De substraatbinding aan het Substraat Bindend Domein 2 (SBD2) van de ABC-transporter GlnPQ

Bachelorondzoek 03-05-'10 – 09-07-'10

L.J.Y.M. Swier
G.K. Schuurman-Wolters, B. Poolman

Inhoudsopgave

1. Inleiding 2
2. Materialen & methode 8
3. Resultaten & discussie 11
4. Conclusie 18
5. Dankbetuiging 19
6. Referenties 19

Samenvatting

Gedurende dit onderzoek is de substraatbinding aan de ATP-bindende cassette (ABC)-transporter GlnPQ bestudeerd. Het doel was om meer inzicht te krijgen in de substraatbinding aan het Substraat Bindend Domein 2 (SBD2) van GlnPQ. Aan de hand van de kristalstructuur van SBD2 is een viertal mutanten geconstrueerd in de bindingssite: D267N, S328L, K373V en D417E. Deze mutanten zijn tot expressie gebracht in *E. coli* en gezuiverd. De karakteristieken voor substraatbinding zijn bepaald met Differential Scanning Calorimetry en Isothermal Titration Calorimetry. Hierbij werd het wild type SBD2 eiwit als referentie voor de data-analyse gebruikt. De gemeten affiniteiten van de mutanten voor glutamine was veel lager van het wild type. Dit was ook verwacht, omdat er echt gesleuteld is aan de waterstofbruggen en de elektrostatische interacties tussen het substraat en het actieve centrum van SBD2. Het kleinste effect is gemeten bij de D417E mutant. Met deze mutatie is de bindingssite van SBD1 gekopieerd naar SBD2. De K373V mutatie blijkt nog wel glutamine te binden met een redelijke affiniteit. De D267N mutatie heeft echter een groot effect op de substraatbinding. Deze leidt namelijk tot een hogere affiniteit voor glutaminezuur of glutamaat in vergelijking met de affiniteit voor glutamine. Daarnaast leidt de mutatie waarschijnlijk ook tot een reorganisatie in de eiwitstructuur. Er was was helaas geen tijd meer voor metingen aan de S328L mutant.

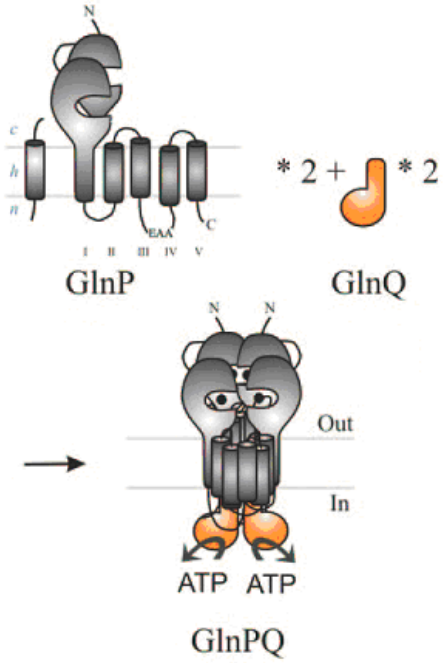
1. Inleiding

1.1 ABC transporter GlnPQ

De ABC-transporter GlnPQ is de enige glutaminetransporter in *Lactococcus lactis*. Het transporteert glutamine en glutaminezuur vanuit de omgeving van de bacterie over het cytoplasmamembraan naar het cytoplasma. [1] Homologen voor het substraat bindend domein van GlnPQ zijn GlnH in *Escherichia coli* en GluBP in *Thermus thermophilus*.[2]

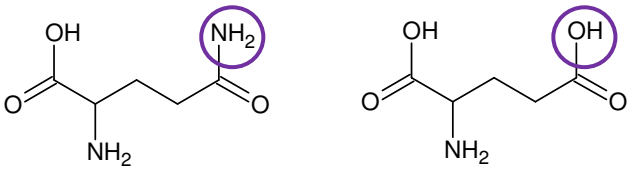
Het actieve GlnPQ complex bestaat uit tweemaal twee subeenheden, GlnP en GlnQ (*Figuur 1)*. De GlnQ subeenheid is het nucleotide bindende domein, waarin ATP wordt gehydrolyseerd. De GlnP subeenheid is het translocator domein. Dit domein bestaat uit een transmembraan domein en twee substraatbindende domeinen. De substraatbindende domeinen worden SBD1 (residuen 32-252) en SBD2 (residuen 253-482) genoemd en zijn voor 50% identiek. [1] Ze zijn verantwoordelijk voor het opnemen van het substraat vanuit de omgeving van de cel. De substraatbinding induceert dan conformationele veranderingen in de substraatbindende domeinen, waardoor deze een interactie aan kunnen gaan met het transmembraan domein. [3,4] Deze interactie zorgt ervoor dat er ook in het transmembraan domein en in de nucleotide bindende domeinen conformationele veranderingen optreden. Hierdoor zal de affiniteit van de nucleotide bindende domeinen voor ATP toenemen. De binding van ATP in deze domeinen induceert aan de hand van nog meer conformationele veranderingen de verplaatsing van het substraat van de bindingssite in het substraat bindende domein naar de bindingssite in het transmembraan domein. Van hieruit wordt het substraat over het membraan de cel in getransporteerd. [3, 4, 5]

Wanneer alleen SBD1 aanwezig is in het translocator domein, is de affiniteit voor het substraat laag en is de omzetting zo'n 20-30% lager dan die van het wild type GlnPQ. Als echter alleen SBD2 aanwezig is, is de affiniteit juist hoog en is de omzetting gelijkwaardig aan die van het wild type GlnPQ. Er wordt dan ook gedacht dat SBD2 echt betrokken is bij het overdragen van het substraat aan het transmembraan domein en dat SBD1 meer een regulerende rol speelt. [1]



Figuur1: Een schematische weergave van de opbouw van het GlnPQ complex. [1]

De substraten voor SBD2 zijn de aminozuren glutamine en glutaminezuur (*Figuur 2*). Glutaminezuur dient hiervoor wel in de geprotoneerde vorm aanwezig te zijn. Het is namelijk gebleken dat een overall lading van nul belangrijk is voor de hoge affiniteit voor het substraat in SBD2. Daarnaast blijkt dat ook de positie van de α-aminogroep en de α-carboxylgroep van het substraat in de substraat bindingssite cruciaal zijn voor een hoge affiniteit.[1] Het enige structurele verschil tussen de twee substraten, is dat glutamine een aminegroep heeft zitten op de plaats waar glutaminezuur een hydroxylgroep heeft zitten. Beide groepen kunnen echter als waterstofbrug donor optreden en daarom kunnen de substraten op gelijke wijze in de bindingssite van SBD2 gebonden worden.

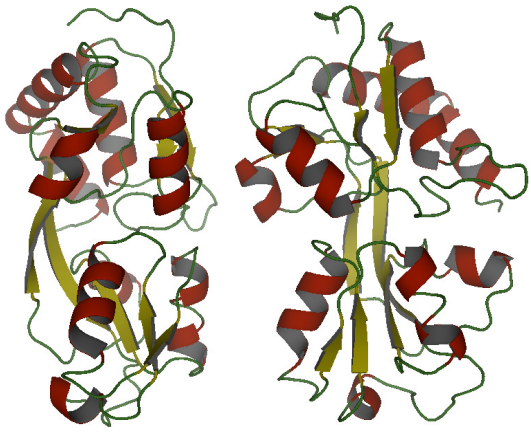


Figuur 2: De substraten glutamine (links) en glutaminezuur (rechts).

1.2 De substraatbinding aan SBD2

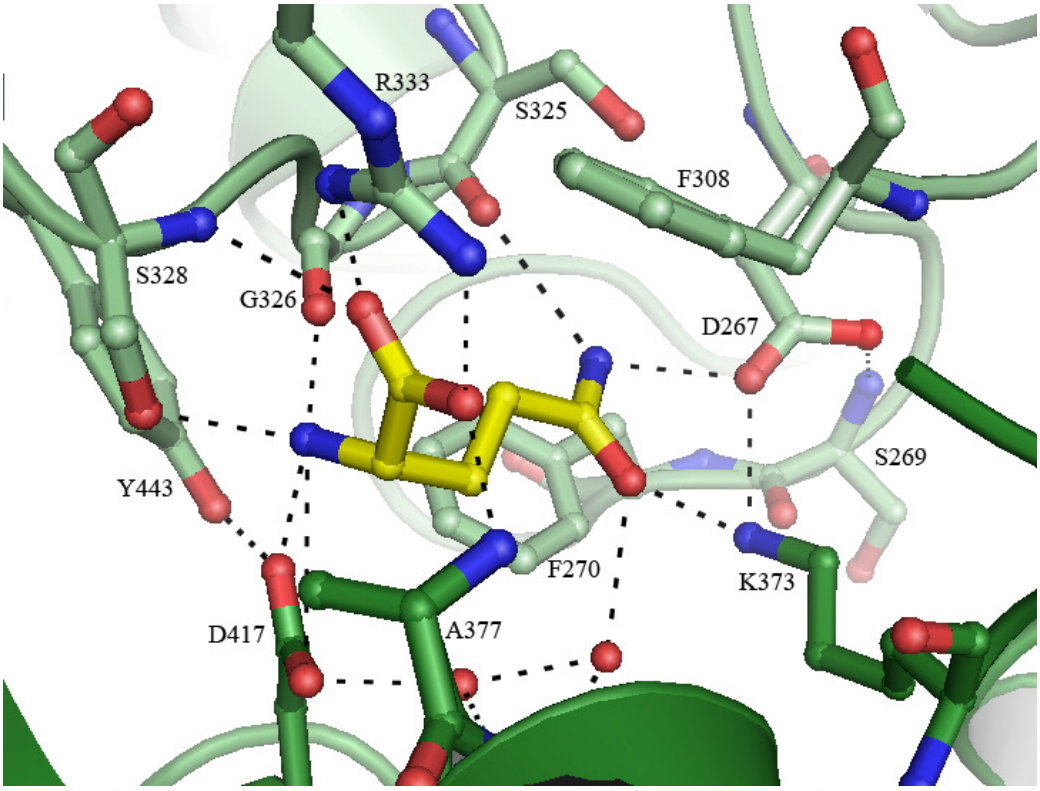
Voor substraat bindende domeinen van ABC-transporters is in het algemeen bekend dat ze uit twee subdomeinen en een schanier bestaan. [3] Ook SBD2 vertoont deze opbouw

en in de ruimte die door de twee subdomeinen wordt ingesloten, bevindt zich de bindingssite (*Figuur 3*). Het 'bovenste' subdomein (residuen 253-342 en 443-482) bestaat uit 5 α-helices en 4 β-strands en het 'onderste' subdomein (residuen 351-437) bestaat ook uit 5 α-helices en 3 β-strands. Het schanier bestaat uit 2 β-strands, namelijk β4 (residuen 343-350) en β8 (residuen 438-442), en zorgt ervoor dat SBD2 in afwezigheid van het substraat in de "ongeligandeerde, open" conformatie is. In deze conformatie wordt er door watermoleculen uit de oplossing een waterstofbrugnetwerk gevormd, die de interactie tussen de twee subdomeinen stabiliseert. Dit netwerk is waarschijnlijk essentieel voor de substraatbinding, omdat het een opening vormt waar het substraat tot door kan dringen. [6, 7] Waneer het substraat in de bindingssite gebonden wordt, zorgt het schanier ervoor dat SBD2 van de "geligandeerde, open" conformatie in de "geligandeerde, gesloten" conformatie komt. [3] Hierbij komt het substraat diep in het eiwit te liggen. Deze manier van substraat binden wordt het Venus flytrap mechanisme genoemd. [4]



Figuur 3: Een zij- en vooraanzicht van SBD2. In het vooraanzicht is goed te zien hoe de β-strands van SBD2 worden omgeven door de α-helices.

