

Leandra Watanabe

**Cristalização e Análise do Modelo
Estrutural da Enzima Ribonuclease
T₁ de *Aspergillus Oryzae* Complexada
com o Análogo de Substrato Guanilil
(3'-6') 6'- Deoxihomouridina (GpcU)**

1910000882





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

LEANDRA WATANABE

**Cristalização e análise do modelo estrutural da enzima
Ribonuclease T₁ de *Aspergillus oryzae* complexada com o
análogo de substrato guanilil (3'-6') 6'-deoxihomouridina (GpcU)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Física
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"



882/00

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni

São José do Rio Preto - SP

- 1998 -



Banca Examinadora

Prof. Dr. R. K. Arni	Departamento de Física - UNESP - Rio Preto
Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes	Departamento de Física e Biofísica - UNESP - Botucatu
Prof. Dr. Roy Edward Larson	Departamento de Bioquímica - USP - Ribeirão Preto

Obtenção do título de Mestre em Física – área de concentração em Biofísica Molecular junto a este Instituto, em 16.10.98, recebendo a menção “com distinção”.



AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. R. K. Arn, pelo projeto de mestrado e pelas demais projetos, que possibilitaram meu aprendizado e crescimento científicos.

A pessoa Arn, que proporcionou o início de minha carreira científica, acreditando em meu interesse e na minha capacidade, por ser minha fonte de inspiração, estímulo e aprendizado, por sua transmissão de experiências vividas ao longo de sua vida, e por permanecer com sua forte presença em meus pensamentos... mesmo durante sua ausência.

Ao Prof. Dr. F. Walz Jr., idealizador deste projeto e fornecedor das amostras, o que proporcionou o início e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. R. J. Ward, por sua co-orientação no período que esteve neste Instituto.

Ao Prof. Dr. Glaucius Oliva, que gentilmente nos permitiu a utilização do equipamento R-AXIS HC - Departamento de Física - USP - São Carlos.

Ao Dr. W. F. de Azevedo Jr., pelo auxílio na confecção de determinadas etapas deste trabalho.

Aos professores deste departamento e aos professores, Dr. Glaucius Oliva, Dr. Richard C. Garratt, Dr. Igor Polykarpov e Dr. Adilson Leite, pelos ensinamentos transmitidos em seus cursos.

Aos meus amigos de pós-graduação, que me ofereceram o mais importante de todos os auxílios - a amizade.

A todos os colegas de pós-graduação pelas inúmeras trocas durante este período.

Ao Prof. Dr. Márcio F. Colombo, que com sua paixão pela área, despertou meu interesse científico, em sua primeira aula, durante seu curso na graduação.

Ao Prof. Dr. Marcelo A. Fosse, meu primeiro orientador e um grande amigo, que muito me ensinou e por sentir quem sou, foi o maior incentivador de minha ida para a área de biologia estrutural.

Aos funcionários do departamento, por toda assessoria.

Ao programa Copex/CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente, me auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos meus pais - Ernesto e Dalva, e às minhas irmãs - Mirela e Trício, que são minha vida. Por eles e por este planeta, que acolhe tudo e todos aqueles que amam. **À vida...**
meu futuro a ciência, com dignidade e ética.

por tê-la dentro de mim...



AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. R. K. Arni, pelo projeto de mestrado e pelos demais projetos, que possibilitaram meu aprendizado e crescimento científicos.

A pessoa Arni, que proporcionou o início de minha carreira científica, acreditando em meu interesse e na minha capacidade, por ser minha fonte de inspiração, estímulo e aprendizado, por sua transmissão de experiências vividas ao longo de sua vida, e por permanecer com sua forte presença em meus pensamentos... mesmo durante sua ausência.

Ao Prof. Dr. F. Walz Jr., idealizador deste projeto e fornecedor das amostras, o que proporcionou o início e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. R. J. Ward, por sua co-orientação no período que esteve neste instituto.

Ao Prof. Dr. Glaucius Oliva, que gentilmente nos permitiu a utilização do equipamento R-AXIS IIC - Departamento de Física - USP - São Carlos.

Ao Dr. W. F. de Azevedo Jr., pelo auxílio na confecção de determinadas etapas deste trabalho.

Aos professores deste departamento e aos professores: Dr. Glaucius Oliva, Dr. Richard C. Garratt, Dr. Igor Polykarpov e Dr. Adilson Leite, pelos ensinamentos transmitidos em seus cursos.

Aos meus amigos de pós-graduação, que me ofereceram o mais importante de todos os auxílios - a amizade.

A todos os colegas de pós-graduação pelas inúmeras trocas durante este período.

Ao Prof. Dr. Márcio F. Colombo, que com sua paixão pela área, despertou meu interesse científico, em sua primeira aula, durante seu curso na graduação.

Ao Prof. Dr. Marcelo A. Fossey, meu primeiro orientador e um grande amigo, que muito me ensinou e por sentir quem sou, foi o maior incentivador de minha ida para a área de biologia estrutural.

Aos funcionários do departamento, por toda assessoria.

Ao programa Capes/CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos meus pais - Ernesto e Dalva, e às minhas irmãs - Mirela e Tricia, que são minha vida. Por eles e por este planeta, que acolhe tudo e todos aqueles que amo, dedicarei meu futuro à ciência, com dignidade e ética.



SUMÁRIO

5. DISCUSSÃO	34
5.1 Avaliação do modelo estrutural	34
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Ribonuclease T ₁	3
1.2 Conservação da estrutura primária	10
1.3 Mecanismo catalítico	13
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Cristalização do complexo Gln ²⁵ RNase T ₁ *GpcU	18
3.2 Coleta dos dados de difração de raios X	21
3.3 Resolução da estrutura	24
3.4 Refinamento do complexo Gln ²⁵ RNase T ₁ *GpcU	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Cristalização do complexo Gln ²⁵ RNase T ₁ *GpcU	26
4.2 Coleta dos dados de difração de raios X	27
4.3 Resolução da estrutura	29
4.4 Refinamento do complexo Gln ²⁵ RNase T ₁ *GpcU	31



5. DISCUSSÃO	34
5.1 Avaliação do modelo estrutural	34
a) Estereoquímica do modelo	34
b) Análise do fator de temperatura (B)	37
c) Densidade eletrônica do análogo de substrato GpcU	38
d) Comparações entre os monômeros da unidade assimétrica	39
5.2 Análise do modelo estrutural	40
a) Função da interação His40 com o grupo 2'-OH da base guanina	47
b) Interações: Tyr38, Arg77, His92 e Phe100	49
c) Conclusões e perspectivas	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
APÊNDICE 1 - Tabela: Método da Matriz Esparsa	65
APÊNDICE 2 - Teoria: Cristalização de Macromoléculas	68
APÊNDICE 3 - Informações Curriculares	77
Créditos - Mestrado	77
Curriculum Vitae	78
Publicações	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática do enovelamento da Gln ²⁵ RNase T ₁ , apresentando suas estruturas secundárias.	05
Figura 2.	Imagem estereoscópica de uma das regiões de reconhecimento, mostrando o sanduíche entre as tirosinas (42 e 45) e a base guanina do complexo binário Gln ²⁵ RNase T ₁ *2'GMP.	06
Figura 3.	Representação da estrutura química de um substrato GpN, onde B representa a base do nucleosídeo resultante; acima da linha observamos o sítio de reconhecimento primário e abaixo, a região do subsítio de reconhecimento.	08
Figura 4.	Alinhamento das estruturas primárias de ribonucleases guanina-específicas.	12
Figura 5.	Esquema do mecanismo catalítico da RNase T ₁ envolvendo o par ácido-base catalíticos (Heinemann & Saenger, 1982).	15
Figura 6.	Imagem esquemática do análogo de substrato GpcU, mostrando os grupos que estão envolvidos na interação com a enzima: base guanina, guanosina 2' hidroxil e grupos 3' fosfato, além o nucleosídeo resultante.	17
Figura 7.	Representação esquemática da técnica de difusão de vapor - sistema <i>hanging drop</i> .	18
Figura 8.	Etapas da técnica de cristalização: (8a) placa de cristalização tipo <i>Linbro</i> ; (8b) lamínula siliconizada com macromolécula e solução precipitante (sistema <i>hanging-drop</i>); (8c) sistema fechado necessário para atingir o estado de supersaturação e possivelmente a cristalização (homepage <i>Hampton Research Cia</i>).	20
Figura 9.	Representação esquemática da montagem de um monocristal no capilar, para coleta dos dados de difração de raios X.	21
Figura 10.	Fotografia da cabeça goniométrica do equipamento utilizado para a coleta dos dados de difração de raios X (McRee, 1993).	22

Figura 11.	Fotografia do monocristal obtido do complexo binário Gln ²⁵ RNase T ₁ *GpcU, utilizado para a coleta dos dados de difração de raios X.	26
Figura 12.	Unidade assimétrica do cristal, apresentando dois monômeros da enzima e três moléculas do análogo de substrato - a quarta molécula aparece por simetria (Ribbons 2.0 - Carson 1987).	31
Figura 13.	Gráfico do Ramachandran ilustrando a distribuição dos resíduos de aminoácidos do complexo binário Gln ²⁵ RNase T ₁ *GpcU.	36
Figura 14.	Gráficos dos fatores de temperatura para a cadeia principal e lateral para os dois monômeros do complexo binário Gln ²⁵ RNase T ₁ *GpcU.	37
Figura 15.	Imagem estereoscópica da densidade eletrônica do análogo do substrato GpcU à uma resolução de 2.0Å.	38
Figura 16.	Diagrama esquemático das ligações de hidrogênio entre RNase T ₁ *GpcU.	42
Figura 17.	Diagrama esquemático das ligações de hidrogênio entre RNase T ₁ com 2'GMP (a) e RNase T ₁ com 3'GMP (b).	43
Figura 18.	Interação no sítio ativo da RNase T ₁ complexada com: (a) <i>exo</i> cGPS ligado no sítio A (b) 3'GMP ligado no sítio B, observado após uma semana (c) 3'GMP ligado no sítio A, com 15 semanas (d) fosfato e <i>exo</i> cGPS ligado no sítio A e B respectivamente.	46
Figura 19.	Descrição esquemática de um diagrama de fase bidimensional da solubilidade de uma macromolécula biológica.	72
Figura 20.	Representação esquemática da gota pendurada (<i>hanging drop</i>), gota sentada (<i>sitting drop</i>) e gota sanduíche (<i>sandwich drop</i>).	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estatísticas da coleta dos dados de difração de raios X	28
Tabela 2.	Resultados da resolução da estrutura cristalográfica	30
Tabela 3.	Estatísticas do Refinamento dos Dados de Difração de Raios X	33
Tabela 4.	RMS total dos carbonos-alfa entre os monômeros da Gln ²⁵ RNase T ₁ livre e Gln ²⁵ RNase T ₁ *GpcU	39
Tabela 5.	Comparação das ligações de hidrogênio da RNase T ₁ com GpcU1, GpcU2, RNase T ₁ *3'GMP+G; RNase T ₁ *2'GMP e RNase T ₁ *3'GMP	41
Tabela 6.	Método da matriz esparsa (Jancarik & Kim, 1991)	65
Tabela 7.	Parâmetros que afetam a solubilidade de macromoléculas biológicas	71



LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
RNA	ácido ribonucléico
RNases	nucleases dos ácidos desoxirribonucléicos
DNases	nucleases dos ácidos ribonucléicos
GpcU	guanilil(3'-6')6'-deoxihomouridina
GpU	dinucleotídeo 3',5' guanosina-uridina
pdb	<i>Protein Data Bank</i>
2'GMP	2' ácido guanílico
3'GMP	3' ácido guanílico
2',5'-GMP	guanilil-2',5'-guanosina
exo 2',3'-cGPS	<i>exo</i> guanosina 2',3'-ciclofosforotioato
RMN	ressonância magnética nuclear
PEG	polietilenoglicol
MPD	2-metil-2,4-pentanediol
HEPES	ácido(N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[2-etanosulfônico])
TRIS	tris-hidroximetil amino metano
B	fator de temperatura
F_{obs}	fator de estrutura observado
F_{calc}	fator de calculado
Cc	coeficiente de correlação



RESUMO

A enzima ribonuclease T_1 (RNase T_1 ; E.C. 3.1.27.3) isolada do fungo *Aspergillus oryzae*, é o representante melhor caracterizado da família de ribonucleases microbianas. Estas endonucleases monoméricas, de baixo peso molecular, apresentam alta homologia sequencial e estrutural.

A RNase T_1 é uma enzima extracelular ácida, que catalisa a hidrólise de fitas simples de RNA, especificamente após guanina, produzindo oligonucleotídeos guanosina terminal 3'-fosfato.

Similarmente à RNase A, a hidrólise envolve duas etapas: a clivagem da cadeia de RNA pela transesterificação da ligação 5'-fosfoéster, formando guanosina 2',3'-fosfato cíclico na primeira etapa, seguido de sua hidrólise, na segunda etapa.

Estudos bioquímicos e estruturais demonstram a importância de um ácido glutâmico (Glu58) e duas histidinas (His40 e His92) juntamente com uma arginina (Arg77) para a atividade enzimática. O papel exato destes aminoácidos na catálise ainda não está claro.

O alvo deste trabalho é obter informações estruturais da interação da RNase T_1 com o análogo fosfonado de GpU (GpcU (guanilil (3',6') 6'-deoxihomouridina). Este análogo fosfonado possui todos os grupos envolvidos na interação, mas não está susceptível à hidrólise.

ABSTRACT

The enzyme ribonuclease T_1 (RNase T_1 ; E.C. 3.1.27.3) isolated from the fungus *Aspergillus oryzae*, is one of the best characterized representatives of the family of microbial ribonucleases. These monomeric low molecular weight endonucleases, display high sequence and structural homology.

RNase T_1 is an acid extracellular enzyme that catalyses the hydrolysis of single stranded RNA specifically after guanine, producing oligonucleotides guanosine 3'-phosphate.

Analogous to RNase A, the hydrolysis involves two steps: the cleavage of RNA by transesterification of the 5'-phosphodiester bond, forming 2'-3'-cyclic phosphate in the first step, followed by hydrolysis of the cyclic phosphate in the second step.

Structural and biochemical studies have demonstrated the importance of a glutamic acid (Glu58), two histidines (His40 and His92) and an arginine (Arg77) for catalytic activity. However, the exact role of these amino acids in catalysis is still unclear.

The aim of this study is to obtain structural information of the interactions of RNase T_1 with a phosphonate analog of GpU (GpcU (guanilil (3', 6')6'-deoxyhomouridina). This phosphonate analog possesses all the groups forming interactions but is not susceptible to hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

As macromoléculas biológicas são separadas nas seguintes classes: ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Com exceção aos lipídeos, as demais macromoléculas são constituídas por unidades monoméricas, sendo respectivamente: nucleotídeos, aminoácidos e açúcares (Voet, 1995).

Existem duas formas de ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). O ácido desoxirribonucleico está presente em todas as formas de vida, e é considerada a molécula da hereditariedade, pois é ela quem transmite toda a informação gênica de um organismo para seu descendente (certos vírus utilizam a fita de RNA para desempenhar essa função). O ácido ribonucleico apresenta-se em diferentes formas, sendo as principais: RNA mensageiro (RNAm), RNA transportador (RNAt) e RNA ribossômico (RNAr), entre outras (Saenger, 1984).

Para desempenhar determinados processos moleculares, os ácidos nucleicos necessitam da interação com a classe macromolecular mais complexa e diversificada - as proteínas. As proteínas podem assumir os mais diferentes papéis durante os processos bioquímicos, que vão desde constituição estrutural de tecidos à complexas reações enzimáticas.

Dentre as várias interações que existem entre os ácidos nucleicos e as proteínas, podemos exemplificar as reações enzimáticas que ocorrem entre fitas de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) e enzimas nucleolíticas (nucleases). A função destas enzimas é catalisar o ataque nucleofílico às ligações fosfodiésteres, promovendo o rompimento destas ligações, com liberação de produtos específicos. As nucleases dos



ácidos desoxirribonucleicos e dos ácidos ribonucleicos são, respectivamente, DNases e RNases (Saenger, 1984).

De maneira geral, as nucleases podem ser classificadas com base em seus substratos (DNA e RNA), com relação à localização do sítio de hidrólise na molécula (endonuclease e exonuclease), e com base nos produtos da reação (3'-fosfato terminal e 5'-fosfato terminal) (Laskowski, 1985).

As hidrólises dos ácidos ribonucleicos (que são pertencentes à classe das RNAs) em seus componentes nucleotídicos, são realizadas por diferentes tipos de enzimas - a classe das ribonucleases (RNases). Estas enzimas estão capacitadas para reconhecer tipos de RNAs e/ou regiões específicas das fitas de RNAs.

As RNases clássicas são caracterizadas por serem moléculas relativamente pequenas, e apresentam especificidade por uma determinada base nitrogenada, enquanto que as RNases recentemente descritas são altamente específicas para determinados tipos de RNAs, por exemplo a RNase P - específica para RNA transportador e RNase E - específica para RNA 5S (Berkower *et al.*, 1973).

Dentre estes diferentes tipos de ribonucleases, existe grande interesse por aquelas enzimas que apresentam sítios de reconhecimento altamente específicos para determinadas bases nitrogenadas. As características estruturais que proporcionam essas interações específicas entre moléculas de proteínas e ácidos ribonucleicos, são utilizadas na área de biologia molecular como uma ferramenta molecular para trabalhos de sequenciamento primário de proteínas.



As ribonucleases de fungos, que hidrolisam ligações fosfodiésteres do ácido ribonucléico com produção de 3'-mononucleotídeos via intermediário 2'-3'-cíclico, podem ser divididas em duas classes de acordo com o massa molecular e existência de especificidade por base nitrogenada ou não.

A primeira classe é constituída entre outras, pelas RNase T₁ de *Aspergillus oryzae* (Sato & Egami, 1957), RNase Ms de *Aspergillus saitoi* (Watanabe *et al.*, 1986), RNase N₁ de *Neurospora crassa* (Ishikawa *et al.*, 1969) e pela RNase U₂ de *Ustilago sphaerogena*. (Frankfort, 1985). Estas enzimas possuem massa molecular de aproximadamente 11000Da e especificidade por ácido guanílico, além de possuírem alta homologia seqüencial e estrutural.

A segunda classe é constituída entre outras, pelas RNase T₂ de *Aspergillus oryzae* (Rushzky, 1963), RNase M de *Aspergillus saitoi* (Watanabe *et al.*, 1986) e pela RNase Trv de *Trichoderma viridae* (Inada *et al.*, 1991). Estas possuem massa molecular entre 24000 e 34000Da e não apresentam especificidade por base nitrogenada, apenas preferência pelo ácido guanílico. Nesta classe também há homologia seqüencial e estrutural entre seus componentes.

1.1 Ribonuclease T₁

A enzima utilizada em nosso estudo estrutural é a ribonuclease T₁ (Gln²⁵RNase T₁; E.C. 3.1.27.3) que é uma endonuclease extracelular extraída do pó TakaDiastase, um extrato enzimático do meio de cultura do fungo *Aspergillus oryzae* (Sato & Egami, 1957), industrialmente utilizado no processamento do malte durante a fabricação de



sakê (vinho de arroz japonês). Fülling e Rüterjans (1978) purificaram de uma fonte diferente (Luitpold Werke, Munich) a isoforma desta RNase T₁, que possui na cadeia polipeptídica um resíduo lisina (Lys) na posição 25. Heinemann e Saenger (1982) purificaram a RNase T₁ original (TakaDiastase), que apresenta um resíduo glutamina (Gln) nessa mesma posição 25. Respectivamente, estas enzimas são denominadas Lys²⁵RNase T₁ e Gln²⁵RNase T₁.

Comparações entre estas isoformas não revelaram diferenças de atividade catalítica; no entanto, a Lys²⁵RNase T₁ apresenta um enovelamento estrutural mais estável, cerca de 0,9 kcal/mol sob condições padrão (Shirley *et al.*, 1989), que pode ser devido à ponte salina entre as cadeias laterais dos resíduos Lys25 e Glu28 (Kiefhaber *et al.*, 1990b).

O primeiro sequenciamento feito desta enzima foi estabelecido por Takahashi (1965) e reconsiderado em uma revisão, na qual as posições dos resíduos de aminoácidos 71 a 73 foram corrigidas de Pro-Gly-Ser para Gly-Ser-Pro (Takahashi, 1985).

A cadeia polipeptídica da RNase T₁ é constituída de 104 resíduos de aminoácidos, com massa molecular 11085Da (Takahashi, 1971). É uma molécula rica em resíduos aromáticos (mas com apenas um resíduo triptofano) e com poucos resíduos básicos. É uma proteína ácida, com ponto isoelétrico 2,9 (Iida & Ooi, 1969).

RNase T₁ é uma proteína compacta, com motivo estrutural tipo $\alpha+\beta$ (Levitt & Chotia, 1976), típico das RNases desta família, tais como RNase Bi de *Bacillus intermedius* (Pavlovsky *et al.*, 1982), RNase U₂ de *Ustilago sphaerogena* (Matsuzaki *et al.*, 1984) e RNase C₂ de *Aspergillus clavatus* (Pavlovsky *et al.*, 1984).



Numa representação esquemática do enovelamento da enzima Gln²⁵RNase T₁ (figura 1), identificamos uma α -hélice longa periférica de 4,5 voltas, uma folha- β antiparalela maior (constituída de cinco fitas: $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$ e $\beta 7$), e uma folha- β antiparalela menor (constituída de duas fitas: $\beta 1$ e $\beta 2$) (Heinemann & Saenger, 1986). A região N-terminal da cadeia polipeptídica é estabilizada por uma ponte dissulfeto, e uma segunda ponte dissulfeto liga a região N-terminal e C-terminal da molécula, o que proporciona uma alta estabilidade à esta enzima, juntamente com as α -hélices, β -folhas e ligações de hidrogênio.

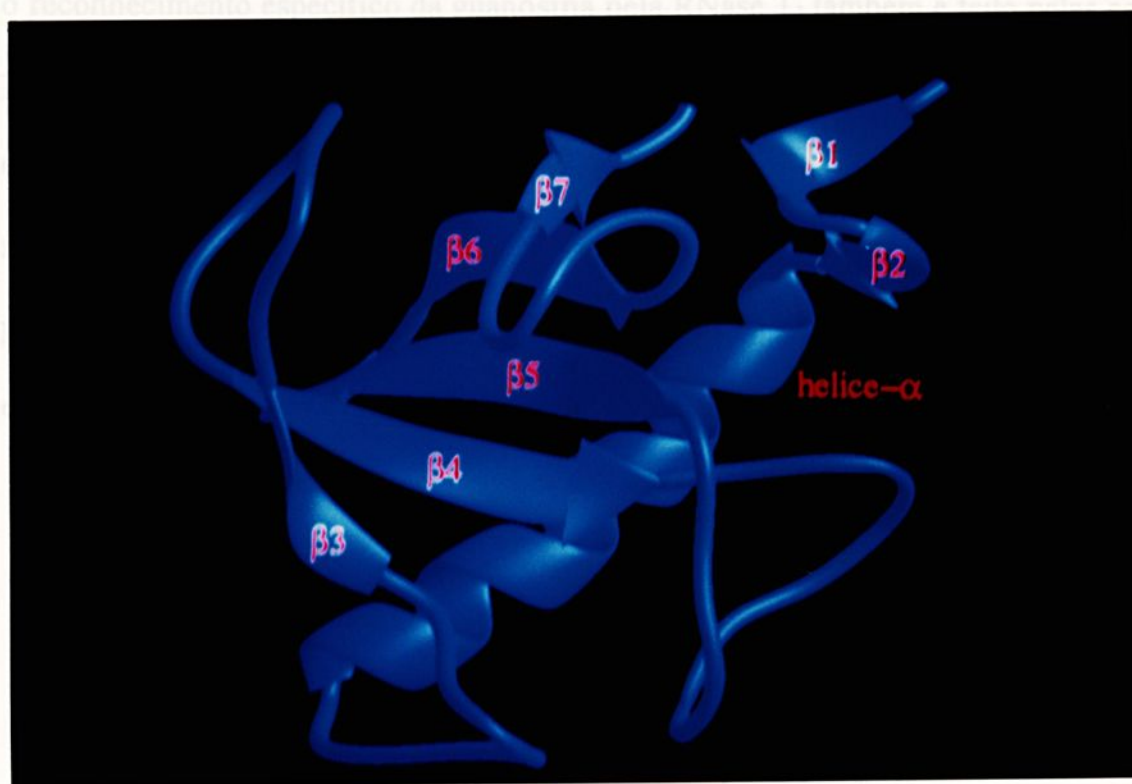


Figura 1. Representação esquemática do enovelamento da Gln²⁵RNase T₁, apresentando suas estruturas secundárias.

Entre a hélice- α e a folha- β maior, há um pequeno bolsão de ligação para acomodar a molécula do inibidor, além de um centro hidrofóbico. As quatro alças laterais dessa região, adotam um enovelamento irregular, pois há dois resíduos de

prolina em conformação *cis* (Pro39 e Pro55), além de um número de voltas reversas (Heinemann & Saenger, 1982).

É nessa região da alça, constituída pelos aminoácidos Tyr42 - Asn43 - Asn44 - Tyr45 - Glu46 e Asn98, onde é feito o reconhecimento específico com a base guanina (Kollner, 1992); enquanto que os resíduos envolvidos na catálise estão ancorados na folha- β maior (constituídos pelos aminoácidos Tyr38, His40, Glu58, Arg77, His92 e Phe100).

Dados estruturais obtidos por cristalografia de difração de raios X sugerem que o reconhecimento específico da guanosina pela RNase T₁ também é feito pelas cadeias laterais das Tyr42 e Tyr45, que fazem um sanduíche em paralelo com a base guanina. O anel aromático da Tyr42 e a base guanina fazem uma interação de empilhamento face-a-face, enquanto que a Tyr45 forneceria seu anel fenólico de forma a proporcionar uma "tampa" ao sítio de ligação (Arni *et al.*, 1988), e não contribuindo especificamente na ligação com guanina (figura 2).

