R77 Nη1	D76 O	2.79	D76 O	2.71	D76 O	2.83
	G74 O	2.89	G74 O	3.11	G74 O	2.88
R77 Nη2	Tris O2	2.73	N83 Oδ1	2.92	Tris O2	2.81
	G74 O	3.07	G74 O	3.16	G74 O	3.14
	Y38 Oη	3.17	Y38 Oη	3.25	Y38 Oη	3.16
H92 Nδ	N99 O	2.88	N99 O	2.96	N99 O	2.98
H92 Nε	Tris O2	2.57	water122	3.18	Tris O2	3.02

Cation Binding and Water Molecules. In RNase T1 RV, we found 274 water molecules that are hydrogen bonded to the three protein backbones, the side chains, and Tris molecules. The unoccupied primary recognition sites and the unoccupied catalytic site in molecule B are filled with water molecules that were also described for corresponding crystal structures. A comparison of RNase T1 structures in complex with 2'-GMP, 2',5'-GpG, and vanadate indicated that there are structurally conserved water molecules (37). The reported hydrogen-bonded chain of 10 water molecules is also found partly in RNase T1 RV. In the wt enzyme, this chain can be divided into two parts, of which the first five water sites are also found in variant RV. This part of the water chain is thought to act as a space filler between the α-helix and the hairpin-like structure of the segment of residues 60–68. In RNase T1-wt, the water molecules of the second part are arranged around a Ca²⁺ ion coordinated to the Asp15 carboxylate. In RNase T1 RV, no cation is bound to the enzyme. Calcium ions were not added to the crystallization buffer as several crystallization experiments in the presence of calcium ions failed, in agreement with the finding that

Table 4: Kinetic Constants for Dinucleoside Phosphate Transesterification and RNA Hydrolysis of the RNase Wild-Type Enzyme and Variants RV, E46Q, and 9/5

enzyme	RNA hydrolysis ^a specific activity (units/mg)	GpC ^a			ApC ^a			specificity ratio [$k_{cat}/K_m(\text{GpC})$]/ [$k_{cat}/K_m(\text{ApC})$]
		K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)	
wild-type ^b	384000 ^d (100)	135 (100)	10200 (100)	750×10^5 (100)	— ^f	— ^f	264 (100)	284000
E46Q ^c	nd ^e	116 (85.9)	20 (0.2)	170.7×10^3 (0.23)	nd ^e	nd ^e	nd ^e	
9/5 ^d	7091 (1.8)	979 (725.2)	444 (4.35)	453.5×10^3 (0.59)	nd ^e	nd ^e	nd ^e	
Glu46Ser/(insert)Gly ^b	nd ^e	— ^f	— ^f	222×10^3 (0.29)	— ^f	— ^f	2280 (863)	97
RV	5644 (1.5)	418 ± 28 (310)	327 ± 22 (3.2)	782.5×10^3 (1.04)	803 ± 63	16 ± 4	19925 (7547)	39

^a Percent of wild-type values in parentheses. ^b From ref 39. ^c From ref 13. ^d From ref 21. ^e Not determined. ^f Only k_{cat}/K_m could be determined.

the occupancy of these binding sites strongly depends on the crystal lattice (38). Indeed, Ca^{2+} is bound to Asp15 only in crystals of crystal form I, space group $P2_12_12_1$. In variant 9/5 that forms crystals that are not isomorphous to other variants, a Ca^{2+} is not bound to Asp15 but to the phosphate binding site of the enzyme.

Enzyme Kinetics

To determine the substrate specificity of variant RV, the hydrolysis of ApC and GpC was assessed and cleavage products were analyzed by thin-layer chromatography. The incubation of the enzyme with both dinucleoside phosphates for 15 min at room temperature yielded a significant hydrolysis of ApC as well as of GpC detected by the release of cytosine, whereas RNase T1-wt showed no detectable hydrolysis of ApC under the same conditions. To determine the steady state kinetic parameters, the dinucleoside phosphates were incubated with the enzyme for 10 min at 25 °C.

The kinetic constants determined for the dinucleoside phosphate cleavage from the spectrophotometric measurements as well as the RNA hydrolysis activities are summarized in Table 4, together with the corresponding kinetic parameters for RNase T1-wt and variants Glu46Gln, 9/5, and Glu46Ser/(insert)Gly (13, 21, 39).

The values of k_{cat} indicate that variant RV exhibits 3.2% GpC transesterification activity with respect to RNase T1-wt, whereas the value of k_{cat}/K_m decreases to 1% due to the increased value of K_m . If the RNA hydrolysis is compared, variant RV shows 1.5% of the wt activity. When compared to those of variant 9/5, the RNA hydrolysis and the value of k_{cat} differ only slightly. The substitution at position 46 therefore seems to have no effect on the velocity of the cleavage reaction, but the value of K_m for variant RV (Asn46) with GpC as the substrate is only approximately half of that for variant 9/5 (Gln46). This significant decrease in K_m indicates that Asn46 in variant RV participates in substrate recognition in contrast to Gln46 in variant 9/5 which was shown to be tightly hydrogen bonded to the backbone of Phe100 in the crystal structure of the variant 9/5–2'-GMP complex (21).

With variant RV, it was possible for the first time to determine single steady state kinetic parameters for a RNase T1 variant with ApC as the substrate. Kinetic analysis of ApC hydrolysis by variant RV results in an ~2-fold increased value of K_m compared to that of the hydrolysis of GpC. The k_{cat} of ApC cleavage is 16 min^{-1} , resulting in a k_{cat}/K_m value of $\sim 2 \times 10^4 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ with ApC.

Another approach to changing the specificity of RNase T1 has been the enlargement of the binding site by the insertion of an additional random amino acid between positions 46 and 47 while position 46 was randomized as well. This led to variants with GpC/ApC specificity ratios of this library ranging from 2.84×10^5 for the wild-type to 97 for variant Glu46Ser/(insert)47Gly (39). Due to the very low enzymatic activity of this variant, individual kinetic parameters could not be determined. The decrease in the specificity constant (k_{cat}/K_m) for GpC cleavage to $222 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (0.29% of the wt value) and the 8-fold increase in this constant for ApC cleavage result in this increased specificity ratio. The authors suggested that the reduction of the specificity ratio is more due to a decrease in the level of guanine recognition rather than to an increase in the level of adenine recognition. In variant RV, however, the increase in the activity for ApC is similar to the decrease in the activity for GpC. Compared to that of RNase T1-wt, the k_{cat}/K_m value for ApC cleavage was increased ~75-fold and the k_{cat}/K_m value for the GpC cleavage was reduced ~96-fold, resulting in a specificity ratio that was reduced 7250-fold.

CONCLUSIONS

Mutagenesis studies with RNase T1 performed so far show that there is no reliable way to predict amino acid substitutions leading to a desired altered specificity. Changing the substrate specificity of RNase T1 by a rational approach is difficult because the substrate recognition is mainly based on interactions with the peptide backbone. Both rational engineering and random mutagenesis did lead to a change in only the activity but not the specificity of the enzyme. In the work presented here, these two approaches were combined, and the RNase T1 RV was generated with a remarkable shift from guanine to purine specificity as shown by dinucleoside phosphate cleavage experiments. The values of K_m for the cleavage of dinucleoside phosphates ApC and GpC differ only by a factor of 2, whereas it is not possible to determine the value of K_m for the ApC cleavage of the wt enzyme or any RNase T1 variant known so far.

The starting point for this work was the well-characterized guanosine-specific RNase T1 variant 9/5 that arose from a random mutagenesis study (20, 21) that differs from the wild-type in five amino acid positions within the guanine recognition loop. In this work, the specificity of this variant was changed by a further single-point mutation (Gln46Asn) within this recognition loop. Unfortunately, cocrystallization experiments with 2'-AMP and 2'-GMP have not been successful so far, but the crystal structure of the new variant without a bound nucleotide was determined and is in good

agreement with the kinetic and binding data (not shown). The primary recognition site resembles those that were found in all other structures of RNase T1 with an unoccupied primary recognition site. The tight hydrogen bonding of the amide group of glutamine in variants E46Q and 9/5 with the protein backbone of Phe100, however, was not observed with Asn46 variant RV (Figure 3c,d). Instead, the three molecules in the crystal asymmetric unit indicate a conformational flexibility of this region. The superposition of RNase T1 RV with variant 9/5 as well as with variant E46Q shows that the predicted loss of the ability to form the discussed H-bond due to the shortened amino acid side chain of Asn46 has not occurred and is compensated by a shift of the protein backbone. The conformations of Asn46 in variant RV and Gln46 in variants 9/5 and E46Q are nearly identical with respect to the amide group and the formation of the hydrogen bond between the backbone nitrogen of Phe100 and Gln O ϵ 1 and Asn O δ 1, respectively. The second formed hydrogen bond, however, is different as Gln N ϵ 2 is bound to the backbone oxygen of Phe100 in variants 9/5 and E46Q. By contrast in variant RV, Asn46 N δ 2 forms a hydrogen bond to O δ 1 of Asn99, comparable to the wt enzyme with an unoccupied recognition site except that the headgroup of Asn99 is rotated in the wild-type and therefore its N δ 2 is able to form a hydrogen bond to Glu46 O ϵ 2. A superposition shows good agreement of Asn46 in variant RV and Glu46 in the wt with an unoccupied recognition site (Figure 4a). Comparison of the structures of the RNase T1–2'-GMP complex (6) and the uncomplexed enzyme (11, 12) shows that in RNase T1-wt Glu46 changes its conformation when a nucleotide binds, and due to a similar conformation of Asn46, the same should hold for variant RV so that an interaction of Asn46 with guanine and with adenine should be possible, the latter causing the observed altered specificity. However, the mode of interaction of Asn46 with adenine and also with guanine needs to be determined.

Furthermore, the kinetic data also show the participation of Asn46 in the specific recognition of the nucleobase because of the halved value of K_m for GpC cleavage and a similar one for ApC cleavage compared to the K_m of variant 9/5 for GpC cleavage. Although the enzyme distinguishes in its binding only slightly between adenosine and guanosine, the cleavage rates of ApC and GpC differ considerably. Differences in the conformations of nucleotides adenosine and guanosine and therefore different positions of cleavable phosphodiester bonds are probably the reasons for this behavior because it is well-known that AMP prefers the anti whereas GMP prefers the syn conformation of the base relative to sugar (40). Moreover, the adenine is probably not saturated with hydrogen bonds, and due to the steric proximity of the peptidic N–H bond of both Arg43 and Asn44 and the N $_6$ amino group of adenosine (see Figure 1b), the base is presumably shifted somewhat or fully out of the binding pocket. A similar shift was also observed in variant 9/5 due to the narrowing of the guanine recognition site (21). An additional reason for such a shift of adenine is the possibility of the formation of a new hydrogen bond between adenine and the protein backbone. From RNase T1-wt, it is known that it undergoes an induced fit during binding of its substrate indicated by conformational changes of Tyr45 and Glu46 (see above) as well as a flip of the peptide group between Asn43 and Asn44 (11). This flip is energetically

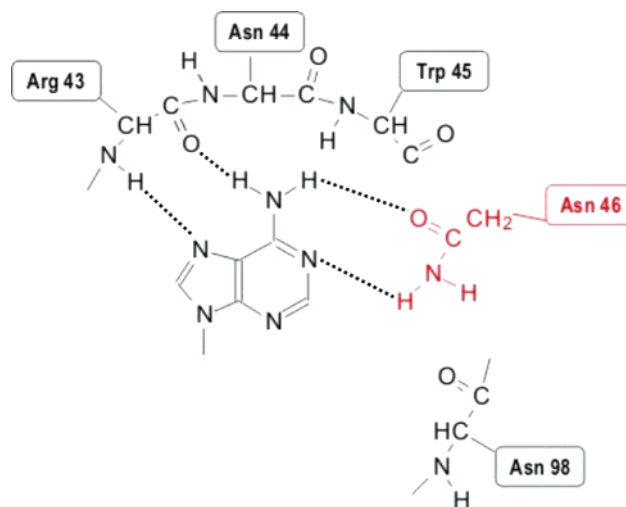


FIGURE 7: Sketch of the possible interaction of the adenine base with RNase T1 RV (note the additional possible hydrogen bond due to the flipped peptide bond between Arg43 and Asn44 in comparison to Figure 1b).

unfavorable as a left-handed helical conformation is introduced. If the flip would not occur when adenine binds, the formation of an additional hydrogen bond between N6 of adenine and N43-O is possible, resulting in a stabilization of adenine binding (Figure 7).