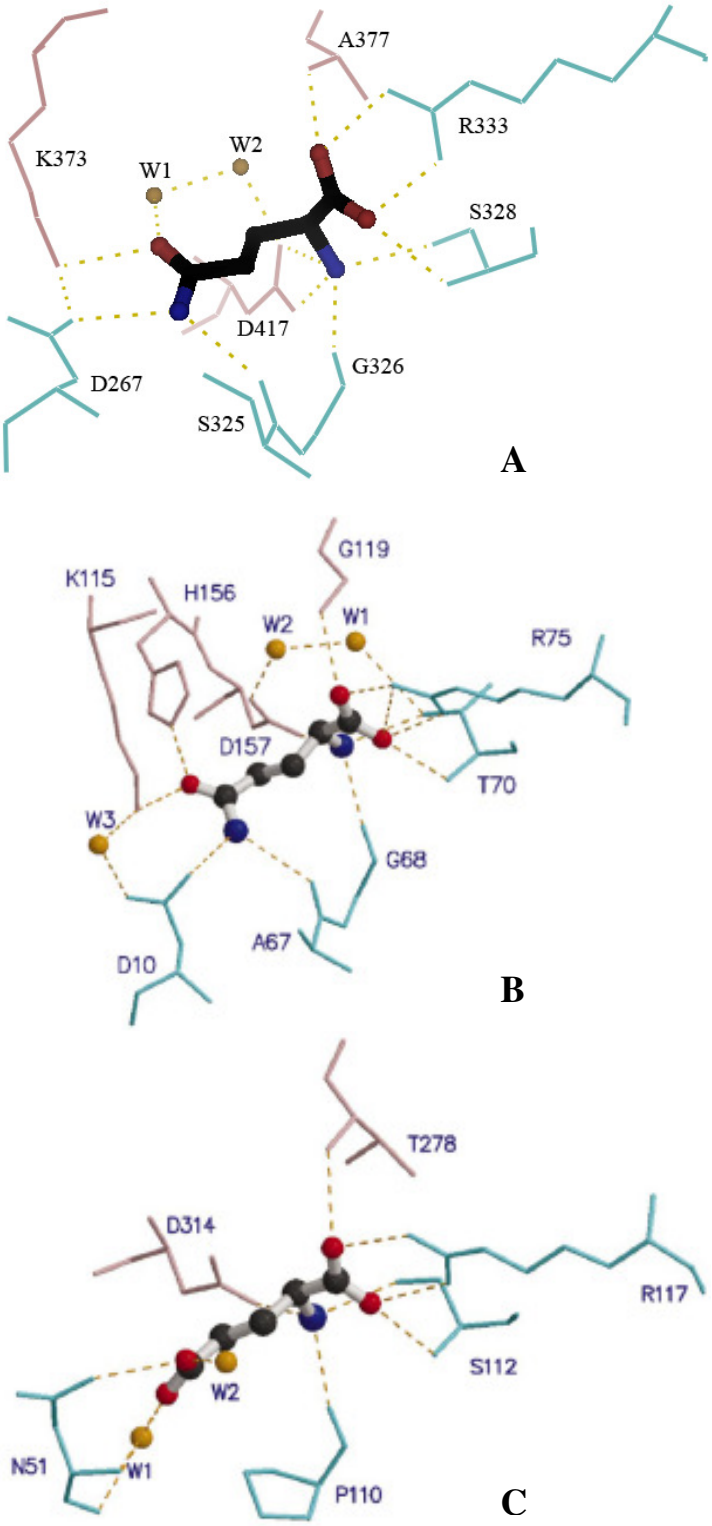
In de bindingssite van SBD2 heeft het substraat interactie met 8 aminozuren, waarvan er 5 tot het 'bovenste' subdomein horen (D267, S325, G326, S328 en R333) en 3 tot het 'onderste' subdomein (K373, A377 en D417) (*Figuur 4*). De gevormde interacties zijn waterstofbruggen en elektrostatische bindingen en zij worden gevormd door zowel functionele groepen in de zijketens van de aminozuren als door α-aminogroepen en α-carboxylgroepen



Figuur 4: De bindingssite van SBD2, met daarin het substraat glutamine (geel) en de aminozuren die interacties hebben met het substraat. De stikstofatomen zijn in blauw weergegeven, de zuurstofatomen in rood en de stippellijn tonen de waterstofbruggen en elektrostatische interacties.

uit de hoofdketen. Ook worden er waterstofbruggen gevormd met de watermoleculen die in de bindingssite zijn gevangen. Daarnaast wordt er een aromatische en hydrofobe pocket gevormd, onder andere door de twee, in periplasma bindingseiwitten sterk geconserveerde fenylalanines F720 en F308, die het substraat als het ware in de pocket klemmen. In deze pocket wordt de ligand-gebonden conformatie gestabiliseerd door sterke van der Waals interacties tussen de methyleengroepen van het substraat enerzijds en de aromatische ringen en hydrofobe zijketens anderzijds en dit stimuleert de substraatbinding. [6, 7]

De manier waarop het substraat in de bindingssite van SBD2 gebonden wordt, vertoont veel overeenkomst met GlnH in *E. coli* [7] en de glutamaatreceptor GluR0 in *Synechocystis* [6] (*Figuur 5*). In *Figuur 6* is een alignment weergegeven tussen GlnH van *E. coli* en SBD1 en SBD2 van GlnP van *L. lactis*. De homologie tussen deze eiwitten is 40-50% en komt vooral duidelijk tot uiting in de aminozuren die de bindingssite vormen. In SBD2 gaat de α-aminogroep waterstofbruggen aan met de hydroxylgroep in de zijketen van S328 en met de α-carboxyl zuurstof van G326 uit de hoofdketen. Ook is er nog een elektrostatische binding met de negatief geladen carboxylgroep in de zijketen van D417. In GlnH heeft de α-aminogroep op gelijke wijze interactie met de hydroxylgroep uit de zijketen van T70, de α-carbonyl zuurstof van G68 in de hoofdketen en met de negatief geladen zijketen van D157. [2, 7] De α-carboxylgroep van het substraat vormt in SBD2 waterstofbruggen met de α-aminogroepen van A377 en S328 uit de hoofdketen. Verder kan het om zijn negatieve lading ook nog elektrostatische bindingen vormen met de positief geladen zijketen van R333. In GlnH vormen de α-aminogroepen van T70 en G119 waterstofbruggen met het substraat en neutraliseert de positief geladen zijketen van R75 de positief geladen α-carboxylgroep. [2, 7] De amide zuurstof van glutamine wordt in SBD2 gebonden door de vorming van een waterstofbrug met de positief geladen zijketen van K373 en met een watermolecuul, dat in de bindingssite gevangen zit. De aminegroep van de γ-amidegroep vormt waterstofbruggen met negatief geladen zijketen van D267 en de α-carboxyl zuurstof van S325 uit de hoofdketen.



Figuur 5: Vergelijking tussen de bindingssite van (A) SBD2 van GlnPQ met glutamine, (B) GlnH met glutamine en (C) GluR0 met glutamaat. Residuen uit het 'bovenste' domein zijn in blauw weergegeven en die uit het 'onderste' domein in lichtpaars. De C, N en O atomen van het substraat zijn respectievelijk zwart, blauw en rood gekleurd. Watermoleculen zijn getoond als oranje balletjes en de oranje stippellijnen representeren de waterstofbruggen en elektrostatische bindingen. [2]

```
GlnH  ---MKSVLKVSLAALTLAFAVSSHAadkklvVATDTAFVPFEFKQGDK-YVGFDVDLWAA   56
SBD1  MKKLFFALAMMLATVTAFLVAPSVKAettvkIASDSSYAPFEFQNGQKKWVGIDVDIMQE   60
SBD2  ---------------------katpkkdvytIASDNSFAPFEFQNDDKQFTGIDVDLLNA  292

GlnH  IAKELKLDYELKPMDFSGIIPALQTKNVDLALAGITITDERKKAIDFSDGYYKSGLLVMV  116
SBD1  VAKINDWKLEMSYPGFDAALQNLKAGQVDGIIAGMTITDERKETFDFSNPYYTSALTIAT  120
SBD2  IAKNQGFKLKWNFIGFQAAVDSVQSGHADGMMSGMSITDARKQVFDYGSPYYSSNLTIAT  352

GlnH  KANNNDVKSVKDLDGKVVAVKSGTGSVDYAKANIKTKD--LRQFPNIDNAYMELGTNRAD  174
SBD1  -TKDSKLSDYSDLKGKAVGAKNGTAAQTWLQENQKKYGYTIKTYSDGVHMFAALSSGNIA  179
SBD2  SSTDDSIKSWKDLKGKTLGAKNGTASFDYLNAHAKEYGYTVKTFTDATTMYSSLNNGSIN  412

GlnH  AVLHDTPNILYFIKTAGNGQFKAVGDSLEAQQYGIAFPKGSDE-LRDKVNGALKTLRENGT 233
SBD1  GAMDEVPVISYAMKQGQDLAMNFPSISLPGG-YGFAVMKGKNSTLVDGFNKALAEMKSNGD 238
SBD2  ALMDDEPVIKYAIKQGQKFATPIKPIP-DGQ-YGFAVKKGSNPELIEMFNNGLANLRANGE 470

GlnH  TYNEIYKKWFGTEPK                                              248
SBD1  DYDKILKKYGITATK                                              253
SBD2  EYDKIIDKYLESDAKTIQSSAKENTFFGILQNNWEQIGRGLLVTLE-TMSI          520
```

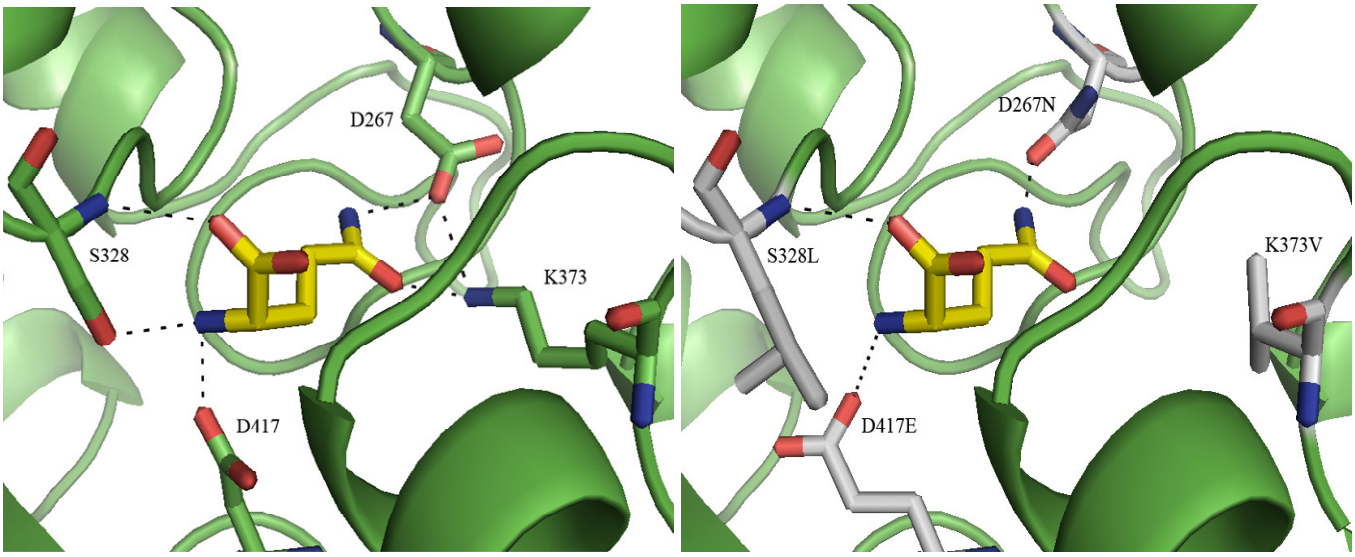
Figuur 6: Een alignment tussen GlnH, SBD1 en SBD2. Identieke residuen zijn vet aangegeven. De residuen uit de bindingssite van GlnH en SBD2 zijn met paars gemarkeerd en de twee fenylalanines die het substraat in de bindingssite geklemd houden, met groen. Ook is met paars aangegeven dat D417 in SBD2 een glutamaat in de vergelijkbare bindingssite van SBD1 is.