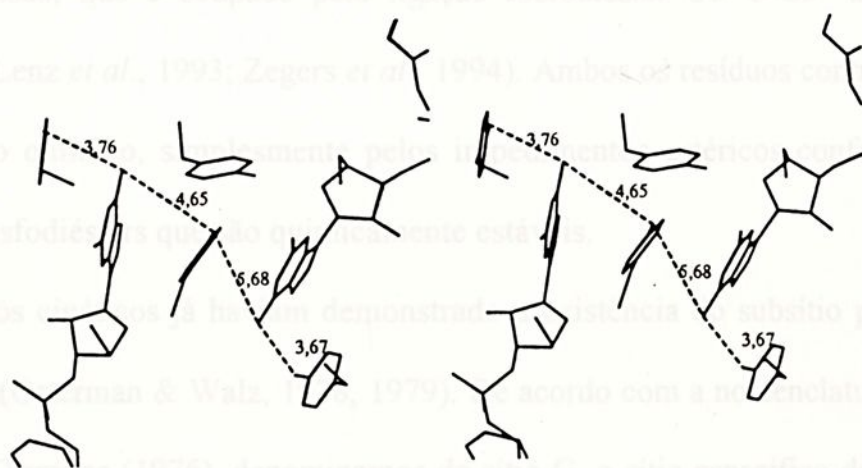


Figura 2. Imagem estereoscópica de uma das regiões de reconhecimento, mostrando o sanduíche entre as tirosinas (42 e 45) e a base guanina do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*2'GpcU.

O grupo carboxila do Glu46 faz parte de um motivo estrutural invariável que oferece a especificidade para guanina (Sevcik *et al.*, 1990), sendo também um resíduo extremamente conservado na família de ribonucleases microbianas guanina-específicas (Hill *et al.*, 1983).

Recentemente, através da substituição de determinados resíduos de aminoácidos - mutações Asn36Ala e Asn98Ala (Steyaert *et al.*, 1992), foi possível identificar o subsítio que liga dinucleotídeos, e demonstrar sua contribuição para a catálise enzimática. Através destes estudos, foi determinada a preferência por resíduos citidina, e quais são as cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos nesse reconhecimento secundário, que são os grupos amidas dos Asn36 e Asn98. O resíduo Asn36 interage com o anel da ribose do nucleosídeo, enquanto que o resíduo Asn98 é responsável pela preferência por citidina.

As interações ocorrem mais precisamente entre as cadeias laterais do Asn36 e Asn98 que formam duas protrusões na superfície da proteína, localizados em ambos os lados do bolsão, que é ocupado pela ligação fosfodiéster O3'-P-O5' do substrato polimérico (Lenz *et al.*, 1993; Zegers *et al.*, 1994). Ambos os resíduos contribuem para o movimento químico, simplesmente pelos impedimentos estéricos conformacionais da ligação fosfodiéster que são quimicamente estáveis.

Estudos cinéticos já haviam demonstrado a existência do subsítio para ligação de substrato (Osterman & Walz, 1978, 1979). De acordo com a nomenclatura proposta por Walz & Terenna (1976), denominamos de sítio G, o sítio específico de ligação da RNase T₁ com guanosina, onde o fosfato e os sítios de ligação nucleosídica em direção ao 5'terminal da fita de RNA ligada, são denominados como sítios 1p, 2p, ... e 1N, 2N,



..., respectivamente, e como subsítios p1, p2, ... e N1, N2, ... em direção ao 3'terminal (figura 3).

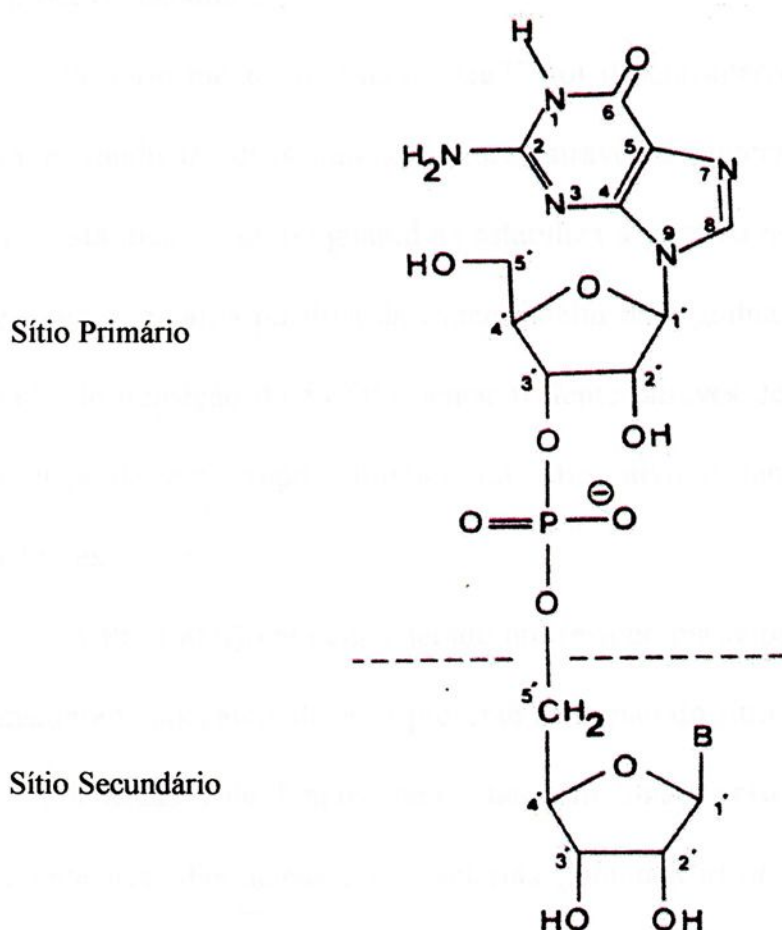


Figura 3. Representação da estrutura química de um substrato GpN, onde B representa a base do nucleosídeo resultante; acima da linha observamos o sítio de reconhecimento primário e abaixo, a região do subsítio de reconhecimento.

A partir de pesquisas com modificações químicas, foi possível identificar o envolvimento dos resíduos de aminoácidos Tyr38, His40, Glu58, Arg77, His92 e Phe100 (Takahashi *et al.*, 1967; Takahashi, 1970a, 1970b, 1976; Doumen *et al.*, 1996) no processo catalítico.

Posteriormente, o resíduo Arg77 foi desconsiderado como resíduo catalítico, demonstrando ter duas outras funções: através de interações com o resíduo Glu58 (base catalítica), o grupo guanidina estabiliza a posição no centro ativo deste resíduo; além disso, a carga positiva da cadeia lateral da arginina mantém baixa a energia do estado de transição do fosfato pentacovalente, através de interações eletrostáticas. A presença de um grupo catiônico no sítio ativo é uma característica comum de nucleases.

A Phe100 não era considerado um resíduo participante da catálise. Passou a ser considerado pois além de estar presente na região do sítio ativo, é encontrado em todas as ribonucleases de fungos, tendo também uma Tyr103 (equivale estruturalmente) presente nas ribonucleases de bactérias (Doumen *et al.*, 1996). O fato de fazer um contato direto com a cadeia lateral da His92 (Arni *et al.*, 1988), fez da Phe100 um possível resíduo participativo do funcionamento catalítico desta enzima.

Evidências diretas da localização dos resíduos de histidinas no sítio ativo, foram obtidas por investigações com ressonância magnética nuclear (RMN) (Fülling & Rüterjans, 1978; Arata *et al.*, 1979; Inagaki *et al.*, 1981) enquanto que, a mudança de fluorescência da proteína ligada a nucleotídeos, tem sido atribuída à localização das cadeias laterais de resíduos de tirosina próximos ao sítio de ligação (Pongs, 1970; Campbell *et al.*, 1976).



As tentativas para se estabelecer uma correlação mais rigorosa entre estrutura e função, através da determinação da estrutura tridimensional por técnicas de difração de raios X desta enzima, teve início com o primeiro trabalho da estrutura da isoforma Lys²⁵RNase T₁ complexada com o inibidor 2'GMP (Heinemann & Saenger, 1982), com um posterior trabalho de refinamento das coordenadas atômicas (Arni, *et al.*, 1987, 1988).

No entanto, muitos outros estudos estruturais foram desenvolvidos na tentativa de esclarecer a alta especificidade desta enzima, entre estes: da isoforma Lys²⁵RNase T₁ complexada com o inibidor 2',5'-GpG (Koepke *et al.*, 1989), e H₂VO₄⁻ (Kostrewa *et al.*, 1989), da Gln²⁵RNase T₁ nativa (Arni *et al.*, 1992), da Gln²⁵RNase T₁ complexada com 2'GMP (Sugio *et al.*, 1988), e com um análogo do substrato 3'GMP (Sugio *et al.*, 1985 a, b), além de vários estudos de mutantes complexados com uma variedade de ligantes ribonucleotídicos e análogos do substrato oligonucleotídicos (Hakoshima *et al.*, 1990a, b).

1.2 Conservação da Estrutura Primária

Essas ribonucleases guanina-específicas de fungos e bactérias, apresentam uma alta homologia seqüencial e estrutural que podem ser verificados através de uma comparação de suas seqüências primárias. As seqüências estão alinhadas de forma a maximizar a homologia entre os exemplares, e os resíduos de aminoácidos estão numerados de acordo com a seqüência da RNase T₁ (figura 4).

A partir de uma análise comparativa dos principais resíduos envolvidos na especificidade e/ou catálise, em algumas RNases microbianas (Hartley, 1980; Hill *et*



al., 1983), é possível observarmos a alta conservação sequencial, apresentando apenas algumas pequenas diferenças entre os membros mais distantes (bactérias).

Praticamente todos os resíduos importantes para catálise e reconhecimento primário e secundário foram conservados durante a evolução, o que demonstra e confirma ainda mais sua importância funcional e estrutural.



1.3 Mecanismo Catalítico

A função da RNase T₁ é catalisar a hidrólise de fitas simples de ácidos ribonucléicos (RNAs) após oligonucleotídeos com guanosina 2'-3'-fosfato terminal, produzindo guanosina 3'-fosfato e 5'-OH terminal. O reconhecimento desta endonuclease é cerca de um milhão de vezes mais específico para o resíduo guanina do que para o resíduo adenina (Walz *et al.*, 1979). Esta alta especificidade motivou extensivos estudos bioquímicos e biofísicos (Egami *et al.*, 1980; Takahashi & Moore, 1982).

Através de uma reação de transesterificação, ocorre uma clivagem específica da cadeia de RNA na ligação 3',5'-fosfodiéster, havendo a produção de um intermediário pentacovalente 2',3'-fosfodiéster cíclico, resultando de sua hidrólise catalítica, os produtos correspondentes 3'monoésteres (Takahashi & Moore, 1982; Heinemann & Hahn, 1989).

Neste mecanismo linear, é essencial a presença do par ácido-base catalíticos, localizados em cada lado da ligação *scissile*, onde a atividade catalítica deste tipo de enzima, depende de dois grupos que possam ser deprotonados (bases catalíticas) e dois grupos que possam ser protonados (ácidos catalíticos) (Steyaert *et al.*, 1990).

Osterman e Walz (1978) sugeriram que o Glu58 e um grupo até então não identificado, corresponderiam as bases catalíticas, e que as His40 e His92 representariam os ácidos catalíticos.

Com base em estudos cristalográficos por difração de raios X da estrutura tridimensional de RNase T₁ complexada com o inibidor específico 2'GMP, foi possível propor um mecanismo catalítico no qual o Glu58 e His92 agiriam como o par



base e ácido catalíticos, respectivamente (Heinemann & Saenger, 1982, 1983). Nishikawa *et al* (1987), observando que o mutante RNaseT₁Ala58 apresentava alta atividade residual (3 ordens de magnitude), propôs um outro mecanismo catalítico, onde dois resíduos de histidinas (His40 e His92) agiriam como par base e ácido catalíticos, da mesma forma que ocorre no mecanismo catalítico de ribonuclease pancreática bovina (RNaseA).

Em um estudo mais recente da dependência de pH em mutantes de RNase T₁, foi possível mostrar a contribuição do papel de base catalítica para o Glu58. A His40 teria uma habilidade em adotar a função de base catalítica, caso o Glu58 estivesse ausente, proporcionando a permanência da atividade catalítica desta enzima, fato estruturalmente razoável (Pletinckx *et al.*, 1994). Uma comparação complexa de todos os sítios ativos da família de ribonucleases microbianas, favoreceu o modelo do par catalítico Glu-His (Nonaka *et al.*, 1993).

Na primeira etapa (etapa de transesterificação), o grupo γ -carboxila do Glu58 age como uma base catalítica, retirando um próton do grupo 2'-OH do anel de ribose do substrato. Este 2'-O carregado negativamente promove o ataque nucleofílico do átomo de fósforo adjacente (figura 5). O anél β -imidazólico da His92, agindo como um ácido catalítico, protona o 5'-O do anel de ribose adjacente, levando à formação do intermediário cíclico 2',3'-fosfato. Na segunda etapa, o intermediário cíclico é hidrolizado pela His92 que retira um próton de uma molécula de água, e com o auxílio do Glu58 protona o 2'-O da ribose, liberando os produtos correspondentes 3'monoésteres (Takahashi & Moore, 1982; Heinemann & Hahn, 1989).



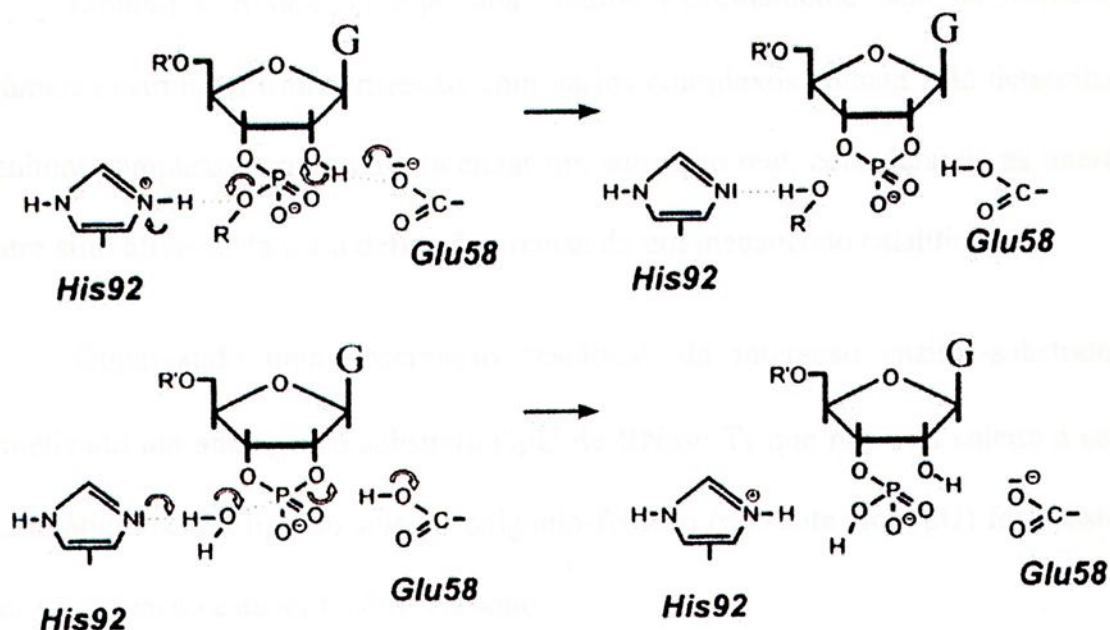


Figura 5. Esquema do mecanismo catalítico da RNase T₁ envolvendo o par ácido-base catalíticos (Heinemann & Saenger, 1982).

O resíduo His92 tem uma cadeia lateral imidazólica com dois papéis: serve como um subsítio, formando um empilhamento com a base de um substrato ligado à enzima, orientando desta maneira o grupo fosfodiéster *scissile* no sítio ativo, permitindo o ataque pelos resíduos catalíticos (Lenz *et al.*, 1991a); além disso, serve como o ácido catalítico na etapa de transesterificação, e como um ácido catalítico que ativa uma molécula de água para a etapa de hidrólise (Heinemann & Saenger, 1982).

Os resíduos Tyr38, His40 e Arg77 estabilizam o intermediário pentacovalente, através de interações eletrostáticas (Nishikawa *et al.*, 1987; Arni *et al.*, 1988; Steyaert *et al.*, 1990, 1991a; Grunert *et al.*, 1991).

2. OBJETIVOS

Embora a RNase T₁ seja uma enzima extremamente bem caracterizada, e inúmeras estruturas tridimensionais com vários complexos tenham sido determinadas, nenhum complexo conseguiu mimetizar um substrato real, considerando as interações entre sítio ativo-fosfato e a definição precisa de um mecanismo catalítico.

Objetivando uma observação “estática” da interação enzima-substrato, foi sintetizado um análogo do substrato GpU de RNase T₁ que não está sujeito à catálise enzimática, pois a ligação *scissile* oxigênio-fósforo (presente em GpU) foi substituída por uma ligação estável fósforo-carbono.

O análogo do substrato é o guanilil (3'-6')6'-deoxihomouridina (GpcU) (figura 6), que possui todos os grupos que estão envolvidos na interação do substrato GpU com RNase T₁, que incluem: base guanina, guanosina 2' hidroxil e grupos 3' fosfato, além o nucleosídeo resultante (Osterman, & Walz, 1978).

Esse trabalho tem com objetivo descrever a co-cristalização e analisar a estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios X do complexo binário RNase T₁ * GpcU, na tentativa de um melhor esclarecimento dos resíduos que participam do reconhecimento altamente específico desta enzima pela guanina, além do entendimento do funcionamento e participação dos resíduos catalíticos.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cristalização de complexo binário $\text{Gln}^{25}\text{RNase T}_1$ *GpcU

Uri

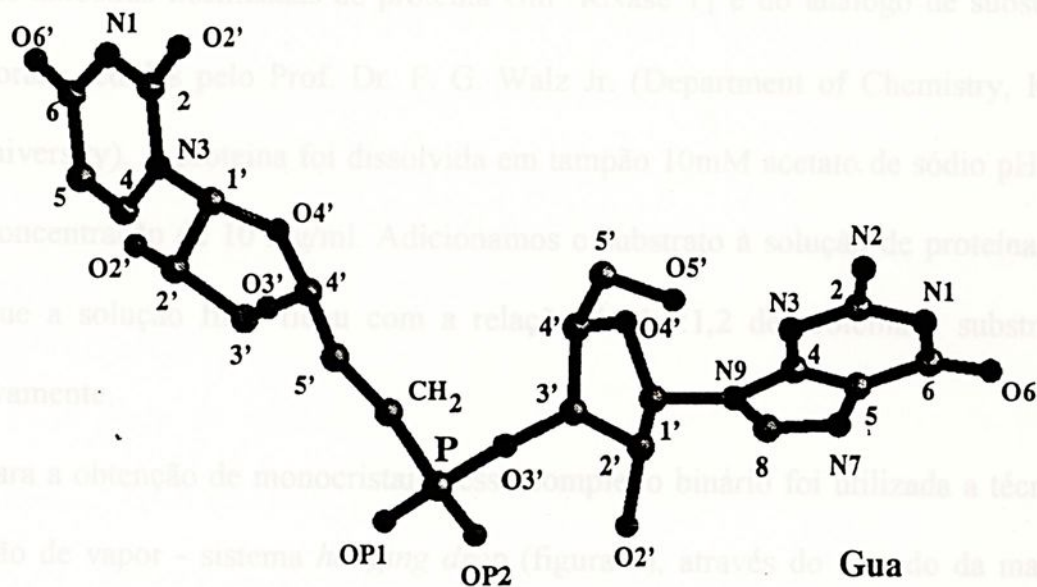


Figura 6. Imagem esquemática do análogo de substrato GpcU, mostrando os grupos que estão envolvidos na interação com a enzima: base guanina, guanosina 2' hidroxil e grupos 3' fosfato, além o nucleosídeo resultante (Ribbons 2.0 - Carson, 1987).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cristalização do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU

As amostras liofilizadas de proteína Gln²⁵RNase T₁ e do análogo de substrato GpcU foram cedidas pelo Prof. Dr. F. G. Walz Jr. (Department of Chemistry, Kent State University). A proteína foi dissolvida em tampão 10mM acetato de sódio pH 4,1 à uma concentração de 10 mg/ml. Adicionamos o substrato à solução de proteína, de forma que a solução final ficou com a relação de 1,0:1,2 de proteína e substrato, respectivamente.

Para a obtenção de monocristais desse complexo binário foi utilizada a técnica de difusão de vapor - sistema *hanging drop* (figura 7), através do método da matriz esparsa (Jancarick & Kim, 1991).

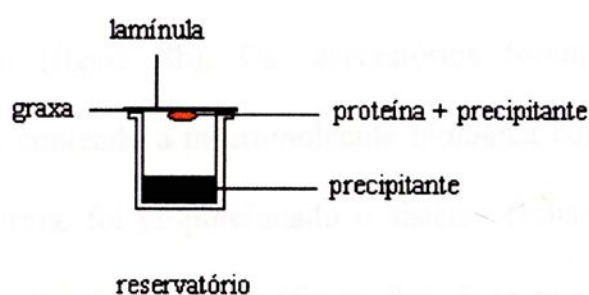


Figura 7. Representação esquemática da técnica de difusão de vapor – sistema *hanging drop*.

O aparato necessário para desenvolver a etapa de cristalização de macromoléculas biológicas são: caixas de cultura celular (usadas para cristalização) - placas tipo *Linbro*, graxa de vácuo, lâminulas siliconizadas, soluções do método da matriz esparsa e a macromolécula biológica à ser cristalizada.

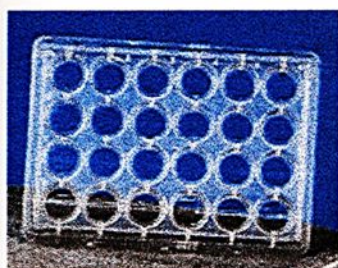
Para que a gota permaneça suspensa (sistema *hanging-drop*), necessitamos que a lamínula apresente uma tensão superficial (para que o cristal não adere na lamínula), para isso, fazemos um processo de siliconização, que é feito utilizando uma solução 1% Prosil-28. Todas as soluções do método da matriz esparsa foram preparadas no próprio laboratório do Grupo de Biologia Estrutural - UNESP - São José do Rio Preto, tomando-se o cuidado de mantê-las com um alto grau de pureza, que é um fator imprescindível para o sucesso da cristalização de macromoléculas biológicas (tabela X - apêndice 1).

Cada placa de cristalização tipo *Linbro* (figura 8a) é constituída por 24 reservatórios. Após distribuir cada solução do método da matriz esparsa em seus respectivos reservatórios, foi colocada uma camada de graxa de vácuo nas bordas dos reservatórios. Em cada lamínula siliconizada, foi pipetado 1 μ L da solução de proteína complexada com o substrato e sobre essa, foi acrescentado 1 μ L da solução presente em cada reservatório (figura 8b). Os reservatórios foram fechados com suas respectivas lamínulas, contendo a macromolécula biológica com a solução de agente precipitante. Dessa forma, foi proporcionado o sistema fechado necessário para dar início ao processo de difusão de vapor (figura 8c). Essa proporção (1 μ L : 1 μ L) foi utilizada para que a concentração da mistura (complexo - solução com agente precipitante) na gota, ficasse à concentração 50% menor do que a concentração da solução precipitante no reservatório, pois é esta diferença de concentrações que faz com que a difusão de vapor inicie.

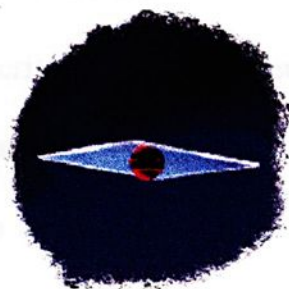
O princípio desse método, é o processo de equilíbrio entre essas duas soluções através da fase de vapor em um meio fechado. A solução menos concentrada perderá seu solvente volátil até que os potenciais químicos de ambas as soluções se igualem



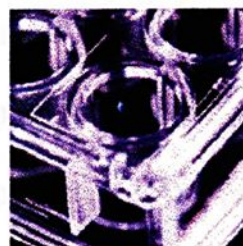
(Blundell & Johnson, 1976) o que poderá ou não, levar a solução da macromolécula à um estado de supersaturação, que é a condição necessária para ocorrer a formação dos primeiros agregados cristalinos, com posterior formação do monocristal.



(8a)



(8b)



(8c)

Figura 8. Etapas da técnica de cristalização: (8a) placa de cristalização tipo *Linbro*; (8b) lamínula siliconizada com macromolécula e solução precipitante (sistema *hanging-drop*); (8c) sistema fechado necessário para atingir o estado de supersaturação e possivelmente a cristalização (homepage *Hampton Research Cia*)

3.2 Coleta dos dados do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

A coleta dos dados de difração de raios X foi feita no Laboratório de Cristalografia de Proteínas no Instituto de Física - USP São Carlos, utilizando um gerador ânodo rotatório Rigaku RU200, e o padrão de difração foi medido utilizando um detetor com placa de imagem R-AXIS IIC.

Após a obtenção do monocristal, sua montagem será feita em um capilar de vidro (diâmetro varia de 0,5 - 1,5mm). O cristal será introduzido por capilaridade, e o excesso de líquido-mãe eliminado através do uso de fitas de papel absorvente, para evitar que o cristal movimente-se durante a coleta dos dados. Devido ao alto conteúdo de solvente na rede interna de qualquer cristal macromolecular, é necessário mantê-lo em um ambiente saturado de solvente, por isso será colocado em ambos os lados do cristal, duas colunas do líquido-mãe (solução de formação do monocristal). As extremidades desse capilar serão vedadas com cera para evitar a evaporação do líquido-mãe e do solvente do interior do cristal (figura 9).

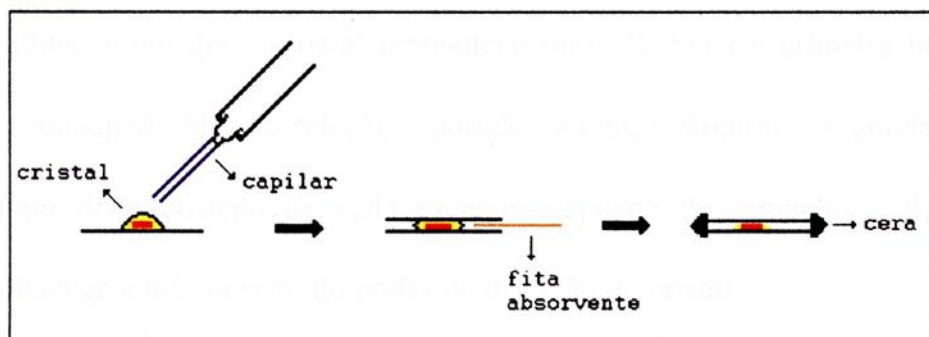


Figura 9. Representação esquemática da montagem de um monocristal no capilar, para coleta dos dados de difração de raios X.

Posteriormente, esse capilar com o monocristal será acoplado na cabeça goniométrica (figura 10) do difratômetro onde daremos início à coleta dos dados de difração de raios X.