Variant RV exhibits the greatest reduction of the G/A specificity ratio observed for any variant to date and also is a purine-specific RNase T1 variant with the highest enzymatic activity. According to this, variant RV is the first variant of RNase T1 for which it was possible to determine single kinetic constants for the cleavage of not only GpC but also ApC; however, the mode of adenine recognition needs to be determined.

REFERENCES

- Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, S., Tishchenko, G., Polyakov, K., and Pavlovskii, S. (1983) The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases, *Trends Biochem. Sci.* 8, 364–369.
- Hartley, R. W. (1980) Homology between prokaryotic and eukaryotic ribonucleases, *J. Mol. Evol.* 15, 355–358.
- Backmann, J., Doray, C. C., Grunert, H. P., Landt, O., and Hahn, U. (1994) Extended kinetic analysis of ribonuclease T1 variants leads to an improved scheme for the reaction mechanism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 213–219.
- Heinemann, U., and Saenger, W. (1983) Crystallographic study of mechanism of ribonuclease T1-catalysed specific RNA hydrolysis, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1, 523–538.
- Heinemann, U., and Saenger, W. (1982) Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1–2'-guanylic acid complex: an X-ray study, *Nature* 299, 27–31.
- Arni, R., Heinemann, U., Tokuoka, R., and Saenger, W. (1988) Three-dimensional structure of the ribonuclease T1 2'-GMP complex at 1.9-Å resolution, *J. Biol. Chem.* 263, 15358–15368.
- Gohda, K., Oka, K., Tomita, K., and Hakoshima, T. (1994) Crystal structure of RNase T1 complexed with the product nucleotide 3'-GMP. Structural evidence for direct interaction of histidine 40 and glutamic acid 58 with the 2'-hydroxyl group of the ribose, *J. Biol. Chem.* 269, 17531–17536.
- Heydenreich, A., Koellner, G., Choe, H. W., Cordes, F., Kisker, C., Schindelin, H., Adamiak, R., Hahn, U., and Saenger, W. (1993) The complex between ribonuclease T1 and 3'-GMP suggests geometry of enzymic reaction path. An X-ray study, *Eur. J. Biochem.* 218, 1005–1012.
- Koepke, J., Maslowska, M., Heinemann, U., and Saenger, W. (1989) Three-dimensional structure of ribonuclease T1 complexed

- with guanylyl-2',5'-guanosine at 1.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 206, 475–488.
10. Ding, J., Koellner, G., Grunert, H. P., and Saenger, W. (1991) Crystal structure of ribonuclease T1 complexed with adenosine 2'-monophosphate at 1.8-Å resolution, *J. Biol. Chem.* 266, 15128–15134.
 11. Kostrewa, D., Choe, H. W., Heinemann, U., and Saenger, W. (1989) Crystal structure of guanosine-free ribonuclease T1, complexed with vanadate (V), suggests conformational change upon substrate binding, *Biochemistry* 28, 7592–7600.
 12. Martinez-Oyanedel, J., Choe, H. W., Heinemann, U., and Saenger, W. (1991) Ribonuclease T1 with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 222, 335–352.
 13. Granzin, J., Puras-Lutzke, R., Landt, O., Grunert, H. P., Heinemann, U., Saenger, W., and Hahn, U. (1992) RNase T1 mutant Glu46Gln binds the inhibitors 2'GMP and 2'AMP at the 3' subsite, *J. Mol. Biol.* 225, 533–542.
 14. Grunert, H. P., Landt, O., Zirpel-Giesebrecht, M., Backmann, J., Heinemann, U., Saenger, W., and Hahn, U. (1993) Trp59 to Tyr substitution enhances the catalytic activity of RNase T1 and of the Tyr to Trp variants in positions 24, 42 and 45, *Protein Eng.* 6, 739–744.
 15. Hakoshima, T., Tanaka, M., Itoh, T., Tomita, K. I., Amisaki, T., Nishikawa, S., Morioka, H., Uesugi, S., Ohtsuka, E., and Ikehara, M. (1991) Hydrophobic effects on protein/nucleic acid interaction: enhancement of substrate binding by mutating tyrosine 45 to tryptophan in ribonuclease T1, *Protein Eng.* 4, 793–799.
 16. Loverix, S., Doumen, J., and Steyaert, J. (1997) Additivity of protein-guanine interactions in ribonuclease T1, *J. Biol. Chem.* 272, 9635–9639.
 17. Nishikawa, S., Morioka, H., Kimura, T., Ueda, Y., Tanaka, T., Uesugi, S., Hakoshima, T., Tomita, K., Ohtsuka, E., and Ikehara, M. (1988) Increase in nucleolytic activity of ribonuclease T1 by substitution of tryptophan 45 for tyrosine 45, *Eur. J. Biochem.* 173, 389–394.
 18. Steyaert, J., Opsomer, C., Wyns, L., and Stanssens, P. (1991) Quantitative analysis of the contribution of Glu46 and Asn98 to the guanosine specificity of ribonuclease T1, *Biochemistry* 30, 494–499.
 19. Hirono, S., and Kollman, P. A. (1991) Relative binding free energy calculations of inhibitors to two mutants (Glu46→Ala/Gln) of ribonuclease T1 using molecular dynamics/free energy perturbation approaches, *Protein Eng.* 4, 233–243.
 20. Hubner, B., Haensler, M., and Hahn, U. (1999) Modification of ribonuclease T1 specificity by random mutagenesis of the substrate binding segment, *Biochemistry* 38, 1371–1376.
 21. Höschler, K., Hoier, H., Hubner, B., Saenger, W., Orth, P., and Hahn, U. (1999) Structural analysis of an RNase T1 variant with an altered guanine binding segment, *J. Mol. Biol.* 294, 1231–1238.
 22. Landt, O., Grunert, H. P., and Hahn, U. (1990) A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction, *Gene* 96, 125–128.
 23. Quaas, R., McKeown, Y., Stanssens, P., Frank, R., Blocker, H., and Hahn, U. (1988) Expression of the chemically synthesized gene for ribonuclease T1 in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector, *Eur. J. Biochem.* 173, 617–622.
 24. Landt, O., Zirpel-Giesebrecht, M., Milde, A., and Hahn, U. (1992) Improving purification of recombinant ribonuclease T1, *J. Biotechnol.* 24, 189–194.
 25. Zabinski, M., and Walz, F. G., Jr. (1976) Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T: kinetic studies using GpC and GpU as substrates, *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 558–564.
 26. Imazawa, M., Irie, M., and Ukita, T. (1968) Substrate specificity of ribonuclease from *Aspergillus saitoi*, *J. Biochem.* 64, 595–602.
 27. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.* 4, 2411–2423.
 28. Anfinsen, C. B., Redfield, R. R., Choate, W. L., Page, J., and Carroll, W. R. (1964) Studies on the cross structure, cross-linkages and terminal sequences in ribonuclease, *J. Biol. Chem.* 207, 201–210.
 29. McPherson, A. (1982) *The preparation and analysis of protein crystals*, John Wiley, New York.
 30. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276, 307–326.
 31. Rossmann, M. G. (1972) *The molecular replacement method: A collection of papers on the noncrystallographic symmetry*, Gordon and Breach, New York.
 32. Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement, *Acta Crystallogr.* A50, 157–163.
 33. Collaborative Computational Project (1994) The CCP4 Suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr.* D50, 760–763.
 34. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr.* D54, 905–921.
 35. Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models into electron density maps and the location of errors in these models, *Acta Crystallogr.* A47, 110–119.
 36. Brunger, A. T. (1992) The free R-value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature* 355, 472–475.
 37. Malin, R., Zielenkiewicz, P., and Saenger, W. (1991) Structurally conserved water molecules in ribonuclease T1, *J. Biol. Chem.* 266, 4848–4852.
 38. Deswarte, J., De Vos, S., Langhorst, U., Steyaert, J., and Loris, R. (2001) The contribution of metal ions to the conformational stability of ribonuclease T1: crystal versus solution, *Eur. J. Biochem.* 268, 3993–4000.
 39. Kumar, K., and Walz, F. G., Jr. (2001) Probing functional perfection in substructures of ribonuclease T1: double combinatorial random mutagenesis involving Asn43, Asn44, and Glu46 in the guanine binding loop, *Biochemistry* 40, 3748–3757.
 40. Saenger, W. (1984) *Principles of Nucleic Acid Structures*, Springer-Verlag, Berlin.

BI035961F

Addressing the Challenge of Changing the Specificity of RNase T1 with Rational and Evolutionary Approaches

Marc Struhalla, Rico Czaja und Ulrich Hahn

ChemBioChem, **5**, 200-205

Abstract

Although ribonuclease T1 (RNase T1) is one of the best-characterized proteins with respect to structure and enzymatic action, numerous attempts at altering the specificity of the enzyme to cleave single-stranded RNA at the 3'-side of adenylic instead of guanylic residues by rational approaches have failed so far. Recently we generated and characterized the RNase T1 variant RV with a 7200-fold increase in adenylyl-3',5'-cytidine (ApC)/guanylyl-3',5'-cytidine (GpC) preference, with the guanine-binding loop changed from 41-KYNNYE-46 (wt) to 41-EFRNWN-46. Now we have introduced the asparagine residue at position 46 of the wild-type enzyme as a single-point mutation in variant E46N and in combination with the Y45W exchange also occurring in RV. Both variants show an improved ApC/GpC preference with a 1450-fold increase for E46N and a 2100-fold increase for Y45W/E46N in comparison to wild-type activity. We also addressed the challenge of altering enzyme specificity with an evolutionary approach. We have randomly introduced point mutations into the RNase T1 wildtype gene and into the gene of the variant RV with different mutation rates. Altogether we have screened about 100 000 individual clones for activity on RNase indicator plates; 533 of these clones were active. A significant change in substrate specificity towards an ApC preference could not be observed for any of these active variants; this demonstrated the magnitude of the challenge to alter the specificity of this evolutionary perfected enzyme.

Purine activity of RNase T1RV is further
improved by substitution of Trp59 by
tyrosine

Rico Czaja, Markus Perbandt, Christian Betzel und Ulrich Hahn

Biochem Biophys Res Commun, **336**, 882-889

Purine activity of RNase T1RV is further improved by substitution of Trp59 by tyrosine

R. Czaja, M. Perbandt, C. Betzel, U. Hahn *

Department of Chemistry, Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg, Germany

Received 16 August 2005

Available online 2 September 2005

Abstract

Ribonuclease T1 is an enzyme that cleaves single-stranded RNA with high specificity after guanylyl residues. Although this enzyme is a very good characterized protein with respect to structure and enzymatic function, we were only recently successful in generating RNase T1-RV, a variant where the specificity was changed from guanine to purine. As this change of substrate specificity was made at the cost of activity, the aim was now to further improve the overall activity of the enzyme. Therefore, we have substituted the tryptophan in position 59 by tyrosine. This substitution led to an increase of enzymatic activity in comparison to variant RV to 425%. As the extent of this enhancement is unique so far we have crystallized and analyzed the structure of this variant in order to get more insights into the reasons for this. Here, we present the crystal structure of this so-called RNase T1-R2 at 2.1 Å resolution. The structure was determined by molecular replacement using the coordinates of the RV variant (PDB entry: 1Q9E). The data were refined to an *R*-factor of 18.7% and *R*_{free} of 24%, respectively. The asymmetric unit contains three molecules and the crystal packing is very similar to that of variant RV. © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Protein design; Mutagenesis; Enzyme specificity; Ribonuclease T1; X-ray crystallography

Ribonuclease T1 (RNase T1, EC 3.1.27.3) is the key member of a family of microbial RNases with prokaryotic and eukaryotic origin, respectively [1–3]. This enzyme from the slime mold *Aspergillus oryzae* cleaves single-stranded RNA with high specificity at the 3'-site of guanylyl residues in a two-step mechanism. The first one is a transesterification of the phosphodiester bond yielding a 2',3'-cyclic phosphate. The cyclic phosphate is then hydrolyzed in a second and rate-limiting step yielding the 3'-phosphate product.

The structures of the enzyme complexed with guanosine-2'-monophosphate [4,5], guanosine-3'-monophosphate [6,7], guanosine-3',5'-bisphosphate [8], guanosine [9], guanylyl-2',5'-guanosine [10], adenosine-2'-monophosphate [11], and without any nucleotide [12,13] have been determined. In all complexes, the guanine base is bound to the

enzyme in the primary recognition site (PRS) which is arranged by two loops including residues 42–46 (Tyr-Asn-Asn-Tyr-Glu) and Asn98. The enzyme recognizes the guanine base via the formation of six hydrogen bonds mainly with main chain atoms (Asn43 NH...Gua N7, Asn44 NH...Gua O6, Tyr45 NH...Gua O6, Glu46 Oe1...Gua N1H, Glu46 Oe2...Gua N2H, and Asn98 O...GuaN2H) as well as by hydrophobic interactions with tyrosines 42 and 45 sandwiching the base. However, the complex with adenosine-2'-monophosphate showed that the adenine base does not bind at the PRS but stacks with His92 a residue which is part of the catalytic center. This binding site is thought to be the 3'-subsite of the enzyme [14,10].