Wanneer deze aminegroep in glutaminezuur een hydroxylgroep is, zullen de waterstofbruggen op dezelfde manier gevormd worden. De binding van de aminegroep gaat in GlnH op dezelfde manier met de negatief geladen zijketen van D10 en de α-carboxyl zuurstof van A67. De amide zuurstof vormt waterstofbruggen met de aminegroepen in de zijketens van K115 en H156. Deze 2 residuen blijken in vergelijking met andere aminozuur bindende eiwitten uniek te zijn in GlnH en vormen daarom de specificiteit voor het substraat. [7]

Zowel in SBD2 als in GlnH zijn er een negatief geladen aspartaat (D267 in SBD2 en D10 in GlnH) en een positief geladen lysine (K373 in SBD2 en K115 in GlnH), die beide waterstofbruggen vormen met het substraat. Deze twee residuen vormen ook onderling een vrij belangrijke elektrostatische binding. In GlnH is de afstand tussen de 2 residuen in de "ongeligandeerde, open" conformatie 10Å en in de "geligandeerde, gesloten" conformatie 3Å. De elektrostatische binding die gevormd wordt als de substraatbinding plaats vindt, lijkt als een soort cipier op te treden die ervoor zorgt dat het substraat stevig in de bindingssite gebonden blijf en speelt dus een belangrijke rol in het binnenkomen en vertrekken van het substraat. [7] Ook zorgt het ervoor dat het substraat in de meest gunstige conformatie voor substraatbinding in de bindingssite aanwezig is. [6]

In GluR0 vindt de binding van de hoofdketen van het substraat glutamaat op gelijke wijze plaats als in SBD2 en GlnH. De α-aminogroep heeft interactie met S112, P110 en D314 en de α-carboxylgroep met S112, T278 en R117. Het grote verschil zit in de waterstofbruggen die de zuurgroep in de zijketen van glutamaat met de aminegroepen van N51 aan gaat. Wanneer glutamine in GluR0 zou willen binden, moet er een rotatie van de zijketen van N51 plaatsvinden, zodat er een waterstofbrug kan worden gevormd tussen de γ-amidegroep van glutamine en de amide zuurstof van de zijketen van N51. [6]

Om meer inzicht te krijgen in de bijdrage van verschillende aminozuren in de binding van glutamine in GlnPQ, werden er in dit onderzoek 4 residuen uit SBD2 vervangen: D267N, S328L, K373V en D417E (*Figuur 7*). Uit in vivo transportmetingen is gebleken dat het SBD2 eiwit met mutatie K373V geen substraat meer over het membraan kan transporteren. De vraag is nu of het nog wel in staat is om substraat te binden en dat werd in dit onderzoek bepaald. De D417E mutatie zorgt ervoor dat de bindingssite van SBD2 op die van SBD1 gaat lijken (*Figuur 6*). Omdat de affiniteit van SBD1 lager is dan van SBD2, was de verwachting dat deze mutatie een hogere K_d dan het wild type SBD2 eiwit zou



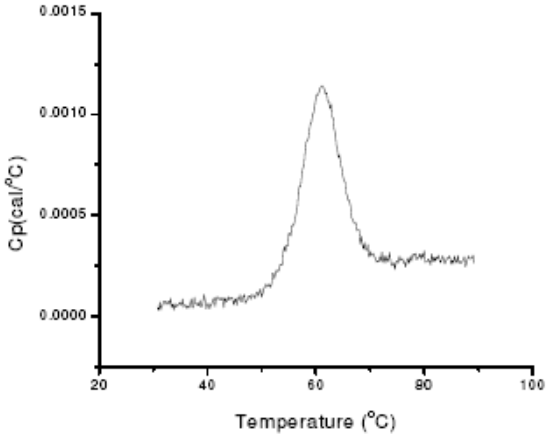
Figuur 7: De bindingsite van SBD2 met de 4 aminozuren die vervangen worden (links) en de bindingssite met daarin alle 4 mutaties. Het substraat is glutamine (geel) en de stikstof- en zuurstofatomen zijn in blauw en rood weergegeven.

hebben. Om de affiniteit van SBD2 voor glutamaat te verhogen, werd de D267N mutatie gemaakt, waarbij de negatief geladen zuurgroep is vervangen door een aminegroep. De S328L mutatie werd gemaakt om te bepalen hoe belangrijk de hydrofobe zijketen van S328 op de substraatbinding is. De invloed van deze vier drastische veranderingen in de bindingssite is onderzocht met Differential Scanning Calorimetry en Isothermal Titration Calorimetry.

1.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Één van de methodes om de substraatbinding te bestuderen, is Differential Scanning Calorimetry. Met deze techniek kun je de invloed van de substraatbinding op het eiwit bestuderen, door de warmte geïnduceerde ontvouwing van het eiwit te volgen. Hierbij wordt het verschil tussen het ongeligandeerde eiwit en het geligandeerde eiwit gemeten en zo kun je zien of de binding van het substraat het eiwit stabiliseert of destabiliseert. [8]

Het DSC apparaat bestaat uit een referentiecel en een meetcel. De referentiecel is gevuld met buffer en de meetcel met een oplossing van het te bestuderen eiwit, dat al dan niet verzadigd is met een overmaat aan substraat. Beide cellen worden tijdens de meting verwarmd en tijdens die verwarming ondergaat het eiwit een overgang vanuit de opgevouwen en actieve conformatie naar een ontvouwen conformatie. De smelttemperatuur T_m waarbij deze ontvouwing in 50% van de eiwitten is opgetreden, wordt met de DSC meting bepaald. Tijdens het verwarmen van de referentiecel en meetcel, wordt namelijk gemeten hoeveel warmte er in vergelijking met de referentiecel nodig is om de oplossing in de meetcel 1°C in temperatuur te doen laten toenemen. Dit wordt weergegeven door de warmtecapaciteit (C_p) van de oplossing, welke in eenheden van cal/°C gegeven wordt (*Figuur 8*). Gedurende de verwarming is te zien dat de



Figuur 8: Een voorbeeldcurve van een DSC meting. De ontvouwing van het eiwit zorgt voor een toename van de warmtecapaciteit en het maximum van deze piek ligt bij de smelttemperatuur T_m. [9]

warmtecapaciteit op een gegeven moment gaat toenemen. De reden dat er nu meer warmte nodig is om de oplossing 1°C in temperatuur te doen laten toenemen, is dat het eiwit zich nu gaat ontvouwen. Hier is energie voor nodig om de temperatuursafhankelijke interacties die voor de opgevouwen structuur zorgen, te

kunnen verbreken. Op het moment dat de piek van de warmtecapaciteit zijn maximum heeft bereikt, is 50% van alle eiwitten ontvouwen. De temperatuur waarbij dit punt is bereikt, is als de smelttemperatuur T_m gedefinieerd. [8]

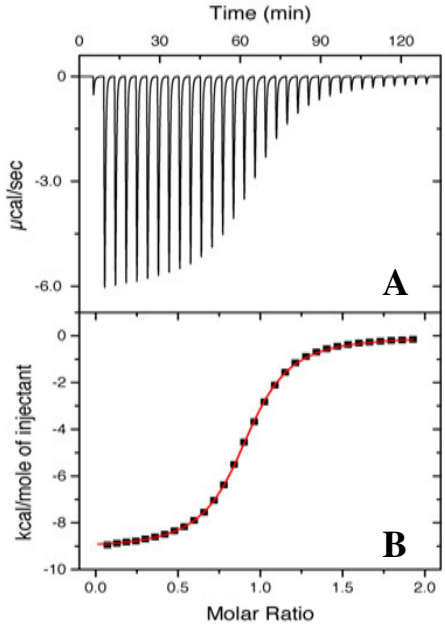
De T_m geeft een indicatie van de thermostabiliteit van het eiwit en verschillen in de T_m zijn indicatief voor de affiniteit voor het substraat. Wanneer T_m toeneemt als het eiwit verzadigd is met substraat, betekent dit dat er stabilisatie van het eiwit door binding van het substraat heeft plaatsgevonden. Hoe beter de substraatbinding is, des te groter zal de bindingsenthalpie zijn. Deze bindingsenthalpie draagt bij aan de thermostabiliteit en dus zal de thermostabiliteit en daarmee ook T_m verhoogd worden als de affiniteit voor het substraat toeneemt. [10] Door met verschillende concentraties te meten, kan de exacte waarde van de affiniteit bepaald worden. Hiervoor dient de ontvouwing echter wel reversibel te zijn. [8]

1.4 Isothermal Titration Calorimerty (ITC)

Een tweede methode om substraatbinding te meten, is met Isothermal Titration Calorimetry. Met deze techniek kunnen direct de bindingsconstante (K_a) en de twee thermodynamische grootheden die deze bindingsconstante definiëren, de bindingsenthalpie (ΔH) en de bindingsentropie (ΔS), bepaald worden. De bindingsenthalpie geeft de sterkte van de interacties tussen het eiwit en het substraat weer, in vergelijking met de interacties die het substraat met het oplosmiddel heeft. De bindingsentropie bestaat uit de solvatatie-entropie en de conformatie-entropie. Wanneer het substraat in het eiwit gebonden wordt, zal het substraat de schil van oplosmiddelmoleculen die het om zich heen heeft gebonden, moeten opgeven. Dit zorgt voor een grotere wanorde en dus voor een positieve solvatatie-entropie. Bij het binden van het substraat in het eiwit, zullen het substraat en bepaalde residuen in het eiwit een zekere conformatie vrijheid verliezen en dit verlies resulteert in een negatieve conformatie-entropie. [11]

De ITC meting is gebaseerd op het constant houden van de temperatuur van de referentiecel en de meetcel. In de meetcel bevindt zich het eiwit en het substraat wordt hier stapsgewijs op bepaalde tijdsintervallen bij in geïnjecteerd. De substraatbinding die na elke injectie optreedt, zorgt voor het vrijkomen van een bepaalde hoeveelheid bindingsenergie, welke proportioneel is aan de hoeveelheid substraat die aan het eiwit bindt en aan de bindingsenthalpie. Deze bindingsenergie wordt gemeten en omgezet naar een signaal in eenheden van vermogen (µcal/sec), dat nodig is om de temperatuur in de meetcel constant te houden (*Figuur 9*). Dit signaal wordt het differential power (DP) signaal genoemd en wanneer dit signaal negatief is, is de substraatbinding exotherm. Een positief signaal geeft aan dat de substraatbinding endotherm is en dat er warmte aan het reactiecel moet worden toegevoegd, om de temperatuur constant te houden. [11, 12]

Wanneer het DP signaal over de tijd wordt geïntegreerd, wordt de thermale energie of enthalpie van de substraatbinding verkregen. Omdat de hoeveelheid eiwit zonder gebonden substraat zal na elke injectie afneemt en steeds meer eiwitten in de reactiecel verzadigd raken met substraat, zal het DP signaal in de tijd afnemen tot alle eiwitten verzadigd zijn en alleen de achtergrondwarmte nog wordt geobserveerd. Deze achtergrondwarmte wordt veroorzaakt door menging en hiervoor moet tijdens de metingen gecorrigeerd worden. [11, 12]