Figura 10. Fotografia da cabeça goniométrica do equipamento utilizado para a coleta dos dados de difração de raios X (McRee, 1993).

Antes de iniciarmos a coleta, será necessário fazer o alinhamento ótico do cristal em relação ao feixe de raios X. O suporte da cabeça goniométrica permite uma translação vertical, o que possibilita o posicionamento do cristal. Após esse posicionamento ajusta-se o eixo de rotação. Obtido esse alinhamento, em qualquer oscilação rotacional, o feixe de raios X permanecerá incidindo sobre o cristal.

Antes do início da coleta dos dados de difração de raios X, serão feitas duas fotos *still* (situação em que o cristal permanece imóvel). Feita a primeira imagem, o cristal será rotacionado 90° em relação à posição inicial, e faremos a segunda imagem *still*. O tempo de exposição de cada imagem depende do tamanho e da relação intensidade/background, ou seja, do poder de difração do cristal.

Os dados obtidos dessas fotos *still* serão auto-indexados, utilizando o programa *Still* do pacote de programas do R-AXIS IIC, que analisa as imagens e fornece os parâmetros da cela unitária, sistema cristalino e as informações necessárias para determinar a orientação do cristal. O número de imagens que serão coletadas e o



ângulo de oscilação. Durante a coleta dos dados de difração, utilizaremos o programa *Oscill* - opção *Simulation*, que fará uma simulação das condições da coleta de dados de oscilação.

A coleta de dados será feita utilizando o método de rotação-oscilação (Arndt & Wonacott, 1977), com uma distância cristal-placa de imagem (D) inferida a partir das imagens *still*. Foi utilizado um intervalo de oscilação de 2°, com tempo de exposição de 45 minutos para cada imagem, com uma voltagem de 50kV e corrente de 100mA.

Para a resolução da estrutura do complexo binário Gln⁺ RNase T₁ GpcU foi utilizado o pacote de programas AMoRe (Automated Package for Molecular Replacement) (Navaza, 1994). Este pacote de programas foi rodado automaticamente, necessitando dos seguintes arquivos de entrada: (i) arquivo dos dados cristalográficos da molécula modelo, com as coordenadas dos átomos e fatores de temperatura (B), (ii) arquivo contendo os dados cristalográficos experimentais da molécula em estudo (h, k, l, F_{obs}, sigma (F)). Com o pacote AMoRe conseguiremos, a partir da estrutura de uma molécula conhecida, chegar a um modelo inicial da estrutura em estudo.

A partir da melhor solução encontrada com o programa AMoRe, prosseguiremos com o refinamento das coordenadas atômicas utilizando o programa X-PLOR (Brünger, 1992).



3.3 Resolução do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

O método utilizado para a resolução do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU foi o método da *Substituição Molecular*, que utiliza os dados cristalográficos de uma macromolécula que apresente uma alta homologia (molécula modelo). Utilizamos as coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica do complexo binário Gln²⁵RNase T₁ 2'GMP (Arni *et al.*, 1988) (código pdb: 1rn1).

Para a resolução da estrutura do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU foi utilizado o pacote de programas AMoRe (*Automated Package for Molecular Replacement*) (Navaza, 1994). Este pacote de programas foi rodado automaticamente, necessitando dos seguintes arquivos de entrada: (i) arquivo dos dados cristalográficos da molécula modelo, com as coordenadas dos átomos e fatores de temperatura (B), (ii) arquivo contendo os dados cristalográficos experimentais da molécula em estudo (h, k, l, F_{obs}, sigma (F)). Com o pacote AMoRe conseguiremos, à partir da estrutura de uma molécula conhecida, chegar à um modelo inicial da estrutura em estudo.

A partir da melhor solução encontrada com o programa AMoRe, prosseguiremos com o refinamento das coordenadas atômicas utilizando o programa X-PLOR (Brünger, 1992).



3.4 Refinamento do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

O refinamento das coordenadas atômicas da molécula problema utilizando o programa X-PLOR (Brünger, 1992), tem início a partir da melhor solução encontrada pelo programa AMoRe durante a etapa de resolução da estrutura.

O objetivo deste programa é fazer a minimização da função Energia_{total}, calculando as variações nas coordenadas atômicas e parâmetros térmicos que conduzem ao mais baixo valor de energia. As etapas do refinamento são: (i) rotina topologia; (ii) refinamento de corpo rígido; (iii) rotina *check* e determinação do peso W_A; (iv) refinamento por dinâmica molecular com temperatura controlada (*Simulated annealing*); (v) refinamento posicional com minimização de energia; (vi) refinamento dos fatores de temperatura (individuais ou de grupos de átomos); (vii) análise do modelo refinado; (viii) colocação das moléculas de água.

Após um ciclo de *Simulated annealing*, os mapas de densidade eletrônica foram visualmente examinados utilizando o programa *FRODO* ou *O* (Jones, 1978) e as posições dos átomos das cadeias laterais serão ajustados manualmente quando necessário. As moléculas de água serão subseqüentemente localizadas e suas posições e fatores de temperatura serão refinados.

As diferenças de rms (*root-mean-square*) das geometrias ideais para comprimento de ligação e ângulos serão calculados com o programa X-PLOR 3.1 (Brünger, 1992); a qualidade estereoquímica total do modelo final para este complexo binário foram analisadas pelo programa *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993); e as ligações de hidrogênio foram determinadas com o programa *HBPLUS* (McDonald & Thornton, 1994).



4. RESULTADOS

4.1 Cristalização do complexo binário $\text{Gln}^{25}\text{RNase T}_1\text{*GpcU}$.

Um monocristal foi obtido à partir de uma das soluções do método da matriz esparsa, utilizando a técnica de difusão de vapor - sistema *hanging-drop*.

Para esse complexo, não foi necessário fazer qualquer melhora na condição original de cristalização, onde o cristal foi obtido após 5 dias na seguinte condição: 0,1M Tris, 0,2M MgCl e 30% PEG 4000, pH 8,75 à temperatura ambiente, onde obtemos um cristal de dimensões 0,1mm x 0,2mm x 0,2mm que foi utilizado para a coleta dos dados de difração de raios X (figura 11).

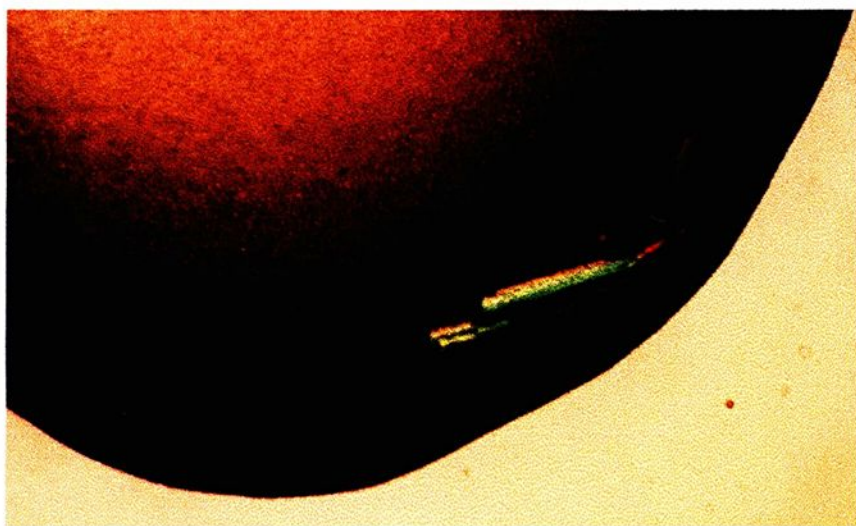


Figura 11. Fotografia do monocristal obtido do complexo binário $\text{Gln}^{25}\text{RNase T}_1\text{*GpcU}$, utilizado para a coleta dos dados de difração de raios X.

4.2 Coleta dos dados de difração de raios X do monocristal do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

As informações experimentais que a coleta de dados de difração de raios X nos fornece são: as amplitudes $F_p(hkl)$ das ondas difratadas pelo cristal, mas as fases $\alpha_p(hkl)$ sempre são perdidas. Então, as amplitudes foram calculadas a partir do conjunto de intensidades medidas experimentalmente, enquanto que as fases serão determinadas na etapa da resolução da estrutura, através do método de *Substituição Molecular* (Blundell & Johnson, 1976).

Os dados de difração de raios X do monocristal desse complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU foram coletados à 2,0Å ($R_{\text{merge}} = 6,4\%$). Os parâmetros de rede obtidos e as estatísticas da coleta de dados de difração de raios X estão apresentados na tabela 1.



Tabela 1. Estatísticas da coleta dos dados de difração de raios X.

Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Resolução (Å)	2.0
Dimensões da cela (Å)	a = 69.91 b = 90.29 c = 33.98 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Número de reflexões simples	8909
Completeza dos dados à 2.0 Å (%)	76.7
R _{sym} (%)	6.4

$$R_{sym} (\%) = \frac{\sum_h \sum_i | \langle F_h \rangle - \langle F_{h,i} \rangle |}{\sum_h \sum_i F_{h,i}}$$

4.3 Resolução da estrutura do complexo binário Gln²⁵RNase T₁ *GpcU.

Para obtermos as informações das fases α_p (hkl) que foram perdidas durante a coleta dos dados de difração de raios X deste complexo, é utilizado o método de *Substituição Molecular*, objetivando determinar a estrutura tridimensional do complexo binário Gln²⁵RNaseT₁*GpcU. Para isso, utilizamos as coordenadas da estrutura cristalográfica do complexo Gln²⁵RNase T₁*2'GMP (inibidor) (Arni *et al.*, 1988) (código pdb: 1rn1).

Para a resolução da estrutura do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU foi utilizado o pacote de programas AMoRe (*Automated Package for Molecular Replacement*) (Navaza, 1994). Os resultados da resolução da estrutura complexo binário Gln²⁵RNase T₁ *GpcU estão apresentados na tabela 2.



Tabela 2. Resultados da resolução da estrutura cristalográfica.

	Solução Molecular		Solução após refinamento de corpo rígido	
	molécula 1	molécula 2	molécula 1	molécula 2
α (°)	132.22	57.35	133.72	57.22
β (°)	65.56	87.75	65.40	87.08
γ (°)	265.87	287.68	265.96	284.97
Tx	0.3114	0.9707	0.31034	0.97221
Ty	0.3004	0.4410	0.30104	0.44092
Tz	0.1084	0.4340	0.10714	0.43517
Cc	52.1	69.5	72.2	72.2
R fator (%)	44.6	36.7	30.7	30.7

Cc = coeficiente de correlação; R fator = $100 \times \sum |F_o - F_c| / \sum (F_o)$

4.4 Refinamento da estrutura cristalográfica do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

O modelo inicial, obtido a partir da resolução da estrutura pelo método de *Substituição Molecular*, apresentou na unidade assimétrica dois monômeros da enzima Gln²⁵RNase T₁ e três moléculas do análogo de substrato GpcU - a quarta molécula aparece por simetria (figura 12).

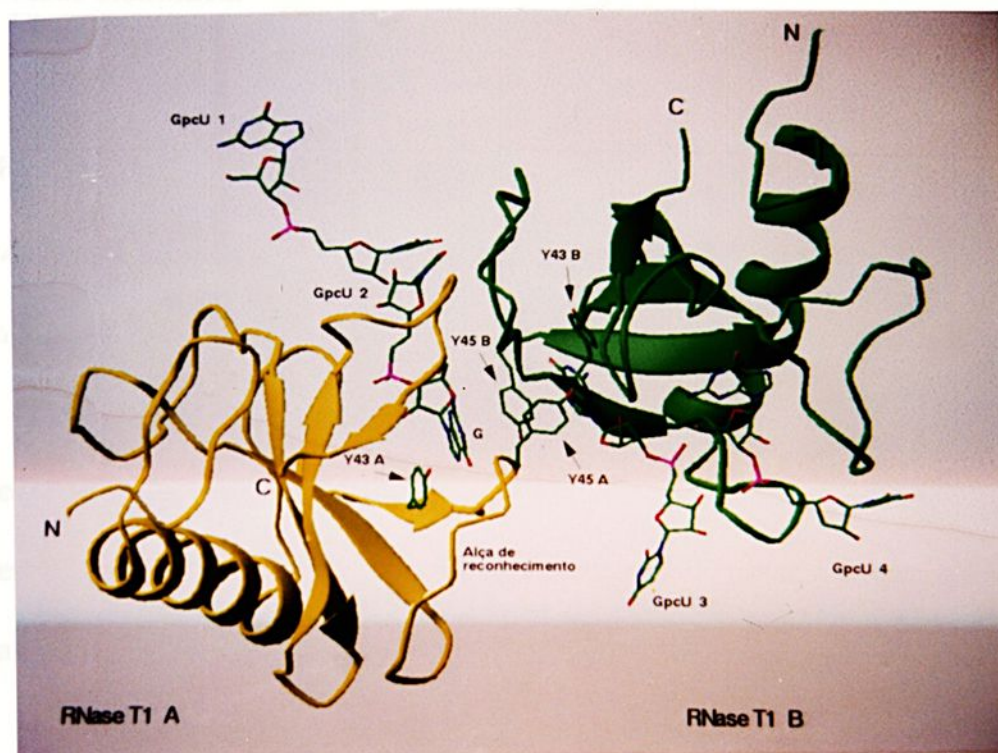


Figura 12. Unidade assimétrica do cristal, apresentando dois monômeros da enzima e três moléculas do análogo de substrato - a quarta molécula aparece por simetria (Ribbons 2.0 - Carson 1987).

Os primeiros mapas de densidade eletrônica $2 F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ para o dímero foram analisados utilizando o programa O (Jones; Kjeldgaard, 1993).

Foi realizado um refinamento de corpo rígido, depois um refinamento por positional ou simulated annealing, seguido do refinamento dos fatores de temperatura B isotrópicos. No refinamento de corpo rígido, os monômeros foram tratados independentemente. Foi realizada uma análise detalhada dos resíduos, e sempre que possível modificou-se o modelo, ajustando as coordenadas da melhor maneira possível à densidade eletrônica.

O refinamento convergiu para um residual cristalográfico de 18.7% ($R_{\text{free}} = 25,4\%$), utilizando intensidades de difração de raios X numa faixa de resolução de 8.0 à 2.0Å, que neste caso é a faixa ótima para refinamento posicional e *Simulated Annealing*.

As moléculas de água foram colocadas utilizando o programa *Pickwater*, do pacote de programas CCP4, que lista os picos mais intensos encontrados no mapa de Fourier diferença. Foram incluídas 92 moléculas de água, após uma análise com o programa O.

O dados estatísticos do modelo final do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU estão apresentados na tabela 3.



Tabela 3. Estatísticas do Refinamento dos Dados de Difração de Raios X

Resolução (Å)	8 – 2.0
R-factor (%)	18.7
R-free (%)	25.4
Valores de B (Å) <i>monômero 1</i> cadeia principal cadeia lateral <i>monômero 2</i> cadeia principal cadeia lateral	 18.54 19.12 19.89 20.71
Número de moléculas de solvente	92
Fator B – solvente	31.11
Número de ligantes	3
Fator B – ligante	21.41
<i>Desvios observados da geometria ideal</i> rms, distância das ligações (Å) rms, ângulos das ligações (graus) rms, ângulos diedros (graus)	 0.08 1.486 25.573
Números de átomos	1562

* $R_{\text{factor}} = 100 \times \sum |F_o - F_c| / \sum (F_o)$, as somas foram efetuadas sobre todas as reflexões com $F > 2\sigma(F)$. # $R_{\text{free}} = R_{\text{factor}}$ para 10% dos dados, os quais não foram incluídos durante o refinamento cristalográfico. Valores de B = médias dos valores B para todos os átomos que não sejam hidrogênio, onde B é o parâmetro de vibração térmica.

5. DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do modelo do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

a) Estereoquímica do modelo

Os valores finais do R_{fator} e R_{free} (para uma completude de 76.7% dos dados) foram 18.7% e 25.4% respectivamente para dados à 2.0Å de resolução. A análise dos desvios da idealidade para comprimentos de ligação, ângulos de ligação e ângulos diédricos foram obtidos pelo programa X-PLOR. Os desvios encontrados para o modelo foram 0.08Å para os comprimentos de ligação, 1.486° para os ângulos entre as ligações, 25.573°, o que está dentro dos valores esperados.

As restrições para os ângulos torsionais ou diédricos que determinam a conformação de uma proteína devem ser também analisados. A cadeia principal da proteína é caracterizada pelos ângulos diedros ϕ (formados pelos átomos C_{i-1} , N_i , $C_{\alpha i}$ e C_i), ψ (formado pelos átomos N_i , $C_{\alpha i}$, C_i e N_{i+1}) e ω ($C_{\alpha i}$, C_i , N_{i+1} e $C_{\alpha i+1}$).

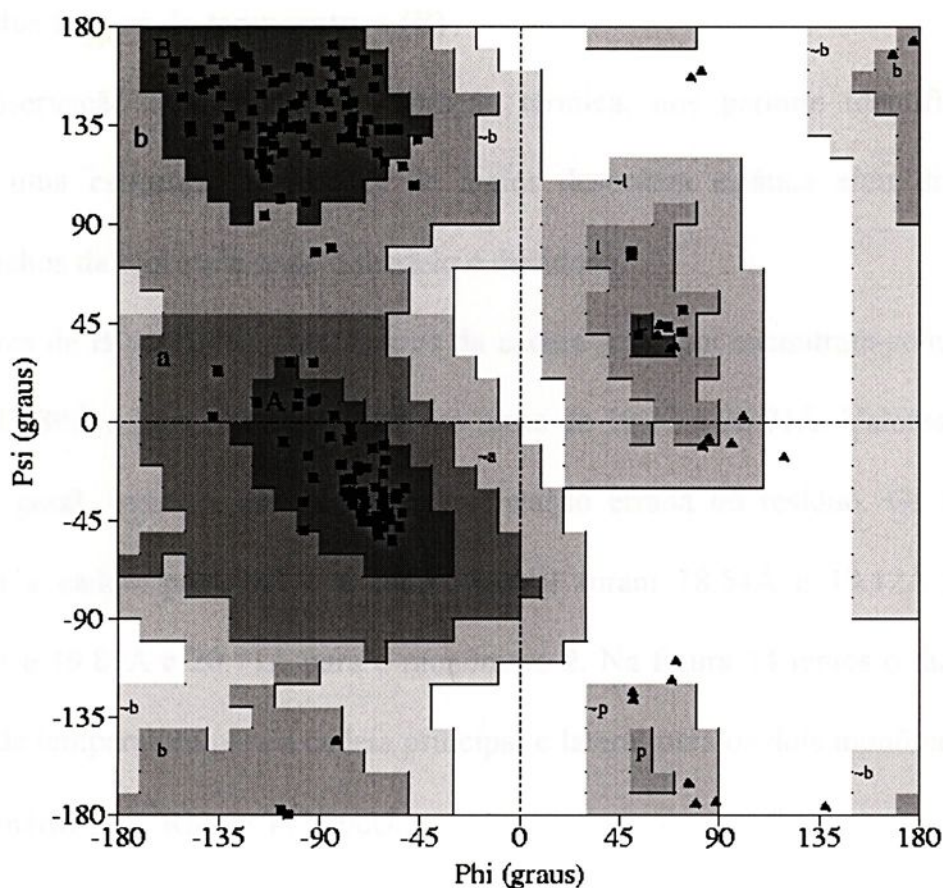
A análise estereoquímica completa foi feita como programa *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1994). Este programa compara os parâmetros de conformação estereoquímica ou geométrica com parâmetros equivalentes de estruturas resolvidas à alta resolução. A figura 13 apresenta o diagrama de Ramachandran para o modelo final do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

A análise indica que 90,7% dos resíduos estão em regiões favoráveis, 9,3% em regiões permitidas, e não há qualquer resíduo nas regiões generosamente permitidas nem nas não permitidas.



O modelo final do complexo RNase T₁*GpcU consiste de 1562 átomos de proteína e 92 moléculas de água. Como apresentados na tabela 3, os desvios totais da estereoquímica ideal no modelo final são baixos e o gráfico de Ramachandran indica um agrupamento das conformações peptídicas nas regiões mais energeticamente favoráveis (figura 13). Os ângulos ϕ e ψ possuem restrições de movimento, devido a impedimentos estéricos entre os átomos da cadeia lateral e os átomos da cadeia principal. O gráfico de Ramachandran descreve estas restrições comparando os parâmetros da proteína de interesse com parâmetros equivalentes de estruturas resolvidas a alta resolução. Neste gráfico as regiões mais escuras são as que possuem geometria mais favorável para ângulos ϕ e ψ , sendo assim, nas regiões claras existem ângulos não permitidos para ϕ e ψ , portanto resíduos que caem nesta região apresentam algum impedimento estérico. No entanto, pode haver uma explicação em termos estruturais ou funcionais, que compense o custo energético de uma conformação não usual. Os resíduos de glicina, representados por triângulos no gráfico, estão em regiões não permitidas, isto se deve ao fato deste resíduo possuir somente um hidrogênio como cadeia lateral, o que lhe confere grande liberdade de rotação. Os demais resíduos são representados por quadrados.





Resíduos em regiões favoráveis [A, B, L]	156	90,7%
Resíduos em regiões permitidas [a, b, l, p]	16	9,3%
Resíduos em regiões generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	0	0%
Resíduos em regiões proibidas	0	0%
Número de resíduos não-glicina e não-polares	172	100%
Número de resíduos terminais (exceto Gly e Pro)	4	
Número de resíduos glicina (representados em triângulos)	24	
Número de resíduos prolina	8	
Total do número dos resíduos	208	

Baseado na análise de 118 estruturas à resolução abaixo que 2,0Å e R-fator não mais que 20%; um modelo de boa qualidade é esperado ter mais de 90% dos resíduos nas regiões favoráveis.

Figura 13. Gráfico de Ramachandran ilustrando a distribuição dos resíduos de aminoácidos do complexo binário Gln²⁵ RNase T₁*GpcU.

b) Análise dos fatores de temperatura (B)

A observação dos fatores de vibração térmica, nos permite identificar no modelo de uma estrutura, as regiões de maior desordem estática e/ou dinâmica inclusive trechos da molécula onde o modelo é duvidoso.

Valores de B aceitáveis para átomos da cadeia principal encontram-se na faixa de 18.54 à 19.89Å e para a cadeia lateral em torno de 19.12 à 20.71Å. Valores acima de 60Å em geral, indicam desordem ou localização errada do resíduo. Os valores médios para a cadeia principal e a cadeia lateral foram 18.54Å e 19.12Å para o monômero 1 e 19.89Å e 20.71Å para o monômero 2. Na figura 14 temos o diagrama dos fatores de temperatura para a cadeia principal e lateral para os dois monômeros do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

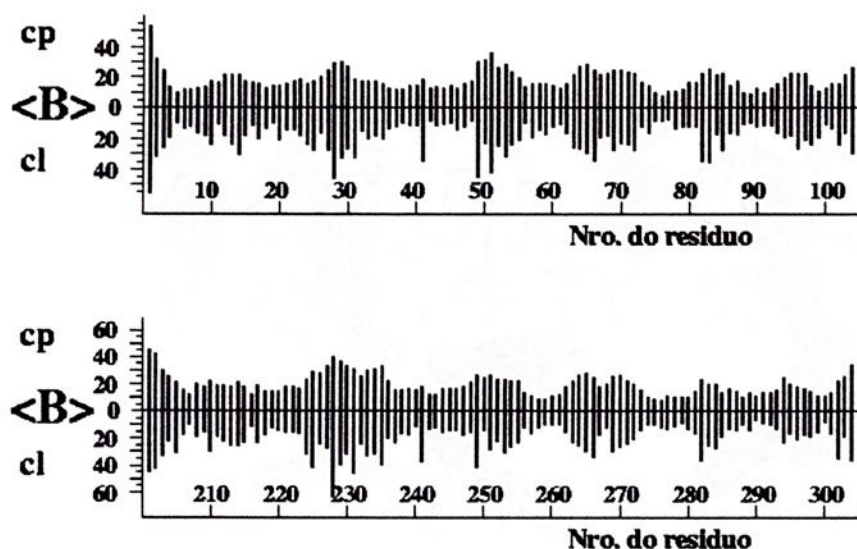


Figura 14. Gráficos dos fatores de temperatura para a cadeia principal e lateral para os dois monômeros do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

Como pode ser observado, o monômero 2 tem fatores de temperatura um pouco mais elevados que o monômero 1, que pode ser atribuído a diferenças no empacotamento das moléculas na rede cristalina. Normalmente, as regiões mais flexíveis e expostas ao solvente tais como "Lys" apresentam uma maior mobilidade estrutural e por isso os valores de B são mais altos.

c) Densidade eletrônica do análogo de substrato GpcU.

O mapa de densidade eletrônica do análogo de substrato GpcU mostra uma excelente qualidade. A figura 15 mostra um diagrama estéreo de região representativa da densidade eletrônica deste GpcU.

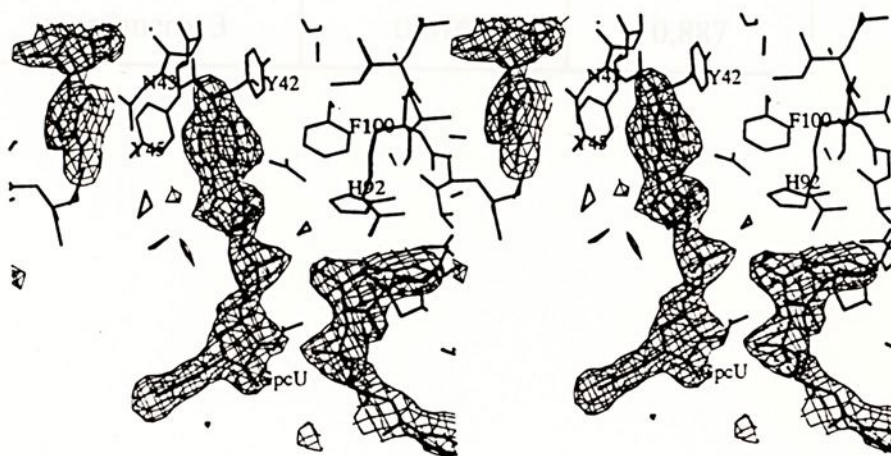


Figura 15. Imagem estereoscópica da densidade eletrônica do análogo do substrato GpcU à uma resolução de 2.0Å.

d) Comparações entre os monômeros da unidade assimétrica

Embora as enzimas utilizadas para a comparação sejam a mesma (Gln²⁵RNase T₁), a sobreposição entre os monômeros das estruturas cristalinas da Gln²⁵RNase T₁ livre e do complexo Gln²⁵RNase T₁*GpcU, revelou uma pequena diferença na orientação relativa entre os monômeros constituintes (baixos valores de rms -*root mean square*) (tabela 4).