A main challenge in RNase T1 research is the alteration of its substrate specificity. The numerous crystal structures have shown that the only amino acid recognizing the base via their side chain is the glutamic acid 46 in addition to the two tyrosines whose hydroxyphenyl residues form unspecific hydrophobic interactions. The glutamic acid 46 is also

* Corresponding author. Fax: +49 40 42838 2848.

E-mail address: uli.hahn@uni-hamburg.de (U. Hahn).

highly conserved within the RNase T1 family [2,15]. This amino acid together with the two tyrosines were therefore the first starting points for mutagenesis studies. However, these rational mutagenesis studies [16–19] as well as random mutagenesis [20–23] did not lead to an altered specificity. But a combination of both—random and rational mutagenesis—resulted in the RNase T1 variant RV [24] with a specificity change from guanine to purine. This variant which contains five mutations within the substrate recognition site cleaves the minimal substrate adenylyl-3',5'-cytidine (ApC) about 75 times better than the wildtype (wt). The simultaneous decrease in guanylyl-3',5'-cytidine (GpC) cleavage activity results in a specificity ratio for A/G of 1:39 in comparison to $1:2.84 \times 10^5$ of the wt. Our aim was now to further improve the enzyme activity. Therefore, we have substituted the Trp59 in variant RV by Tyr yielding RNase T1-R2. The mentioned amino acid substitution is known to lead to higher activities also in other RNase T1 variants [17,25]. This variant RNase T1-R2, which differs from the wt in six positions, shows indeed a higher overall enzymatic activity compared to RV. With RNase T1-R2 we observed so far the biggest increase in enzymatic activity due to a single point mutation.

Materials and methods

Isolation and crystallization. RNase T1-R2 (Lys41Glu Tyr42Phe Asn43Arg Tyr45Trp Glu46Asn Trp59Tyr) was constructed using a two-step PCR as described elsewhere [26] and inserted into the secretion-expression vector pIN-III-ompA2 [27] using the restriction sites *Xba*I and *Hind*III. The mutagenesis primer was 5'-ACG AGC AGT AGC ATC AGT-3' (base substitution underlined). The enzyme was overproduced using the *Escherichia coli* strain TOP10F' (Invitrogen), isolated from the periplasm by osmotic shock, and purified by DEAE anion exchange and size exclusion chromatography to homogeneity [28,29]. Purity and authenticity were judged by SDS-PAGE and MALDI-MS.

The crystals used for data collection were obtained by the hanging drop vapor diffusion method [30]. The protein (2 mM) in Tris/HCl buffer (10 mM, pH 7.5) was initially equilibrated for about an hour at room temperature with 2'-AMP (100 mM). The droplet was prepared by mixing an equal volume of the protein–nucleotide solution and the reservoir solution containing Tris/HCl buffer (100 mM, pH 8.0), CaCl₂ (100 mM), and PEG4000 (25%). Hexagonal crystals grew at 6 °C within 4 or 5 days.

Data collection and structure determination. For cryoprotection during data collection, the crystals were soaked in reservoir solution containing 15% glycerol and 2'-AMP. Data were collected at 100 K from a single crystal at the Consortiums beamline X13 DESY Hamburg. Diffraction data with a limiting resolution of 2.1 Å were measured and processed using the DENZO/SCALEPACK program [31]. The data collection statistics are summarized in Table 1.

The structure was solved by molecular replacement with the program AMoRe [32] of the CCP4-suite [33] using RNase T1-RV (PDB-entry: IQ9E) as search model. The crystals belong to the space group P6₁ with *a* and *b* = 56.5 Å and *c* = 159.2 Å. The Matthews coefficient was calculated to be 2.2 Å³ Da⁻¹ for three molecules in the asymmetric unit with a corresponding solvent content of 43.8%.

Refinement. Refinement of the structure was carried out using the programs REFMAC 5.2.005 [34] and CNS 1.1 [35] with individual isotropic temperature factors against 95% of the data. The remaining randomly excluded reflections were used for cross-validation by means of the *R*_{free}-factor [36]. The model was manually rebuilt using the interactive model building programs O and TURBO-FRODO [37,38]. In later stages of refinement solvent molecules were identified and manually added to the

model. The progress of refinement in each stage was monitored by the decrease in *R*_{free}. The refinement statistics are summarized in Table 1.

Enzyme specificity and kinetics. The substrate specificity was tested by the cleavage of the minimal substrates GpC and ApC. The dinucleoside phosphates (1 mg/ml) were incubated with the enzyme (5 μM) in Tris/HCl buffer (10 mM, pH 7.5) at 37 °C for 10 min. Cleavage products were analyzed by thin layer chromatography [39].

Hydrolysis of high molecular RNA was measured by determining the acid soluble oligonucleotides at 260 nm by a modified test of Anfinsen et al. [40]. A total volume of 1 ml containing yeast RNA (3 mg) in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.5) and EDTA (2 mM) was incubated with the enzyme for 15 min at 37 °C. By addition of 250 μl of ice-cold lanthane nitrate (2.5% w/v) in perchloric acid (30% v/v) the non-hydrolyzed RNA was precipitated on ice for 20 min. After centrifugation, the extinction of the 1:20 diluted supernatant was determined at 260 nm. The specific activity of the enzyme was calculated using the following equation.

$$\text{Specific activity (U/mg)} = \frac{(E_{260} - E_{260(\text{blank})}) \cdot 25}{\text{milligram of protein}}$$

To determine the blank, the enzyme was replaced by buffer.

To determine the kinetic parameters for the cleavage of the minimal substrates, GpC and ApC, the hyperchromic effect during transesterification was measured spectrophotometrically. The reaction was carried out in a Varian Cary 50 spectrophotometer in Mes buffer (100 mM, pH 6.0), NaCl (100 mM), and EDTA (2 mM) at 25 °C. The initial velocities were measured at least as triplicates using a difference extinction coefficient of $\Delta\epsilon_{280\text{nm}} = 2200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for GpC- and $\Delta\epsilon_{268\text{nm}} = 2120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for ApC-transesterification [41,42] at substrate concentrations up to 1200 and 800 μM for GpC- and ApC-hydrolysis, respectively. Depending on the activity the enzyme concentrations were 12.5 nM (GpC) and 200 nM (ApC). The enzyme concentration was measured spectrophotometrically using the calculated extinction coefficient $\epsilon_{280\text{nm}} = 17,670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [43]. The Michaelis–Menten constants were determined by non-linear regression using the program GraphPad Prism.

Results and discussion

Enzyme kinetics

The specificity test assayed by thin layer chromatography revealed for RNase T1-R2, a similar purine specificity, as described for RNase T1-RV [24]. Also this variant cleaves both minimal substrates ApC and GpC. In order to investigate whether the additional amino acid substitution W59Y had effect on the enzymatic activity, the RNA hydrolysis as well as the kinetic parameters for dinucleoside phosphate cleavage were determined.

The unique kinetic parameters *k*_{cat} and *K*_M for the hydrolysis of both substrates could be determined for RNase T1-RV [24]. However, this was not possible in the case of RNase T1-R2. The measured initial velocities increased linearly to the substrate concentrations so no saturation was observed for GpC-hydrolysis within the analyzed concentration range and therefore only the *k*_{cat}/*K*_M-value could be determined for GpC-hydrolysis by RNase T1-R2. In the case of ApC-cleavage, we observed a beginning of substrate saturation but nevertheless we decided to determine also in this case only the *k*_{cat}/*K*_M and no single parameters. The results of the kinetic analysis are summarized in Table 2.

RNase T1-R2 shows activities for the GpC-transesterification of about 4.5% compared to the wildtype but about

Table 1
Data collection, processing, and refinement statistics

Crystallographic data		Refinement	
X-ray source	Consortiums beamline X13 (DESY)	Reflections in working set	15,888 (2620)
Space group	P6 ₁	Reflections in test set	842 (149)
Resolution range	50–2.10	R_{cryst}^a (%)	18.7 (23.3)
Unit cell parameters		R_{free}^b (%)	23.8 (25.8)
$a = b$ (Å)	56.52	Protein atoms	2346
c (Å)	159.21	Water atoms	322
$\alpha = \beta$ (°)	90.0	Ligand atoms	24
γ (°)	120.0	R.m.s.d. bond lengths (Å)	0.008
V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2.2	R.m.s.d. bond angles (°)	1.40
Solvent content (%)	43.8	R.m.s.d. dihedral angles (°)	24.90
Measured reflections	129,408	R.m.s.d. improper angles (°)	0.68
Unique reflections	16,781	Mean B -factor (Å ²)	24.40
Completeness (%)	99.6 (99.9)	Residues in allowed regions (%)	93.4
R_{sym} (%)	12.0 (43.2)	Residues in additional allowed regions (%)	6.6
$I/\sigma(I)$	8.8 (2.6)	PDB entry code	1TTO

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

$$^a R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{hkl} |F(hkl)_{\text{obs}} - F(hkl)_{\text{calc}}|}{\sum_{hkl} F(hkl)_{\text{obs}}}$$

^b $R_{\text{free}} = R_{\text{cryst}}$ for a random 5% of reflections not used in refinement (test set).

Table 2
Kinetic constants for dinucleoside phosphate cleavage and RNA hydrolysis of RNase T1-R2 in comparison to the wildtype and other variants

Enzyme	RNA hydrolysis (% wt activity)	GpC k_{cat}/K_M (min ⁻¹ M ⁻¹)	ApC k_{cat}/K_M (min ⁻¹ M ⁻¹)	Ratio (GpC)/(ApC)
R2	7.5	$33.15 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$	$84,310 \pm 3000$	39
RV	1.5 ^a	782.5×10^{3a}	$19,925^a$	39
wt	100	750×10^{5b}	264^b	284,000
E46Q	17 ^c	170.7×10^{3c}	nd ^e	—
9/5	1.8 ^d	453.5×10^{3d}	nd ^e	—

^a From Czaja et al. [24].

^b From Kumar and Walz [22].

^c From Granzin et al. [16].

^d From Höschler et al. [21].

^e Not determined.

425% compared to variant RV. The relative velocity of ApC-transesterification was about 3200% of wildtype activity and was increased also to 425% of the activity of RV. The RNA hydrolysis activity was enhanced in a similar range as observed for the cleavage of the minimal substrates. These data indicate an increase of the overall activity for RNase T1-R2 in comparison to T1-RV but they show no changed specificity ratio because the ApC-hydrolysis activity was increased to the same extent as the GpC-hydrolysis activity.

As predicted from other variants [17] the substitution of W59 by tyrosine enhances also the activity of RNase T1-RV. The relative activity enhancement of RNase T1-R2 is summarized and compared to the activity enhancement of W59Y substitution in other variants in Fig. 1. It is clearly visible that this substitution increases the enzymatic activity in each of the analyzed enzymes. However, the W59Y substitution leads, with the exception of the H40T variant, only to an increase in activity from about 110% to about 165% whereas this variation in RV led to more than a 4-fold activity increase. The changes in the activity of the H40T variant must

be explained probably in a different way because in this case a catalytically active amino acid is involved.

The W59Y substitution in variant RV provided the highest increase in activity observed so far. This activity enhancement is also remarkable when considering that only the k_{cat}/K_M -value could be determined. Due to the fact we did not reach the zone of real substrate saturation, especially the value of k_{cat} must have been increased more than “only” 4-fold—a value much higher than that observed for any other W59Y variant.

Overall structure, geometry of the catalytic, and primary recognition site

In order to investigate this enhancement in activity also on structural level, we have crystallized this variant and analyzed the structure at 2.1 Å resolution. The crystals of RNase T1-R2 belong to the hexagonal space group P6₁. The final model consists of three individual molecules in the asymmetric unit, each with one bound Tris molecule in the catalytic pocket.