Figuur 9: Een voorbeeld van het resultaat van een ITC meting: (A) de gemeten DP signalen en (B) de bindingsenthalpie die door het integreren van de DP signalen over de tijd verkregen wordt. [13]

Het resultaat van de ITC meting is een sigmodiale curve, waarin de eerste punten de bindingsenthalpie weergeven, de curve de bindingsconstante geeft en het omslagpunt de

ratio van binding c.q. het aantal bindingssites (n) weergeeft. [14]

Met de software Origin worden vervolgens deze drie grootheden (de bindingsenthalpie, de bindingsconstante en de bindingsstochiometrie) bepaald. De berekening $1/K_a$ levert de dissociatieconstante (K_d) op en met de bindingsconstante en de bindingsenthalpie kunnen volgens de formule $\Delta G = -RT\ln(K_a) = \Delta H - T\Delta S$ ook de bindingsentropie en de Gibbs vrije energie van de binding berekend worden. [11, 12, 14] Door de ITC meting bij verschillende temperaturen uit te voeren, kan met de formule $\Delta C_p = \partial\Delta H/\partial T$ eventueel ook de warmtecapaciteit (ΔC_p) van de substraatbinding berekend worden. [12, 14]

2. Materialen & methode

2.1 Het creëren van gemuteerde plasmiden en de transformatie naar MC1061 E. coli

Het plasmide waarmee in dit onderzoek gewerkt is, is het pBad SBD2 plasmide (4841 bp) uit de *E. coli* stam MC1061. Voor gebruik werd dit plasmide gezuiverd uit een kweek van de MC1061 *E. coli* stam. Dit werd gedaan volgens het centrifuge protocol van het Wizard ® Plus SV Minipreps DNA purification system [15]. Vervolgens werd door middel van digestie met het restrictie-enzym DraI en analyse van de DNA fragmenten op 1% agarose TBE gel gecontroleerd of het juiste plasmide gezuiverd was. In het pBad SBD2 plasmide zijn daarna met site directed mutagenese op 2 verschillende manieren mutaties in het gen voor het SBD2 domein aangebracht. Hierbij werden er ook extra restrictiesites ingebracht, om te kunnen controleren of de mutatie inderdaad was ingebouwd.

De eerste manier was een PCR met Phusion polymerase. Deze methode werd toegepast om de K373V mutant te creëren. De mutatie specifieke primers die hiervoor gebruikt werden, zijn weergegeven in Tabel 1. Naast het codon voor de mutatie bevatte deze primers ook de restrictiesite van het restrictie-enzym XmaJI (CCTAGG). Na het checken voor PCR product op 1% agarose TBE gel werd het PCR product gezuiverd volgens het NucleoSpin® Extract II Macherey-Nagel PCR clean-up protocol [16]. Na digestie met XmaJI en een tweede zuivering volgens het PCR clean-up protocol, werd er overnacht een ligatie met T4 ligase uitgevoerd. Tijdens de ligatie ging de temperatuur van 20°C naar 4°C door de incubatie in een bekerglas met 2L water van 20°C weg te zetten bij 4°C. Na deze ligatie werd het gemuteerde plasmide naar $CaCl_2$ competente MC1061 *E.Coli* getransformeerd.

De tweede manier was een Quickchange PCR met Pfu polymerase. Allereerst werd er gecontroleerd op PCR product op 1% agarose TBE gel en nadat er op het PCR product een digestie met DpnI was uitgevoerd [I], was het plasmide al klaar om getransformeerd te worden naar $CaCl_2$ competente MC1061 E. coli. Deze methode werd in eerste instantie gebruikt om de D267N mutant te creëren, maar omdat dit geen PCR product opleverde, werd deze mutant geproduceerd door de PRC met Phusion polymerase uit te voeren. De gebruikte, mutatie specifieke primers zijn weergegeven in Tabel 1 en zij bevatten geen restrictiesites. Na de PCR moest er een zuivering volgens het PCR clean-up protocol worden uitgevoerd, omdat DpnI niet knipt in Phusion buffer. Daarna volgde een digestie met DpnI en vervolgens werd het gemuteerde plasmide getransformeerd naar $CaCl_2$ competente MC1061 *E. coli*.

Om de D417E en de S328L mutant te creëren, werd er ook een Quickchange PCR met Pfu polymerase uitgevoerd. De specifiek primers die hierbij gebruikt zijn, zijn weergegeven in Tabel 1. Naast het codon voor de mutatie, bevatten de primers voor de D417E mutant ook de restrictiesite van het restrictie-enzym NsiI (ATGCAT). De primers voor de S328L mutant bevatten geen restrictiesite. Na de PCR hoefde er niet eerst een zuivering plaats te vinden, omdat DnpI wel kan knippen in Pfu buffer. Dus volgde de digestie met DnpI meteen en daarna konden de gemuteerde plasmiden naar $CaCl_2$ competente MC1061 *E. coli* getransformeerd worden.

De $CaCl_2$ competente MC1061 *E. coli* werden verkregen vanuit de MC1061 *E. coli* stam en gegroeid in LB medium [5% yeast

[I] DpnI is een restrictie-enzym dat alleen dubbelstrengs, gemethyleerde 5'- GmATC - 3' sequenties knipt. [17] Door een digestie met DpnI uit te voeren, worden de ouderlijke pBad SBD2 plasmiden geknipt en wordt er op deze manier geselecteerd voor de mutatie bevattende, gesynthetiseerde plasmiden. De ouderlijke plasmiden die uit de MC1061 E. coli stam gezuiverd zijn, zullen namelijk gemethyleerd zijn en de gesynthetiseerde plasmiden niet.[18]

Tabel 1: Mutatie specifieke primers (met de mutatie in het rood en de restrictiesite in het blauw).

Mutatie	De oude sequenties in het pBad plasmide en de mutatie specifieke primers
K373V	OUD: 5'- ACCTTAAAGGTAAAACTCTTGGTGCTAAAAACGGAACTGCTTCttttgat K373Vfw: 5'- GGTAcAACCCTAGGTGCTGTTAACGGAACTGCTTCttttg K373Vrev: 5'- TTcACAGCACCTAGGGTTTTACCTTTAAGGT
D267N	OUD: 5'-GTTTACACCATTGCTTCAGATAATAGCTTCGCTCCATTTG D267Nfw: 5'- CACCATTGCTTCAAATAATAGCTTCGC D267Nrev: 5'- GCGAAGCTATTATTTGAAGCAATGGTG
D417E	OUD: 5'- GAATAACGGTTCTATCAATGCTCTAATGGATGACGAACCCGTCATTAAATAC D417Efw: 5'-GTTCTATCAATGCATTGATGGATGAAGAACCCGTCATTAAATAC D417Erev: 5'- GTATTTAATGACGGGTTCTTCATCCATCAATGCATTGATAGAAC
S328L	OUD: 5'- gctgacgGAATGATGTCAGGAATGTCAATCACTGATGCTCGtaacaag S328Lfw: 5'- GGAATGATGTCAGGAATGCTTATCACTGATGCTCGTAAACAAG S328Lrev: 5'- CTTGTTTACGAGCATCAGTGATAAGCATTCCTGACATCATTCC

Tabel 2: Mutant specifieke restrictie-enzymen

Mutatie	***Specifiek restrictie-enzym***	***DNA fragmenten na digestie***
K373V	XmaJI, DraI	470-744-692-1372-1544-19 bp
D267N	DraI	744-692-1372-2014-19 bp
D417E	NsiI	2995-1314-532 bp
S328L	DraI	744-692-1372-2014-19 bp

extract, 10% Bacto trypton, 10% NaCl]. De cellen werden bij een OD_{600}=0.54 geoogst door centrifugatie voor 30 sec bij 11.000xg. Vervolgens werd de cellen geresuspendeerd in 1ml 0.1M $CaCl_2$ en voor 30 min geïncubeerd op ijs. Hierna werd er nogmaals gecentrifugeerd voor 30 sec bij 11.000xg en werden de cellen daarna geresuspendeerd in 200µl 0.1M $CaCl_2$ met 20% glycerol. Na snel invriezen in vloeibaar N_2 werden de $CaCl_2$ competente MC1061 *E. coli* bewaard bij -80°C.

Voor de transformatie werden de $CaCl_2$ competente MC1061 *E. coli* eerst ontdooid op ijs en na toevoeging van de gemuteerde plasmiden, werd er 30 min geïncubeerd op ijs. Hierna volgde er een heatshock voor 5 min bij 37°C en na toevoegen van 400µl LB medium werd er voor 30-60 min geïncubeerd bij 37°C. Na de transformatie werden de cellen uitgeplaat op ampicilline bevattende agarplaten en gegroeid, overnacht bij 37°C of op tafel voor een weekend.

Na groei werden er 4 individuele kolonies gebruikt om 2ml LB medium met 0.1mg/ml ampicilline mee aan te enten en na groei bij 37°C werd het DNA uit deze kweken gezuiverd volgens het centrifuge protocol van het Wizard ® Plus SV Minipreps DNA purification system. Om te controleren of de juiste, gemuteerde plasmiden verkregen waren, werden de gezuiverde plasmiden geknipt met specifieke restrictie-enzymen (*Tabel 2*) en daaropvolgend werd een analyse van de digestie fragmenten op 1% agarose TBE gel uitgevoerd. Wanneer deze uitslag positief was, werden de gezuiverde plasmiden opnieuw getransformeerd naar $CaCl_2$ competente MC1061 *E.coli*. Na groei op ampicilline bevattende agarplaten werd er 1 kolonie aangeprikt om 4ml LB medium met 0.1 mg/ml ampicilline mee aan te enten. Na groei van dit medium werd hier 1 ml van genomen om een glycerol stock oplossing van te maken, welke na snel ingevroren te zijn in vloeibaar N_2, bij -80°C bewaard werd. Het resterende volume werd gezuiverd volgens het centrifuge protocol van het Wizard ® Plus SV Minipreps DNA purification system. Daarna werd er door middel van digestie met specifieke restrictie-enzymen en analyse op gel nogmaals gecontroleerd of het juiste plasmide aanwezig was. Wanneer dit nog steeds het geval was, werd de plasmide ook nog eens gecontroleerd door middel van sequencing.

2.2 De expressie van het SBD2 eiwit en de mutanten

Om te controleren of de gemuteerde plasmiden ook het gewenst SBD2 eiwit tot expressie konden brengen, werd er een expressieproef uitgevoerd. Hiervoor werden er eerst culturen van 4ml LB medium met 0.1mg/ml ampicilline bij 37°C gegroeid. Bij

een OD_{600} = 0.4 – 0.6 werden deze culturen geïnduceerd met $2*10^{-3}$ % arabinose. Twee uur na inductie werden de cellen geoogst en analyse met SDS-PAGE gel elektroforese liet zien of het gewenste SBD2 eiwit in overexpressie geproduceerd was. Als controle was er een monster van voor de inductie meegenomen.