Tabela 4. RMS total dos carbonos-alfa entre os monômeros da Gln²⁵RNase T₁ livre e Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

Gln ²⁵ RNase T ₁ livre	Gln ²⁵ RNase T ₁ *GpcU	
	monômero A	monômero B
monômero 1	0,744	0,861
monômero 2	0,658	0,927
monômero 3	0,676	0,887



5.2 Análise do modelo do complexo binário Gln²⁵RNase T₁*GpcU.

Os espectros de diferença UV observados para a ligação de GpcU à RNase T₁ são parecidos com os mesmos espectros para a ligação de 3'GMP e outros ligantes à RNase T₁ (Walz Jr., 1977), o que indica que a interação dos cromóforos da guanina desses ligantes são similares. Tal observação foi confirmada no presente estudo, indicando que a ligação da guanina do GpcU ao sítio de ligação primário da RNase T₁ exibe um padrão de ligação de hidrogênio (figura 16) quase idêntico àqueles observados nas estruturas dos complexos binários da RNase T₁ com 2'GMP (figura 17a) (Arni *et al.*, 1988) e 3'GMP (figura 17b) (Zegers *et al.*, 1994; Heydenreich *et al.*, 1993; Gohda *et al.*, 1994). Uma comparação desses padrões de ligação de hidrogênio estão mostrados na tabela 6.

A diferença em ΔG° para a ligação da enzima com GpU menos aquela para dGpdX (X = A, C, G e T) (Walz, Jr. & Terenna, 1976) é $-1,9 \pm 0,3$ kcal/mole, o que reflete as interações favoráveis da enzima com o grupo 2'-OH da guanina no sítio ativo de substratos do tipo de monofosfato dinucleotídeos.

Tabela 5. Comparação das ligações de hidrogênio da RNase T₁ com GpcU1, GpcU2, RNase T₁*3'GMP+G; RNase T₁*2'GMP e RNase T₁*3'GMP.

doador		aceptor		distância em Å				
resíduo	átomo	resíduo	átomo	GpcU1	GpcU2	1RGA	1RGC1	1RLS
N36	ND2	Y38	OH	3.13	3.20	>5	3.84	>5
Y38	OH	Gp	OnP	2.43	2.71	2.49	2.56	2.53
H40	ND1	N36	O	3.09	2.92	2.80	2.88	2.85
H40	ND1	S37	O	2.67	2.79	2.99	3.01	2.81
H40	NE2	Gp	2'O	2.56	2.54	2.59	2.70	2.63
H40	NE2	Gp	OnP	3.77	3.64	-	-	-
H40	NE2	E58	OEn	-	-	3.29	-	-
Gp	2'O	E58	OEn	2.52	2.60	2.65	2.67	2.53
Gp	OnP	E58	OEn	-	-	-	2.59	3.19
R77	NE	E58	OEn	3.29	2.81	3.15	3.28	2.90
R77	NH2(1)	Gp	OnP	-	-	3.08	3.16	2.76
R77	NH1(2)	G74	O	2.66	3.09	2.88	3.06	3.03
R77	NH1(1)	D76	O	3.01	2.84	2.95	2.94	3.03
H92	ND1	N99	O	2.81	2.86	2.75	2.74	2.72
H92	NE2	Gp	OnP	-	-	3.05	2.53	2.66
Gua	N2	N98	O	3.02	2.95	3.00	2.85	3.07
Gua	N2	E46	OEn	2.85	2.87	2.76	2.92	3.15
Gua	N1	E46	OEn	2.92	2.90	2.76	2.83	3.06
Y45	N1	Gua	O6	2.74	2.61	2.84	2.72	2.98
N44	N1	Gua	O6	2.59	2.65	2.82	2.50	2.71
N43	N1	Gua	N7	2.90	2.78	2.75	2.76	2.95

1RGA = T₁*3'GMP+G

1RGC1 = T₁*2'GMP

1RLS = T₁*3'GMP



42

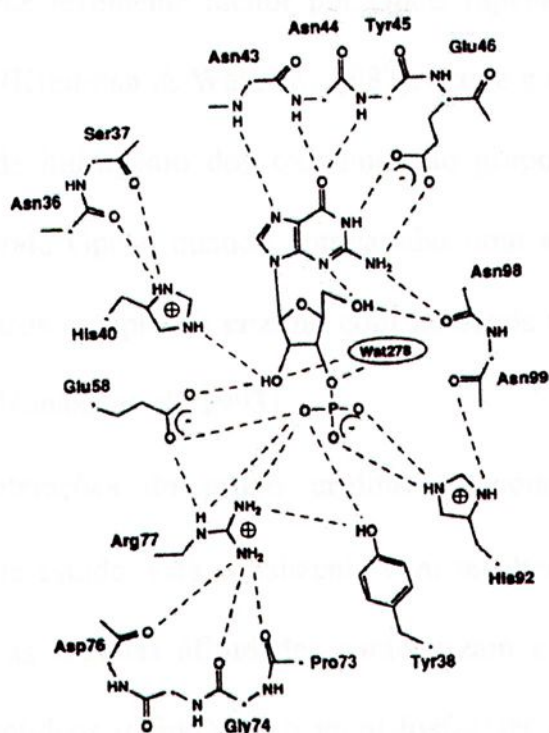


Figura 17. Diagrama esquemático das ligações de hidrogênio entre RNase T₁ com 3'GMP (Heydenreich, *et al.*, 1993).

A base estrutural para esta interação é elucidada no trabalho presente, que indica que com o grupo 2'OH da guanosina está ligado por meio de ligações de hidrogênio com a His40 e Glu58 (figura 16). Foi observado também, que a RNase T₁ apresenta uma afinidade levemente menor por GpcU (apenas 0,4 kcal/mol), quando comparada com GpU (Kreitman & Walz Jr., 1983), o que é consistente com o menor número de ligações de hidrogênio dos oxigênios do grupo fosfonil observadas na estrutura com o substrato GpcU, quando comparadas com aquelas dos oxigênios do grupo fosfonil em outros complexos enzima com análogos GpX (X = A, C, G e T) (Koepke *et al.*, 1989; Nonaka *et al.*, 1993).

A falta de interações do grupo uridina no complexo RNase T₁*GpcU observadas no presente estudo, está consistente com resultados prévios, que indicam que, essencialmente, as mesmas afinidades caracterizam a ligação da enzima com monofosfatos dinucleotídeos (dGpdX) e o metil-fosfoéster do 3'dGMP (Walz Jr. & Terenna, 1976; Walz Jr. 1977). Estudos recentes também indicaram a falta da contribuição para a afinidade de ligação do grupo X para os substratos GpX, embora as interações do nucleotídeo X no sítio N1 (Walz Jr. & Terenna, 1976) podem afetar dramaticamente a catálise. Esta visão é também corroborada pela falta de uma interação substancial da uridina do GpcU com a RNase Pb, observada a partir de experimentos de RMN (Yakovlev & Moiseyev, 1993).

O fato que, as mesmas interações e conformação do ligante caracterizam a ligação ao sítio ativo de duas moléculas de GpcU, apesar das diferenças significantes no que tange a proximidade de moléculas de solvente e uma terceira molécula de GpcU, sugerem que este modo comum de ligação não é resultado de fatores extrínsecos, que são dependentes da estrutura cristalina, tais com, empacotamento



cristalino e volume de solvente. Por esta razão, os resultados presentes, na visão dos estudos prévios, corroboram a visão que as interações observadas entre GpcU e RNase T₁ são um bom modelo para aquelas que podem ocorrer em solução aquosa, e, por esta razão, podem ser informativos no que considera os aspectos da catálise.

Um outro estudo recente (Zegers *et al.*, 1998) mostra a estrutura de um complexo de RNase T₁ com exo 2', 3' cGPS, esse substrato é hidrolizado de forma lenta pela RNase T₁, num período que pode se estender a meses. Tal característica, tornou possível a co-cristalização da RNase T₁ com exo 2',3'cGPS em diferentes estágios da catálise e a resolução da estrutura mostra a evolução do complexo durante a catálise (figura 18).

Figura 18. Interação no sítio ativo da RNase T₁ complexada com (a) 2' cGPS ligado no sítio A (b) 3' cGPS ligado no sítio B, observado após uma semana (c) 3' cGPS ligado no sítio A, após 13 semanas (d) Testado e com cGPS ligado no sítio A e B respectivamente (Zegers, *et al.*, 1998)

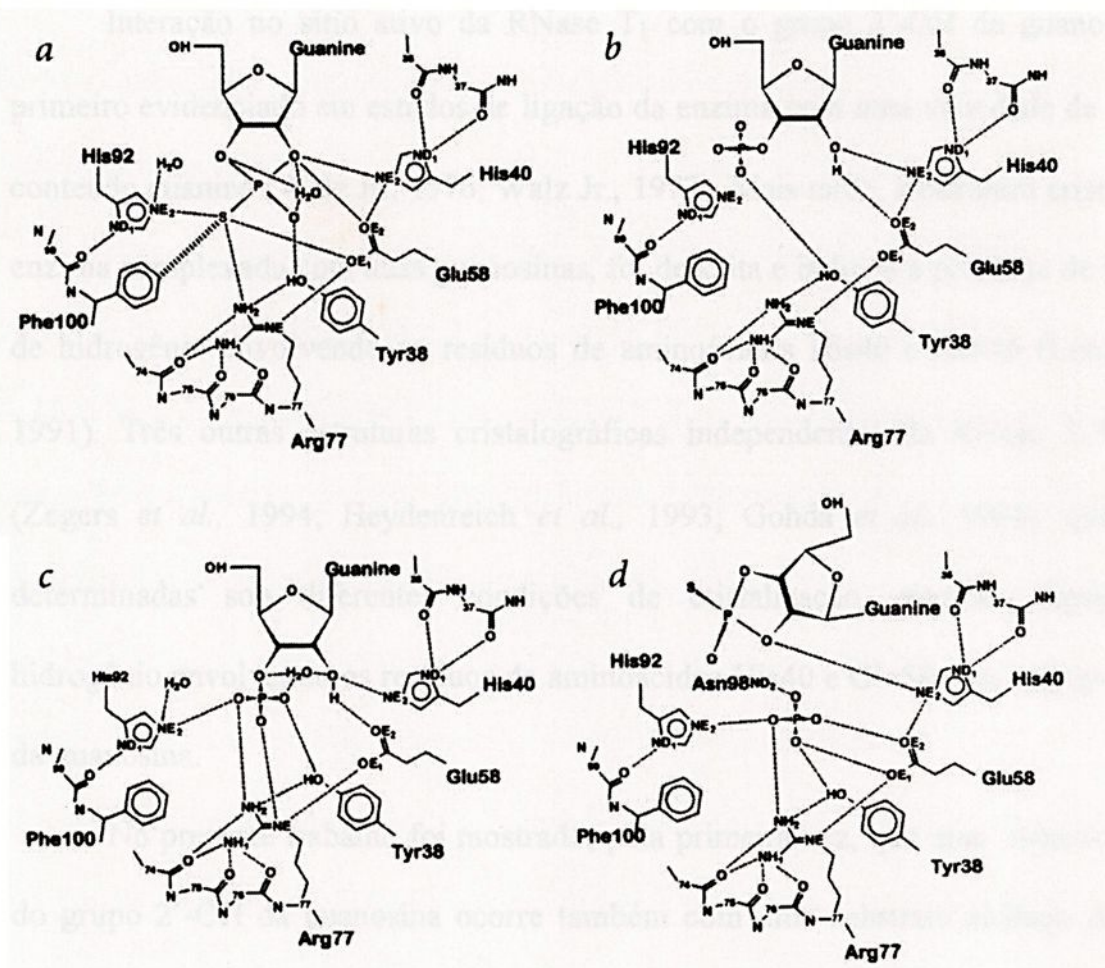


Figura 18. Interação no sítio ativo da RNase T₁ complexada com: (a) *exo* cGPS ligado no sítio A (b) 3'GMP ligado no sítio B, observado após uma semana (c) 3'GMP ligado no sítio A, com 15 semanas (d) fosfato e *exo* cGPS ligado no sítio A e B respectivamente (Zegers, *et al.*, 1998).

a) Função da interação His40 com o grupo 2'-OH da base guanina

Interação no sítio ativo da RNase T₁ com o grupo 2'-OH da guanosina foi primeiro evidenciado em estudos de ligação da enzima com uma variedade de ligantes contendo guanina (Walz Jr., 1976; Walz Jr., 1977). Mais tarde, a estrutura cristalina da enzima complexada com duas guanosinas, foi descrita e indicou a presença de ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos de aminoácidos His40 e Asn36 (Lenz *et al.*, 1991). Três outras estruturas cristalográficas independentes da RNase T₁*3'GMP (Zegers *et al.*, 1994; Heydenreich *et al.*, 1993; Gohda *et al.*, 1994), que foram determinadas sob diferentes condições de cristalização, mostram ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos de aminoácidos His40 e Glu58 com o grupo 2'-OH da guanosina.

No presente trabalho foi mostrado, pela primeira vez, que uma ligação similar do grupo 2'-OH da guanosina ocorre também com um substrato análogo de RNA. Visto que, fortes evidências suportam a visão tradicional que o grupo carboxilato do Glu58 age como uma base na transesterificação catalisada da RNase T₁ (Steyaert, 1997), sua ligação de hidrogênio com o grupo 2'-OH da guanosina não é uma surpresa total, e, havia mesmo sido prevista (Walz Jr., 1976). Entretanto, era inesperado encontrar que o grupo imidazole da His40 aja como doador, para formar uma segunda ligação de hidrogênio com o grupo 2'-OH da guanosina. Este mesmo padrão de ligação de hidrogênio foi observado na estrutura do complexo de RNase T₁*exo 2', 3'-cGPS (Zegers, *et al.*, 1998).

Em outras estruturas de RNase, homólogas à RNase T₁, é observada a ausência do resíduo de aminoácido His na posição 40 (Nonaka *et al.*, 1993). Para a RNase St, o



resíduo de aminoácido Thr42 ocupa a mesma posição relativa da His40 (Nonaka *et al.*, 1993). No caso da Barnase, o resíduo de aminoácido Lys27 ocupa a mesma posição da His40, o que sugere que esse resíduo é funcionalmente análogo à His40 da RNase T₁ (Steyaert *et al.*, 1990).

Todas as estruturas tridimensionais das RNases homólogas à RNase T₁ têm um doador de hidrogênio (por exemplo: imidazole, hidroxila ou amônio) na mesma região do sítio ativo ocupada pelo grupo imidazole do resíduo de aminoácido His40 da RNase T₁, e é possível que este grupo funcione da mesma maneira, fazendo ligação de hidrogênio com o grupo 2'OH da guanosina. Esta especulação é indiretamente suportada pela estrutura cristalina da RNase A com 3'CMP, que revelou a presença de ligações de hidrogênio envolvendo o grupo 2'-OH com o grupo $\epsilon\text{-NH}_3^+$ da Lys41 (possível substituto para His40) e o grupo imidazole da His12 (provável substituto para Glu58) (Zegers *et al.*, 1994). Além disso, a análise das estruturas dos complexos de RNase A-vanadato uridina, mostram uma forte interação da Lys41 com o 2'-oxigênio (Ladner *et al.*, 1997) que sugere a possível importância da ligação da His40 com o grupo 2'OH do substrato no mecanismo catalítico.

Por último, simulações de dinâmica molecular da interação substrato com RNase T₁ (Cordes *et al.*, 1995) e RNase A (Haydock *et al.*, 1990) previram a ligação de hidrogênio do grupo 2'OH da guanosina com a His40 e Lys41, respectivamente. No caso da RNase A, foi sugerido que essa interação com a Lys41 pode ser necessária para uma deprotonação eficiente do grupo 2'OH do substrato pela His12 (Haydock *et al.*, 1990). Estudos de mutagênese sítio-dirigida da His40 da RNase T₁ (Steyaert & Wyns, 1993), Lys27 da Barnase (Mossakowska *et al.*, 1989) e Lys41 da RNase A



(Trautwein *et al.*, 1991), indicaram uma dramática perda de atividade quando essas substituições foram feitas. O que sugere que esses resíduos de aminoácido participam da estabilização do estado de transição.

Todas as RNases, acima mencionadas, exibem (ou podem potencialmente exibir) um doador de hidrogênio para o grupo 2'OH do substrato, que, por sua vez, pode servir para ativar a transferência de prótons deste grupo para uma base presente no sítio ativo. No caso da RNase T₁, a cooperatividade observada para a ação catalítica da His40 e Glu58 (Steyaert & Wyns, 1993) pode refletir sua ligação de hidrogênio conjunta com o grupo 2'-OH do substrato. A base para esta cooperatividade positiva foi sugerida envolvendo a interação direta (via ligação de hidrogênio) entre His40 NE2 e Glu58 OE2 (Steyaert & Wyns, 1993), visto que, esses átomos estão a uma distância de 3,0Å um do outro na enzima sem ligantes (Martinez-Oyanedel *et al.*, 1991) e 3,9Å na estrutura do complexo RNase T₁*GpcU, o que sugere que, tal ligação é enfraquecida quando eles mutualmente se ligam, por meio de ligação de hidrogênio, ao grupo 2'OH do substrato.

b) Interações: Tyr38, Arg77, His92 e Phe100

A contribuição para o ΔG° para a ligação da RNase T₁ ao grupo guanosina 3'-fosfodiéster é de somente -0,7 kcal/mole e depende de um grupo protonado, sugerindo o envolvimento de um resíduo de histidina. Considerando a diferença em ΔG° para ligação de RNase T₁ às moléculas de GpU e GpcU (Kreitman & Walz Jr., 1983), a contribuição do grupo fosfonado correspondente nesse análogo é de apenas -0,3 kcal/mole. No presente estudo o grupo fosfonado do GpcU está distante da maioria dos



resíduos que constituem o sítio P1 da enzima (resíduos Arg77, His92 e Phe100). A única exceção é a Tyr38, cujo o grupo hidroxil fenólico forma uma forte ligação de hidrogênio com um oxigênio do grupo fosfonil. Outras estruturas cristalográficas resolvidas anteriormente revelaram a presença de uma ligação de hidrogênio entre a Tyr38 e oxigênios do vanadato (Kostrewa, *et al.*, 1989), sulfato (Arni *et al.*, 1992), e também oxigênios dos grupos fosfatos do 3'GMP (Zegers *et al.*, 1994; Heydenreich *et al.*, 1993; Gohda *et al.*, 1994) e análogos GpX.

A substituição da Tyr38 na RNase T₁ por fenilalanina não tem nenhum efeito no K_M, mas reduz em quase 100 vezes o k_{cat} para os substratos GpX (X = A, C, U, MeOH) (Steyaert *et al.*, 1991). Por esta razão, este resíduo provavelmente está envolvido na estabilização do estado de transição fazendo ligação de hidrogênio com um átomo de oxigênio de um grupo fosfonil. Uma curiosidade da presente estrutura está na ligação de hidrogênio adicional do oxigênio fenólico com o hidrogênio ND da Asn36 (tabela 6). Entretanto, esta ligação de hidrogênio não é observada na estrutura sem ligantes (Martinez-Oyanedel *et al.*, 1991) e foi observada, somente, em um monômero do complexo trimérico da enzima com sulfato (Arni *et al.*, 1992). De qualquer forma, é possível que a estabilização da Tyr38 pela sua interação com Asn36 possa fortalecer sua ligação de hidrogênio com O1P. Ao contrário da Tyr38, as conformações das cadeias laterais dos resíduos His40, His92 e Arg77 estão aparentemente fixadas por ligações de hidrogênio com oxigênio do grupo carboxil da cadeia principal, em uma variedade de estruturas cristalinas, incluindo aquelas sem ligantes no sítio ativo (Martinez-Oyanedel *et al.*, 1991) ou com sulfato (Arni *et al.*, 1992) além daquelas das RNases T₁ complexadas com 3'GMP e análogos GpX



6. REFERÊNCIAS

(Zegers *et al.*, 1994; Heydenreich *et al.*, 1993; Gohda *et al.*, 1994; Koepke *et al.*, 1989; Nonaka *et al.*, 1993).

c) Conclusões e Perspectivas

Os resultados deste estudo nos fez concluir que específicas alterações de aminoácidos no laço de reconhecimento podem diminuir a especificidade desta enzima pela guanina. Com base nisto, foram planejados mutantes da RNase T₁ (inserção de Pro na região do laço e concomitantes mutações na posição 46). Cineticamente, estes mutantes apresentam uma menor especificidade e uma catálise maior. Os mutantes gerador pelo Prof. Dr. Walz Jr., estão sendo purificados e estamos aguardando o recebimento destas amostras, para dar continuidade às nossas pesquisas.

6. REFERÊNCIAS

- Arata, Y., Kimura, S., Matsuo, H. & Narita, K. (1979) Proton and phosphorus nuclear magnetic resonance studies of ribonuclease T₁. *Biochemistry* **18**, 18-24.
- Arndt, U. W., Wonacott, A. J. (1977) *The rotation method in crystallography*. North-Holland, Amsterdam.
- Arni, R.K., Heinemann, U., Maslowska, M., Tokuoka, R. & Saenger, W. (1987) *Acta Crystallogr., Sect. B* **43**, 548-554.
- Arni, R.K., Heinemann, M., Tokuoka, R. & Saenger, W. (1988) Three-dimensional structure of the Ribonuclease T₁*2'-GMP complex at 1.9Å resolution. *J. Biol. Chem.* **263**, 15358-15368.
- Arni, R.K., Pal, G., Ravichandran, K., Tulinsky, A., Walz, F. & Metcalf, P. (1992) Three-dimensional structure of Gln²⁵-Ribonuclease T₁ at 1.84Å resolution: structural variations at the base recognition and catalytic sites. *Biochemistry* **31**, 3126-3135.
- Berkower, I., Leis, J., Hurwistz, J. (1973) Isolation and characterization of an endonuclease from *Escherichia coli* specific for ribonucleic acids in ribonucleic and deoxyribonucleic acid hybrid structures. *J. Biol. Chem.* **288**, 5914-5920.
- Blundell, T. L., Johnson, L. N. (1976) *Protein crystallography*. Academic Press, New York.
- Boistelle, R. & Astier, J. P. (1988) *J. Crystal Growth*, **90**, 14.
- Brünger, A. T. (1992) X-PLOR Version 3.1: A system for crystallography and NMR (Yale University Press, New Haven).



- CCP4. (1994) The SERC(UK) Collaborative computing project No. 4: A suite of programmes for protein crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.
- Campbell, M., Shipp, S. & Jantzen, E. (1976) Location of chromophoric residues in ribonuclease T₁ by solvent perturbation difference spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 1014-1020.
- Carter, C. W. Jr & Carter, C. W. (1979) *Trends in Biotechnology* **7**, 277-282.
- Cordes, F., Starikov, E.B., & Saenger, W. (1995) Initial state of an enzymatic reaction: Theoretical prediction of complex formation in the active site of RNase T₁. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10365-10372.
- Doumen, J., Gonciarz, M., Zegers, I., Loris, R., Wyns, L. & Steyaert, J. (1996) A catalytic function for the structurally conserved residue Phe100 of ribonuclease T₁. *Protein Science* **5**, 1523-1530.
- Drenth, J. (1994) *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer-Verlag. New York. USA.
- Ducruix, A., Giegé, R. (1992) *Crystallization of nucleic acid and proteins*. Oxford University Press, New York.
- Egami, F., Oshima, T. & Ushida, T. (1980) Specific interaction of base-specific nucleases with nucleosides and nucleotides. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* **32**, 250-277.
- Frankfort, H.M., Robertson, H.D. (1985) Ribonucleases. In: Linn, S.M., Roberts, R.J. *Nucleases*, Cold Spring Harbor Lab., New York, 371-377.



- Fülling, R. & Rüterjans, H. (1978) Proton magnetic resonance studies of ribonuclease T₁. Assignment of histidine-27 C2-H and C5-H proton resonances by a photooxidation reaction. *FEBS Lett.* **88**, 279-282.
- Fülling, R. & Rüterjans, H. (1978) *FEBS Lett.* **88**, 274 - 278.
- Gohda, K., Oka, K-I., & 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.
- Green, A. A. (1932) *J. Biol. Chem.* **95**, 47.
- Grunert, H., Zouni, A., Beineke, M., Quaas, R., Georgalis, Y., Saenger, W. & Hahn, U. (1991) Studies on Ribonuclease T₁ mutants affecting enzyme catalysis. *Eur. J. Biochem.* **197**, 203-207.
- Hakoshima, T., Oka, K., Toda, S., Tanaka, M., Goda, K., Higo, T., Itoh, T., Minami, H., Tomita, K., Nishikawa, S., Morioka, H., Imura, J., Usegui, S., Ohtsuka, E. & Ikehara, M. (1990a) Crystallographic characterization of wild-type and mutant ribonuclease T₁ complexes with several ribonucleotides. *J. Biochem.* **108**, 695-698.
- Hakoshima, T., Itoh, T., Tomita, K., Nishikawa, S., Morioka, H., Usegui, S., Ohtsuka, E. & Ikehara, M. (1990b) Crystallization and preliminary X-ray investigation of non-specific complexes of a mutant ribonuclease T₁ (Y45W) with 2'AMP and 2'UMP. *J. Mol. Biol.* **216**, 497-499.
- Hartley, R. W. (1980) Homology between prokaryotic and eukaryotic ribonucleases. *J. Mol. Evol.* **15**, 355-358.



- Haydock, K., Lim, C., Brünger, A. T., & Karplus, M. (1990) Simulation analysis of structures on the reaction pathway of RNase A. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 3826-3831.
- Heinemann, U. & Saenger, W. (1982) Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T₁ – 2'- guanylic acid complex: X-Ray study. *Nature* **299**, 27-31.
- Heinemann, U. & Saenger, W (1983) Crystallographic study of mechanism of ribonuclease T₁-catalysed specific RNA hydrolysis. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1**, 523-538.
- Henimann, U. & Saenger, W. (1986) *Eur. J. Biochem.* **109**, 109-114.
- Heinemann, U. & Hahn, U. (1989) *Protein-Nucleic Acid Interactions* (Saenger, W., & Heinemann, U., Eds) pp 111-141, CRC Press, Boca Raton, FL.
- 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**, 1005-1012.
- Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, G., Polyakov, K. & Pavlovsky, S. (1983) The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases *Trends Biochem. Sci* **8**, 364-369.
- Iida, S., Ooi, T. (1969) Titration of ribonuclease T₁. *Biochemistry* **8**, 3897-3902.
- Inada, Y. *et al.* (1991) Isolation, characterization and primary structure of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease with higher specific activity from *Trichoderma viridae*. *J. Biochem.* **110**, 896-904.