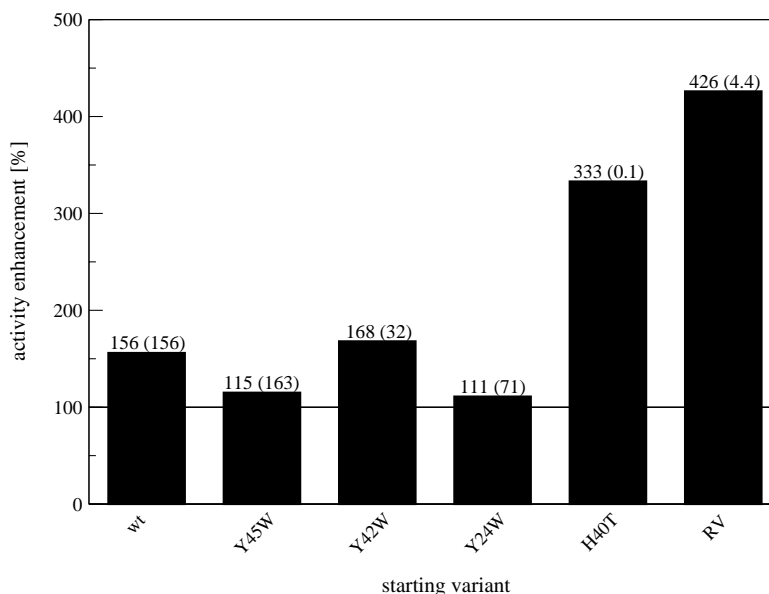


Fig. 1. Enhancement of the activity (k_{cat}/K_M) by W59Y replacement. The diagram shows the relative activities of the Y59 variants compared to those of the W59 variants (starting variant). Values in parentheses show the relative activities compared to the wildtype activity.

For the RNase T1 molecules the average temperature factors for all atoms were 19.22 \AA^2 (chain A), 24.96 \AA^2 (chain B), and 22.41 \AA^2 (chain C). The temperature factors of the water molecules were in the range from 4.31 to 53.56 \AA^2 and the average temperature factor was 32.34 \AA^2 . A plot of the average main chain B -factors for each residue is shown in Fig. 2.

The atomic parameters were deposited at the Protein Data Bank (PDB entry 1TTO). The ϕ and ψ torsion angles of all residues were located in the allowed regions of the Ramachandran plot. The overall structure of the three molecules in the asymmetric unit is very similar. The r.m.s. deviation for the superposition of the C_α atoms of chains B and C onto chain A was 0.43 and 0.59 \AA , respectively. The r.m.s. deviation for the superposition of the C_α atoms of chain C onto chain B was 0.55 \AA . The superposition of these three molecules is shown in Fig. 3. Although the enzyme was cocrystallized with the nucleotide 2'-AMP, no nucleotides were found in the crystal structure. Instead, we found residual electron density in each of the three molecules within the catalytic site that was associated with Tris molecules. The active site amino acids are Glu58 and His92 which catalyze RNA-cleavage by a general acid–base mechanism. However, the whole catalytic pocket is formed by the amino acids Tyr38, His40, Glu58, Arg77, His92, and Phe100. Normally, the phosphate moiety of the scissile phosphodiester bond binds in this pocket. But in the structure of RNase T1-R2, we have found instead bound Tris which was a component of the purification and crystallization buffer. The Tris molecules have taken positions which are occupied by the phosphate moiety of 2'-GMP or 3'-GMP in nucleotide complexed structures (Fig. 4). They are also bound in a similar manner as it was observed in the structure of T1-RV too [24]. But whereas in the struc-

ture of RV the Tris is bound only at chains A and C, in the R2 structure each chain of the asymmetric unit has bound a Tris molecule.

The comparison of the backbone conformation of the three chains of the asymmetric unit showed that the deviations occurred mainly in the loops flanking the active site (primary recognition site as well as catalytic site). Above all the amino acid residues 43–49 (r.m.s.d. 1.08 \AA) and 95–99 (r.m.s.d. 0.93 \AA) showed the highest differences in their backbone conformations. Another region with slight differences in the backbone conformation was located near the catalytic site, namely in the loop regions 33–38 (r.m.s.d. 0.34 \AA) and 69–73 (r.m.s.d. 0.61 \AA) whereas the actual catalytic amino acids did not show any differences in their backbone conformation.

The substituted amino acid in position 59 is located in the hydrophobic core of the protein and adjacent to the catalytic amino acid residue Glu58. A comparison of the structure of RNase T1-R2 with the very similar RV structure as well as with different wildtype structures showed that the tyrosine in position 59 has occupied a very similar position as it was previously described for the tryptophan. The aromatic rings of both the tryptophan and the tyrosine were located in the same plane (Fig. 4). This tyrosine 59 is also one of the amino acids with the lowest flexibility indicated by their temperature factor (Fig. 2).

The conformation of the PRS which is mainly built of the amino acids 42–46 was also very similar to that of RNase T1-RV. As no nucleotide has bound to this site most of the hydrogen bonds normally formed with the nucleotide were displaced in this structure by hydrogen bonds with water molecules. The PRS in RNase T1-R2 was occupied by four water molecules. Three of these water molecules have taken positions of the guanine base. One

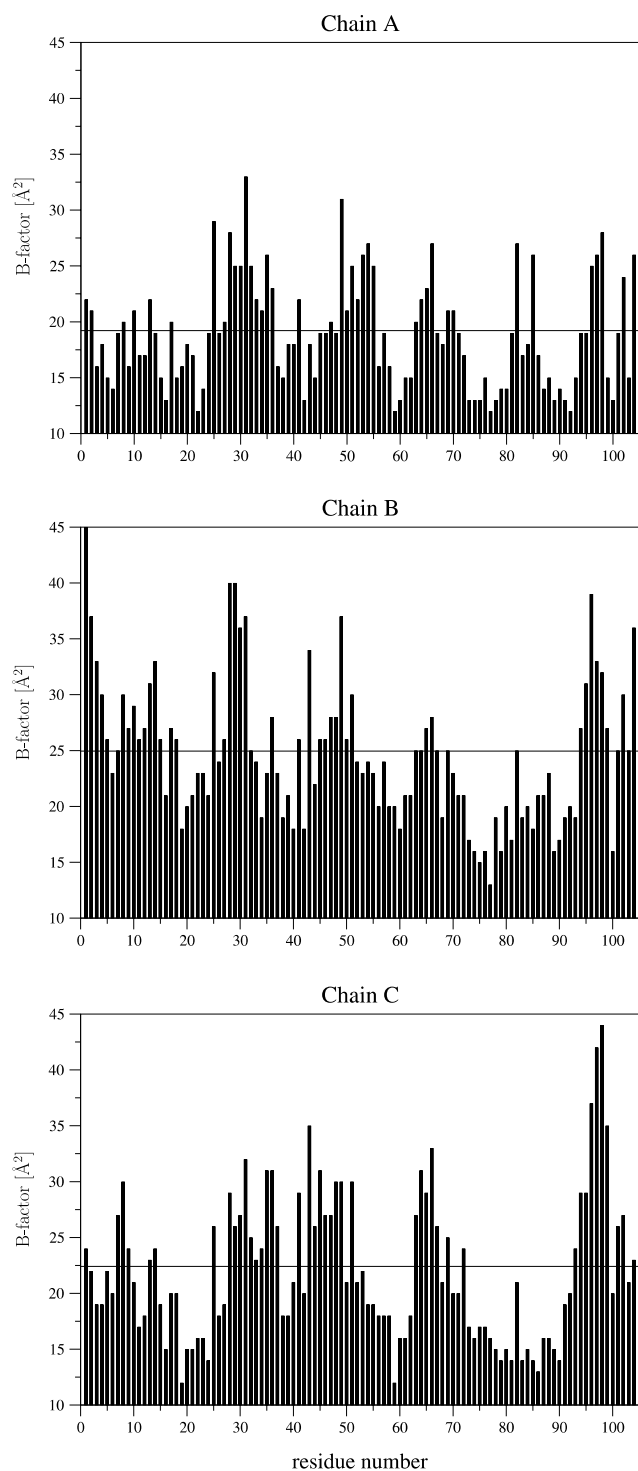


Fig. 2. *B*-factors of main chain atoms for each residue of the three polypeptide chains of RNase T1-R2 within the asymmetric unit. The horizontal line represents the average *B*-factor for all residues of the respective polypeptide chain.

corresponded to the nitrogen N2, one to the nitrogen N7, and the third was located between the positions of the oxygen O6 and the nitrogen N1. The fourth water molecule, which was found in the PRS, was in its position comparable to the O ϵ 1 of Glu46 of the wt-2'-GMP complex. This water is also present in structures in which the Glx46 is

pulled out of the PRS for example in the wt with empty PRS [12,13] or in variant 9/5 [21].

In RNase T1-wt with an empty PRS, the peptide bond of amino acids 43 and 44 is turned by about 140° [12]. This peptide bond adopted in RNase T1-R2 different conformations in the different molecules of the asymmetric unit. Although no nucleotide has bound to the enzyme, the peptide bonds of the chains A and B resembled those found in structures of an enzyme–nucleotide complex. But interestingly in chain C this bond was turned by about 120° in comparison to chain A or B which is similar to that of other uncomplexed RNase T1 structures. A similar phenomenon was found in the closely related structure of RNase T1-RV. The alternative conformations which were described for that peptide bond in chain A in the RV variant could not be found in RNase T1-R2. However, not only the conformation of this particular peptide bond was different in chain C but also the overall conformation of the entire PRS. This effect is already visible in Fig. 3 showing only the C α -overlay. Due to this peptide bond flip, the whole backbone of chain C was shifted up to 2.55 Å in comparison to the other two chains. The shift of the backbone of chain C was terminated by amino acids Phe42 and Phe48, which themselves showed a good agreement in the superpositioning with chains A and B.

Whereas the conformations of the side chain in position 42 were highly conserved—it forms the bottom of a hydrophobic pocket—the conformations of the second aromatic amino acid of the PRS, Trp45, differed clearly in the three chains of the asymmetric unit. A comparison with the structure of RNase 9/5 [21]—a structure with a very similar PRS but with bound 2'-GMP—showed that the indole of this tryptophane residue was rotated by about 120° in chain A and 110° in chain B, respectively. The conformation of Trp45 in chain C was completely different probably due to the flipped peptide bond Arg43-Asn44 and the resulting shift of the protein backbone. A comparison with the closely related RNase T1 variant RV, also taking into account the crystallographic parameters, showed a very good agreement of the individual chains with each other. As no ligand has bound to PRS the crucial amino acid 46 also in this crystal structure was pulled out of the PRS. This behavior is also known from other crystal structures with unoccupied binding sites [12,16]. In these structures, the O ϵ -atoms of the Glu46 in that case are hydrogen bonded either only to water molecules (9RNT—without any ligand) or to the backbone nitrogen of Phe100 and to the N δ 2 of Asn99 (3RNT—with vanadate). A similar hydrogen bonding pattern was found for Asn46 in the R2 variant. Only the headgroup of Asn99 has flipped in the R2 variant to form this hydrogen bond to Asn46. The shortening of that amino acid by a methylene group was compensated by a shift of the whole backbone in comparison to structures carrying a Glx residue (Fig. 4).

Grunert et al. [17] have suggested that due to the W59Y substitution the amino acids of the catalytic and the binding pocket are more flexible. This suggestion could later be

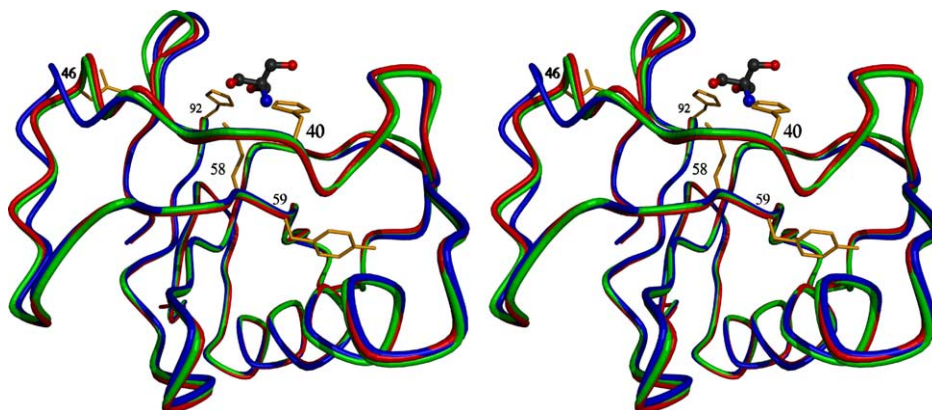


Fig. 3. Stereo image of the overlay of the three molecules of RNase T1-R2 in the asymmetric unit. The protein backbones are shown as C_{α} -representation (molecule A in red, molecule B in green, and molecule C in blue). Also shown in ball-and-stick representation is the Tris molecule bound to chain A as representative. Relevant residues are marked. This figure and Fig. 4 were made with POVScript+ [45], a modification of MolScript [46], and finally rendered with POVRay (<http://www.povray.org>). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