Voor het tot expressie brengen van het SBD2 eiwit en de mutanten, werd er 15ml van een overnacht cultuur doorgeënt naar 1L LB medium met 0.1mg/ml ampicilline. Deze cultuur werd gegroeid bij 37°C tot een OD_{600} = 0.5 – 0.6. Daarna werd de cultuur geïnduceerd met $2*10^{-3}$ % arabinose[II]. Twee uur na inductie werden de cellen geoogst door de cultuur af te draaien in een JLA8.1000 rotor (15 min, 6000xg). De cellen werden gewassen met 50mM KPi, pH=7.5. Na een tweede maal centrifugeren in een JLA8.1000 rotor (15 min, 6000xg) werd de pellet gewogen en geresuspendeerd in 10 ml 50mM KPi, pH=7.5 per gram natgewicht cellen. Deze suspensie werd vernacht op ijs bewaard bij 4°C. De volgende dag werd er een spatelpunt Dnase, een spatelpunt Rnase, 1mM PMSF en 2mM $MgCl_2$ aan de suspensie toegevoegd. Vervolgens werden de cellen gelyseerd met behulp van een manuele french press bij een drukverschil van 10.000Psi. Na toevoeging van 4mM EDTA werd het ruwe celextract afgedraaid in een JA25.50 rotor (10 min, 15.000 rpm). Het supernatant werd overgebracht naar ultrabuizen en nog eens afgedraaid in een 50.2Ti rotor (1 uur, 40.000 rpm). Daarna werd het supernatant, na snel ingevroren te zijn in vloeibaar N_2, tot zuivering bewaard bij -80°C in fracties van 2 en 5ml.

Om te controleren waar het eiwit zich tijdens de stappen voor het verkrijgen van het lysaat bevond, werden er van het ruwe celextract, van de pellet en van de supernatant, van zowel de low speed als van de high speed centrifuge stap, monsters genomen. Deze monsters zijn met behulp van SDS-PAGE gel elektroforese geanalyseerd.

[II] Het pBad plasmide bevat onder andere het AraC gen en een pBad promotor. Wanneer arabinose wordt toegevoegd en aan AraC bindt, zal AraC via interactie met RNA polymerase de transcriptie van de pBad promotor activeren. Op deze manier staat de pBad promotor onder arabinose geïnduceerde controle . Achter de pBad promotor ligt het gen voor GlnPSBD2 en dat zal dan tot overexpressie worden gebracht.[19]

2.3 De zuivering van het wild type SBD2 eiwit en de mutanten

De eerste zuiveringsstap werd uitgevoerd door middel van een Ni^{+2}-sepharose kolom [3 ml 50% Ni^{+2}-sepharose suspensie]. Deze kolom werd eerst gewassen met 10 kolomvolumes (KV) MQ en daarna met 10 KV bindingsbuffer [50mM KPi, pH=8.0, 200mM KCl, 20mM imidazol]. Om het eiwit aan de kolom te binden, werd er een oplossing van 4ml lysaat en 8ml bindingsbuffer aan het kolommateriaal toegevoegd en dit werd voor een uur al roterend geïncubeerd bij 4°C. Vervolgens werd de kolom gegoten en gewassen met 20 KV wasbuffer [50mM KPi, pH=8.0, 200mM KCl, 50mM imidazol]. Daarna werd het eiwit van de kolom geëlueerd met elutiebuffer [50 mM Kpi, pH = 8.0, 200 mM KCl, 500 mM imidazol]. Het eluens werd opgevangen in fracties van eerst 1x 2/3 KV en vervolgens van 0.5 KV. Van deze fracties werd met behulp van een Nanodrop de eiwitconcentratie bepaald. Ook werden er monsters van het lysaat, de flowthrough, de wasstap en de fracties geanalyseerd met behulp SDS-PAGE gel elektroforese, zodat er bepaald kon worden welke fracties het gewenste eiwit bevatten. Deze fracties werden samengevoegd en nadat de eiwitconcentratie nogmaals was bepaald met behulp van een Nanodrop, werd er 5mM EDTA en TEV protease in een 1:40 w/w ratio toegevoegd. Dit mengsel werd vervolgens overnacht gedialyseerd tegen 1L dialyse buffer [50mM Tris, pH=8.0, 0.5mM EDTA, 0.5mM DTT], de buffer waarin het TEV protease optimaal knipt.

De volgende dag werden het geHis-tagde TEV protease en de ongeknipte SBD2 eiwitten verwijderd door een tweede Ni^{+2}-sepharose kolom [1ml 50% Ni^{+2}-sepharose suspensie] te laten lopen. Deze kolom werd eerst gewassen met 10 KV MQ en 6 KV Ni-buffer [50mM KPi, pH=8.0, 200mM KCl]. De eiwitoplossing in Ni-buffer werd op de kolom geladen en de flowthrough met daarin geknipte SBD2 eiwitten, werd opgevangen. Na bepaling van de eiwitconcentratie werd de eiwitoplossing op een Amicon YM-10 filter (cut-off van 10kDa) of een Amicon® Ultra 4filter (cut-off van 4kDa) geladen en met behulp van een Harrier 18/80 centrifuge (4000xg) geconcentreerd tot een volume van 400 à 500µl. Om te voorkomen dat er aggregaten op de Superdex 200 size exclusion kolom werden geladen, werd het monster voor

het laden op de kolom eerst gecentrifugeerd (Eppendorf Centrifuge, 10 min, 14.000 rpm, 4°C). Nadat de eiwitconcentratie nogmaals bepaald was, werd de eiwitoplossing op de kolom geladen. Het gezuiverde SBD2 eiwit werd in fracties van 0.5ml van de kolom geëlueerd met SEC buffer (size exclusion chromatography buffer) [20mM HEPES, pH=7.5, 150mM NaCl]. De fracties die het eiwit bevatten, werd samengevoegd en in aliquots van 250µl bij -80°C bewaard, nadat zij snel ingevroren waren in vloeibaar N_2. Deze aliquots werden gebruikt voor DSC en ITC metingen.

2.4 DSC metingen

Voorafgaande aan de DSC metingen ondergingen de monsters overnacht een dialyse tegen 1L DSC buffer [50mM KPi, pH=6.0, 1mM EDTA, 1mM NaN_3]. Daarna werd de eiwitconcentratie van de monsters nogmaals bepaald door een UV spectrum op te nemen en hieruit de absorptie bij 280 nm om te rekenen naar de eiwitconcentratie.

De DSC metingen werden uitgevoerd in een VP-DSC MicroCalorimeter van MicroCal^{TM}. Tijdens de meting werden de monsters verwarmd van 30 tot 80°C met een snelheid van 60°C/h en als referentie is er DSC buffer pH=6.0 gebruikt. Per monster werden er 3 curves gemaakt: van 6.0µM eiwit in DSC buffer pH=6.0, van 6.0µM eiwit, 5mM Gln in DSC buffer pH=6.0 en van 6.0µM eiwit, 5mM Glu in DSC buffer pH=6.0. Deze curves zijn gecorrigeerd door een referentiescan met DSC buffer pH=6.0 of 5mM Glu in DSC buffer pH=6.0 er van af te trekken.

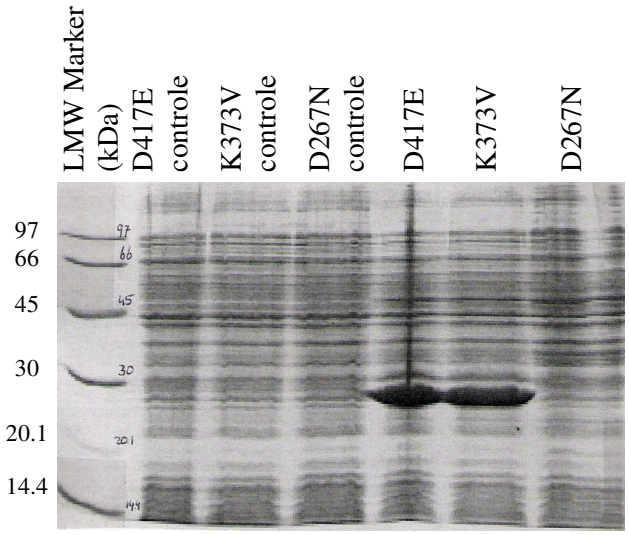
2.5 ITC metingen

Voorafgaande aan de ITC metingen ondergingen de monsters overnacht een dialyse tegen 1L ITC buffer [50mM KPi, pH=6.0, 1mM EDTA, 1mM NaN_3]. Hierna werd de eiwitconcentratie nogmaals bepaald door een UV spectrum op te nemen en hieruit de absorptie bij 280 nm om te rekenen naar de eiwitconcentratie. Vervolgens werden de metingen uitgevoerd met iTC_{200} MicroCalorimeter van MicroCal, GE Healthcare. Per meting vonden er 20 injecties plaats, waarvan de eerste een volume van 0.5µl had en de overige 19 injecties een volume van 2µl. De metingen werden uitgevoerd bij een celtemperatuur van 25°C. De substraten werden voor gebruik verdund in ITC buffer pH=6.0, totdat de concentratie minimaal gelijk was aan 10x de concentratie van het eiwit. Wanneer de K_d vrij hoog uitviel, werd de substraatconcentratie hieraan aangepast. De metingen voor het WT SBD2 eiwit en voor de mutanten K373V en D417E werden alleen met glutamine als substraat uitgevoerd. De meting voor de D267N mutant werd zowel met glutamine, als met glutamaat als substraat gedaan.

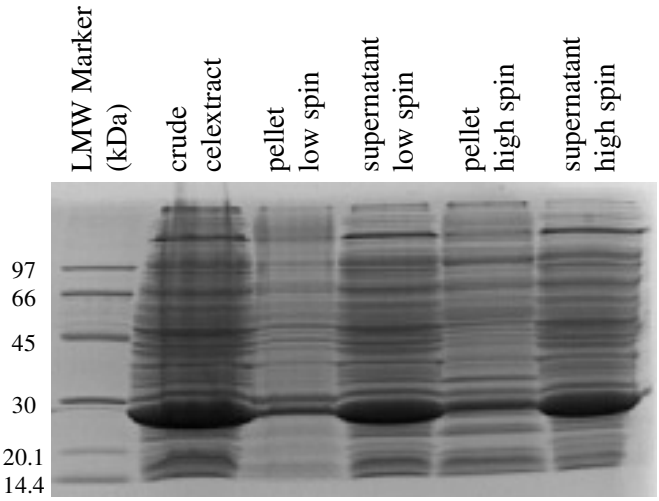
3. Resultaten & discussie

3.1 Het creëren van gemuteerde SBD2 plasmiden en de expressie van de gemuteerde SBD2 eiwitten

Nadat de gemuteerde pBad SBD2 plasmiden met succes gecreëerd waren, naar $CaCl_2$ competente MC1061 *E. coli* waren getransformeerd en nadat met digestie door specifieke restrictie-enzymen en met sequencing uitvoerig was gecontroleerd of de *E. coli* de juiste gemuteerde plasmiden bevatten, werd er een expressieproef uitgevoerd om te controleren of de gemuteerde plasmiden ook in staat waren het gemuteerde SBD2 eiwit te produceren. In *Figuur 10* is de analyse van de expressieproef voor de D417E, de K373V en de D267N mutant op SDS-PAGE gel te zien. Het SBD2 eiwit is 28kDa. Vergelijking met de controles die voor de inductie zijn genomen, laat zien dat het SBD2 eiwit met de D417E mutatie en met de K373V mutatie tot overexpressie zijn gebracht na de inductie met arabinose. De *E. coli* die het gemuteerde pBad plasmide met de D267N mutatie moesten hebben, waren niet tot expressie van het gemuteerde eiwit in staat. Blijkbaar is er in de mutagenese iets gebeurd, waardoor er geen werkzaam eiwit kon worden geproduceerd. Herhaling van de expressieproef met een andere kolonie leverde wel een overexpressie van het gemuteerde SBD2 eiwit met mutatie D267N op en met deze kolonie is verder gewerkt. Voor de kolonie met het gemuteerde pBad plasmide met de S328L mutatie is er geen expressieproef uitgevoerd. Hiervan was door sequencing al bekend dat de mutatie aanwezig was en is direct het lysaat gemaakt. Door tijdgebrek is besloten deze mutant niet verder te analyseren.