- Inagaki, F., Kawano, Y., Shimada, K. & Miyazawa, F. (1981) Nuclear magnetic resonance study on the microenvironments of histidine residues of ribonuclease T₁ and carboxymethylated ribonuclease T₁. *J. Biochem.* **89**, 1185-1195.
- Ishikawa *et al.* (1969) Isolation and characterization of nuclease mutants in *Neurospora crassa*. *Genetics*, **63**, 75-92.
- Jancarik, J., Kim, S. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.
- Jones, T. A. (1978) A graphics model building and refinement system for macromolecules. *J. Appl. Cryst.* **11**, 268-272.
- Kiefhaber, T., Schmid, F., Renner, M., Hinz, H., Hahn, U. & Quaas, R. (1990b) Stability of recombinant Lys25-ribonuclease T₁. *Biochemistry* **29**, 8250-8257.
- Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S. & Nyborg, J. (1993) The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure* **1**, 35-50.
- 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**, 475-488.
- Kollner, G., Choe, H., Heinemann, U., Grunert, H., Zouni, A., Hahn, U. & Saenger, W. (1992) His92Ala mutation in Ribonuclease T₁ induces segmental flexibility. *J. Mol. Biol.* **224**, 701-713.
- Kostrewa, D., Choe, H., Heinemann, U. & Saenger, W. (1989) Crystal structure of guanosine-free Ribonuclease T₁, complexed with vanadate (V) suggests conformational change upon substrate binding. *Biochemistry* **28**, 7592-7600.



- Kreitman, R.J. & Walz, Jr., F.G. (1983) Ribonuclease T₁ binds with an isosteric non-active phosphonate analogue of GpU. *Biophys. J.* **41**, 390a.
- Ladner, J.E., Wladowski, B.D., Svensson, L.A., Sjolín, L., & Gilliland, G.L. (1997) X-Ray structure of a Ribonuclease A-Uridine Vanadate complex at 1.3Å resolution. *Acta Cryst.* **D53**, 290-301.
- Laskowski, M. (1985) Nuclease: Historical perspectives. In: Linn, S. Roberts, R. J. *Nucleases* New York: Cold Spring Harbor. p 1-21.
- Laskowski, R. A., Macarthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereo chemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.
- Lenz, A., Cordes, F., Heinemann, U. & Saenger, W. (1991) Evidence for a substrate-binding subsite in Ribonuclease T₁. *J. Biol. Chem.* **266**, 7661-7667.
- Lenz, A., Choe, H., Granzin, J., Heinemann, U. & Saenger, W. (1993) Three-dimensional structure of the ternary complex between Ribonuclease T₁, guanosine 3'-5'-biphosphate and inorganic phosphate at 1.9Å resolution. *Eur. J. Biochem.* **211**, 311-316.
- Levitt, M. & Chotia, C. (1976) Structural patterns in globular proteins. *Nature* **261**, 552-558.
- Martinez-Oyanedel, J., Choe, H-W., Heinemann, U., & Saenger, W. (1991) Ribonuclease T₁ with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5Å resolution. *J. Mol. Biol.* **222**, 335-352.
- Matsuzaki J., Hotoda, H., Sekine, M, Hata, T. (1984) *Nucleic Acids Symp Ser.* **15**, 93-96.



- McDonald, L. J. & Thornton, H. (1994) *Mol. Cell Biochem.* **138**, 221-226.
- McPherson, A. (1982) *Preparation and Analysis of Protein Crystal*, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- McRee, D. E. (1993) *Practical protein crystallography*. Academic Press, Inc. San Diego, USA.
- Mossakowska, D. E., Nyberg, K., and Fersht, A. R. (1989) Kinetic characterization of the recombinant Ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* (Barnase) and investigation of key residues in catalysis by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **28**, 3843-3850.
- Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.* **A50**, 157-163.
- Nishikawa, S., Moriako, H., Kim, H., Fuchimura, K., Tanaka, T., Uesugi, S., Hakoshima, T., Tomita, K., Ohtsuka, E. & Ikehara, M. (1987) Two histidine residues are essential for Ribonuclease T₁ activity as is the case for Ribonuclease A. *Biochemistry* **26**, 8620-8624.
- Nonaka, T., Nalamura, K., Uesugi, S., Ikehara, M., Irie, M. & Mitsui, Y. (1993) Crystal structure of Ribonuclease Ms (as a Ribonuclease T₁ homologue) complexed with a guanylyl-3',5'-cytidine analogue. *Biochemistry* **32**, 11825-11837.
- Osterman, H. & Walz, F. (1978) Subsites and catalytic mechanism of Ribonuclease T₁: kinetic studies using GpA, GpC, GpG and GpU substrates. *Biochemistry* **17**, 4124-4130.



- Osterman, H. & Walz, F. (1979) Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T1: kinetic studies using GpA, GpC, GpG, and GpU as substrates. *Biochemistry* **17**, 4124-4130.
- Pavlovsky, A. G., Vagin, A. A., Vainstein, B. K., Chepurnova, N. K., Karpeisky, M. Y. (1982) Three-dimensional structure of ribonuclease from *Bacillus intermedius* 7P at 3.2 Å resolution. *FEBS Lett* **162**, 167-170.
- Pavlovsky, K. M., Vagin, A. A., Tischenko, G. N. & Bezborodora, S. I. (1984) *Metabolism and Enzymology of Nucleic Acids* **5**, 131.
- Pletinckx, J., Steyaert, J., Zegers, I., Choe, H., Heinemann, U. & Wyns, L. (1994) Crystallographic study of Glu58Ala RNase T₁*2'guanosine monophosphate at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **33**, 1654-1662.
- Pongs, O. (1970) Influences of pH and substrate analogs on ribonuclease T1 fluorescence. *Biochemistry* **9**, 2316-2322.
- Rushizky, G.W., Sober, H.A. (1963) Studies on the specificity of ribonuclease T₂ *J. Biol. Chem.* **56**, 371-376.
- Saenger, W. (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag. New York Inc. USA.
- Sato, S. & Egami, F. (1957) Studies on ribonucleases in Takadiastase. *J. Biochem.* **44**, 753-757.
- Sevcik, J., Sanishvilli, R., Pavlovsky, A. & Polyakov, K. (1990) Comparison of active sites of some microbial ribonucleases: structural basis for guanylic specificity. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 158-162.



- Shirley, B. A., Stanssens, P., Steyaert, J., Pace, C.N. (1989) Conformational stability and activity of ribonuclease T1 and mutants Gln25----Lys, Glu58----Ala, and the double mutant. *J. Biol. Chem.* **264**, 11621-11625.
- Steyaert, J., Hallenga, K., Wyns, L. & Stanssens, P. (1990) Histidine-40 of Ribonuclease T₁ acts as a base catalyst when the true catalytic base, glutamic 58, is replaced by alanine. *Biochemistry* **29**, 9064-9072.
- Steyaert, J., Opsomer, C., Wyns, L. & Stanssens, P. (1991a) Quantitative analysis of the contribution of Glu46 and Asn98 to the guanosine specificity of Ribonuclease T₁. *Biochemistry* **30**, 494-499.
- Steyaert, J., Haikal, A., 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**, 8666-8670.
- Steyaert, J., Haikal, A., Stanssens, P. & Wyns, L. (1992) Dissection of the Ribonuclease T₁ subsite: the transesterification kinetics of Asn36Ala and Asn98Ala ribonuclease T₁ for minimal dinucleoside phosphates. *Eur. J. Biochem* **203**, 551-555.
- Steyaert, J. & Wyns, L. (1993) Functional interactions among the His40, Glu58 and His92 catalysts of Ribonuclease T₁ as studied by double and triple mutants. *J. Mol. Biol.* **229**, 770-781.
- Steyaert, J. (1997) A decade of protein engineering on Ribonuclease T₁: atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. *Eur. J. Biochem.* **247**, 1-11.



- Sugio, S., Amisaki, T., Ohishi, H., Tomita, K., Heinemann, U. & Saenger, W. (1985a) *FEBS Lett.* **181**, 129-132.
- Sugio, S., Oka, K., Ohishi, T., Tomita, K., Heinemann, U. & Saenger, W. (1985b) Three-dimensional structure of the ribonuclease T₁ X 3'-guanylic acid complex at 2.6Å resolution. *FEBS Lett.* **183**, 115-118.
- Sugio, S., Amisaki, T., Ohishi, H. & Tomita, K. (1988) Refined X-Ray structure of the low pH form of Ribonuclease T₁-2'-guanylic acid complex at 1.9Å resolution. *J. Biochem.* **103**, 354-366.
- Takahashi, K. (1965) The amino acid sequence of ribonuclease T₁. *J. Biol. Chem.* **240**, 4117-4119.
- Takahashi, K., Stein, W. & Moore, S. (1967) The identification of a glutamic acid residue as part of the active site of ribonuclease T-1. *J. Biol. Chem.* **242**, 4682-4690.
- Takahashi, K. (1970a) The structure and function of ribonuclease T₁. IX. Photooxidation of ribonuclease T₁ in the presence of rose bengal. *J. Biochem.* **67**, 833-839.
- Takahashi, K. (1970b) The structure and function of ribonuclease T₁. XI. Modification of the single arginine residue in ribonuclease T₁ by phenylglyoxal and glyoxal. *J. Biochem.* **68**, 659-664.
- Takahashi, K. (1971) The structure and function of ribonuclease T₁. Isolation and amino acid sequences of peptic peptides from heat-denatured ribonuclease T₁. *J. Biochem.* **70**, 803-815.



- Takahashi, K. (1976) The structure and function of ribonuclease T₁. XXI. Modification of histidine residues in ribonuclease T₁ with iodoacetamide. *J. Biochem.* **80**, 1267-1275.
- Takahashi, K. & Moore, S. (1982) *The Enzymes* **15**, 435-468.
- Takahashi, K. (1985) A revision and conformation of the amino acid sequence of Ribonuclease T₁. *J. Biochem.* **98**, 815-817.
- Trautwein, K., Holliger, P., Stackhouse, J., & Benner, S. A. (1991) Site-directed mutagenesis of bovine pancreatic ribonuclease: lysine-41 and aspartate-121. *FEBS Lett.* **281**, 275-277.
- Voet, D. & Voet, J. G. (1995) *Biochemistry*. 2ed. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Walz, Jr., F.G. & Terenna, B. (1976) Subsite interactions of Ribonuclease T₁: binding studies of dimeric substrate analogues. *Biochemistry* **15**, 2837-2842.
- Walz, Jr., F.G. (1976) Ribose recognition by Ribonuclease T₁: difference spectral binding studies with guanosine and deoxyguanosine. *Biochemistry* **15**, 4446-4450.
- Walz, Jr., F.G. (1977) Studies on the nature of guanine nucleotide binding with Ribonuclease T₁. *Biochemistry* **16**, 5509-5515.
- Walz, Jr., F.G., Osterman, H. & Libertin, C. (1979) Base-group specificity at the primary recognition site of ribonuclease T₁ for minimal RNA substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 95-102.
- Watanabe, H., Enomoto, K., Ohgi, K. (1986) Identification of the glutamyl and histidyl residues involved in the active site of a minor ribonuclease from *Aspergillus saitoi*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 1107-1112.



- Weber, D. J., Meeker, A. K. & Mildvan, A. S. (1991) *Biochemistry* **30**, 6103-6114.
- Yakovlev, G.I., & Moiseyev, G.P. (1993) NMR studies of a complex of RNase *Penicillium brevicompactum* with dinucleoside phosphonate and the implications for the mechanism of enzyme action. *Beiochim. Biophys. Acta* **1202**, 143-148.
- Zegers, I., Haikal, A., Palmer, R. & Wyns, L. (1994) Crystal structure of Ribonuclease T₁ with 3'-guanylic acid and guanosine. *J. Biol. Chem.* **269**, 127-133.
- Zegers I, Loris R, Dehollander G, Fattah Haikal A, Poortmans F, Steyaert J, Wyns L. (1998) Hydrolysis of a slow cyclic thiophosphate substrate of RNase T₁ analyzed by time-resolved crystallography. *Nature Struct. Biol.* **5**, 280-283.

APÊNDICE I



APÊNDICE 1

Tabela 6. Método da matriz esparsa (Jancarik & Kim, 1991).

SOLUÇÃO	SAL	TAMPÃO	PRECIPITANTE	H ₂ O	pH
1	0,2M calcium chloride	0,1M Acetate	30% MPD (3ml 100%)	5 ml	4,25
2	———	———	0,4M Kalium Sodium Tartrate	8 ml	7,49
3	———	———	0,4M Amm. Phosphate	8 ml	8,02
4	———	0,1M TRIS	2,0M Amm. Sulfate	3,3 ml	8,19
5	0,2M Sodium Citrate	0,1M HEPES	40% MPD	3 ml	7,31
6	0,2m Mg Chloride	0,1M TRIS	30% PEG 4000	2 ml	8,39
7	———	0,1M Cacodylate	1,4M Sodium Acetate	2 ml	6,56
8	0,2M Sodium Citrate	0,1M Cacodylate	30% Isopropanol	4 ml	6,72
9	0,2M Amm. Acetate	0,1M Citrate	30% PEG 4000	2 ml	5,94
10	0,2ml Amm. Acetate	0,1M Acetate	30% PEG 4000	2 ml	6,16
11	———	0,1M Citrate	1,0M Amm. Phosphate	4 ml	7,98
12	0,2M Mg Chloride	0,1M HEPES	30% Isopropanol	5 ml	7,14
13	0,2M Sodium Citrate	0,1M TRIS	30% PEG 400	4 ml	8,83
14	0,2M calcium chloride	0,1M HEPES	28% PEG 400	4,2 ml	7,14
15	0,2M Amm. Sulfate	0,1M Cacodylate	30% PEG 8000	2,4 ml	5,50
16	———	0,1M HEPES	1,5M Lithium Sulfate	0,7 ml	7,70
17	0,2M Lithium Sulfate	0,1M TRIS	30% PEG 4000	1,9 ml	8,57
18	0,2M Mg Acetate	0,1M Cacodylate	20% PEG 8000	4 ml	5,96
19	0,2M Amm. Acetate	0,1M TRIS	30% Isopropanol	5 ml	8,22
20	0,2M Amm. Sulfate	0,1M Acetate	25% PEG 4000	3,4 ml	4,42
21	0,2M Mg Acetate	0,1M Cacodylate	30% MPD	5 ml	6,13
22	0,2M Sodium Acetate	0,1M TRIS	30% PEG 4000	2 ml	8,64
23	0,2M Mg Chloride	0,1M HEPES	30% PEG 4000	5 ml	7,11
24	0,2M calcium chloride	0,1M Acetate	20% Isopropanol	6 ml	4,20
25	———	0,1M Imidazol	1,0M Sodium Acetate	4 ml	7,74



26	0,2M Amm. Acetate	0,1M Citrate	30% MPD	5 ml	6,02
27	0,2M Sodium Citrate	0,1M HEPES	20% Isopropanol	5 ml	7,43
28	0,2M Sodium Acetate	0,1M Cacodylate	30% PEG 8000	2 ml	6,14
29	————	0,1M HEPES	0,8M Kalium Sodium Tartrate	5 ml	7,65
30	0,2M Amm. Sulfate	————	30% PEG 8000	3,4 ml	4,75
31	0,2M Amm. Sulfate	————	30% PEG 4000	3,4 ml	4,70
32	————	————	2,0M Amm. Sulfate	4,3 ml	4,68
33	————	————	4,0M Sodium Formate	—	8,34
34	————	0,1M Acetate	2,0M Sodium Formate	4 ml	6,10
35	————	0,1M HEPES	1,8M Kalium Phosphate	—	5,7
36	————	0,1M TRIS	8% PEG 8000	7,4 ml	8,49
37	————	0,1M Acetate	8% PEG 4000	7,4 ml	4,40
38	————	0,1M HEPES	1,4M Sodium Citrate	/10ml	7,94
39	————	0,1M HEPES	2% PEG 400 + 2,0 M Amm. Sulfate	3,1 ml	7,57
40	————	0,1M Citrate	20% Isopropanol + 20% PEG 4000	3,0 ml	5,06
41	————	0,1M HEPES	10% Isopropanol + 20% PEG 4000	4 ml	7,20
42	0,05M Kalium Phosphate	————	20% PEG 8000	5,5 ml	7,00
43	————	————	30% PEG 2000	4,0 ml	5,03
44	————	————	0,2M Sodium Formate	9,5 ml	7,06
45	0,2M Zinc Acetate	0,1M Cacodylate	18% PEG 8000	3,4 ml	5,58
46	0,2M Calcium Acetate	0,1M Cacodylate	18% PEG 8000	3,4 ml	5,97

Diluir as soluções para 10 ml de água.



APÊNDICE 2

TEORIA DA CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

Cristalografia de macromoléculas biológicas é um ramo especializado da cristalografia que investiga, pelo uso da técnica de difração de raios X em monocristais, a estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas (Blundell & Johnson, 1976).

Muitos dos avanços no entendimento dos sistemas biológicos à nível molecular tornaram-se possíveis através dos conhecimentos gerais e dos detalhes estruturais de proteínas, ácidos nucleicos, e dos complexos biologicamente relevantes de enzima-inibidor e enzima-substrato após o avanço da área cristalográfica, que atualmente é uma das mais poderosas ferramentas moleculares. Companhias químicas e farmacêuticas têm-se tornado ativas nessa área de determinação estrutural, devido a seus interesses no desenvolvimento de novos produtos industriais e no desenho racional de novas drogas (Drenth, 1994).

A determinação de qualquer estrutura cristalográfica tem início com a obtenção de cristais apropriados, ou seja, cristais que apresentem um determinado tamanho mínimo (com a menor dimensão por volta de 0,2mm), uma formação monocristalina e principalmente, padrão de difração quando expostos aos raios X (Blundell & Johnson, 1976).

Diferentemente dos cristais de pequenas moléculas, um cristal de proteína dificilmente excede 1mm^3 em volume. São cristais bem mais frágeis devido ao alto conteúdo de solvente (20% a 80%), e também devido às fracas interações (do tipo hidrofóbico e ligações de hidrogênio) entre as moléculas dentro da rede cristalina.



O crescimento de cristais de macromoléculas biológicas é um processo de múltiplos parâmetros, que envolve três etapas clássicas: nucleação, crescimento e cessamento do crescimento (Boistelle & Astier, 1988). Um cristal de proteína macroscópico contém aproximadamente 10^{15} moléculas, que tem início a partir da associação de agregados proteicos pré-nucleares que eventualmente atingem o tamanho nuclear crítico (Weber, 1991). Com esses núcleos estáveis, o crescimento prossegue via adição de moléculas em direção à rede cristalina. Ambas as etapas - nucleação e crescimento - ocorrem em condições de supersaturação, onde a concentração da proteína excede seu valor de solubilidade no equilíbrio.

A supersaturação está em função da concentração da macromolécula e de vários parâmetros que podem afetar sua solubilidade (Tabela 7). É possível atingir esse estado de supersaturação através da elevação das concentrações moleculares, e através de alterações dos parâmetros da solução que podem diminuir a solubilidade macromolecular.

A solubilidade de qualquer molécula depende da interação desta com a água. Uma camada de água cerca o soluto através das interações com as cargas e dipolos da superfície molecular. A alta constante dielétrica da água contribui para a solubilidade, permitindo a separação dos íons carregados. Caso haja algum acréscimo de íons na solução da macromolécula, a atmosfera iônica mudará a interação desses íons com as moléculas de água, modificando a solubilidade.

Em baixas concentrações iônicas (ou baixa força iônica), o efeito desta atmosfera iônica será o de aumentar a solubilidade, pois favorece as possibilidades de interações entre macromolécula e água. Este fenômeno é conhecido como *salting-in*.



Em altas concentrações iônicas (ou alta força iônica), o efeito desta atmosfera será o de diminuir a solubilidade, pois os íons passam a competir entre eles e com a macromolécula pela água que os rodeiam. Este fenômeno é conhecido como *salting-out* (Green, 1932).

Outra forma de alteração da solubilidade é através da modificação da carga líquida, adicionando ou removendo prótons na solução (isto é, alterações de pH) ou ligando íons especificamente a grupos polares da proteína. Geralmente, a proteína é mais solúvel quanto mais carga líquida contém. Atinge-se o menor ponto de solubilidade quando a carga líquida é zero, isto porque os íons podem empacotar em uma forma sólida e interagir eletrostaticamente, sem acúmulo de carga líquida de alta energia. O ponto de carga nula em uma proteína é dada pelo seu ponto isoelétrico (pI).

Alterações de temperatura também podem aumentar ou diminuir a solubilidade, dependendo da proteína e das condições experimentais. Solventes orgânicos também podem diminuir a solubilidade através da solvatação específica e do deslocamento da água ligada (Blundell & Johnson, 1976).



Tabela 7. Parâmetros que afetam a solubilidade de macromoléculas biológicas.

Parâmetros físico-químicos intrínsecos

- supersaturação (concentração da macromolécula e precipitante)
- temperatura, pH (flutuações)
- força iônica e pureza das substâncias químicas utilizadas
- vibrações
- efeitos de densidade e viscosidade (diferenças entre cristal e líquido-mãe)
- partículas sólidas

Parâmetros bioquímicos e biofísicos

- ligação de substratos, cofatores e íons metálicos
- aditivos específicos (agentes redutores, detergentes não-iônicos, poliaminas)
- envelhecimento da amostra (degradação e denaturação)

PUREZA DAS MACROMOLÉCULAS

- contaminantes macromoleculares
- heterogeneidade conformacional ou da sequência dos aminoácidos

A solubilidade de qualquer macromolécula depende de vários parâmetros. Desta forma, podemos representar através de um diagrama bidimensional, a solubilidade de uma macromolécula em solução (mg/ml ou mM) em função de um parâmetro (agente precipitante), mantendo os demais parâmetros constantes. Esse diagrama de fase (figura 19), compreende as seguintes zonas: supersaturada e hiposaturada, que são separadas pela curva de solubilidade (Ducruix & Giegé, 1992).



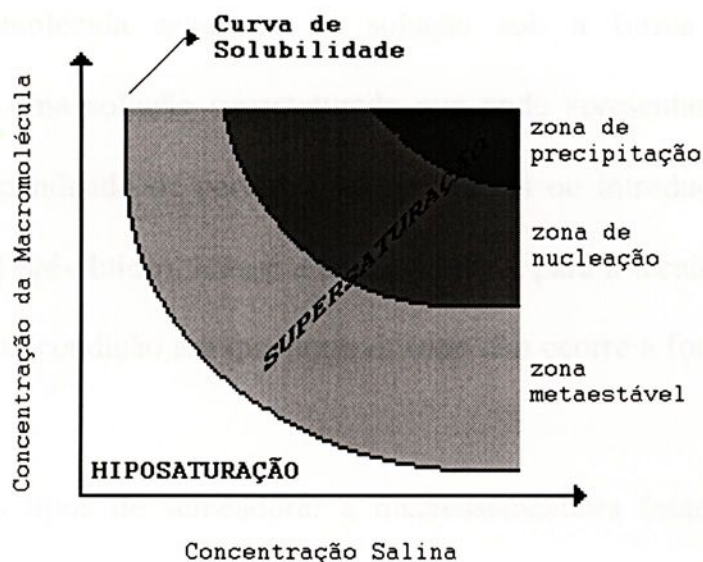


Figura 19. Descrição esquemática de um diagrama de fase bidimensional da solubilidade de uma macromolécula biológica.

Abaixo dessa curva de solubilidade (zona hiposaturada), as condições da solução são tais, que a macromolécula nunca irá cristalizar. Acima desta curva de solubilidade (zona supersaturada), temos uma região que pode ser subdividida em zonas: de precipitação, de nucleação e metaestável.

Um experimento que corresponda às condições na curva de solubilidade, significa que a solução saturada da macromolécula está em equilíbrio com a macromolécula cristalizada, fato que corresponde à situação ao final do processo de crescimento do cristal (estado de equilíbrio). Acima dessa curva de solubilidade, a concentração da macromolécula biológica é maior que a concentração no equilíbrio para uma dada concentração salina (zona de supersaturação).

Dependendo da cinética para se alcançar o nível de supersaturação, três zonas podem ser atingidas: (i) precipitação: onde o excesso de macromolécula

imediatamente separa-se da solução em um estado amorfo; (ii) nucleação: onde o excesso de macromolécula separa-se da solução sob a forma cristalina; (iii) metaestável: que é uma solução supersaturada que pode apresentar a formação de núcleos ou não, dependendo de perturbações mecânicas ou introdução de sementes (um pequeno cristal pré-obtido). Esta é a condição ideal para a técnica de sementeira (*seeding*), pois é uma condição em que normalmente não ocorre a formação de novos núcleos.

Existem dois tipos de sementeira: a macrossemeadura (*macroseeding*), que consiste na introdução de um cristal macromolecular de dimensão macroscópica, e a microssemeadura (*microseeding*), que consiste na introdução de alguns microcristais. Após a introdução de sementes, a condição de supersaturação necessária para o crescimento do cristal diminui, tornando-se mais fácil seu controle.

Existem muitas técnicas para a cristalização de macromoléculas biológicas, todas tendo como objetivo levar a solução da macromolécula biológica à um estado de supersaturação (Ducruix & Giegé, 1992; McPherson, 1985). De todas essas, a técnica de difusão de vapor é a mais utilizada, apresentando três sistemas diferentes: gota pendurada (*hanging drop*), gota sentada (*sitting-drop*) e gota sanduíche (*sandwich drop*) (figura 20).



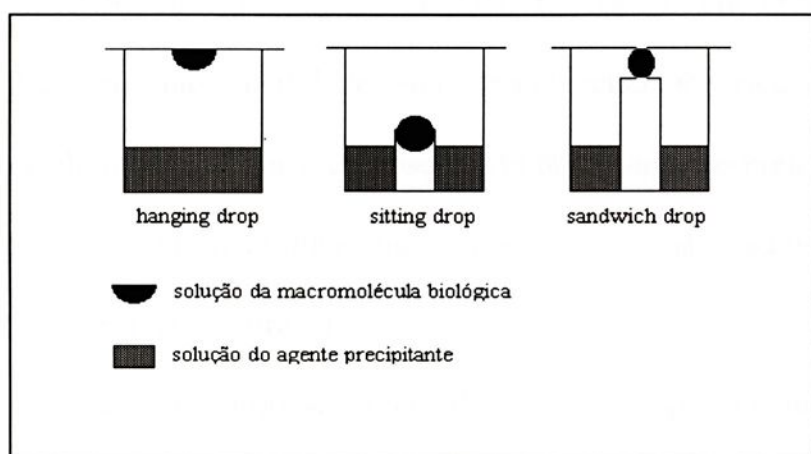


Figura 20. Representação esquemática da gota pendurada (*hanging drop*), gota sentada (*sitting drop*) e gota sanduíche (*sandwich drop*).