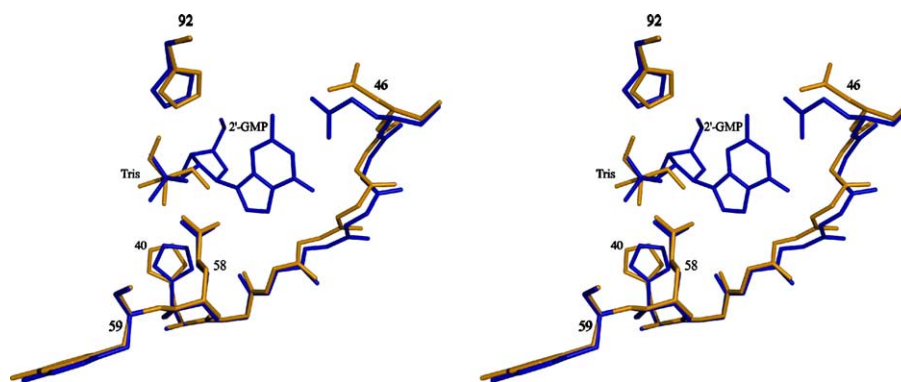


Fig. 4. Stereo image of the active site of RNase T1-R2 (orange) in comparison to the wt (blue). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

confirmed by exploring the stability of these variants with FT-IR [44] and calorimetric studies [25], as well as by the significantly increased temperature factors at least by the factor of 2 in the crystal structures of the W59Y variants (Table 3). This flexibility could be the reason for the increased activity of these variants. However for RNase T1-R2, this B -value

enhancement was not observed as these temperature factors were already higher in variant RV in comparison to the wild-type (Table 3). And furthermore in contrast to other W59Y variants, we have observed in variant R2 even a slight decrease of these values for almost all amino acids of the catalytic and primary binding site. In addition to the lower

Table 3
Comparison of the average main chain B -values (\AA^2) of W59Y variants

Residue	wt			W59Y	Y45W	Y45W/W59Y	RV	R2
	3RNT	9RNT	1BU4					
40	14.8	10.8	10.3	21.4	08.1	21.8	20.9	19.1
41	14.7	10.7	11.8	34.9	07.6	45.8	21.6	18.9
42	15.3	10.2	11.3	15.1	11.0	16.4	20.0	18.1
43	15.6	10.6	15.6	37.6	11.1	27.0	23.7	21.6
44	13.8	09.6	13.9	24.0	08.1	22.9	25.3	21.9
45	14.3	11.9	16.4	27.8	09.2	38.0	28.7	23.9
46	14.3	11.3	16.6	40.6	13.1	25.7	27.0	23.4
58	12.1	08.8	09.3	25.1	09.2	31.5	18.1	17.1
59	09.7	06.9	08.4	36.2	06.1	26.6	19.2	14.0
77	11.8	06.5	07.1	17.1	06.6	17.0	15.0	15.7
92	11.2	08.3	08.1	17.8	09.0	24.1	20.4	18.3
100	14.6	10.1	11.1	31.2	05.8	23.1	21.1	20.4

resolution of this crystal structure, this means that the decrease of the temperature factors has to be even higher than observed and the structure of these regions is more rigid compared to RV. It is noticeable that just the tyrosine 59 shows the lowest *B*-value so it seems that in the case of RV and R2 the W59Y substitution stabilizes the binding and the catalytic pocket.

However, as already mentioned, in RNase T1-R2 we have observed up to now the highest enhancement in activity for W59Y substitutions and simultaneously a slightly diminished flexibility of the amino acids of the catalytic site which is in contrast to the hitherto existing results. But nevertheless probably exactly this fact contributes to the highly enhanced activity in the case of the variants RV and R2 because from the crystal structures of W59Y variants in complex with 2'-GMP it is known that the phosphate group of the inhibitor moves by about 0.5 Å deeper into the active site and forms additional hydrogen bonds to amino acids of the active site. From the crystal structure of variant 9/5 (which differs from variants RV and R2 only by the N46Q and N46Q together with Y59W, respectively), it is known that the bound inhibitor 2'-GMP adopts a different conformation compared to wildtype structures and is furthermore shifted out of the binding pocket by about 1 Å caused by the narrowing of the primary recognition site [21]. This narrowing is thought to be a consequence of the E46Q substitution and the different conformation of this glutamine compared to the glutamic acid in the wildtype. Unfortunately so far there are no structural data available for complexes of variants RV and R2 with bound nucleotides but one can now imagine that in variant R2 due to the Q46N/W59Y substitutions the nucleobase is as well able to move deeper into the PRS. From Figs. 2 and 3 it is clearly visible that amino acids forming active site and flanking regions show the highest flexibilities, with the exception of the amino acids participating directly in catalysis. From these observations one could conclude that the substrate is easily bound by the enzyme and then fixed better due to the more rigid structure of the catalytic and primary recognition site of variant R2 compared to RV to form a more productive enzyme–substrate complex. To answer this question we started crystallization experiments to obtain complex crystals with both 2'-GMP or 2'-AMP, to get insights into the adenine and guanine recognition by these purine-specific RNase T1 variants as well as to follow this remarkably increased activity by the W59Y substitution.

Acknowledgments

The authors thank Elena Hensel and Philipp Kiross for excellent technical assistance.

References

- [1] K. Sato, F. Egami, Studies on ribonucleases in takadiastase, *J. Biochem. (Tokyo)* 44 (1957) 753–767.
- [2] R.W. Hartley, Homology between prokaryotic and eukaryotic ribonucleases, *J. Mol. Evol.* 15 (4) (1980) 355–358.
- [3] K. Takahashi, S. Moore, Ribonuclease T1, *Enzymes* 15 (1982) 435–468.
- [4] U. Heinemann, W. Saenger, Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex: an X-ray study, *Nature* 299 (5878) (1982) 27–31.
- [5] R. Arni, U. Heinemann, R. Tokuoka, W. Saenger, Three-dimensional structure of the ribonuclease T1 2'-GMP complex at 1.9-Å resolution, *J. Biol. Chem.* 263 (30) (1988) 15358–15368.
- [6] K. Gohda, K. Oka, K. Tomita, T. Hakoshima, Crystal structure of RNase T1 complexed with the product nucleotide 3'-GMP. Structural evidence for direct interaction of histidine 40 and glutamic acid 58 with the 2'-hydroxyl group of the ribose, *J. Biol. Chem.* 269 (26) (1994) 17531–17536.
- [7] A. Heydenreich, G. Koellner, H.W. Choe, F. Cordes, C. Kisker, H. Schindelin, R. Adamiak, U. Hahn, W. Saenger, The complex between ribonuclease T1 and 3'GMP suggests geometry of enzymic reaction path. An X-ray study, *Eur. J. Biochem.* 218 (3) (1993) 1005–1012.
- [8] A. Lenz, U. Heinemann, M. Maslowska, W. Saenger, X-ray analysis of cubic crystals of the complex formed between ribonuclease T1 and guanosine-3',5'-bisphosphate, *Acta Crystallogr. B* 47 (1991) 521–527.
- [9] A. Lenz, F. Cordes, U. Heinemann, W. Saenger, Evidence for a substrate-binding subsite in ribonuclease T1. Crystal structure of the complex with two guanosines, model building of the complex with the substrate guanylyl-3',5'-guanosine, *J. Biol. Chem.* 266 (12) (1991) 7661–7667.
- [10] J. Koepke, M. Maslowska, U. Heinemann, W. Saenger, Three-dimensional structure of ribonuclease T1 complexed with guanylyl-2',5'-guanosine at 1.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 206 (3) (1989) 475–488.
- [11] J. Ding, G. Koellner, H.P. Grunert, W. Saenger, Crystal structure of ribonuclease T1 complexed with adenosine 2'-monophosphate at 1.8-Å resolution, *J. Biol. Chem.* 266 (23) (1991) 15128–15134.
- [12] D. Kostrewa, H.W. Choe, U. Heinemann, W. Saenger, Crystal structure of guanosine-free ribonuclease T1, complexed with vanadate (V), suggests conformational change upon substrate binding, *Biochemistry* 28 (19) (1989) 7592–7600.
- [13] J. Martinez-Oyanedel, H.W. Choe, U. Heinemann, W. Saenger, Ribonuclease T1 with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 222 (2) (1991) 335–352.
- [14] H.L. Osterman, F.G. Walz, Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T1: kinetic studies using GpA, GpC, GpG, GpU as substrates, *Biochemistry* 17 (20) (1978) 4124–4130.
- [15] C. Hill, G. Dodson, U. Heinemann, W. Saenger, Y. Mitsui, K. Nakamura, S. Borisov, G. Tishchenko, K. Polyakov, S. Pavlovskii, The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases, *Trends Biochem. Sci.* 8 (10) (1983) 364–369.
- [16] J. Granzin, R. Puras-Lutzke, O. Landt, H.P. Grunert, U. Heinemann, W. Saenger, U. Hahn, RNase T1 mutant Glu46Gln binds the inhibitors 2'-GMP and 2'-AMP at the 3' subsite, *J. Mol. Biol.* 225 (2) (1992) 533–542.
- [17] H.P. Grunert, O. Landt, M. Zirpel-Giesebrecht, J. Backmann, U. Heinemann, W. Saenger, U. Hahn, Trp59 to Tyr substitution enhances the catalytic activity of RNase T1 and of the Tyr to Trp variants in positions 24, 42 and 45, *Protein Eng.* 6 (7) (1993) 739–744.
- [18] T. Hakoshima, M. Tanaka, T. Itoh, K.I. Tomita, T. Amisaki, S. Nishikawa, H. Morioka, S. Uesugi, E. Ohtsuka, M. Ikehara, Hydrophobic effects on protein/nucleic acid interaction: enhancement of substrate binding by mutating tyrosine 45 to tryptophan in ribonuclease T1, *Protein Eng.* 4 (7) (1991) 793–799.
- [19] J. Steyaert, C. Opsomer, L. Wyns, P. Stanssens, Quantitative analysis of the contribution of Glu46 and Asn98 to the guanosine specificity of ribonuclease T1, *Biochemistry* 30 (2) (1991) 494–499.
- [20] B. Hubner, M. Haensler, U. Hahn, Modification of ribonuclease T1 specificity by random mutagenesis of the substrate binding segment, *Biochemistry* 38 (4) (1999) 1371–1376.

- [21] K. Höschler, H. Hoier, B. Hubner, W. Saenger, P. Orth, U. Hahn, Structural analysis of an RNase T1 variant with an altered guanine binding segment, *J. Mol. Biol.* 294 (5) (1999) 1231–1238.
- [22] K. Kumar, F.G. Walz Jr., Probing functional perfection in substructures of ribonuclease T1: double combinatorial random mutagenesis involving Asn43, Asn44, Glu46 in the guanine binding loop, *Biochemistry* 40 (12) (2001) 3748–3757.
- [23] M. Struhalla, R. Czaja, U. Hahn, Addressing the challenge of changing the specificity of RNase T1 with rational and evolutionary approaches, *ChemBioChem.* 5 (2) (2004) 200–205.
- [24] R. Czaja, M. Struhalla, K. Hoschler, W. Saenger, N. Strater, U. Hahn, RNase T1 variant RV cleaves single-stranded RNA after purines due to specific recognition by the Asn46 side chain amide, *Biochemistry* 43 (10) (2004) 2854–2862.
- [25] W.D. Schubert, G. Schluckebier, J. Backmann, J. Granzin, C. Kisker, H.W. Choe, U. Hahn, W. Pfeil, W. Saenger, X-ray crystallographic and calorimetric studies of the effects of the mutation Trp59 → Tyr in ribonuclease T1, *Eur. J. Biochem.* 220 (2) (1994) 527–534.
- [26] O. Landt, H.P. Grunert, U. Hahn, A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction, *Gene* 96 (1) (1990) 125–128.
- [27] J. Ghrayeb, H. Kimura, M. Takahara, H. Hsiung, Y. Masui, M. Inouye, Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*, *EMBO J.* 3 (10) (1984) 2437–2442.
- [28] R. Quaas, Y. McKeown, P. Stanssens, R. Frank, H. Blocker, U. Hahn, Expression of the chemically synthesized gene for ribonuclease T1 in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector, *Eur. J. Biochem.* 173 (3) (1998) 617–622.
- [29] O. Landt, M. Zirpel-Giesebrecht, A. Milde, U. Hahn, Improving purification of recombinant ribonuclease T1, *J. Biotechnol.* 24 (2) (1992) 189–194.
- [30] A. McPherson, *The Preparation and Analysis of Protein Crystals*, Wiley, New York, 1982.
- [31] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 307–326.
- [32] J. Navaza, AMoRe: an automated package for molecular replacement, *Acta Crystallogr. A* 50 (1994) 157–163.
- [33] Collaborative Computational Project, The CCP4-Suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr. D* 50 (1994) 760–763.
- [34] G.N. Murshudov, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr. D* 53 (3) (1997) 240–255.
- [35] A.T. Brunger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, G.L. Warren, Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr. D* 54 (Pt. 5) (1998) 905–921.
- [36] A.T. Brunger, The free *R*-value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature* 355 (1992) 472–475.
- [37] T. Jones, J. Zou, S. Cowan, M. Kjeldgaard, Improved methods for building protein models into electron density maps and the location of errors in these models, *Acta Crystallogr. A* 47 (1991) 110–119.
- [38] A. Rousssel, C. Cambillau, *Silicon Graphics Geometry Partners Directory*, Silicon Graphics, Mountain View, CA, 1991, pp. 86–89.
- [39] J. Backmann, C.C. Doray, H.P. Grunert, O. Landt, U. Hahn, Extended kinetic analysis of ribonuclease T1 variants leads to an improved scheme for the reaction mechanism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1) (1994) 213–219.
- [40] C.B. Anfinsen, R.R. Redfield, W.L. Choate, J. Page, W.R. Carroll, Studies on the cross structure, cross-linkages and terminal sequences in ribonuclease, *J. Biol. Chem.* 207 (1964) 201–210.
- [41] M. Zabinski, F.G. Walz Jr., Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T: kinetic studies using GpC and GpU as substrates, *Arch. Biochem. Biophys.* 175 (2) (1976) 558–564.
- [42] M. Imazawa, M. Irie, T. Ukita, Substrate specificity of ribonuclease from *Aspergillus saitoi*, *J. Biochem. (Tokyo)* 64 (5) (1968) 595–602.
- [43] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.* 4 (11) (1995) 2411–2423.
- [44] H. Fabian, C. Schultz, J. Backmann, U. Hahn, W. Saenger, H. Mantsch, D. Naumann, Impact of point mutations on the structure and thermal stability of ribonuclease T1 in aqueous solution probed by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry* 33 (35) (1994) 10725–10730.
- [45] T. Fenn, D. Ringe, G. Petsko, POVScript+: a program for model and data visualization using persistence of vision ray-tracing, *J. Appl. Crystallogr.* 36 (2003) 944–947.
- [46] P. Kraulis, MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 946–950.