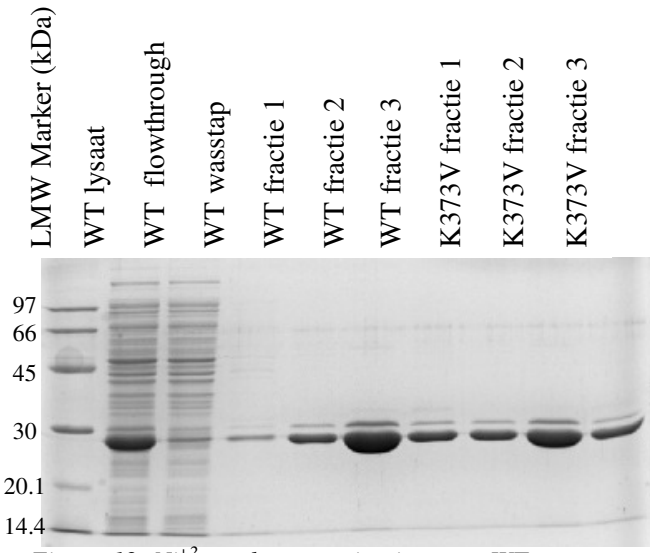


Figuur 10: Expressie voor de D417E, de K373V en de D267N mutant. In de controlelaan zit het monster van voor de inductie en in de mutantlaan dat van 2 uur na de inductie met $2*10^{-3}$% arabinose. Alle laantjes bevatten ~20µg eiwit.



Figuur 11: Bereiden van het lysaat voor S328L. In alle laantjes is dezelfde hoeveelheid van 2.0mg eiwit opgebracht. SBD2 S328L is te zien als een 28kDa eiwit.

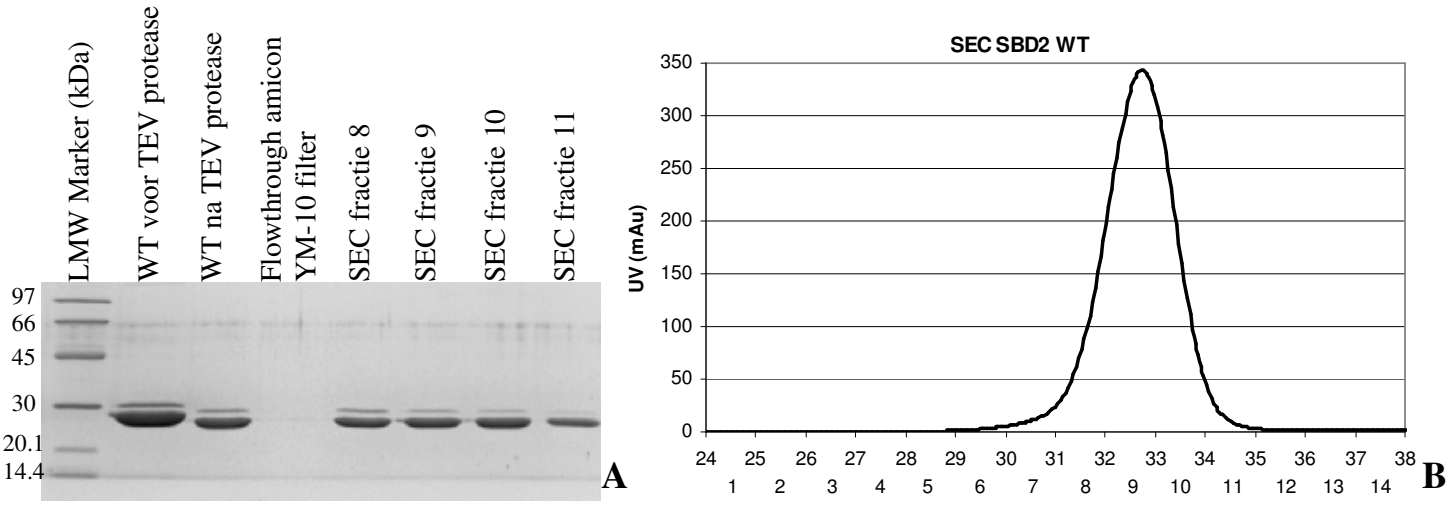
Na de expressieproef zijn het WT SBD2 eiwit en de mutanten tot expressie gebracht. Om te controleren waar het eiwit zich tijdens de stappen voor het verkrijgen van het lysaat bevond, zijn er monsters voor analyse op SDS-PAGE gel genomen van het ruwe celextract, van de pellet en van de supernatant, van zowel de low speed als van de high speed centrifuge stap. In *Figuur 11* is de analyse van de monsters van het tot expressie brengen van de S328L mutant te zien. Het SBD2 eiwit is inderdaad tot overexpressie gebracht en na de centrifugestappen was het voornamelijk aanwezig in de supernatanten,



Figuur 12: Ni^{+2}- sepharose zuivering voor WT SBD2 en de K373V mutant. Van links naar rechts zijn eerst het startmateriaal, de flowthrough en de wasstap voor de WT zuivering opgebracht. Daarnaast drie elutiefracties van WT SBD2 en drie van de K373V mutant, waarvan respectievelijk 1.8µg, 9.5µg, 2.0µg, 1.7µg, 6.8µg en 1.7µg eiwit geladen is.

zoals te verwachten is bij expressie van een oplosbaar eiwit.

De eerste zuiveringsstap van het verkregen lysaat werd gedaan met behulp van een Ni^{+2}-sepharose kolom. Om aspecifieke binding van eiwit te voorkomen is er 20mM imidazol aanwezig tijdens de binding van SBD2 aan het Ni^{+2}- sepharose. In *Figuur 12* is de analyse op SDS-PAGE gel van de zuivering van het lysaat met WT SBD2 eiwit en van het lysaat met SBD2 K373V te zien. Het monster van het lysaat met WT SBD2 eiwit laat zien dat dit eiwit in overmaat aanwezig was in het lysaat. Het monster van de flowthrough door de Ni^{2+}-sepharose kolom laat zien dat deze overmaat zo groot was, dat niet eens alle SBD2 eiwitten uit het lysaat aan de kolom konden binden. In de wasstap met 50mM imidazol kwam er ook al wat eiwit van de kolom af. Dit waren waarschijnlijk de eiwitten die niet zo goed konden binden, omdat de kolom waarschijnlijk al overladen was. Verder is nog te zien dat de 3 elutiefracties met 500mM imidazol inderdaad het SBD2 eiwit of de K373V mutant bevatten en dat deze zo goed als zuiver zijn. Het is onbekend waar het dunne bandje dat boven de band van het SBD2 eiwit ligt, vandaan komt. Op alle SDS-PAGE gelen die na de eerste zuivering gemaakt zijn, bleef dit dunne bandje, steeds in dezelfde



Figuur 13: (A) De SDS-PAGE gel en (B) het emissiespectrum dat tijdens het lopen van de SEC met het WT SBD2 eiwit van de opgevangen fracties is opgenomen. In de eerste laan van de gel bevindt zich 10µl LMW marker en in laan 2-4 20µl van de desbetreffende oplossingen. De hoeveelheid eiwit in de lanen 5-8 zijn respectievelijk 3.7µg, 7.3µg, 3.9µg en 1.3µg.

verhouding tot het SBD2 eiwit, terugkomen.

Na de Ni^{+2}-sepharose kolom werd de His-tag van de SBD2 eiwitten verwijderd met behulp van TEV protease en dialyse overnacht tegen de buffer waarin TEV goed knipt. Tijdens de dialyse zijn ook de 500mM imidazol en de afgeknipte His-tags verwijderd. De geknipte SBD2 eiwitten werden van de ongeknipten gescheiden door nog een Ni^{+2}-sepharose kolom te laten lopen. Van zowel voor als na de behandeling met TEV protease is er een monster genomen. De analyse hiervan op SDS-PAGE gel is te zien in *Figuur 13A*, samen met de analyse van de SEC die als laatste zuiveringsstap werd gedaan. De band van het SBD2 eiwit ligt duidelijk lager na de behandeling met TEV protease, wat laat zien dat de His-tags verwijderd zijn. Het monster van de flowthrough door het Amicon YM-10 filter laat zien dat er geen eiwit verloren is gegaan. Analyse op SDS-PAGE gel van elutie fracties liet zien dat het eiwit inderdaad aanwezig was in deze fracties en weer vergezeld werd met het dunne bandje dat zich boven de SBD2 band bevond.

In de 4ml lysaat die gezuiverd is, zat de inhoud van 400mg cellen. Er is bepaald hoeveel mg gezuiverd eiwit hier uiteindelijk uit gewonnen is en wat de uiteindelijke opbrengst was. De resultaten hiervan zijn weergegeven in Tabel 3. Het lysaat dat de S328L mutant bevatte, kon wegens gebrek aan tijd niet gezuiverd worden.

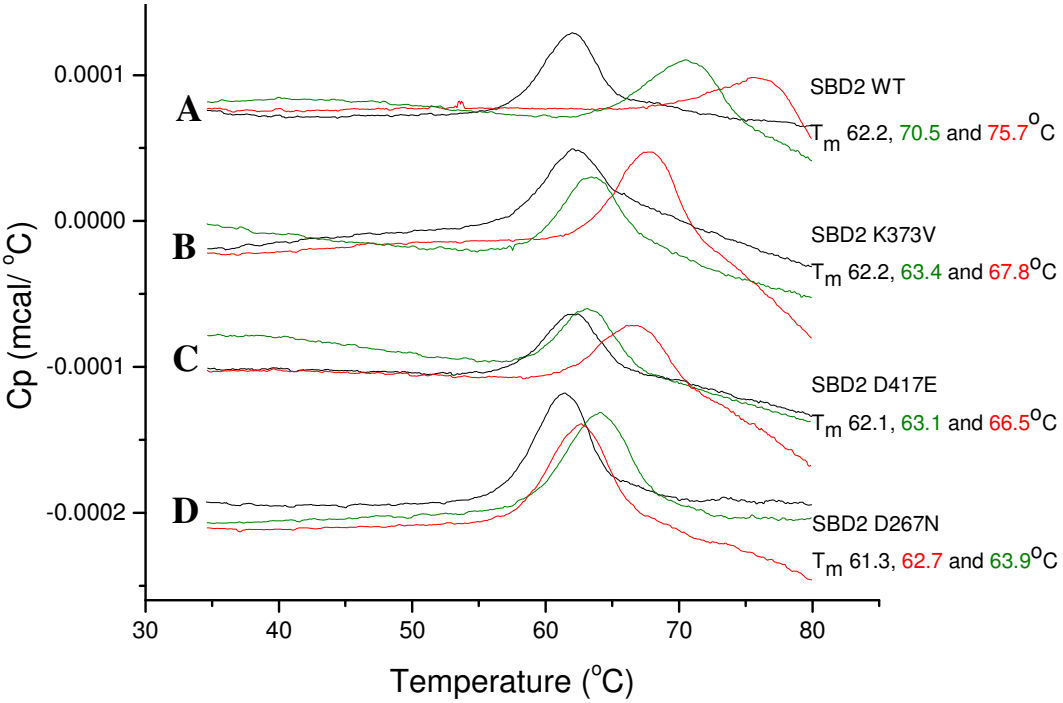
Tabel 3: Opbrengst van de eiwitzuivering

	Gezuiverd eiwit (mg)	Opbrengst (%)
WT	6.20	1.55
K373V	5.57	1.39
D417E	3.52	0.88
D267N	3.02	0.76

3.2 DSC metingen

In *Figuur 14* zijn de resultaten van de DSC metingen van het WT SBD2 eiwit en de mutanten K373V, D417E en D267N te zien. De scans met de eiwitten zonder gebonden substraat zijn in het zwart getoond, met de eiwitten verzadigd met 5mM glutamine in het rood en met de eiwitten verzadigd met 5mM glutamaat in het groen.