O princípio da cristalização por difusão de vapor está no equilíbrio de duas soluções com concentrações diferentes do agente precipitante.

Uma gota contendo a macromolécula biológica a ser cristalizada mais a solução com o agente precipitante, é equilibrada contra um reservatório contendo a solução com o agente precipitante à uma concentração 50% maior do que na gota. O equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (água e/ou solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório. Se o equilíbrio ocorre por meio de troca da água (da gota para o reservatório), isto leva a uma diminuição do volume da gota, e conseqüentemente à um aumento na concentração de todos os constituintes da gota de cristalização. Para espécies químicas com pressão de vapor maior que a pressão de vapor da água, a troca ocorre do reservatório para a gota, aumentando o volume da gota.

Com o aumento do número de macromoléculas biológicas cristalizadas com sucesso, tornou-se óbvio que muitas das condições de cristalização apresentava

semelhanças químicas entre si, isto levou à proposição de métodos de cristalização (Carter & Carter, 1979), onde um número limitado de condições de cristalização eram testados, utilizando pequenas quantidades da macromolécula biológica, geralmente por volta de poucos miligramas. A partir da observação dos resultados preliminares desses experimentos foi possível determinar quais tipos de tampão, aditivos e agentes precipitantes seriam os mais favoráveis.

Dentro desta idéia, foi proposto o método da matriz esparsa (Jancarick & Kim, 1991). Para esse método, foram escolhidas três categorias de parâmetros que afetam a cristalização como variáveis principais, que são: pH e materiais tampões, aditivos e agentes precipitantes. Para a variável pH e tampões foram escolhidos cinco diferentes pH's: 4,6 / 5,6 / 6,5 / 7,5 / 8,5 e para cada valor de pH foi escolhido o tampão químico que apresentou ser o mais adequado para a cristalização de proteínas anteriormente. Para os agentes precipitantes foram escolhidos: 2-propanol como agente volátil, 2-metil-2,4-pentanediol (MPD) e polietilenoglicol (PEG) como agentes não-voláteis e vários agentes de *salting-out*. Por tentativa e erro a matriz multidimensional foi simplificada e as condições finais estão apresentadas no apêndice 1.



APÊNDICE 3

INFORMAÇÕES CURRICULARES

Créditos - Mestrado

1. Biofísico-Química I - Departamento de Física, Unesp / Rio Preto; Prof. Dr. José Ruggiero (16 créditos - conceito B).
2. Biofísico-química II - Departamento de Física, Unesp / Rio Preto; Prof. Dr. Márcio F. Colombo (16 créditos - conceito A).
3. Métodos experimentais - Departamento de Física, Unesp / Rio Preto; Prof. Dr. Márcio F. Colombo (12 credits - conceito B).
4. Seminários - Departamento de Física, Unesp / Rio Preto (6 créditos - conceito A).
5. Cristalografia I - Departamento de Física, Unesp / Rio Preto; Prof. Dr. R. K. Arni (12 créditos - conceito A).
6. Cristalografia II - Departamento de Física, Unesp / Rio Preto; Prof. Dr. R. K. Arni (12 créditos - conceito A).
7. Introdução à Engenharia Genética – CBMEG; Unicamp / Campinas; Prof. Dr. Adílson Leite (curso de verão).
8. Cristalografia de Macromoléculas Biológicas - Departamento de Física; USP / São Carlos; Prof. Dr. Glaucius Oliva (12 créditos - conceito A).
9. Estrutura, função e evolução de proteínas - Departamento de Física; USP / São Carlos; Prof. Dr. Richard Garratt (12 créditos - conceito A).
10. Cristalografia de Macromoléculas - Departamento de Física; Unicamp / Campinas; Dr. Igor Polikarpov (12 créditos - conceito A).



Dados Pessoais

Leandra Watanabe

25 anos . solteira

RG: 19.160.882

Contato

R. Luzitana 1647 ap. 42

Centro . Campinas . 13015-122

Celular: (019) 979.7859

Formação Acadêmica

Pós-Graduação

Mestrado em Física

Área de Concentração: Biofísica Molecular

Projeto: Cristalização e análise do modelo estrutural da Ribonuclease T₁ de *Aspergillus oryzae* complexada com o análogo de substrato GpcU (guanilil (3'-6') 6'-deoxihomouridina)

Orientação: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni

Departamento de Física . IBILCE / UNESP - São José do Rio Preto (março 1996 - outubro 1998)

Capes / CNPq

Graduação

Bacharel em Ciências Biológicas

UNESP . São José do Rio Preto . SP

março 1992 - dezembro 1995

Iniciação Científica

Departamento de Física

Projeto: Estudo Estrutural de Fosfolipases A2

Orientador: Prof. Dr. R. K. Arni

UNESP . São José do Rio Preto . SP

agosto 1995 - fevereiro 1996

Estágios

Departamento de Física

Projeto: Cristalização Macromoléculas Biológicas

Orientador: Prof. Dr. R. K. Arni

UNESP . São José do Rio Preto . SP

março 1995 - julho 1995

Departamento de Física

Projeto: Estudos espectroscópicos para caracterização do corante tetrametilmurexida com sais.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo A. Fossey

UNESP . São José do Rio Preto . SP

março 1994 - fevereiro 1995



Produção Científica

R. K. Arni, L. Watanabe, Ward, R. J., Kreitman, R. J., Kumar, K. and Walz Jr., F. G. (1999). Three-Dimensional Structure of Ribonuclease T₁ Complexed with an Isosteric Phosphonate Substrate Analogue of GpU: Alternate Substrate Binding Modes and Catalysis. *Biochemistry* 38 pp. 2452 - 2461.

R. K. Arni, L. Watanabe, M. Fontes, D. C. Burdette and J. G. Zeikus (1996). Crystallization of the Secondary Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. *Protein and Peptide Letters* 3 n.6 pp. 423-426.

Congressos

XXVIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)

Cristalização do recombinante 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC-oxidase)

Watanabe, L., Arni, R. K. and Dilley, D.

Caxambu . MG - maio de 1997.

Congresso de Iniciação Científica - UNESP

Purificação da Aldolase do Músculo Peitoral de *Gallus domesticus*.

Ruiz, M. T., Watanabe, L. and Arni, R. K.

Guaratinguetá . SP - dezembro de 1996.

VII Workshop Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

Crystallization of the secondary alcohol dehydrogenase from the extreme thermophilic bacteria *Thermoanaerobacter ethanolicus*, a bifunctional alcohol dehydrogenase-acetyl-coa-thioesterase.

Watanabe, L., Arni, R. K., Ward, R. J., Burdette, D. and Zeikus, J. G.

Campinas . SP - novembro de 1996.

Congresso de Biomoléculas em Comemoração aos dez anos do Departamento de Física, IBILCE/UNESP

Crystallization of the secondary alcohol dehydrogenase from the extreme thermophilic bacteria *Thermoanaerobacter ethanolicus*, a bifunctional alcohol dehydrogenase-acetyl-coa-thioesterase.

Watanabe, L., Arni, R. K., Ward, R. J., Burdette, D. and Zeikus, J. G.

São José do Rio Preto . SP - outubro de 1996.

XXVª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)

Crystallization of the secondary alcohol dehydrogenase from the extreme thermophilic bacteria *Thermoanaerobacter ethanolicus*, a bifunctional alcohol dehydrogenase-acetyl-coa-thioesterase.

Watanabe, L., Arni, R. K., Ward, R. J., Burdette, D. and Zeikus, J. G.

Crystal structure of ribonuclease T₁ complexed with the isosteric phosphonate analogue of the RNA fragment GpcU: reveals the existence of subsites and a novel ribose interaction.

Arni, R. K., Watanabe, L., Ward, R. J. and Walz Jr., F. G.

Caxambu . MG - maio de 1996.



CRYSTALLIZATION OF THE SECONDARY ALCOHOL DEHYDROGENASE FROM *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E.

R. K. Arni^{#*}, L. Watanabe[#], M. Fontes[&], D. S. Burdette^a and J. G. Zeikus^{a**}

[#]Department of Physics, IBILCE/UNESP, C.P. 136 CEP 15054-000, São José do Rio Preto-SP, Brazil

[&]Department of Biophysics, UNESP, Botucatu-SP, Brazil

^aDepartment of Biochemistry, Michigan State University, East Lansing-MI, USA
Michigan Biotechnology Institute, Lansing-MI, USA

Abstract

The secondary alcohol dehydrogenase from the thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E has been crystallized at 40°C by vapour diffusion using polyethylene glycol as a precipitant. The orthorhombic crystals belong to the space group P 2₁2₁2 with cell constants of a=170.0Å, b=125.7Å and c=80.5Å. A native X-ray diffraction data set has been collected to 2.7Å resolution.

1. Introduction

Alcohol dehydrogenases (ADHs), central to prokaryotic and eukaryotic metabolism, are also potential biocatalysts for chiral chemical production [1-6]. The functionally and presumably structurally similar ADHs are classified as primary or secondary based on their catalytic efficiencies toward primary or secondary alcohols. These typically homodimeric or homotetrameric enzymes are almost exclusively Zn containing metalloenzymes [7] that use NAD(H), NADP(H) or both as cofactors. While primary ADHs from diverse sources have been extensively characterized [7] and their crystal structures have been determined [8-9], little is known about the molecular basis for primary ADH substrate specificity. Far less is currently known about secondary ADH structure-function, with relatively few reported studies on enzyme purification and

characterization [10-14]. The crystallization of a homologous secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii* has been reported [15-16].

As industrial catalysts, enzymes must have robust activities that are stable under process chemical and thermal conditions. The saccharidases used in starch liquification and the proteases used in detergents typify current industrial enzyme standards. Recently, chemically crosslinking enzyme crystals has been demonstrated as a general mechanism to significantly stabilize biocatalysts [17]. Also, thermophilic enzymes (recently reviewed by [18]) possess greater resistance to both thermal and chemical denaturation than their mesophilic counterparts. Genetic engineering of desirable protein stability characteristics however, has been complicated by the fact that the additional stability is due to subtle structural differences [18-19]. High-resolution structural studies of thermophilic enzymes will be useful to evaluate the structural basis for thermal stability.

Biphasic Arrhenius plots reported for *T. brockii* and *T. ethanolicus* 2° ADH activity indicate that at low temperatures these enzymes adopt configurations suboptimal for catalysis [20]. Therefore, the high-temperature crystallization of the 2° ADH from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E described here will advance research in both thermophilic ADH structure and their potential industrial utility by providing 2° ADH structural information under conditions where the enzyme is catalytically more optimal that may be used as industrial chiral catalysts.

2. Experimental Methods

2.1 Purification

Purification of the enzyme was performed anaerobically in a glove bag under N₂/H₂ (19:1) atmosphere, and all buffers used in steps subsequent to the dye columns contained 5mM DTT. Buffers for the ion exchange steps included 10% (W/V) glycerol. Cells from the batch fermentation were lysed by gently stirring a solution of 10g wet weight of cells, 5mg of hen-egg white lysozyme, 0.1mg of bovine pancreatic DNase I and 50ul Triton X-100 in 50 ml of 50mM Tris/HCL buffer, pH 7.0 for 30 minutes at 20°C. The lysate was centrifuged at 12,000g for 30 minutes in airtight tubes to pellet debris. The clarified supernatant was applied to a 25ml Red A column equilibrated with 50mM Tris/HCL, pH 7.0, washed with 50ml of 50mM Tris/HCL pH 7.0 and eluted with 50ml of 50mM Tris/HCL, pH 7.0 containing 0.5mM NADP⁺. The

2^o Adh-containing fractions were concentrated to 2ml in a stirred ultrafiltration cell (Amicon) under anaerobic N₂, and this was applied to an S300 gel-filtration column equilibrated with 50mM Tris/HCL, pH 8.0, containing 200mM NaCl.

2.2 Crystallization

For crystallization, the protein was concentrated to 10mg/ml in 50mM Tris, pH8.0 which additionally contained 20mM NaCl, 0.1mM DTT, 1mM NaN₃ and 0.1mM EDTA. The crystallization conditions were screened by the method of Jancarik and Kim, [21]. Needle clusters were obtained with various PEGs and ammonium sulphate over a wide pH range. The largest crystals were obtained by equilibrating 1μl of the protein stock solution against a reservoir containing 0.1M Cacodylate, 20mM NaCl, 1mM NaN₃, 6% PEG 8000, 0.2M MgCl₂, pH 6.2. The crystals generally grew as thin needles both at 4^o C and at room temperature (20^oC). The crystallization trials were then conducted at progressively higher temperature. When the crystallization was carried out at 40^oC, large single crystals (approximate dimensions 0.7 x 0.3 x0.3 mm) were obtained after about 4-5 days (Fig.1).

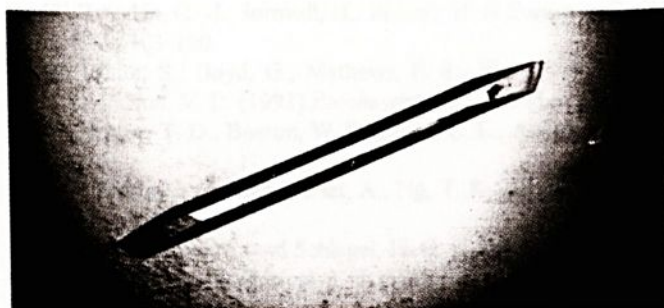


Fig.1. Photomicrograph of a crystal of 2^o ADH from *T. ethanolicus* 39E

3. Results and Discussion

3.1 Preliminary X-ray analysis

The crystals showed a tendency to dissolve after a period of a few days at room temperature. Thus, the concentration of PEG was increased to 10% to stabilize the crystals and the crystals were mounted in this solution.

X-ray were generated by a Rigaku RU200 operated at 100mA and 50kV and diffraction data was recorded by a R-AXIS IIC imaging plate detector. The crystals

belong to the space group $P2_12_12$ with cell constants of $a=170.0\text{\AA}$, $b=125.7\text{\AA}$ and $c=80.5\text{\AA}$. Diffraction data was collected from two crystals to $2.7\text{\AA}$ ($R_{\text{merge}}=10.44\%$). The asymmetric unit contains a tetramer as in the case of the crystals of the secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii* [15] with a V_M of $2.85\text{\AA}^3/\text{Da}$. Attempts are currently underway to obtain higher resolution data and a search for heavy atom derivatives has been initiated.

Acknowledgements: Financial assistance by CNPq and FAPESP (Brazil) to R.K.A. is gratefully acknowledged.

References

- [1] Keinan, E., Hafeli, E. K., Seth, K. K. & Lamed, R. L. (1986) *J. Am. Soc.* **108**, 162-169.
- [2] Keinan, E., Hafeli, E. K., Seth, K. K. & Lamed, R. L. (1986) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **501**, 130-149.
- [3] Keinan, E., Seth, K. K., Lamed, R. L., Ghirlando, R. and Singh, S. P. (1990) *Biocatalysis* **4**, 1-15.
- [4] Hummel, W. (1990) *Appl. Microbiol. Biotech.* **34**, 15-19.
- [5] Bradshaw, C. W., Fu, H., Shen, G. -J. and Wong, C. -H (1992) *J. Organic Chem.* **57**, 1526-1532.
- [6] Bradshaw, C. W., Hummel, W. and Wong, C. -H. (1992) *J. Organic Chem.* **57**, 1533-1536.
- [7] Brändén, C. -I., Jornvall, H., Eklund, H. & Furugren, B. (1975) *Enzymes* (3rd Ed.) **11A**, 103-190.
- [8] White, S., Boyd, G., Mathews, F. S., Xia, Z. -X., Dai, W. -W., Xiong, J. -P., Davidson, V. L. (1993) *Biochemistry* **32**, 12955.
- [9] Hurley, T. D., Bosron, W. F., Stone, C. L., Amzel, L. M. (1994) *J. Mol. Biol.* **239**, 415.
- [10] Zeikus, J. G., Ben-Bassat, A., Ng, T. K. & Lamed, R. J. (1981) *Arch. Microbiol.* **128**, 365-370.
- [11] Steinbüchel, A. and Schlegel, H. G. (1984) *Eur. J. Biochem.* **141**, 555-564.
- [12] Bryant, F. O., Weigel, J. & Ljungdahl, L. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 460-465.
- [13] Ismaiel, A. A., Zhu, C. -X., Colby, G. D. and Chen, J. -S. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 5097-5105.
- [14] Burdette, D. S., Zeikus, J. G. (1994) *Biochem. J.* **302**, 163.
- [15] Zhang, Z., Djebli, A., Shoham, M., Frolow, F., Peretz, M. and Burstein, Y. (1993) *J. Mol. Biol.*, **230**, 353-355.
- [16] Korkhin, Y., Frolow, F., Bogin, O., Peretz, M., Kalb (Gilboa), A. J. & Burstein, Y. (1996) *Acta Cryst.* **D52**, 887-889.
- [17] St. Claire, N. & Navia, M. (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7314.
- [18] Vieille, C., Burdette, D. S., Zeikus, J. G. (1996) *Biotech. Ann. Rev.* **2**, 1.
- [19] Böhm, G. and Jaenicke, R. (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* **43**, 97-106.
- [20] Burdette, D. S., Vieille, C., Zeikus, J. G. (1996) *Biochem. J.* **316**, 115.
- [21] Jancarik, J. & Kim, S. -H. (1991) *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411.

Received August 27, 1996, accepted September 22, 1996.

Three-Dimensional Structure of Ribonuclease T₁ Complexed with an Isosteric Phosphonate Substrate Analogue of GpU: Alternate Substrate Binding Modes and Catalysis^{†,‡}

Raghuvir K. Arni,^{*,§} Leandra Watanabe,[§] Richard J. Ward,^{||} Robert J. Kreitman,[⊥] Kapil Kumar,[∇] and Frederick G. Walz, Jr.^{*,∇}

Department of Physics, UNESP/IBILCE, S. J. do Rio Preto-SP, CEP 15054-000, CP 136, Brazil, Department of Biochemistry, USP/FMRP, Avenida Bandeirantes 3900, BR-14049900 Ribeirão Preto, SP, Brazil, Laboratory of Molecular Biology, Division of Basic Sciences, National Cancer Institute, National Institutes of Health, 3714E16, 37 Convent Drive, MSC 4255, Bethesda, Maryland 20892, and Department of Chemistry, Kent State University, Kent, Ohio 44242

Received November 3, 1998; Revised Manuscript Received December 29, 1998

ABSTRACT: The X-ray crystal structure of a complex between ribonuclease T₁ and guanylyl(3'-6')-6'-deoxyhomouridine (GpcU) has been determined at 2.0 Å resolution. This ligand is an isosteric analogue of the minimal RNA substrate, guanylyl(3'-5')uridine (GpU), where a methylene is substituted for the uridine 5'-oxygen atom. Two protein molecules are part of the asymmetric unit and both have a GpcU bound at the active site in the same manner. The protein-protein interface reveals an extended aromatic stack involving both guanines and three enzyme phenolic groups. A third GpcU has its guanine moiety stacked on His92 at the active site on enzyme molecule A and interacts with GpcU on molecule B in a neighboring unit via hydrogen bonding between uridine ribose 2'- and 3'-OH groups. None of the uridine moieties of the three GpcU molecules in the asymmetric unit interacts directly with the protein. GpcU-active-site interactions involve extensive hydrogen bonding of the guanine moiety at the primary recognition site and of the guanosine 2'-hydroxyl group with His40 and Glu58. On the other hand, the phosphonate group is weakly bound only by a single hydrogen bond with Tyr38, unlike ligand phosphate groups of other substrate analogues and 3'-GMP, which hydrogen-bonded with three additional active-site residues. Hydrogen bonding of the guanylyl 2'-OH group and the phosphonate moiety is essentially the same as that recently observed for a novel structure of a RNase T₁-3'-GMP complex obtained immediately after in situ hydrolysis of *exo*-(S_p)-guanosine 2',3'-cyclophosphorothioate [Zegers et al. (1998) *Nature Struct. Biol.* 5, 280–283]. It is likely that GpcU at the active site represents a nonproductive binding mode for GpU [Steyaert, J., and Engleborghs (1995) *Eur. J. Biochem.* 233, 140–144]. The results suggest that the active site of ribonuclease T₁ is adapted for optimal tight binding of both the guanylyl 2'-OH and phosphate groups (of GpU) only in the transition state for catalytic transesterification, which is stabilized by adjacent binding of the leaving nucleoside (U) group.

Ribonuclease T₁ (RNase T₁)¹ is an extracellular enzyme from *Aspergillus oryzae* that catalyzes the hydrolysis of RNA at guanylyl residues yielding new guanosine 3'-phosphate and 5'-OH ends. This occurs in a two-step process with cleavage of the RNA chain by transesterification of a 5'-phosphoester bond to form a guanosine 2',3'-cyclic phosphate terminus in the first step followed by hydrolysis of the cyclic phosphate to form a guanosine 3'-phosphate in a second, independent step. This stable, low molecular weight, monomeric endonuclease is the leading representative of a family of related fungal/bacterial proteins that share sequence and three-dimensional structural similarities (1–3). Even though

RNase T₁ has been extremely well characterized, the determination of a definitive catalytic mechanism has been elusive. Nevertheless, it is known that contributing residues at its catalytic site include Tyr38, His40, Glu58, Arg77, His92, and Phe100 and, with the exception of Arg77, the importance of these residues in catalysis was verified by site-directed mutagenesis (3). It is generally agreed that the α -carboxylate group of Glu58 acts as a general base and

[†] This work was supported in part by FAPESP and CNPq (Brazil).

[‡] Refined coordinates and structure factors have been deposited in the Brookhaven Protein Data Bank: PDB ID code 1B2M.

* Corresponding author: Tel (330) 672-2493; FAX (330) 672-3816; Email FWALZ@KENT.EDU.

[§] Department of Physics, UNESP/IBILCE.

^{||} Department of Biochemistry, USP/FMRP.

[⊥] National Cancer Institute, NIH.

[∇] Kent State University.

¹ Abbreviations: 3'-CMP, cytidine 3'-phosphate; GfpC, 2'-deoxy-2'-fluoroguanlyl(3'-5')cytidine; 3'-dGMP, 2'-deoxyguanosine 3'-phosphate; 3'-dUMP, 2'-deoxyuridine 3'-phosphate; 3'-GMP, guanosine 3'-phosphate; GpcC, guanylyl(3'-6')-6'-deoxyhomocytidine; GpcU, guanylyl(3'-6')-6'-deoxyhomouridine; GpG, guanylyl(3'-5')guanosine; GpU, guanylyl(3'-5')uridine; G2'p5'G, guanylyl(2'-5')guanosine; dCpdA, deoxycytidylyl(3'-5')deoxyadenosine; dGpdC, deoxyguanylyl(3'-5')deoxycytidine; NMR, nuclear magnetic resonance; 2'-OH, 2'-hydroxyl; RNase, ribonuclease; rms, root-mean-square; RNase S, a fully active cleavage product of RNase A where the peptide bond between residues 20 and 21 was hydrolyzed by mild digestion with subtilisin; SD, standard deviation; TBP, trigonal bipyramidal phosphorane; 3'-UMP, uridine 3'-phosphate; UpcA, uridylyl(3'-6')-6'-deoxyhomoadenosine.



the β -imidazolium group of His92 acts as a general acid in a concerted action for enzyme-catalyzed transesterification (3–5). It is also likely that the side chains of Tyr38, Arg77, and Phe100 are mainly involved in the electrostatic stabilization of a trigonal bipyramidal phosphorane (TBP) transition state, whereas the role of His40 in catalysis is less clear (3). The results of four independent reports on crystal structures of RNase T₁ complexed with 3'-GMP showed that His40 formed a strong hydrogen bond with the ribose 2'-OH group, which was also hydrogen-bonded with Glu58 (6–9). On the basis of these observations, it was proposed that the imidazolium group of His40 either electrostatically stabilizes the negative charge on the 2'-oxygen that develops with proton transfer to the carboxylate of Glu58 (6) or polarizes the 2'-OH group to facilitate this proton transfer in the first step of the reaction with RNA (7). However, evidence for a hydrogen bond between His40 and the 2'-OH group in RNase T₁ complexes with GpN (*N* = A, C, G, or U) phosphodiester substrates or substrate analogues has not been reported.

A kinetic model to explain the dramatic effect of the leaving nucleoside group (i.e., *N* in GpN substrates) on k_{cat} proposed tight enzyme binding with the guanosine moiety such that an initial, catalytically incompetent enzyme–substrate complex only involves interactions with this portion of the substrate (3). This initial complex then isomerizes to a catalytically productive mode where both nucleoside moieties specifically interact with the enzyme. This elegant model fits all the data but the discrete nature of the two binding modes is unknown. Therefore, it would be useful to study structures of enzyme complexes with nonreactive analogues of GpN substrates to elucidate different binding modes regarding the occupancy of previously defined subsites.²

The crystal structure of RNase T₁ complexed with G2'p5'G had the 5'-end guanine at the primary recognition (guanine) site and the 3'-end guanine at the N1 subsite where it was stacked on the imidazolium ring of His92 (12). RNase Ms is an excellent structural model for RNase T₁ and the structure of this orthologous enzyme complexed with GfpC (a nonreactive substrate analogue of GpC having a fluorine substituting for the guanosine 2'-OH group) revealed a similar binding at the G (guanine), p1, and N1 subsites (13). NMR studies on the binding of GfpU with RNase T₁ indicated that the guanosine and uridine moieties interacted with the enzyme (14). On the other hand, the crystal structure of orthologous barnase complexed with dGpdC indicated that this substrate analogue was not optimally bound at the active site and made contacts with neighboring molecules (15). In all of these cases, the bound substrate analogues did not contain a 2'-OH group, which precluded information regarding its interactions with the enzyme. A complementary approach to these studies employed an isosteric phosphonate analogue of GpU having a methylene substitution for the 5'-phosphoryl oxygen (designated GpcU), which has a guanosine 2'-OH group. NMR studies on the binding of GpcU with RNase Pb₁ (another RNase T₁ orthologue) were

reported; however, unlike the case for GfpU with RNase T₁ (14), the uridine moiety was not bound to the enzyme (16).