3 Diskussion und Ausblick

Obwohl die Arbeit mit Ribonucleasen ein schon sehr altes Forschungsgebiet ist, so hat es doch gerade in den letzten Jahren aufgrund der Entdeckung der massiven Beteiligung verschiedenster Ribonucleinsäuren an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wieder stark an Bedeutung gewonnen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Ribonuclease T1 hinsichtlich der spezifischen Protein-RNA-Interaktionen. Die Zielsetzung war dabei, aufgrund der bekannten Interaktionen des Wildtyps mit seinem Substrat Spezifitätsvarianten darzustellen und zu charakterisieren. Mit der Darstellung der Variante RV, die sich vom Wildtyp in fünf Positionen unterscheidet, gelang es zum ersten mal bei einer RNase T1 Variante enzymkinetische Parameter für das Minimalsubstrat ApC zu messen (Czaja et al., 2004). Durch eine etwa 75-fache Erhöhung der Aktivität der ApC-Hydrolyse und gleichzeitig etwa 96-fache Verringerung der GpC-Hydrolyse-Aktivität konnte im Vergleich zum Wildtyp mit dieser Variante das Spezifitätsverhältnis der beiden Substrate A/G um mehr als das 7000-fache gesteigert werden. Die Kristallstruktur dieser Variante konnte bis zu einer Auflösung von 1.7 Å gelöst werden. Obwohl kein Nucleotid an das Enzym gebunden hatte, konnten auch anhand dieser nucleotidfreien Struktur Anhaltspunkte gefunden werden, wie eine mögliche Protein-Adenin-Interaktion aussehen könnte. Vor allem die flexible Peptidbindung Arg43-Asn44, die im Wildtyp im nucleotidfreien und -gebundenen Zustand unterschiedliche Konformationen einnimmt, gibt Hinweise auf eine mögliche zusätzliche Wasserstoffbrücke (Arg43 O... Ade N7), die eine Adeninbindung stabilisieren könnte. Um den Einfluss des Asparaginrestes an Position 46 näher zu beleuchten, wurde einerseits die Einzelvariante Glu46Asn, als auch die Doppelvariante Tyr45Trp/Glu46Asn dargestellt (Struhalla et al., 2004). Beide Varianten zeigten, wie auch die Variante RV, eine zusätzliche Spaltung nach Adenosinresten. Durch die Einführung eines Tryptophanrestes an Position 45 konnte die Aktivität der Variante Glu46Asn leicht erhöht und auch das Spezifitätsverhältnis weiter verbessert werden. Dieser Aminosäureaustausch Tyr45Trp führt auch in anderen Varianten zur Aktivitätserhöhung und wird ebenso für die Aktivität der Variante 9/5 verantwortlich

gemacht.

Ausgehend von der Tatsache, dass die Substitution Trp59Tyr im Wildtyp, sowie in verschiedenen RNase T1 Varianten zu einer Erhöhung der Gesamtaktivität führt, wurde diese Mutation ebenfalls in die Variante RV eingeführt. Die kinetische Charakterisierung dieser sogenannten Variante R2 zeigte die erwartete Aktivitätserhöhung, in einem allerdings unerwartet starken Ausmaß (Czaja et al., 2005).

Während in allen bisher untersuchten Varianten, mit Ausnahme der Variante His40Thr, diese Substitution die Aktivität bis zum 1,8-fachen der Ausgangsaktivität erhöhte, führte dieser Austausch in der Variante RV zu einer Aktivitätssteigerung um mehr als das 4-fache. Kristallstrukturanalysen zusammen mit kalorimetrischen und FT-IR-Studien der Varianten Trp59Tyr und Tyr45Trp/Trp59Tyr ergaben, dass möglicherweise eine erhöhte Flexibilität, vor allem im Bereich des aktiven Zentrums, zu dieser Steigerung führt (Schubert et al., 1994; Fabian et al., 1994). Im Gegensatz dazu konnte in der Kristallstruktur der Variante R2 im Vergleich zur Variante RV eine verringerte Flexibilität dieser Aminosäuren festgestellt werden. Diese ist allerdings immer noch höher als im Wildtyp. Die beobachtete Steigerung der enzymatischen Aktivität könnte daher erklärt werden, dass aufgrund der verringerten Flexibilität des aktiven Zentrums und der Substratbindungstasche nach Bindung des Substrates ein produktiverer Enzym-Substrat-Komplex gebildet wird, woraus der erhöhte k_{kat} -Wert für diese Variante resultiert. Neben der veröffentlichten Kristallstruktur der Variante R2 wurde unter veränderten Bedingungen eine zweite Kristallform erhalten, von der Diffraktionsdaten bis zu einer Auflösung von 1,6 Å gemessen werden konnten. Die Struktur konnte allerdings nur bis zu einem kristallographischen R -Wert von etwa 25% ($R_{\text{free}} \approx 30\%$) verfeinert werden, was für eine Struktur dieser Auflösung absolut unzureichend ist. Dieses Ergebnis kann auf einen sogenannten Zwillingskristall zurückgeführt werden. Der Zwillingsgrad des gemessenen Kristalls konnte mit der Methode nach Yeates (Yeates, 1997) bestimmt werden und lag bei 0,384. Der Zwillingsgrad eines perfekten Zwillingskristalls liegt bei 0,5. Aufgrund von Zeitgründen wurde auf eine weitere Analyse oder erneute Kristallisation und Datensammlung verzichtet.

Ausgehend von den Ergebnissen von Kumar & Walz Jr. (2001) wurden die beiden Varianten Glu46Pro/(insert)47Gln und Glu46Pro/(insert)47Asn, die im Vergleich zum Wildtyp eine vergrößerte primäre Bindungstasche besitzen, dargestellt (unpublizierte Ergebnisse). Für die in der Arbeit von Kumar & Walz Jr. (2001) dargestellte Variante Glu46Pro/(insert)47Glu konnten Hinweise gefunden werden, dass der Glutamatrest

(jetzt an Position 47) eine ähnliche Funktion wie im Wildtyp übernimmt. Für alle Insertionsvarianten wurde eine etwa zehnfach erhöhte Aktivität gegenüber ApC im Vergleich zum Wildtyp detektiert, was zunächst nur auf die Vergrößerung der PRS zurückgeführt wurde. Die Vermutung lag daher nahe, dass durch einen Austausch Glu→Gln oder Glu→Asn Adeninreste auch spezifisch durch diese beiden Aminosäuren erkannt werden. Beide Varianten konnten dargestellt werden. Ein verändertes Spaltmuster mit periplasmatischen Extrakten konnte für beide Varianten allerdings nicht detektiert werden. Da sich beide Varianten nicht reinigen ließen, war auch eine weitergehende kinetische Charakterisierung nicht möglich.

Zur Untersuchung des Einflusses von Phe100 auf die Aktivität und Spezifität der Variante Glu46Gln wurde eine Bibliothek mit allen möglichen Variationen an Position 100 erstellt (unpublizierte Ergebnisse). Eine primäre Charakterisierung dieser Varianten auf enzymatische Aktivität zeigte, dass 12 der 19 Varianten in der Lage waren, RNA zu spalten. Dabei konnte festgestellt werden, dass vor allem positiv oder partiell positiv geladene Aminosäuren in dieser Position zu einem Verlust der Aktivität führen. Ob diese Ergebnisse auch für den Wildtyp zutreffend sind, ist nicht untersucht worden. Um diese Varianten hinsichtlich ihrer Spezifität und gegebenenfalls auch kinetisch charakterisieren zu können, wurde versucht die aktiven Enzyme zu reinigen, was allerdings nur für einige Varianten möglich war. Da dem Phenylalaninrest auch strukturstabilisierende Eigenschaften zugeschrieben werden, kann vermutet werden, dass eine Substitution zu einer strukturellen Instabilität des Enzyms führt, was die Reinigung einiger Varianten unmöglich macht. Ein mit den gereinigten Enzymen durchgeführter dünnschichtchromatographischer Spezifitätstest ergab, dass nur die Variante Phe100Val ein unter diesen Testbedingungen verändertes Spaltmuster zeigte. Überraschenderweise konnte auch für die Variante Glu46Gln eine Spaltung von ApC nachgewiesen werden. Eine kinetische Charakterisierung war aufgrund der geringen Aktivität nicht möglich.

Der Vergleich von Proteinstrukturen mit gebundenen Nucleotiden zeigt, dass Glutamatreste sehr häufig an Guanin-Interaktionen beteiligt sind (Abb. 3.1). Die Mehrheit dieser Interaktionen sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen N1 und N2 der Guaninbase und den beiden Sauerstoffatomen der Säurefunktion des Glutamatrestes, wie sie auch bei RNase T1 gefunden werden.

Im Gegensatz dazu ist dieser Rest an Adeninerkennungen nur in äußerst geringem Ausmaß beteiligt. Insgesamt konnten nur 11 Interaktionen von Glutamatresten mit Adenin in der Proteindatenbank gefunden werden. Dafür wurde ein Suchalgorithmus der *amino*

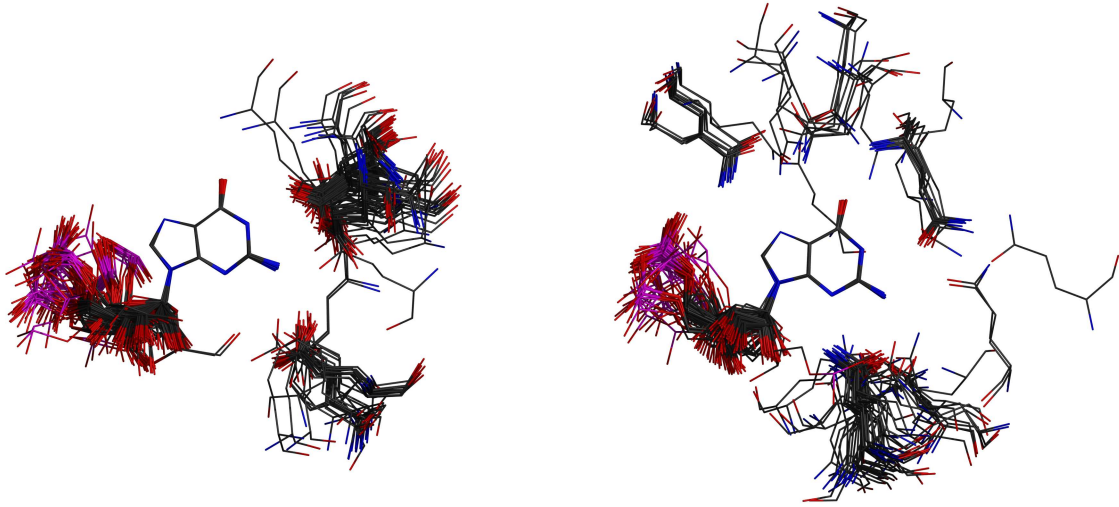


Abbildung 3.1: Übereinanderlagerung der Interaktionen von Guanin mit Glutamatresten (links) und Glutaminresten (rechts). Die Strukturen wurden mit Hilfe der *amino acid-nucleotide interaction database* (AANT; <http://aant.icmb.utexas.edu>) (Hoffman et al., 2004) erstellt.