De DSC metingen met het WT SBD2 eiwit laten zien dat de binding van glutamine voor een vrij grote toename van de thermostabiliteit zorgt: de T_m is namelijk 13.5°C toegenomen in vergelijking met het eiwit zonder gebonden substraat. De binding van glutaminezuur zorgt ook voor een verhoging van de thermostabiliteit, alleen is deze wel wat kleiner: de T_m is nu 8.3°C toegenomen. Dit laat zien dat de affiniteit van SBD2 voor glutamine hoger is dan voor glutaminezuur. Voor zowel de curve met glutamine, als voor de curve met glutaminezuur is te zien dat het ontvouwen eiwit aggregeert en neerslaat. Dit maakt dat de meting irreversibel is. Voor de curve met glutamine is zelfs niet helemaal zeker of het eiwit al wel de T_m heeft bereikt voordat het neerslaat.



Figuur 14: De resultaten van de DSC metingen voor (A) het WT SBD2 eiwit, (B) de K373V mutant, (C) de D417E mutant en (D) de D267N mutant. De eiwit concentratie was steeds 6µM en als er substraat is toegevoegd, was dit 5mM. Per mutant is de curve zonder substraat zwart, met 5mM glutamine rood en met 5mM glutamaat groen gekleurd. De smelttemperaturen (T_m) die bij deze curves horen, hebben dezelfde kleur.

Ondanks dat de K373V mutant niet tot transport in staat blijkt te zijn, laten de DSC metingen zien dat er wel degelijk substraatbinding in de K373V mutant optreedt. Het gemuteerde eiwit zonder gebonden substraat heeft dezelfde T_m als het WT SBD2 eiwit zonder gebonden substraat. De mutatie heeft dus geen effect op de thermostabiliteit van het eiwit in de opgevouwen toestand. Wanneer het gemuteerde eiwit verzadigd is met glutamine, neemt de T_m 5.6°C toe in vergelijking met het eiwit zonder gebonden substraat. Er moet wel binding van glutamine zijn opgetreden, om deze hogere thermostabiliteit te kunnen verkrijgen. Dat de T_m 7.9°C lager is dan van het WT SBD2 eiwit dat verzadigd is met glutamine, laat zien dat de K373V mutatie de affiniteit voor glutamine wel een stuk verlaagd. Een verhoging van de thermostabiliteit door de binding van glutaminezuur is wat minder zeker. De DSC scan laat zien dat bij een verzadiging met glutamaat de verhoging van T_m slechts 1.2°C is ten opzichte van het mutante eiwit zonder gebonden substraat. In vergelijking met de T_m van het WT SBD2 eiwit, is deze 7.4°C gedaald. Dit laat zien dat de mutatie de affiniteit voor glutaminezuur een stuk laat dalen en dat de affiniteit van de K373V mutant voor glutamine hoger is dan voor glutaminezuur. Wanneer je naar alle drie de curves van de K373V mutant kijkt, is te zien dat in alle drie gevallen het ontvouwen eiwit aggregeert en neerslaat.

Voor de D417E mutant is de T_m voor het gemuteerde eiwit zonder gebonden substraat 0.1°C lager dan voor het WT SBD2 zonder gebonden eiwit. Op basis hiervan kun je niet zeggen dat de D417E mutatie effect heeft op de thermostabiliteit van het gevouwen eiwit, want het verschil is erg klein en kan ook een onnauwkeurigheid zijn. De verzadiging van het gemuteerde eiwit met glutamine zorgt voor een verhoging van de T_m van 4.4°C. De mutatie maakt de binding van glutamine dus nog wel mogelijk en deze substraatbinding draagt ook bij aan de thermostabiliteit van het eiwit. Maar vergelijking met de T_m voor het WT SBD2 eiwit dat verzadigd is met glutamine, welke 9.2 °C hoger is, wijst uit dat de affiniteit voor glutamine door de D417E mutatie wel verlaagd is, zelfs meer dan door de K373V mutatie. De verzadiging van het gemuteerde eiwit met glutamaat laat een toename van de T_m zien van maar 1°C. Of er werkelijk binding van glutaminezuur optreedt en of deze wel effect heeft op de thermostabiliteit van het eiwit, is niet met

Tabel 4: De resultaten van de ITC metingen

	N (sites)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	K_a (M^{-1})	K_d (μM)
WT SBD2	0.57 ± 0.01	-4848 ± 119	10.5	7.1E5 ± 1.3E5	1.4 ± 0.3
SBD2 K373V	1.07 ± 0.03	-1233 ± 51.2	16.9	3.9E4 ± 3.4E3	25 ± 2
SBD2 D417E	0.62 ± 0.06	-8308 ± 927	-6.91	3.8E4 ± 5.0E3	26 ± 3
SBD2 D267N	geen binding	geen binding	geen binding	geen binding	geen binding

zekerheid te zeggen. De T_m van het WT SBD2 eiwit dat verzadigd is met glutamaat, is 7.3°C hoger. De mutatie zorgt dus voor een redelijke daling van de affiniteit voor glutaminezuur. Verder is te zien dat in het gemuteerde eiwit de affiniteit voor glutamine hoger is dan voor glutaminezuur. Als naar het verloop van alle drie de curves gekeken wordt, is te zien dat ook hier alle eiwitten na de ontvouwing aggregeren en neerslaan.

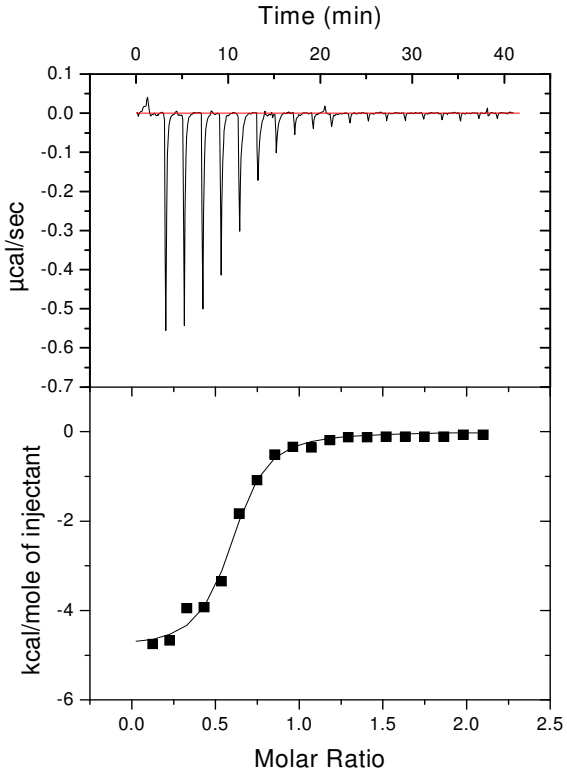
De T_m van de D267N mutant zonder gebonden substraat is 0.9°C lager dan van het WT SBD2 eiwit zonder gebonden substraat. Het verschil is niet heel groot, dus de mutatie heeft geen desastreuze gevolgen voor de ontvouwing van het ongeligandeerde eiwit. Wanneer de curves voor het gemuteerde eiwit verzadigd met glutamine en met glutamaat worden bekeken, is te zien dat de T_m maar enkele graden toenemen in vergelijking met de T_m voor de mutant zonder gebonden substraat. De affiniteit is voor beide substraten dus vrij laag en de binding van het substraat, die met de ITC metingen niet werd waargenomen, zal erg zwak zijn. Doordat de binding erg zwak is, draagt deze ook niet veel bij aan de thermostabiliteit van het eiwit in de gevouwen conformatie. Wat wel opvalt, is dat nu de T_m van het met glutamaat verzadigde eiwit hoger is dan voor het met glutamine verzadigde eiwit. De binding van glutamine zorgt voor een verhoging in de T_m van 1.4°C en de binding van glutaminezuur voor een verhoging van 2.6°C. Zoals verwacht is de affiniteit voor glutaminezuur of glutamaat door de mutatie dus wel hoger geworden dan de affiniteit voor glutamine. Maar wanneer je deze T_m's vergelijkt met die van het WT SBD2 eiwit dat verzadigd is met glutamine of met glutamaat, dan zijn de T_m's respectievelijk 12.1°C en 5.7°C gedaald.

3.3 ITC metingen

De ITC metingen werden minstens tweemaal uitgevoerd. Voor het WT SBD2 eiwit en de K373V mutant werden de metingen met glutamine als enig substraat en bij pH=6.0 uitgevoerd. Glutamine werd ook als enig substraat gebruikt voor de ITC metingen van de D417E mutant en deze metingen zijn bij pH=6.0 en eenmaal bij pH=5.0 uitgevoerd. De ITC metingen voor de D267N mutant werden zowel met glutamine als met glutamaat uitgevoerd en bij pH=6.0 en pH=5.0. De resultaten van de vier beste metingen zijn weergegeven in Tabel 4 en de bijbehorende figuren worden bij het bespreken per eiwit getoond.

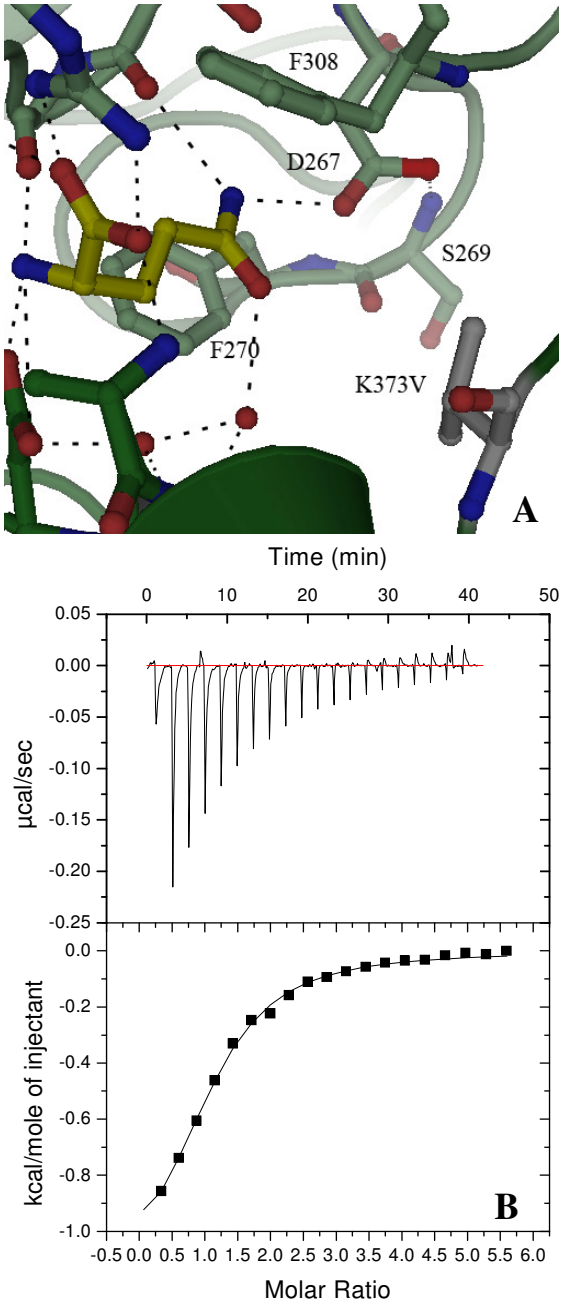
Het WT SBD2 eiwit heeft een K_d van 1.4 ± .3μM, wat overeenkomt met eerdere metingen. Net als de DSC meting laat de ITC meting dus zien dat SBD2 een hoge affiniteit heeft voor glutamine. Aangezien er per SBD2 1 glutamine kan binden, zou N rond de 1 moeten zijn. In eerste instantie had dit aan een verkeerd bepaalde eiwitconcentratie kunnen liggen, waardoor de substraatconcentratie gedurende de ITC meting niet minimaal 10x de concentratie van het eiwit was geweest. Maar nadat de eiwitconcentratie op de juiste manier bepaald was, bleef de n rond de 0.5-0.6. Een verklaring hiervoor zou de aanwezigheid van inactief eiwit kunnen zijn. Aan de sigmodiale curve die met de ITC meting verkregen is, is verder nog te zien dat de binding van glutamine een exotherm proces is (*Figuur 15*).

