

Zusammenfassung

Strukturelle Untersuchungen zur Substratspezifität von Ribonuclease T1

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_{kat}/K_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

Strukturelle Untersuchungen zur Substratspezifität von Ribonuclease T1

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_{cat}/K_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.