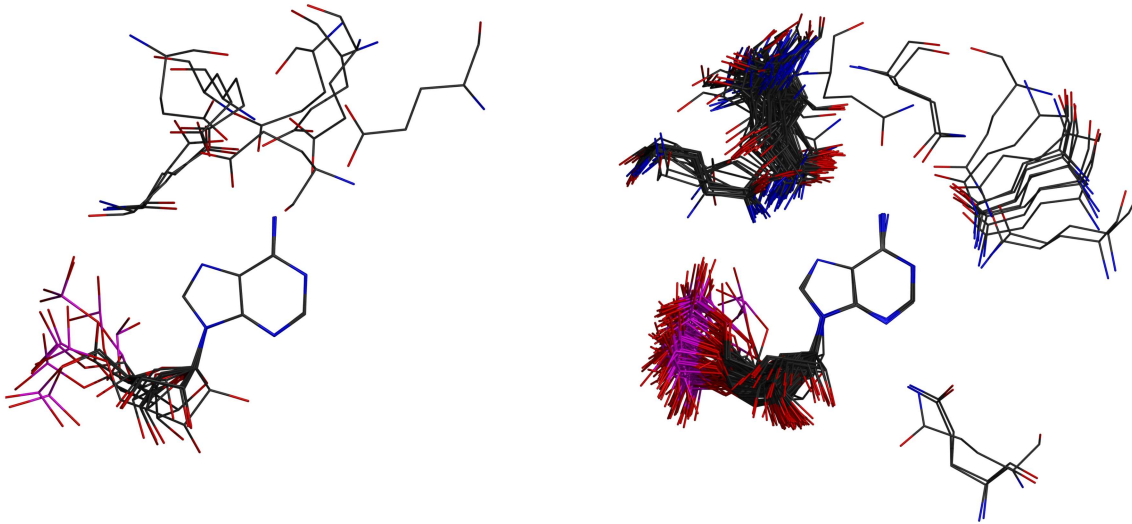


Abbildung 3.2: Übereinanderlagerung der Interaktionen von Adenin mit Glutamatresten (links) und Glutaminresten (rechts)

acid-nucleotide interaction database (Hoffman et al., 2004) verwendet. Die Vorhersage, die von Hirono & Kollman (1991) zur Substratspezifitätsveränderung von RNase T1 gemacht wurden, gehen von der Annahme aus, dass durch den Austausch Glu46Gln die Wasserstoffbrückenbindungen Ade N1···Gln NE2, sowie Ade N6···Gln OE1 zur spezifischen Erkennung dieser Base führen müssten. Ein Vergleich mit anderen Proteinstrukturen zeigt, dass diese Interaktionen nicht nur hypothetisch sind, sondern tatsächlich vorkommen, selbst wenn der Großteil der Glutamin-Adenin-Interaktionen Wechselwirkungen mit N6 und N7 des Adenins sind (Abb. 3.2). Eine Interaktion von Guanin mit der gesamten Säureamidgruppierung des Glutamins ist bisher in der Strukturdatenbank noch nicht vorhanden (Abb. 3.1).

Theoretische Untersuchungen haben kürzlich gezeigt, dass Wasserstoffbrückenbindungen nur einen relativ kleinen Beitrag zur spezifischen Erkennung von Nucleobasen beitragen. Einen weitaus größeren Effekt scheint das elektrostatische Potential der Bindungstasche auf die Unterscheidung zwischen Adenosin und Guanosin zu haben (Basu et al., 2004). Es ist schon länger bekannt, dass Kation- π -Interaktionen zwischen Protein und Nucleobase häufiger auftreten als π - π -Interaktionen, wie sie zum Beispiel bei RNase T1 gefunden werden. Solche Kation- π -Wechselwirkungen werden am häufigsten bei Argininresten, die mit Adenin interagieren, gefunden (Biot et al., 2002).

Die Daten von Basu et al. (2004) lassen den Schluss zu, dass die bevorzugte Ausbildung von Kation- π -Interaktionen mit Adenin-Resten in den unterschiedlichen elektrostatischen Potentialen der resultierenden Bindungstaschen zu suchen sind, da natürlich auch Guanin-Reste reine Kation- π -Wechselwirkungen eingehen können. Eine daraus resultierende Diskriminierung zwischen Adenin und Guanin ist leicht vorstellbar, da die Dipolmomente der beiden Basen jeweils in unterschiedliche Richtungen zeigen (Abb. 3.3). Vor diesem Hintergrund wäre auch eine Veränderung des elektrostatischen Potentials der primären Bindungstasche von RNase T1 sehr interessant. Ein Austausch von Tyr45 gegen positiv oder partiell positiv geladene Aminosäuren (Arg, Lys, Asn, Gln und His) könnte die π - π -Interaktionen, die bei RNase T1 zwischen Tyr45 und Guanin ausgebildet werden, durch Kation- π -Interaktionen ersetzen. Gleichzeitig könnte sich durch eine solche Substitution auch das elektrostatische Potential der Bindungstasche ändern, wodurch unter Umständen Spezifitätsänderungen beobachtet werden könnten. Einen sehr interessanten Sonderfall würde dabei das Histidin einnehmen. Diese Aminosäure ist kationisch in ihrer protonierten Form und verhält sich unprotoniert wie ein „simples aromatisches System“ (Biot et al., 2002). Aufgrund eines pK_S -Wertes, der für

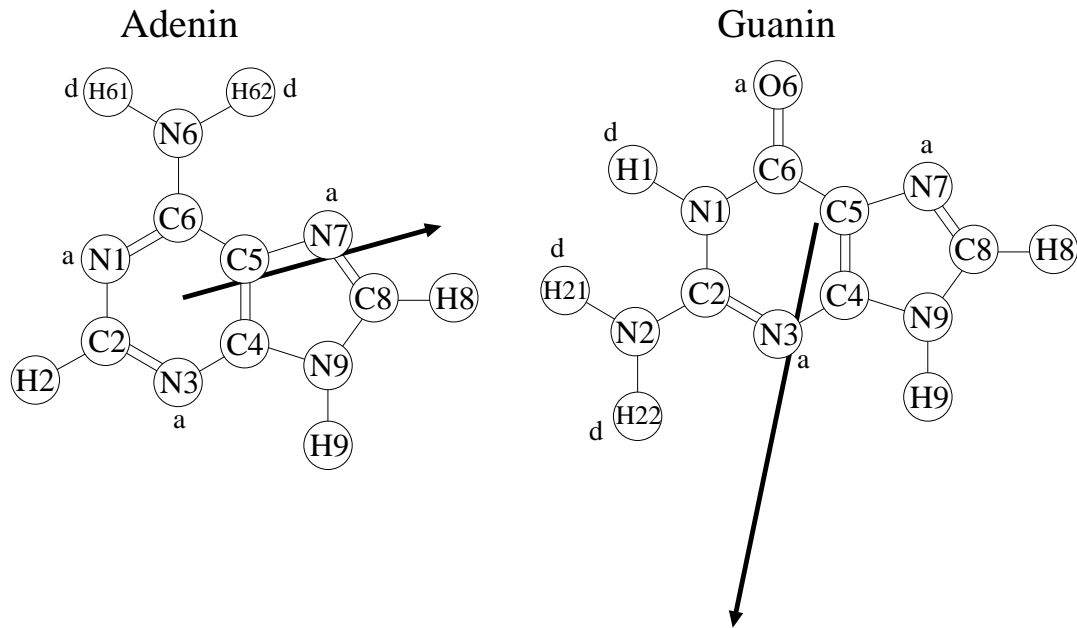


Abbildung 3.3: Strukturen von Adenin und Guanin. Potentielle Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donoren sind mit *a* bzw. *d* gekennzeichnet. Der Pfeil zeigt die Richtung und Stärke des jeweiligen Dipolmomentes an. (Grafik aus Basu et al. (2004))

freies Histidin nahe dem Neutralpunkt liegt, sind beide Formen relativ leicht ineinander überführbar. Man könnte daher spekulieren, dass die Enzymvariante Tyr45His nur aufgrund von *pH*-Verschiebungen seine Spezifität verändern könnte.

Literaturverzeichnis

- Allers, J., Shamoo, Y., 2001. Structure-based analysis of protein-RNA interactions using the program ENTANGLE. *J Mol Biol* 311 (1), 75–86.
- Anfinsen, C., 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181 (96), 223–230.
- Backmann, J., Doray, C. C., Grunert, H. P., Landt, O., Hahn, U., 1994. Extended kinetic analysis of ribonuclease T1 variants leads to an improved scheme for the reaction mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 199 (1), 213–219.
- Basu, G., Sivanesan, D., Kawabata, T., Go, N., 2004. Electrostatic Potential of Nucleotide-free Protein is Sufficient for Discrimination Between Adenine and Guanine-specific Binding Sites. *J Mol Biol* 342, 1054–1066.
- Biot, C., Buisine, E., Kwasigroch, J. M., Wintjens, R., Rooman, M., 2002. Probing the energetic and structural role of amino acid/nucleobase cation- π interactions in protein-ligand complexes. *J Biol Chem* 277 (43), 40816–40822.
- Czaja, R., 2001. Darstellung und Charakterisierung einer Ribonuklease T1-Variante mit veränderter Substratspezifität. Diplomarbeit, Universität Leipzig.
- Czaja, R., Perbandt, M., Betzel, C., Hahn, U., 2005. Purine activity of RNase T1RV is further improved by substitution of Trp59 by tyrosine. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 882–889.
- Czaja, R., Struhalla, M., Hoshler, K., Saenger, W., Strater, N., Hahn, U., 2004. RNase T1 variant RV cleaves single-stranded RNA after purines due to specific recognition by the Asn46 side chain amide. *Biochemistry* 43 (10), 2854–2862.
- Deshpande, R. A., Shankar, V., 2002. Ribonucleases from T2 family. *Crit Rev Microbiol* 28 (2), 79–122.

- Ding, J., Koellner, G., Grunert, H. P., Saenger, W., 1991. Crystal structure of ribonuclease T1 complexed with adenosine 2'- monophosphate at 1.8-Å resolution. *J Biol Chem* 266 (23), 15128–15134.
- Fabian, H., Schultz, C., Backmann, J., Hahn, U., Saenger, W., Mantsch, H. H., Naumann, D., 1994. Impact of point mutations on the structure and thermal stability of ribonuclease T1 in aqueous solution probed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 33 (35), 10725–10730.
- Gohda, K., Oka, K., Tomita, K., Hakoshima, T., 1994. Crystal structure of RNase T1 complexed with the product nucleotide 3'- GMP. Structural evidence for direct interaction of histidine 40 and glutamic acid 58 with the 2'-hydroxyl group of the ribose. *J Biol Chem* 269 (26), 17531–17536.
- Granzin, J., Puras-Lutzke, R., Landt, O., Grunert, H. P., Heinemann, U., Saenger, W., Hahn, U., 1992. RNase T1 mutant Glu46Gln binds the inhibitors 2'GMP and 2'AMP at the 3' subsite. *J Mol Biol* 225 (2), 533–542.
- Grunert, H. P., Landt, O., Zirpel-Giesebrecht, M., Backmann, J., Heinemann, U., Saenger, W., Hahn, U., 1993. Trp59 to Tyr substitution enhances the catalytic activity of RNase T1 and of the Tyr to Trp variants in positions 24, 42 and 45. *Protein Eng* 6 (7), 739–744.
- Grunert, H. P., Zouni, A., Beineke, M., Quaas, R., Georgalis, Y., Saenger, W., Hahn, U., 1991. Studies on RNase T1 mutants affecting enzyme catalysis. *Eur J Biochem* 197 (1), 203–207.
- Hartley, R. W., 1980. Homology between prokaryotic and eukaryotic ribonucleases. *J Mol Evol* 15 (4), 355–358.
- Hays, F., Teegarden, A., Jones, Z., Harms, M., Raup, D., Watson, J., Cavaliere, E., Ho, P., 2005. How sequence defines structure: a crystallographic map of DNA structure and conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (20), 7157–7162.
- Heinemann, U., Hahn, U., 1982. Structural and functional studies of ribonuclease T1. In: Saenger, W., Heinemann, U. (Eds.), *Protein-Nucleic Acid Interaction*. Maximilian Press, London, pp. 111–141.
- Heinemann, U., Saenger, W., 1982. Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'- guanylic acid complex: an X-ray study. *Nature* 299 (5878), 27–31.