We also prepared GpcU and determined that ΔG° for its binding with RNase T₁ was less negative than that for GpU by only 0.4 kcal/mol, which suggested that its interactions with the enzyme closely approximate those for a minimal RNA substrate (17). We now report the X-ray crystal structure of a RNase T₁–GpcU complex. Two protein molecules are part of the asymmetric unit and both have GpcU bound essentially in the same manner at the active site. A third GpcU has its guanine moiety at the N1 subsite on one enzyme molecule and interacts with another GpcU on a symmetry-related molecule via hydrogen bonding between uridine ribose moieties. Some key findings regarding interactions at the active site are that the guanosine 2'-OH group is tightly bound to His40 and Glu58, that the phosphonate group is only bound with Tyr38, and that the uridine moiety does not contact the enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of GpcU. GpcU was prepared by condensing *N*²-benzoyl-5'-*O*-(dimethoxytrityl)guanosine (1.5 mmol) with pyridinium-2',3'-*O*-isopropylidene-6'-deoxyhomouridine 6'-phosphonate (1.2 mmol) using dicyclohexylcarbodiimide according to the method of Jones et al. (18). The reported synthesis of 2',3'-*O*-isopropylidene-6'-deoxyhomouridine 6'-phosphonate (19) was followed with modifications used in the synthesis of the 6'-phosphonate analogue of 5-fluoro-deoxyuridylate (20). The protected guanosine was produced by synthesizing *N*²,2',3',5'-tetrabenzoylguanosine (21) followed by partial deblocking to *N*²-benzoylguanosine (22). *N*²-Benzoyl-5'-*O*-(di-*p*-methoxytrityl)guanosine was then prepared according to the synthesis of 5'-*O*-(di-*p*-methoxytrityl)-*N*⁴-benzoylcytidine (23). After condensation, the deprotected products [guanylyl(3'–6')-6'-deoxyhomouridine and guanylyl(2'–6')-6'-deoxyhomouridine; 80% yield] were separated on a DEAE Sephadex A-25 column (2.6 × 60 cm) by using an 8 L linear gradient of ammonium bicarbonate (pH 8.5) from 0.02 to 0.16 M at a flow rate of 1.3 mL/min at room temperature. Treatment of the 2'-isomer with 20% acetic acid at 100 °C for 15 min resulted in its equilibration with the 3'-isomer (slightly favored), which was chromatographically purified to increase the yield of the desired product.

GpcU binding with RNase T₁. Ribonuclease T₁ (Gln25 allozyme) was purified as previously described and its concentration was determined with a molar absorptivity at 278 nm ($\epsilon_{278\text{ nm}}$) of $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (24). The concentration of GpcU was determined with the molar absorptivity for GpU [$\epsilon_{280\text{ nm}} = 1.06 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (25)]. Binding was studied at pH 5.5 using ultraviolet difference spectroscopy (24). The maximum difference absorbance occurred at 291 nm and values of the difference absorbance, ΔA , at this wavelength were determined for a fixed total concentration of the enzyme ($[E]_0 = 3.43 \times 10^{-3} \text{ M}$) in the presence of variable total concentrations of GpcU ($[L]_0$; (0.479–2.21) × 10^{−4} M). The equilibrium is characterized by $K_d = \{([E]_0 - \Delta A/\Delta\epsilon)([L]_0 - \Delta A/\Delta\epsilon)\}/(\Delta A/\Delta\epsilon)$ where K_d is the dissociation constant, $\Delta\epsilon$ is the difference molar absorptivity at 291 nm and $\Delta A/\Delta\epsilon = [EL]$ (the concentration of the enzyme–ligand complex). Data were fit to the quadratic

² Nomenclature for subsites on RNase T₁ can be summarized in terms of the generalized RNA sequence 5'-2p-1N-1p-G-p1-N1-p2-3', where G represents the primary recognition site for guanosine, p1 is the binding/catalytic site engaging the guanosine 3'-phosphodiester group, N1 is the site occupied by the leaving nucleoside group, etc. (10, 11).

solution, $\Delta A = \Delta \epsilon \{ ([L]_0 + [E]_0 + K_d - ([L]_0 + [E]_0 + K_d)^2 - 4[L]_0[E]_0)^{1/2} / 2 \}$ using NFIT as previously described (26).

Crystallization. The protein was dissolved in 10 mM sodium acetate, pH 4.1, at a concentration of 10 mg/mL. GpcU was added at a molar excess of 1.2:1 and incubated at 4 °C for 24 h. Crystallization trials used the hanging-drop vapor-diffusion technique (27) with 24-well tissue culture plates. A 2 μ L droplet of the protein–ligand solution was mixed with an equal volume of reservoir solution [0.1 M Tris-HCl, 0.2 M magnesium chloride, and 30% poly(ethylene glycol) 4000 at pH 8.75]. Initial crystallization trials used screening conditions (28) at room temperature. A single crystal with dimensions of 0.2 $\times$ 0.2 $\times$ 0.15 mm was obtained after 6 weeks of incubation in the presence of the reservoir solution.

Data Collection. Cu K α radiation was produced by a Rigaku RU200 rotating anode generator operating at 50 kV and 100 mA using a fine focus filament (0.3 mm) and a crystal monochromator. Diffraction intensities were measured with a Rigaku R-Axis IIC imaging plate detector. The crystals belong to space group $P2_12_12_1$ with cell constants $a = 69.91$ Å, $b = 90.29$ Å, and $c = 33.98$ Å; a complete data set was collected to 2.0 Å at 22 EC. The data were processed using the Rigaku Data Processing Package, PROCESS (29), to provide an R_{sym} of 6.4%.

Structure Determination and Refinement. The atomic coordinates of RNase T₁ in an enzyme–2'-GMP complex [PDB code 1rnt (30)] stripped of solvent and with an overall temperature factor of 20 Å² were used as the search model for molecular replacement using AMORE (31). The self-rotation function indicated the presence of two protein molecules in the asymmetric unit. The cross-rotation function using data in the resolution range 20.0–3.5 Å (correlation coefficient = 19.6/16.1) and translation function (resolution range 8.0–3.5 Å) determined the positions for the two molecules in the asymmetric unit (correlation coefficient = 59.1; R -factor = 38.6%). The rigid body refinement using data between 8.0 and 3.5 Å led to a correlation coefficient of 69.0 and an R -factor of 32.9%. Simulated annealing, positional, overall anisotropic B -factor, and individual restrained B -factor refinements were performed with X-PLOR version 3.1 (32). For model building, the program O (33) was used on a Silicon Graphics Extreme workstation. A number of omit maps were calculated and clear electron density was observed for the three GpcU molecules at all stages of the refinement. The refinement converged to a crystallographic residual of 18.7% ($R_{\text{free}} = 25.4\%$) for data between 8.0 and 2.0 Å. An analysis of the Ramachandran plot by PROCHECK (34) indicated that 90.7% of the residues lie in the most favored regions and 9.3% of the residues lie in additionally allowed regions. The rms deviations from ideal values for the final model indicates good stereochemistry. The final model consists of 1556 protein atoms, 120 ligand atoms, and 92 solvent molecules. Data collection, molecular replacement, and refinement statistics are summarized in Table 1.

RESULTS

GpcU Binding with RNase T₁. Excellent agreement was found between the binding data and the model quadratic

Table 1: Data Collection, Molecular Replacement, and Refinement Statistics

Data Collection	
max. resolution (Å)	2.0
R_{sym} (%)	6.4
space group	$P2_12_12_1$
cell constants (Å)	$a = 69.91, b = 90.29, c = 33.98$
Molecular Replacement	
rotation	
resolution range (Å)	20.0–3.5
correlation coefficient	19.6/16.1
translation	
resolution range (Å)	8.0–3.5
correlation coefficient	59.1
R -factor (%)	38.6
rigid-body refinement	
resolution range (Å)	8.0–3.5
correlation coefficient	69.0
R -factor (%)	32.9
Refinement Statistics	
total reflections accepted	26 734
resolution range (Å)	8.0–2.0
σ cutoff	2.0
F^2/σ (overall)	7.4
F^2/σ (last shell 2.0–2.2 Å)	3.6
completeness in last shell (%)	69.5
R (%)	18.7
R_{free} (%)	25.4
rms deviation bonds (Å)	0.011
rms deviation angles (deg)	1.742
rms deviation impropers (deg)	1.420

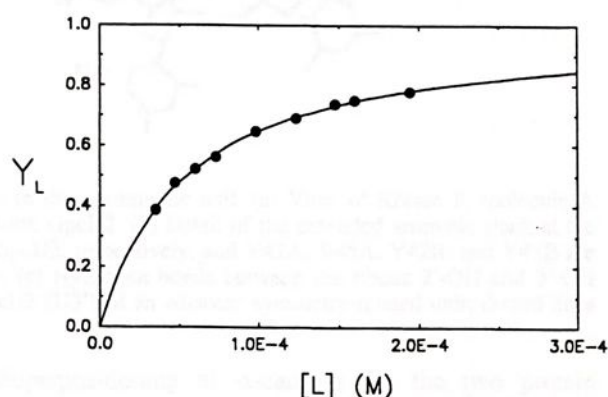


FIGURE 1: Plot of the fractional saturation, Y_L , for GpcU binding with RNase T₁ vs free ligand concentration at 25 °C and pH 5.5. Experimental values of Y_L were calculated as $(\Delta A/\Delta \epsilon)/[E]_0$ and corresponding values of $[L]$ as $[L]_0 - [EL]$, where $[EL] = \Delta A/\Delta \epsilon$. The theoretical curve was calculated from $Y_L = [L]/([K_d + [L]])$.

equation (see under Materials and Methods) where $r^2 = 0.9999$ and the best-fit values for K_d and $\Delta \epsilon$ were $(1.85 \pm 0.07 \times 10^{-4} \text{ M})$ and $3633 \pm 47 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively. A plot of the fractional saturation as a function of the free GpcU concentration is shown in Figure 1. The free energy change for binding was -5.8 kcal/mol [$\Delta G^\circ = -RT \ln (1/K_d)$], which was 0.4 kcal/mol less negative than that calculated for GpU [$\Delta G^\circ = -RT \ln (1/K_M)$] using the Michaelis constant, K_M , which was determined under essentially the same conditions (35).

Structural Overview. The asymmetric unit of the crystal consists of two RNase T₁ and three GpcU molecules, which are arranged as shown in Figure 2. Protein molecule A has one ligand with its guanine bound at the primary recognition site (GpcU1) and another ligand with its guanine at the N1 subsite (GpcU3). Protein molecule B has only one bound

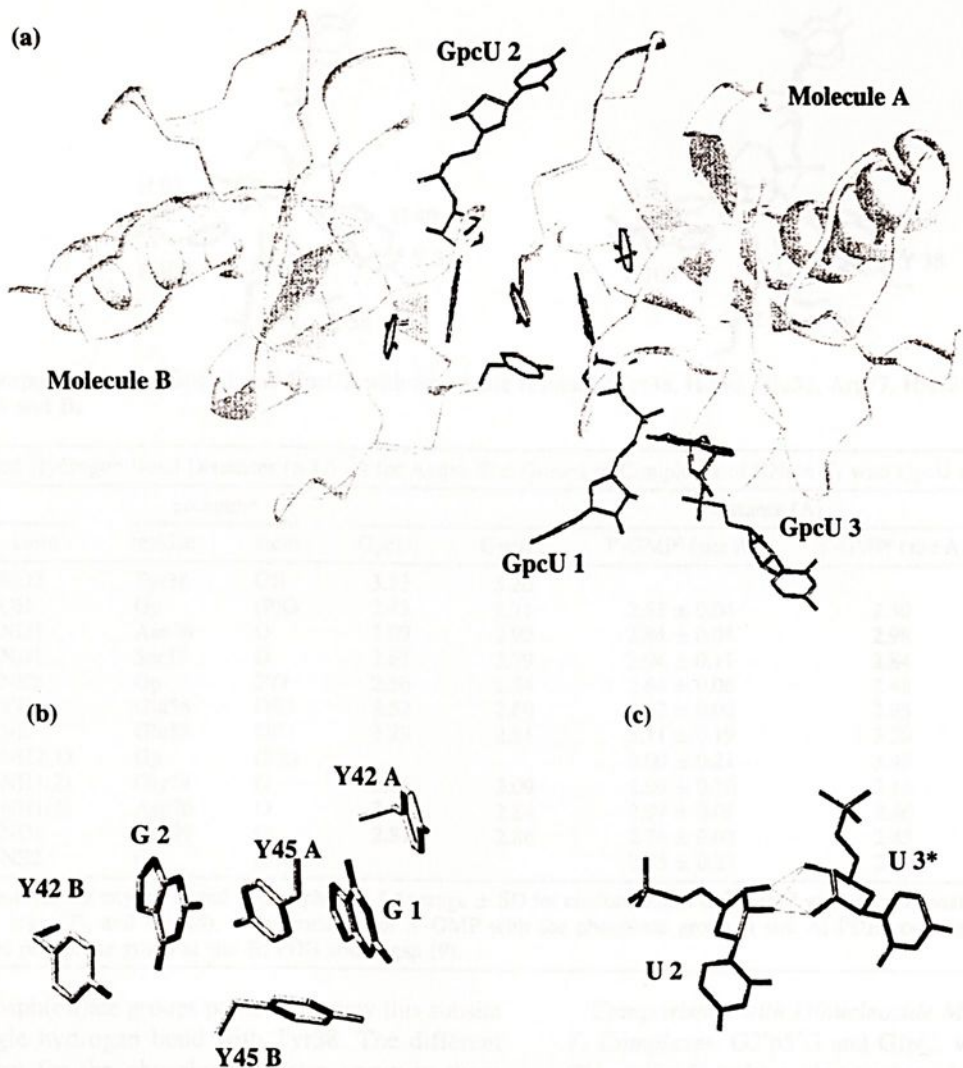


FIGURE 2: View of the two RNase T₁ molecules and three GpcU molecules in the asymmetric unit. (a) View of RNase T₁ molecule A complexed with GpcU1 and GpcU3 with RNase T₁ molecule B complexed with GpcU2. (b) Detail of the extended aromatic stack at the dimeric interface where G1 and G2 are the guanine moieties of GpcU1 and GpcU2, respectively; and Y42A, Y45A, Y42B, and Y45B are phenolic groups of tyrosine 42 and 45 on molecules A and B, respectively. (c) Hydrogen bonds between the ribose 2'-OH and 3'-OH groups of uridine residues for GpcU2 (U2) of one asymmetric unit with U3* of an adjacent symmetry-related unit; dotted lines represent hydrogen bonds.

ligand (GpcU2) with its guanine at the primary recognition site. None of the uridine moieties interacts with either protein molecule, but the uridine 2'- and 3'-hydroxyls of GpcU3 hydrogen-bond with the same groups on GpcU2 from a symmetry-equivalent unit in the crystal with four donor-acceptor oxygen distances ranging from 2.55 to 2.77 Å as shown in Figure 2C. Also, the uridine 3'-OH of GpcU1 forms a hydrogen bond with O1P (the *pro-S* phosphinic oxygen) of GpcU3 (2.93 Å). In addition, a water molecule forms a strong hydrogen bond with O1P of GpcU1 (2.66 Å) but a comparable, fixed water was not associated with GpcU2 at the active site of protein molecule B. This water molecule is also within hydrogen-bonding distance with the side chains of Glu58 (3.08 Å), Arg77 (3.57 Å) and His92 (3.55 Å).

The dimer interface, which involves essentially homologous protein surfaces including the primary recognition site, is different from those for other dimeric forms of crystalline RNase T₁, which exhibit heterologous interactions. It includes an extended stack of five aromatic groups which proceeds as Y42(molecule A)-Gua(GpcU1)-Y45(molecule A)-Gua(GpcU2)-Y42(molecule B) as illustrated in Figure 2B. This array is accommodated by movement of Tyr45 in molecule

B. Superpositioning of α -carbons for the two protein molecules yielded an rms deviation of 0.4 Å. Figure 3 illustrates the superpositioning of the active-site-ligand regions.

Comparisons with 3'-GMP-RNase T₁ Complexes. Protein interactions with the guanosine moiety of GpcU at the active site are similar to those observed in RNase T₁-3'-GMP complexes (6-9). Hydrogen bonds with guanine at the primary recognition site involving Asn43, Asn44, Tyr45, Glu46, and Asn98 were essentially identical for both ligands (data not shown). Also, all GpcU and 3'-GMP complexes had similar hydrogen bonds for His40 and Glu58 with the guanosine 2'-OH group; Tyr38 with a nonbridging phosphinic oxygen; and main-chain (O) to side-chain (N-H) hydrogen bonds that conformationally stabilize His40, Arg77, and His92 (see Table 2). On the other hand, side-chain to side-chain hydrogen bonds between Tyr38 and Asn36 were only observed in the GpcU1 and GpcU2 complexes. In most 3'-GMP-RNase T₁ complexes the phosphomonoester group completely occupies the p1 subsite, where it closely interacts with Tyr38, Arg77, His92, and Phe100; but this is not case for GpcU1 and GpcU2 as well as one 3'-GMP complex (9),

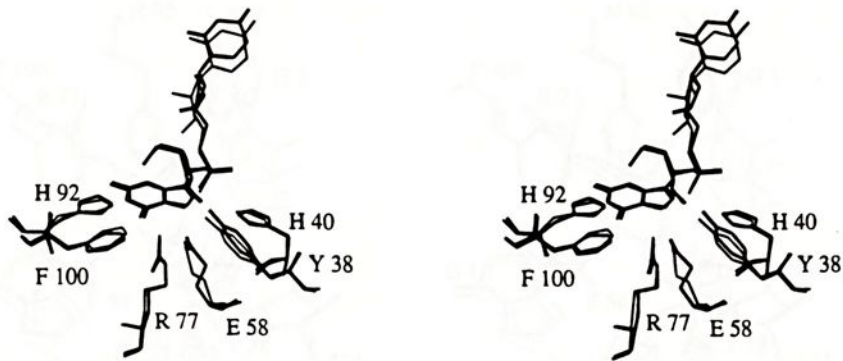


FIGURE 3: Superpositioning of GpcU1 and GpcU2 with active-site residues (Tyr38, His40, Glu58, Arg77, His92, and Phe100) on RNase T₁ molecules A and B.

Table 2: Selected Hydrogen-Bond Distances (≤ 3.5 Å) for Active-Site Groups in Complexes of RNase T₁ with GpcU and 3'-GMP

donor		acceptor ^a		distance (Å)				
residue	atom	residue	atom	GpcU1	GpcU2	3'-GMP ^b (site A)	3'-GMP ^c (site A)	3'-GMP ^d (site B)
Asn36	ND2	Tyr38	OH	3.13	3.20			
Tyr38	OH	Gp	(P)O	2.43	2.71	2.53 ± 0.04	2.30	2.80
His40	ND1	Asn36	O	3.09	2.92	2.84 ± 0.04	2.98	2.96
His40	ND1	Ser37	O	2.67	2.79	2.94 ± 0.11	2.84	2.84
His40	NE2	Gp	2'O	2.56	2.54	2.64 ± 0.06	2.48	2.56
Gp	2'O	Glu58	OE1	2.52	2.60	2.62 ± 0.08	2.95	2.66
Arg77	NE	Glu58	OE1	3.29	2.81	3.11 ± 0.19	3.20	3.11
Arg77	NH2(1)	Gp	(P)O			3.00 ± 0.21	3.43	
Arg77	NH1(2)	Gly74	O	2.66	3.09	2.99 ± 0.10	2.16	2.97
Arg77	NH1(1)	Asp76	O	3.01	2.84	2.97 ± 0.05	2.86	2.99
His92	ND1	Asn99	O	2.81	2.86	2.74 ± 0.02	2.85	2.86
His92	NE2	Gp	(P)O			2.75 ± 0.27	2.60	

^a (P)O is a nonbridging oxygen bound to phosphorus. ^b Average ± SD for conformations of 3'-GMP with the phosphate group at site A (9); PDB codes 1rga (6), 1rgc (7), and 1rls (8). ^c Conformation of 3'-GMP with the phosphate group at site A; PDB code 6gsp (9). ^d Conformation of 3'-GMP with the phosphate group at site B; PDB code 4gsp (9).

where the phosph(on)ate groups partially occupy this subsite having a single hydrogen bond with Tyr38. The different interaction loci for the phosphomonoester group in these alternate positions were referred to as site A (complete occupation of the p1 subsite) and site B (partial occupation of the p1 subsite) (9).³

The guanosine glycosidic torsion angle (χ) narrowly ranged from 44° to 63° for all 3'-GMP and GpcU complexes at the active site of RNase T₁. Similar ribose conformations with pseudorotational angles (P) ranging from 51° to 96° (*C4'-exo* to *O4'-endo*) were observed for 3'-GMP complexes, which have their phosphate groups at site A (6–9). On the other hand, P closely ranged from 161° to 180° (*C2'-endo*) for GpcU1/GpcU2 and 3'-GMP, where the phosph(on)ate groups occupy site B (9). Superpositioning of either GpcU1 or GpcU2 with 3'-GMP occupying phosphate site B, showed near congruence for their guanylyl moieties and placed their phosphorus atoms less than 0.9 Å apart (data not shown).

³ Crystal structures were determined for *exo*-(*S*_p)-guanosine 2',3'-cyclophosphorothioate complexed with RNase T₁ and during the course of its slow hydrolysis to guanosine 3'-thiophosphate, which is rapidly desulfurized to 3'-GMP (9). The conformation of the initial 3'-GMP product had its phosphate group positioned for hydrogen bonding only with Tyr38 (site B). Subsequently, the conformation of nucleotide changes so that the phosphate group also interacts with Arg77, His92, and Phe100 in addition to Tyr38 (site A). [This latter structure was previously found for directly prepared crystals of the 3'-GMP–RNase T₁ complex (6–8).] Specific hydrogen bonds with the guanine and guanosine 2'-OH moieties were maintained in the initial and final binding modes of 3'-GMP. It was also noted that the residues involved in phosphate group binding occupied fixed positions regardless of covalent and conformational changes in the bound nucleotide (9).

Comparisons with Dinucleoside Monophosphate–RNase T₁ Complexes. G2'p5'G and GfpC, which lack a ribose 2'-OH on the 5'-end guanine nucleoside, adopt glycosidic and backbone conformations that permit their phosphodiester groups to completely interact at the p1 subsite (site A) with Tyr38, Glu58, Arg77, His92, and Phe100 (12, 13) like the phosphomonoester groups of 3'-GMP in most complexes (see above). Superpositioning of active-site residues for RNase T₁–GpcU (molecule A with GpcU1 and GpcU3), RNase T₁–G2'p5'G, and RNase Ms–GfpC complexes gave the results in Figure 4. Portions of the ligand molecules were excluded to highlight the following points. All guanine residues at the primary recognition site occupy essentially the same relative position as a result of extensive hydrogen bonding and, with the exception of His39 of RNase Ms (equivalent to His40 of RNase T₁), all active-site residues are almost congruent. Remarkable coplanarity was also observed for base groups stacked on the imidazolium group of H92 at the N1 site, including the guanine of GpcU3, the 3'-end guanine of G2'p5'G, and the cytosine moiety of GfpC. Unlike binding of the guanine moiety at the primary recognition site, the base groups at the N1 subsite are not constrained by hydrogen bonds so that different coplanar orientations of the same base group can occur; e.g., compare the two guanine moieties at this locus in Figure 4. Good overlap was also observed for the phosphate groups of G2'p5'G and GfpC (at site A) but their phosphorus atoms were over 2 Å distant from that in the phosphonate group of GpcU1, which is considerably displaced at the p1 subsite to site B.

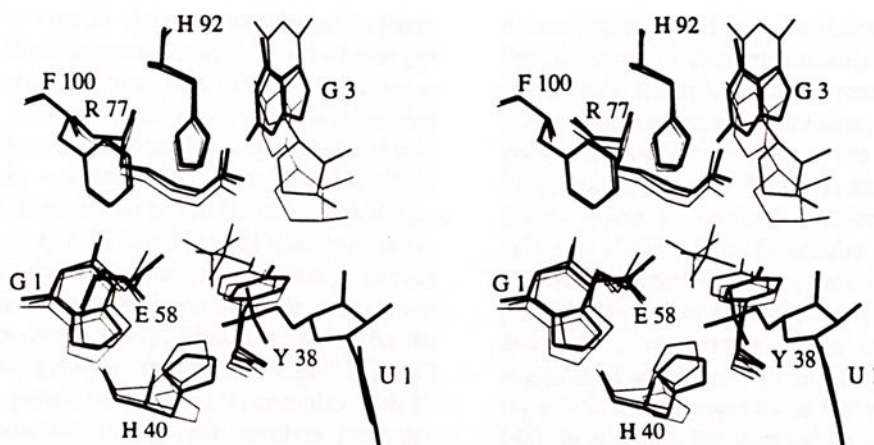


FIGURE 4: Superpositioning of active-site residues and ligand portions for RNase T₁–GpcU1/3, RNase T₁–G2'p5'G, and RNase Ms–GfpC complexes. Thick, medium, and thin lines represent RNase T₁–GpcU1/3, RNase T₁–G2'p5'G, and RNase Ms–GfpC complexes, respectively. For clarity the 5'-end guanosine ribose group was not included. Only the guanine (G3) of GpcU3 is shown and G1 refers to this moiety on GpcU1. The 5'-carbons of the 3'-end nucleosides are not shown for G2'p5'G and GfpC. The phosphate groups of G2'p5'G and GfpC at site A are illustrated by the overlapping tetrahedral figures in the middle of this view, which are displaced from the phosphonate group at the 6'-deoxyuridine 6'-phosphonate fragment (U1) of GpcU1 at site B. The active-site residues are all numbered according to the RNase T₁ sequence.