- Heinemann, U., Saenger, W., 1983. Crystallographic study of mechanism of ribonuclease T1-catalysed specific RNA hydrolysis. *J Biomol Struct Dyn* 1 (2), 523–538.
- Heydenreich, A., Koellner, G., Choe, H. W., Cordes, F., Kisker, C., Schindelin, H., Adamiak, R., Hahn, U., Saenger, W., 1993. The complex between ribonuclease T1 and 3'GMP suggests geometry of enzymic reaction path. An X-ray study. *Eur J Biochem* 218 (3), 1005–1012.
- Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, S., Tishchenko, G., Polyakov, K., Pavlovskii, S., 1983. The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases. *Trends Biochem Sci* 8 (10), 364–369.
- Hirono, S., Kollman, P. A., 1990. Calculation of the relative binding free energy of 2'GMP and 2'AMP to ribonuclease T1 using molecular dynamics/free energy perturbation approaches. *J Mol Biol* 212 (1), 197–209.
- Hirono, S., Kollman, P. A., 1991. Relative binding free energy calculations of inhibitors to two mutants (Glu46 → Ala/Gln) of ribonuclease T1 using molecular dynamics/free energy perturbation approaches. *Protein Eng* 4 (3), 233–243.
- Hoffman, M., Khrapov, M., Cox, J., Yao, J., Tong, L., Ellington, A., 2004. AANT: the Amino Acid-Nucleotide Interaction Database. *Nucleic Acids Res* 32 (Database issue), D174–181.
- Höschler, K., Hoier, H., Hubner, B., Saenger, W., Orth, P., Hahn, U., 1999. Structural analysis of an RNase T1 variant with an altered guanine binding segment. *J Mol Biol* 294 (5), 1231–1238.
- Hubner, B., Haensler, M., Hahn, U., 1999. Modification of ribonuclease T1 specificity by random mutagenesis of the substrate binding segment. *Biochemistry* 38 (4), 1371–1376.
- Koepke, J., Maslowska, M., Heinemann, U., Saenger, W., 1989. Three-dimensional structure of ribonuclease T1 complexed with guanylyl- 2',5'-guanosine at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 206 (3), 475–488.
- Kostrewa, D., Choe, H. W., Heinemann, U., Saenger, W., 1989. Crystal structure of guanosine-free ribonuclease T1, complexed with vanadate (V), suggests conformational change upon substrate binding. *Biochemistry* 28 (19), 7592–7600.

- Kumar, K., Walz Jr., F. G., 2001. Probing functional perfection in substructures of ribonuclease T1: double combinatorial random mutagenesis involving Asn43, Asn44, and Glu46 in the guanine binding loop. *Biochemistry* 40 (12), 3748–3757.
- Lenz, A., Cordes, F., Heinemann, U., Saenger, W., 1991a. Evidence for a substrate-binding subsite in ribonuclease T1. Crystal structure of the complex with two guanines, and model building of the complex with the substrate guanylyl-3',5'-guanosine. *J Biol Chem* 266 (12), 7661–7167.
- Lenz, A., Heinemann, U., Maslowska, M., Saenger, W., 1991b. X-ray analysis of cubic crystals of the complex formed between ribonuclease T1 and guanosine-3',5'-bisphosphate. *Acta Crystallogr B* 47 (Pt 4), 521–527.
- Martinez-Oyanedel, J., Choe, H. W., Heinemann, U., Saenger, W., 1991. Ribonuclease T1 with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol* 222 (2), 335–352.
- Merrifield, B., 1986. Solid phase synthesis. *Science* 232 (4748), 341–347.
- Moore, S., Stein, W. H., 1973. Chemical structures of pancreatic ribonuclease and deoxyribonuclease. *Science* 180 (85), 458–464.
- Quaas, R., Grunert, H. P., Kimura, M., Hahn, U., 1988a. Expression of ribonuclease T1 in *Escherichia coli* and rapid purification of the enzyme. *Nucleosides & Nucleotides* 7 (5-6), 619–623.
- Quaas, R., McKeown, Y., Stanssens, P., Frank, R., Blocker, H., Hahn, U., 1988b. Expression of the chemically synthesized gene for ribonuclease T1 in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector. *Eur J Biochem* 173 (3), 617–622.
- Raines, R. T., 1998. Ribonuclease A. *Chem Rev* 98 (3), 1045–1066.
- Sato, K., Egami, F., 1957. The specificity of T1 ribonuclease. *C R Seances Soc Biol Fil* 151 (10), 1792–1796.
- Schubert, W. D., Schluckebier, G., Backmann, J., Granzin, J., Kisker, C., Choe, H. W., Hahn, U., Pfeil, W., Saenger, W., 1994. X-ray crystallographic and calorimetric studies of the effects of the mutation Trp59 → Tyr in ribonuclease T1. *Eur J Biochem* 220 (2), 527–534.

- Shirley, B., Stanssens, P., Steyaert, J., Pace, C., 1989. Conformational stability and activity of ribonuclease T1 and mutants. Gln25 → Lys, Glu58 → Ala, and the double mutant. *J Biol Chem* 264 (20), 11621–11625.
- Steyaert, J., 1997. A decade of protein engineering on ribonuclease T1—atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. *Eur J Biochem* 247 (1), 1–11.
- Steyaert, J., Haikal, A. F., Wyns, L., Stanssens, P., 1991. Subsite interactions of ribonuclease T1: Asn36 and Asn98 accelerate Gpn transesterification through interactions with the leaving nucleoside N. *Biochemistry* 30 (35), 8666–8670.
- Steyaert, J., Hallenga, K., Wyns, L., Stanssens, P., 1990. Histidine-40 of ribonuclease T1 acts as base catalyst when the true catalytic base, glutamic acid-58, is replaced by alanine. *Biochemistry* 29 (38), 9064–9072.
- Struhalla, M., Czaja, R., Hahn, U., 2004. Addressing the Challenge of Changing the Specificity of RNase T1 with Rational and Evolutionary Approaches. *ChemBioChem* 5 (2), 200–205.
- Takahashi, K., Uchida, T., Egami, F., 1970. Ribonuclease T1, Structure and function. *Adv Biophys* 1, 53–98.
- Thompson, J. E., Venegas, F. D., Raines, R. T., 1994. Energetics of Catalysis by Ribonucleases: Fate of the 2',3'-Cyclic Phosphodiester Intermediate. *Biochemistry* 33, 7408–7414.
- Treger, M., Westhof, E., 2001. Statistical analysis of atomic contacts at RNA-protein interfaces. *J Mol Recognit* 14 (4), 199–214.
- Walz Jr., F. G., Ostermann, H. L., Libertin, C., 1979. Base-group specificity at the primary recognition site of ribonuclease T1 for minimal RNA substrates. *Arch Biochem Biophys* 195, 95–102.
- Yeates, T. O., 1997. Detecting and overcoming crystal twinning. *Methods Enzymol* 276, 344–358.
- Yoshida, H., 2001. The ribonuclease T1 family. *Methods Enzymol* 341, 28–41.
- Zhang, Y., Skolnick, J., 2005. The protein structure prediction problem could be solved using the current PDB library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (4), 1029–1034.

A Anhang

Artikel

- R. Czaja, M. Struhalla, K. Höschler, W. Saenger, N. Sträter und U. Hahn (2004), „RNase T1 variant RV cleaves single-stranded RNA after purines due to specific recognition by the Asn46 side chain amide“, *Biochemistry*, **43**, 2854-2862
- M. Struhalla, R. Czaja und U. Hahn (2004), „Addressing the challenge of changing the specificity of RNase T1 with rational and evolutionary approaches“, *ChemBioChem*, **5**, 200-205
- R. Czaja, M. Perbandt, C. Betzel und U. Hahn (2005), „Purine-Activity of RNase T1RV is Further Improved by Substitution of Trp59 by Tyrosine“, *Biochem Biophys Res Commun*, **336**, 882-889

Buchbeitrag

- S. Kainz, R. Czaja, T. Greiner-Stöflele und U. Hahn (im Druck) „*Selection of RNase-Resistant RNAs*“, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol.173 (RNA Towards Medicine), Springer Verlag

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10} m)	IR	Infrarot
Abb.	Abbildung	k_{kat}	Wechselzahl, molare Aktivität
AMP	Adenosinmonophosphat	K_M	Michaelis-Konstante
ApC	Adenylyl-cytidin	NMR	Kernspinresonanz
Da	Dalton	PRS	primäre Bindungstasche
FT	Fouriertransformation	RKSA	Röntgenkristallstrukturanalyse
GDP	Guanosindiphosphat	RNA	Ribonucleinsäure
GMP	Guanosinmonophosphat	RNase	Ribonuclease
GpC	Guanylyl-cytidin	Tab.	Tabelle
GpG	Guanylyl-guanosin	wt	Wildtyp

Tabelle A.1: Abkürzungen der Aminosäuren und Nucleobasen im Ein- und Dreibuchstabencode entsprechend der IUPAC-Nomenklatur

Aminosäure	Ein- und Dreibuchstabencode	Aminosäure	Ein- und Dreibuchstabencode
Alanin	A / Ala	Leucin	L / Leu
Arginin	R / Arg	Lysin	K / Lys
Asparagin	N / Asn	Methionin	M / Met
Asparaginsäure	D / Asp	Phenylalanin	F / Phe
Cystein	C / Cys	Prolin	P / Pro
Glutamin	Q / Gln	Serin	S / Ser
Glutaminsäure	E / Glu	Threonin	T / Thr
Glycin	G / Gly	Tryptophan	W / Trp
Histidin	H / His	Tyrosin	Y / Tyr
Isoleucin	I / Ile	Valin	V / Val

Nucleobase	Nucleobase	Nucleobase	Nucleobase
Adenin	A / Ade	Thymin	T / Thy
Cytosin	C / Cyt	Uracil	U / Ura
Guanin	G / Gua	beliebig	N / Base
Purin	R / Pur	Pyrimidin	Y / Pyr

Für die Enzymvarianten ist folgende Nomenklatur verwendet worden:

XnZ: Die Aminosäure X an der Position n wurde gegen die Aminosäure Z ausgetauscht.

(insert)nZ: Die Aminosäure Z wurde zwischen die Positionen n-1 und n inseriert.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Rico Czaja
Geburtstag 23.07. 1976
Geburtsort Leipzig

Schulbildung

09/1984–06/1995 Grundschule und Gymnasium in Leipzig (Leistungskurse Mathematik und Chemie)
06/1995 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

07/1995–06/1996 ABC-Abwehr in Bad Dübén

Studium

10/1996–03/2001 Biochemie-Studium an der Universität Leipzig
07/1998 Vordiplomprüfung
07/2000 Diplomprüfung
10/2000–03/2001 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Ulrich Hahn
03/2001 Abschluss: Diplom-Biochemiker

Berufserfahrung und Promotion

04/2001–12/2002 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie, Universität Leipzig
seit 01/2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei Herrn Prof. Ulrich Hahn möchte ich mich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des sehr interessanten Themas bedanken. Desweiteren bin ich sehr dankbar für die freundliche und freie Arbeitsatmosphäre und seine stetige Unterstützung in fachlichen Fragen.

Bei Herrn Prof. Norbert Sträter und Dr. Markus Perbandt möchte ich mich bedanken für die Einführung in die Röntgenkristallstrukturanalyse, sowie die geduldige Beantwortung aller in diesem Zusammenhang auftretenden Fragen. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle auch Herrn Prof. Wolfram Saenger, der mir ermöglicht hat, die Röntgenkristallstrukturanalyse in seiner Arbeitsgruppe an der FU Berlin zu erlernen.

Meinen Leipziger Laborkollegen, insbesondere Herrn Dr. Marc Struhalla, möchte ich für eine Vielzahl an hilfreichen Tipps und Tricks danken, die mir meine Arbeit sehr erleichtert haben.

Bei Frau Brigitte Wolff und Frau Elena Hensel bedanke ich mich für die zuverlässige Hilfe bei allen Arten von Sequenzierungen, sowie bei Frau Hannah Schröder-Borm bei der unermüdlichen Unterstützung bei Proteinaufreinigungen.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, sowie den Mitarbeitern der Institute in Leipzig und Hamburg für die freundliche Atmosphäre, kollegiale Zusammenarbeit und den immer wieder hilfreichen fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen.

Nicht zuletzt bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung jeglicher Art während meines Studiums und meiner Dissertation.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde zuvor keiner Prüfungsbehörde in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt.

Hamburg, 7. Oktober 2005