Table 3: *B*-Factors for Different Moieties of Dinucleoside Monophosphate Substrate Analogues and Guanine Nucleotides from Crystal Structures of Their Complexes with RNase T₁ or RNase Ms

ligand ^a	<i>B</i> -factors (Å ² ± SD) ^b				
	5'-end nucleoside		phosphor(on)yl group, PO ₂ (PO ₃)	3'-end nucleoside	
	guanine	sugar		sugar	base
GpcU1	5.6 ± 2.8	16.1 ± 3.6	24.1 ± 1.7	29.3 ± 4.4	28.2 ± 4.2
GpcU2	9.5 ± 2.8	16.8 ± 2.5	27.0 ± 4.8	30.9 ± 2.5	38.0 ± 1.2
GpcU3	22.8 ± 4.4	22.0 ± 2.6	19.4 ± 1.7	22.2 ± 2.9	20.5 ± 3.3
GfpC (13)	20.6 ± 1.5	27.4 ± 5.4	25.3 ± 3.6	33.8 ± 3.0	30.5 ± 2.8
G2'p5'G (12)	22.3 ± 1.6	29.8 ± 0.8	31.4 ± 0.3	29.6 ± 0.6	27.0 ± 0.6
3'-GMP (6)	12.4 ± 1.8	25.4 ± 3.2	32.2 ± 2.5		
3'-GMP (7)	16.0 ± 2.3	35.5 ± 5.4	47.2 ± 1.7		
3'-GMP (8)	12.4 ± 2.8	28.3 ± 6.0	48.9 ± 2.6		
3'-GMP ^c (9)	29.1 ± 1.7	40.3 ± 2.5	45.9 ± 0.5		
3'-GMP ^d (9)	18.2 ± 1.8	23.6 ± 2.0	26.7 ± 1.1		
2'-GMP (23)	15.3 ± 1.1	21.2 ± 0.8	22.5 ± 0.4		

^a Suffixes 1, 2, and 3 for GpcU refer to ligands with guanine groups bound at the primary recognition site of protein molecule A, the primary recognition site of protein molecule B, and the N1 subsite of protein molecule A, respectively. Numbers in parentheses are references. Data for GfpC and G2'p5'G are for major conformers only. ^b Average *B*-factors were calculated for all atoms in each moiety; bridging atoms in the ester linkages were considered as part of the sugars; nonbridging phosphorus-bound oxygens were considered part of the phosphonate (PO₂) and phosphate (PO₃) groups. ^c Conformation of 3'-GMP with the phosphate group at site A. ^d Conformation of 3'-GMP with the phosphate group at site B.

Dynamics of Bound Ligands. Heterogeneity of *B*-factors was observed that correlated with base, sugar, and phosphonate/phosphate segments of the bound ligands as shown in Table 3. In the cases of GpcU1, GpcU2, and 3'-GMP, *B*-factors for the guanine, guanosine-ribose, and phosphonate moieties are inversely proportional to the number of hydrogen bonds involved in binding each segment. [The relationship of *B*-factors with protein–ligand hydrogen bonding was recently reported for glycoside binding with concanavalin A (36).] The higher *B*-factors for GpcU3 vis à vis those for GpcU1/GpcU2 and their similarity between segments are consistent with the lack of hydrogen bonding between GpcU3 and the protein. The much smaller gradient in *B*-factors for guanine and guanosine-ribose moieties of bound GfpC and G2'p5'G suggests a cooperative dynamic linkage between the guanine and ribose segments that is dependent on their mutual binding. The lower guanine *B*-factors for bound 2'-GMP correlate with those for its more tightly bound phosphate group (37).

DISCUSSION

Ligand Interactions at the Active Site Are Not Dependent on the Crystal Structure. In view of the structures of the G2'p5'G–RNase T₁ and GfpC–RNase Ms complexes, it might have been expected that GpcU bound at the active site of RNase T₁ would have its phosphonate group in close proximity with Arg77, His92, and Phe100 at the p1 subsite and that the uracil moiety would be stacked on His92 at the N1 subsite. Therefore, it is possible that the lack of these interactions is a result of crystal packing, particularly since hydrogen bonding between GpcU3 and GpcU2 (in a neighboring asymmetric unit) was shown to be part of the lattice structure. Arguments against this view can be summarized as follows. First, the results in Figure 3 and Table 2 indicate that the two GpcU molecules at their respective active sites have almost identical conformations and hydrogen-bonding characteristics (involving the guanine, guanosine 2'-OH, and phosphonate groups), even though they differ in their local environments regarding the existence of a water-phos-

phosphate interaction for GpcU1, the presence of guanine (from GpcU3) stacked on His92 adjacent to GpcU1, and a hydrogen bond between the uridine ribose of GpcU1 and the phosphonate of GpcU3. Second, NMR studies of GpcU binding with orthologous RNase Pb₁ indicated that the uridine moiety was not bound to the enzyme (16). Third, alternate minor conformations were observed for bound G2'p5'G with RNase T₁ (12) and for gfpC with RNase Ms (13) that form fewer hydrogen bonds with the phosphate groups at the p1 subsite and exhibit no interactions at the N1 subsite for guanine and cytosine base groups, respectively. Also, a precedent for the binding mode of the guanylyl moieties of GpcU1/GpcU2 has recently been reported for a RNase T₁ complex with 3'-GMP where its phosphate group only involves hydrogen bonding with Tyr38 at site B (see above). Last, kinetic and mutagenic studies of RNase T₁ with GpN substrates independently suggested that a nonproductive, major binding mode has no interactions of the leaving nucleoside (N) group at the N1 subsite of the enzyme (3). Therefore, it is reasonable to conclude that the binding interactions of GpcU1 and GpcU2 with RNase T₁ observed here are not the result of crystal lattice forces and most likely approximate those that occur in solution. The fact that ΔG° values for GpcU and GpU binding with RNase T₁ are almost the same (see above) suggests that they bind in a similar manner. On the other hand, the binding of GpcU3 at the N1 site to form a tertiary complex with protein molecule A and GpcU1 is obviously stabilized by its bonding with GpcU2 in a neighboring asymmetric unit.

Significance of Guanylyl 2'-OH Group Interactions with His40 and Glu58. Studies on the pH dependence of ligand binding with RNase T₁ comparing a variety of guanosine and deoxyguanosine nucleosides/nucleotides revealed the existence of a binding site for the 2'-OH group and suggested the involvement of a deprotonated carboxyl group and a protonated imidazole group in this interaction (37, 38). Subsequently, a crystal structure of the enzyme complexed with two guanosines was reported and indicated that hydrogen bonds for the guanosine 2'-OH group at the active site involved the side chains of His40 and Asn36; however, modeling of enzyme binding with GpG in the same report predicted that the Guo 2'-OH group (5'-end) was hydrogen-bonded with His40 (donor) and Glu58 (acceptor) (39). This prediction was experimentally supported by four independent crystal structures for RNase T₁-3'-GMP complexes (6-9). In the present study we now show that similar binding of this 2'-OH group also occurs with a more RNA-like substrate analogue.

Even though His40 is not conserved among orthologues of RNase T₁, those with known crystal structures have superposable hydrogen-bond donor groups at this locale, including Thr42 for RNase St and Lys27 for barnase (13). In the case of barnase, it had been suggested that Lys27 is functionally analogous to His40 in RNase T₁ (5). Non-orthologous enzymes in two additional ribonuclease superfamilies also have Lys residues in this position, with Lys 108 for RNase Rh and Lys41 for RNase A (13). In the case of RNase A the crystal structure of its complex with 3'-CMP revealed hydrogen bonding of the ligand 2'-OH group with the ϵ -NH₃⁺ group of Lys41 (40). In addition, the structure of RNase A-uridine vanadate complexes (an analogue for a likely TBP intermediate/transition state) evidenced a strong

interaction of Lys41 with the apical 2'-oxygen (41). Therefore, members of three ribonuclease superfamilies catalyzing comparable transesterification reactions have a hydrogen-bond donor (i.e., either imidazolium, hydroxyl, or ammonium groups) in the same region of the active site as the His40 imidazolium group of RNase T₁ and it is possible that these groups share a common functional interaction with the substrate 2'-OH group. Molecular dynamics simulations of substrate interactions with RNase T₁ (42) and RNase A (43) predicted hydrogen bonding of the 2'-OH group with His40 and Lys41, respectively; in the case of RNase A, it was suggested that this interaction with Lys41 might be required for efficient deprotonation of this substrate group by His12 (43). In addition, site-directed mutagenesis studies of His40 of RNase T₁ (44), Lys27 of barnase (45), and Lys41 of RNase A (46) reported a dramatic loss in activity upon substitution, and in all cases where kinetic parameters were determined, this was mainly reflected in k_{cat} , which suggests a role for these residues in transition-state stabilization.

Hydrogen-bond donor interaction might orient the reactive 2'-OH group for more efficient proton transfer to the general base catalyst (i.e., a carboxylate for RNase T₁ and its orthologues; an imidazole for RNase Rh and RNase A). However, in cases where the putative hydrogen-bond donor group is relatively acidic (e.g., His imidazolium or Lys ammonium groups) it is not clear how reprotonation of the nascent alkoxide could be prevented, although this was reported to be theoretically possible in a gas-phase model system for RNase A (47). Cooperativity observed for the catalytic action of His40 and Glu58 of RNase T₁ (44) might reflect their common hydrogen bonding with the substrate guanylyl 2'-OH group. Whether these interactions are the same for catalytic and noncatalytic substrate binding modes is uncertain.

Comparisons with UpcA, dCpdA, and 3'-CMP Binding with RNase A. UpcA is a substrate analogue for pyrimidine-specific RNase A (or its active derivative RNase S) that corresponds with GpcU for guanine-specific RNase T₁. Coordinates for an unrefined X-ray crystal structure of a RNase S-UpcA complex (48) were used to contrast the ligand binding modes for the two enzymes. The uracil moiety of UpcA is bound at the primary recognition site of RNase S; however, unlike the corresponding case for RNase T₁, the adenine moiety occupies the N1 subsite being stacked on the imidazolium group of His119 (putative general acid catalyst) and the phosphonate group "completely" interacts at the p1 subsite. The latter conclusion is strongly supported by the results in Table 4, which compare hydrogen bonding at the active site of RNase S with UpcA and RNase A with 3'-CMP and dCpdA ligands. The uridylyl moiety of UpcA superposes almost congruently with the bound 3'-CMP with all atoms displaced by less than 0.75 Å (data not shown), but no interactions of the uridylyl 2'-OH group with His12 and Lys41 were observed. On the other hand, (P)O atoms of the phosphonate group of UpcA and the phosphate groups of 3'-CMP and dCpdA bind in a similar fashion. It is interesting that the distance between the imidazolium group of His119 and C6' in the UpcA complex is almost identical to that with a (P)O in the 3'-CMP complex and 5'O in the dCpdA complex (see Table 4). (In contrast, the corresponding distance between His92 and C6' in the RNase T₁-GpcU complex is 6.9 Å.) These results demonstrate that a phos-

Table 4: Selected Hydrogen-Bond Distances for Active-Site Groups in Complexes of RNase A with UpcA and 3'-CMP

donor ^a		acceptor ^a		distance (Å)		
residue (moiety)	atom	residue (moiety)	atom	UpcA ^b	3'-CMP ^c	dCpdA ^d
Gln11	NE2	PO ₂	(P)O	2.94	3.35	2.92
His12	NE2	PO ₂	(P)O	3.07	2.68	2.76
Phe120	N	PO ₂	(P)O	3.14	2.72	3.07
His119	ND1	A	(5'O) ^e	3.08	3.06	2.67
U/C	2'O	His12	NE2	4.54	2.91	
Lys41	NZ	U/C	2'O	6.97	2.68	
Asn44	ND2	U/C	2'O	3.14	3.61	

^a PO₂ represents the phosphinic group with two nonbridging oxygens; (P)O is a phosphinic oxygen; U, C, and A are uridine, cytidine, and adenosine/6'-deoxyadenosine, respectively. ^b Coordinates were obtained from ref 48. ^c PDB code 1rpf (40). ^d PDB code 1rpg (40). ^e 5'O for dCpdA or its spatially equivalent 6'C in UpcA or P(O) in 3'-CMP.

phosphate ester group (on UpcA) and a phosphodiester group (on dCpdA) bind in a similar manner at the p1 subsite of RNase A, which is consistent with the fact that both groups are monoanionic at the pH values used and have a similar calculated negative charge on their (P)O atoms (data not shown).

The above findings suggest that the hierarchy of subsite binding affinities for dinucleoside monophosphate substrates is different for RNase A and RNase T₁ regarding interactions at the primary recognition (guanine or pyrimidine), (guanylyl or pyrimidylyl) 2'-OH, p1, and N1 subsites. Unfortunately, *B*-factors for the RNase A-UpcA complex are not available to corroborate this view, but they are available for the RNase A-dCpdA complex, which reveals a similar overall binding mode of dCpdA with that for UpcA. Unlike the results for GpcU1 and GpcU2 in Table 3, the *B*-factors for dCpdA are considerably more variable for atoms within each moiety; nevertheless, they compare roughly as: PO₂ = cytosine < adenine < deoxyriboses. This order again correlates with the number of hydrogen bonds between the enzyme and each moiety (data not shown) but is dramatically different from the corresponding order for GpcU1 and GpcU2 in Table 3. It is possible that tighter binding of the leaving nucleoside group at the N1 site characterizes RNase A vis à vis RNase T₁ since the adenine group of dCpdA is stabilized by several hydrogen bonds in addition to stacking interactions on the imidazolium (general acid) group, which is common to both enzymes (32, 48; see Figure 4). Therefore, it is likely that RNase T₁ and RNase A differ regarding the relative affinities at the different subsites for dinucleoside monophosphate substrates. It is also noteworthy that the binding of dinucleoside monophosphate substrate analogues for both enzymes appears to exclude simultaneous, strong interactions at the 2'-OH and p1 subsites that compose the catalytic site.

Implications for the Transesterification Catalytic Mechanism. The results of the present study on the RNase T₁-GpcU complex and previous results on the RNase A-UpcA complex suggest that these phosphonate substrate analogues have the potential to interact optimally with the enzyme at all relevant subsites including the primary recognition site (guanine with RNase T₁ and uracil with RNase A), the 2'-OH subsite (RNase T₁ only),⁴ the p1 subsite (for RNase A only), and the N1 subsite (for RNase A only) and are

excellent models for ground-state substrate interactions. Since it is axiomatic that enzymes bind optimally with transition states for the catalyzed reaction, we hypothesize that strong interactions of the relevant 2'-OH and phosphate groups only occur with a TBP-like transition state, which explains why neither GpcU nor UpcA binds at all available subsites (i.e., no binding at the p1 and N1 subsites for GpcU with RNase T₁; no binding at the uridylyl 2'-OH subsite for UpcA with RNase A). This suggestion implies that catalytic groups at the p1 subsite of RNase T₁ are stabilized for transition-state binding and this is evidenced by their fixed positions (held by side-chain-main-chain hydrogen bonding; see Table 2) in the free enzyme and a variety of complexes as recently noted (9). The observation of alternate binding modes for the phosphomonoester group of 3'-GMP (9, 26) and the phosphodiester groups of GF2'p5'G (12) and GfpC (13) also supports this hypothesis.

The "exit" conformation of the 3'-GMP (i.e., phosphate bound at site B) hydrolysis product of *exo*-(S_p)-guanosine 2',3'-cyclophosphorothiolate is essentially the same as that for the guanylyl moiety of GpcU at the active site. This observation suggests that the GpcU complex might represent a preferred "entry" conformation for a dinucleoside monophosphate (GpU) substrate. In this regard, the protonation state of these exit and entry modes would be the same with Glu58 and His92 side chains in their anionic and cationic forms, respectively. Therefore, it is possible that there is a preferred sequence of GpN substrate interactions with the enzyme that first involves strong hydrogen bonding with the guanosine moiety (base and 2'-OH groups) and the phosphate with Tyr38 prior to interaction of the leaving nucleoside group at the N1 subsite, which promotes the TBP transition state at the p1 subsite via interactions with Arg77, His92, and Phe100. Advancement to the transition state might involve continued interaction of the phosphate group with Tyr38, which possibly acts as a "snare" to guide this process. Such a role would be consistent with the exclusive effect of a Tyr38Phe mutant on *k*_{cat} (3). The observation of a hydrogen bond of Tyr38 with Asn36 in the present study (Table 2) suggests the possibility of a more concerted process in achieving the transition state since the latter residue was previously proposed to interact with the ribose at the N1 subsite (3).

Summary. The following tentative conclusions are supported by the results of the present study. (1) GpcU binding at the active site of RNase T₁ involving the guanine moiety (hydrogen-bonded with Asn43, Asn44, Tyr45, Glu46, and Asn98), the guanosine 2'-OH group (hydrogen-bonded with His40 and Glu58), and the phosphonate (hydrogen-bonded with Tyr38 only) is essentially the same as that for the major binding mode of the substrate, GpU. (2) This substrate binding mode facilitates catalysis by decreasing the mobility (and/or optimizing the orientation) of the phosphate and 2'-OH groups along the reaction coordinate. (3) Maximal interaction of the substrate's guanosine 2'-OH and phosphate groups is only achieved for the TBP intermediate/transition

⁴ Different interactions at the 2'-OH subsite for RNase T₁ and RNase A were previously evidenced in ribose/deoxyribose nucleotide binding studies. It was found that the affinity of RNase T₁ with 3'-GMP is considerably greater than that for 3'-dGMP (37) but the opposite was true for RNase A, where its affinity with 3'-dUMP is significantly greater than that for 3'-UMP (49).

state, which is stabilized by interaction of the leaving nucleoside moiety at the N1 subsite.

REFERENCES

- Irie, M. (1997) RNase T₁/RNase T₂ Family RNases, in *Ribonucleases: Structures and Functions* (D'Alessio, G., and Riordan, J. F., Eds. Academic Press, Inc., New York, pp 101–130.
- Pace, C. N., Heinemann, U., Hahn, U., and Saenger, W. (1991) Ribonuclease T₁: Structure, Function, and Stability, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 30, 343–360.
- Steyaert, J. (1997) A Decade of Protein Engineering on Ribonuclease T₁: Atomic Dissection of the Enzyme–Substrate Interactions, *Eur. J. Biochem.* 247, 1–11.
- Sowa, G. A., Hengge, A. C., and Cleland, W. W. (1997) ¹⁸O Isotope Effects Support a Concerted Mechanism for Ribonuclease A, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 2319–2320.
- Steyaert, J., Hallenga, K., Wyns, L., and Stanssens, P. (1990) Histidine-40 of Ribonuclease T₁ Acts as a Base Catalyst When the True Catalytic Base, Glutamic 58, is Replaced by Alanine, *Biochemistry* 29, 9064–9072.
- Zegers, I., Haikal, A. F., Palmer, R., and Wyns, L. (1994) Crystal Structure of RNase T₁ with 3'-Guanylic Acid and Guanosine, *J. Biol. Chem.* 269, 127–133.
- 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.
- Gohda, K., Oka, K.-I., 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.
- Zegers, I., Loris, R., Dehollander, G., Haikal, A. F., Poortmans, F., Steyaert, J., and Wyns, L. (1998) Hydrolysis of a Slow Cyclic Thiophosphate Substrate of RNase T₁ Analyzed by Time-Resolved Crystallography, *Nat. Struct. Biol.* 5, 280–283.
- Walz, F. G., Jr., and Terenna, B. (1976) Subsite Interactions of Ribonuclease T₁: Binding Studies of Dimeric Substrate Analogues, *Biochemistry* 15, 2837–2842.
- Walz, F. G., Jr. (1997) Upstream Subsite Interactions for Oligonucleotide Binding with Ribonuclease T₁, *Biochim. Biophys. Acta* 1350, 183–188.
- 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.
- Nonaka, T., Nakamura, K. T., Uesugi, S., Ikehara, M., Irie, M., and Mitsui, Y. (1993) Crystal Structure of Ribonuclease Ms (as a Ribonuclease T₁ Homologue) Complexed with a Guanylyl-3',5'-Cytidine Analogue, *Biochemistry* 32, 11825–11837.
- Shibata, Y., Shimada, I., Ikehara, M., Miyazawa, T., and Inagaki, F. (1988) ¹H NMR Investigation of the Interaction between RNase T₁ and a Novel Substrate Analogue, 2'-Deoxy-2'-Fluoroguanlyl-(3'→5')-Uridine, *FEBS Lett.* 235, 237–240.
- Baudet, S., and Janin, J. (1991) Crystal Structure of a Barnase–d(GpC) Complex at 1.9 Å Resolution, *J. Mol. Biol.* 219, 123–132.
- Yakovlev, G. I., and Moiseyev, G. P. (1993) NMR Studies of a Complex of RNase *Penicillium brevicompactum* with Dinucleoside Phosphonate and the Implications for the Mechanism of Enzyme Action, *Biochim. Biophys. Acta* 1202, 143–148.
- Kreitman, R. J., and Walz, F. G., Jr. (1983) Ribonuclease T₁ Binds with an Isosteric Non-Active Phosphonate Analogue of GpU, *Biophys. J.* 41, 390a.
- Jones, G. H., Albrecht, H. P., Damodara, N. P., and Moffat, J. G. (1970) Synthesis of Isosteric Phosphonate Analogues of Some Biologically Important Phosphodiester, *J. Am. Chem. Soc.* 92, 5510–5511.
- Jones, G. H., and Moffat, J. G. (1968) The Synthesis of 6'-Deoxyhomonucleoside 6'-Phosphonic Acids, *J. Am. Chem. Soc.* 90, 5337–5338.
- Montgomery, J. A., Thomas, H. J., Kisliuk, R. L., and Gaumont, Y. (1979) Phosphonate Analogue of 2'-Deoxy-5-fluorouridylic Acid, *J. Med. Chem.* 22, 109–111.
- Green, D. P., Ravindranathan, T., Reese, C. B., and Saffhill, R. (1970) *Tetrahedron* 26, 1031–1041.
- Chládek, S., and Smrť, J. (1964) Oligonucleotidic Compounds. VIII. Synthesis of Adenylyl-(5'→3')-Uridine, Adenylyl-(5'→3')-Cytidine, Guanylyl-(5'→3')-Uridine, Guanylyl-(5'→3')-Cytidine, Cytidylyl-(5'→3')-Cytidine, Adenylyl-(5'→3')-Uridylyl-(5'→3')-Cytidine and Related Compounds, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 229, 214–233.
- Rammner, D. H., and Khorana, H. G. (1962) Studies on Polynucleotides. XVI. Specific Synthesis of the C₃–C₅, Internucleotidic Linkage. Examination of Routes Involving Protected Ribonucleosides and Ribonucleoside 3'-Phosphates. Synthesis of Uridylyl-(3'→5')-Adenosine, Uridylyl-(3'→5')-Cytidine, Adenylyl-(3'→5')-Adenosine, and Related Compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 84, 3112–3122.
- Walz, F. G., Jr., and Hooverman, L. L. (1973) Interaction of Guanine Ligands with Ribonuclease T₁, *Biochemistry* 12, 4846–4851.
- Zabinski, M., and Walz, F. G., Jr. (1976) Subsites and Catalytic Mechanism of Ribonuclease T₁: Kinetic Studies Using GpC and GpU as Substrates, *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 558–564.
- Walz, F. G., Jr. (1992) Relaxation Kinetics of Ribonuclease T₁ Binding with Guanosine and 3'-GMP, *Biochim. Biophys. Acta* 1159, 327–334.
- McPherson, A. (1982) *The Preparation and Analysis of Protein Crystals*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Jancarik, J., and Kim, S.-H. (1991) Sparse-Matrix Sampling—A Screening Method for Crystallization of Proteins, *J. Appl. Crystallogr.* 24, 409–411.
- Higashi, T., (1990) Auto-Indexing of Oscillating Images, *J. Appl. Crystallogr.* 23, 253–257.
- Armi, 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.
- Navaza, J. (1994) AMORE—An Automated Package for Molecular Replacement, *Acta Crystallogr. A* 50, 157–163.
- Brunker, A. T. (1992) *X-PLOR, Version 3.1: A System for X-ray Crystallography and NMR*, Yale University Press, New Haven, CT.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) Improved Methods for Building Protein Models in Electron Density Maps and the Location of Errors in These Models, *Acta Crystallogr. A* 47, 110–119.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK—A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Walz, F. G., Jr., Osterman, H. L., and Libertin, C. (1979) Base-Group Specificity at the Primary Recognition Site of Ribonuclease T₁ for Minimal RNA Substrates, *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 95–102.
- Bradbrook, G. M., Gleichmann, T., Harrop, S. J., Habash, J., Raftery, J., Kalb, J., Hillier, I. H., and Helliwell, J. R. (1998) X-ray and Molecular Dynamics Studies of Concanavalin-A Glucoside and Mannoside Complexes, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 94, 1603–1611.
- Walz, F. G., Jr. (1977) Studies on the Nature of Guanine Nucleotide Binding with Ribonuclease T₁, *Biochemistry* 16, 5509–5515.
- Walz, F. G., Jr. (1976) Ribose Recognition by Ribonuclease T₁: Difference Spectral Binding Studies with Guanosine and Deoxyguanosine, *Biochemistry* 15, 4446–4450.
- Lenz, A., Cordes, F., Heinemann, U., and Saenger, W. (1991) Evidence for a Substrate-Binding Subsite in Ribonuclease T₁, *J. Biol. Chem.* 266, 7661–7667.

40. Zegers, I., Maes, D., Dao-Thi, M.-H., Poortmans, F., Palmer, R., and Wyns, L. (1994) The Structures of RNase A Complexed with 3'-CMP and d(CpA): Active Site Conformation and Conserved Water Molecules, *Protein Sci.* 3, 2322-2339.
41. Wladowski, B. D., Svensson, L. A., Sjolín, L., Ladner, J. E., and Gilliland, G. L. (1997) Structure (1.3 Å) and Charge States of a Ribonuclease A-Uridine Vanadate Complex: Implications for the Phosphate Ester Hydrolysis Mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5488-5498.
42. Cordes, F., Starikov, E. B., and Saenger, W. (1995) Initial State of an Enzymatic Reaction. Theoretical Prediction of Complex Formation in the Active Site of RNase T₁, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10365-10372.
43. Haydock, K., Lim, C., Brunger, A. T., and Karplus, M. (1990) Simulation Analysis of Structures on the Reaction Pathway of RNase A, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 3826-3831.
44. Steyaert, J., and Wyns, L. (1993) Functional Interactions Among the His40, Glu58 and His92 Catalysts of Ribonuclease T₁ as Studied by Double and Triple Mutants, *J. Mol. Biol.* 229, 770-781.
45. Mossakowska, D. E., Nyberg, K., and Fersht, A. R. (1989) Kinetic Characterization of the Recombinant Ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* (Barnase) and Investigation of Key Residues in Catalysis by Site-Directed Mutagenesis, *Biochemistry* 28, 3843-3850.
46. Trautwein, K., Holliger, P., Stackhouse, J., and Benner, S. A. (1991) Site-Directed Mutagenesis of Bovine Pancreatic Ribonuclease: Lysine-41 and Aspartate-121, *FEBS Lett.* 281, 275-277.
47. Lim, C., and Tole, P. (1992) Endocyclic and Exocyclic Cleavage of Phosphorane Monoanion: A Detailed Mechanism of the RNase A Transphosphorylation Step, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7245-7252.
48. Richards, F. M., and Wyckoff, H. W. (1973) 1 Ribonuclease-S, in *Atlas of Molecular Structure in Biology* (Philips, D. C., and Richards, F. M. (Eds.) Oxford University Press, London.
49. Walz, Jr., F. G. (1971) Kinetic and Equilibrium Studies on the interaction of Ribonuclease A and 2'-Deoxyuridine 3'-Phosphate, *Biochemistry* 10, 2156-2162.

BI982612Q