In het SBD2 K373V eiwit werd K373 vervangen door een neutrale en apolaire valine (*Figuur 16*). Als gevolg hiervan zullen zowel de waterstofbrug die de negatief geladen aminegroep met het substraat vormt, als de elektrostatische binding die de groep met D267 vormt, verdwenen zijn. De DSC metingen lieten zien dat de mutant hierdoor nog wel tot substraatbinding in staat is, maar dat de affiniteit voor glutamine een stuk lager is dan in het WT SBD2 eiwit. Of er sprake kan zijn van een binding van glutaminezuur en een affiniteit voor dit substraat, is moeilijk te zeggen. De ITC meting leverde een K_d van 25 ± 2μM, welke een stuk groter was dan voor het WT SBD2 eiwit. Dit geeft aan dat de affiniteit voor glutamine ten opzichte van het WT SBD2 eiwit gedaald is. Blijkbaar is de elektrostatische binding tussen K373 en D267



Figuur 15: Het resultaat van de ITC meting van 0.074mM WT SBD2, die bij pH=6.0 en 25.0°C werd uitgevoerd met 0.75mM glutamine.

erg belangrijk om het substraat stevig in de bindingssite te houden. De amide zuurstof in de zijketen van het substraat gaat ook nog een waterstofbrug aan met een watermolecuul dat in de bindingssite gevangen zit, dus alleen het verbreken van de waterstofbrug met het substraat zou niet zo'n daling in de affiniteit veroorzaken. Door het verbreken van de elektrostatische verbinding, zal de ingesloten ruimte tussen het 'bovenste' en het 'onderste' subdomein meer open komen te staan. Hierdoor zou het substraat na binding in de bindingssite makkelijker weer kunnen vertrekken en dit verklaart ook de waarde van de K_d. Het zou ook de reden kunnen zijn waarom de K373V mutant niet tot transport in staat is, maar het substraat nog wel redelijk bindt: het substraat blijft niet lang genoeg gebonden om het ook nog te kunnen transporteren. De pK_a van de γ-carboxylgroep van glutamaat is 4.25 [1], dus bij pH=6.0 is glutamaat voornamelijk in de gedeprotoneerde en negatief geladen vorm aanwezig. Aangezien een overall lading van 0 belangrijk is voor een hoge affiniteit voor het substraat, verklaart dit al waarom glutamaat doorgaans niet gebonden wordt. Door de K373V mutatie is de affiniteit voor glutaminezuur/glutamaat sterk gedaald;



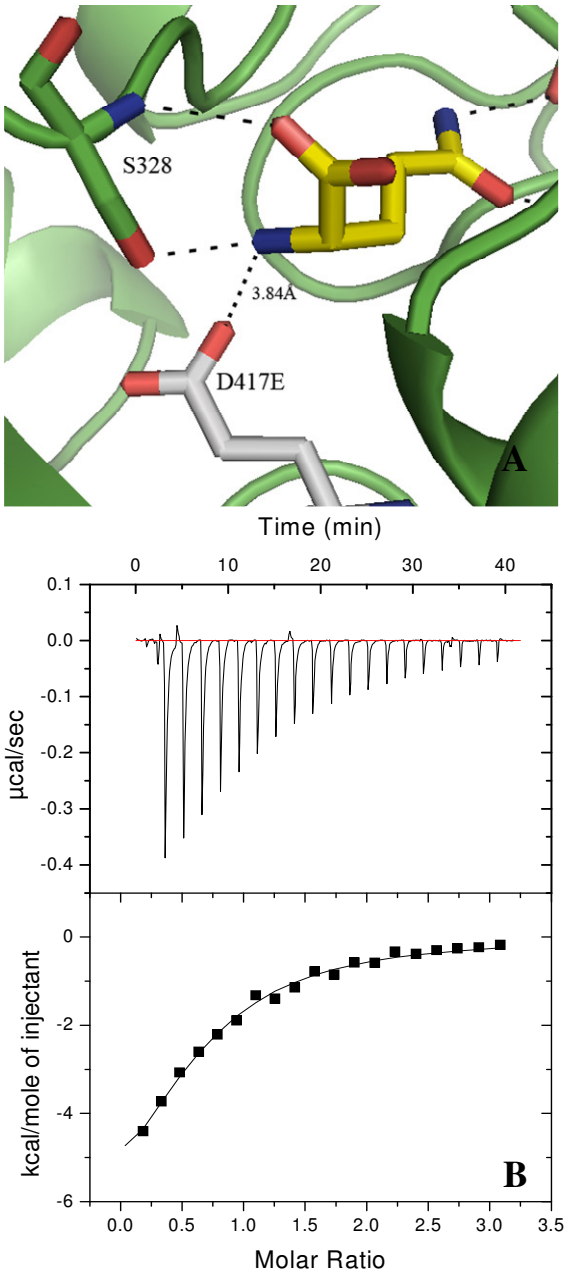
Figuur 16: (A) de bindingssite van de K373V mutant en (B) het resultaat van de ITC meting van 0.074mM SBD2 K373V, die bij pH=6.0 en 25.0°C werd uitgevoerd met 2.0mM glutamine.

het is zelfs niet helemaal zeker of er wel binding optreedt. Misschien dat de positief geladen aminegroep van K373 nog voor enige stabilisatie van de negatieve lading van glutamaat kan zorgen, waardoor het in het WT SBD2 eiwit nog wel kan binden en in de K373V mutant nauwelijks tot niet. Al met al is de K373 erg belangrijk in de bindingssite. Niet zozeer omdat het een waterstofbrug met het substraat aangaat of de negatieve lading van glutamaat kan stabiliseren, maar om de, als

portier werkende elektrostatische binding die het met D267 vormt.

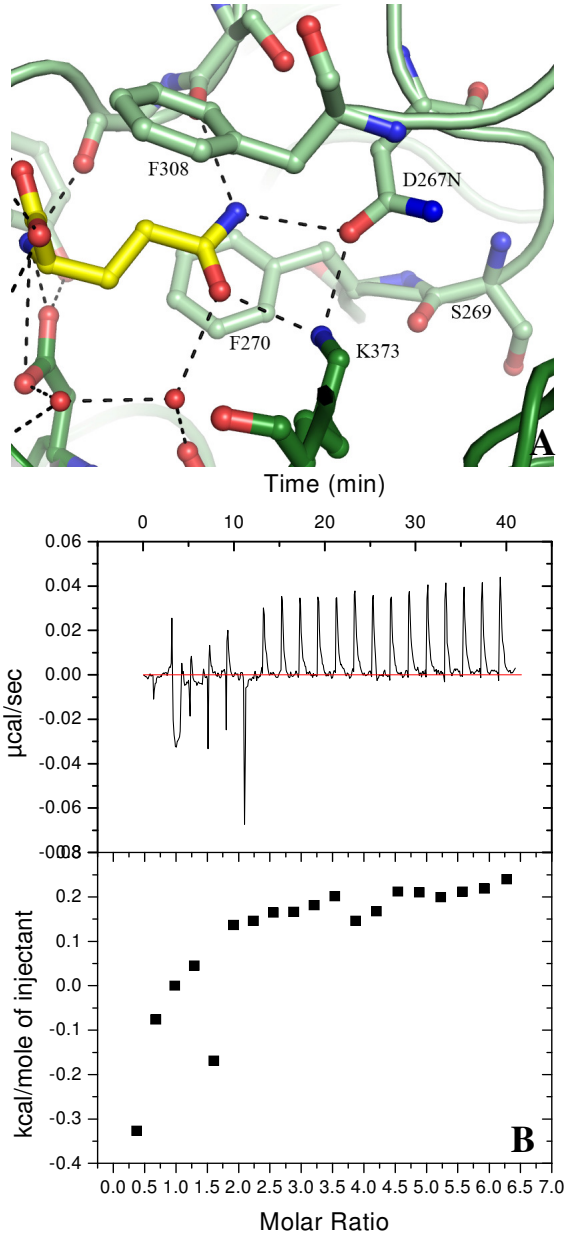
De D417E mutant was gemaakt om meer inzicht te kunnen krijgen in de lagere affiniteit van SBD1, ten opzichte van die van SBD2. In de vergelijkbare bindingssite van SBD1 zit op de plaats van D417 een glutamaat. Het enige structurele verschil tussen een aspartaat en een glutamaat, is dat de zijketen van glutamaat één methylgroep langer is. Het zou kunnen zijn dat de lagere affiniteit van SBD1 te maken heeft met een andere positie van de carboxylgroep, die betrokken is bij een waterstofbrug met de α-aminogroep van het substraat (*Figuur 17*). De DSC metingen toonden aan dat de D417E mutant nog wel glutamine kan binden, maar het niet met zo'n hoge affiniteit als het WT. De affiniteit leek zelfs lager dan voor de K373V mutant. De affiniteit voor glutaminezuur was nog lager; net als voor de K373V mutant is het moeilijk om te zeggen of er überhaupt wel binding van glutaminezuur optreedt. De ITC metingen gaven een K_d van 26 ± 3μM, welke in hetzelfde gebied ligt als de K_d van de K373V mutant. Waarschijnlijk is niet de aanwezigheid van een aspartaat in deze hoek van de bindingssite, maar de locatie van de negatief geladen carboxylgroep is belangrijk voor het bepalen van de affiniteit van het substraat. Als deze negatief geladen carboxylgroep namelijk te ver verwijderd is van het substraat, is het niet meer in staat om de positieve lading op de α-aminogroep van het substraat te stabiliseren. Dit komt waarschijnlijk in SBD1 ook voor, waardoor de overall lading van het substraat geen 0 is en de affiniteit ervoor daalt.

Volgens de ITC metingen werd er noch glutamine, noch glutaminezuur in de D267N mutant gebonden (*Figuur 18*). De DSC metingen lieten zien dat er wel degelijk affiniteit voor beide substraten was, maar dat deze wel erg laag was en dat als er al binding optrad, deze erg zwak zou zijn. Verrassend was wel dat de affiniteit voor glutaminezuur of glutamaat hoger lag dan voor glutamine. De D267N mutatie werd echter ook gemaakt om de affiniteit voor glutamaat te verhogen. De verwachting was dat als D267 wordt vervangen door een asparagine, dat dan de amide zuurstof in de zijketen van deze asparagine een waterstofbrug ging vormen met de aminegroep of hydroxylgroep van respectievelijk glutamine of het geprotoneerde glutaminezuur. Wanneer echter het



Figuur 17: (A) de bindingssite van de D417E mutant en (B) het resultaat van de ITC meting van 0.058mM SBD2 D417E, die bij pH=6.0 en 25.0°C werd uitgevoerd met 0.86mM glutamine.

gedeprotoneerde glutamaat aanwezig was, zou de amidegroep 180° kunnen roteren, zodat de aminegroep een waterstofbrug met de negatief geladen zuurstof van glutamaat zou kunnen vormen. Daarnaast is het waarschijnlijk dat de D10 in GlnH de binding van glutamaat en andere aminozuren tegengaat door middel van Coulomb repulsie. [6] Doordat D10 een negatief geladen zijketen heeft die naar het substraat gericht is, zal de aanwezigheid van een negatieve lading aan het eind van de zijketen, vrij ongunstig zijn en niet tot een goede



Figuur 18: (A) de bindingssite van de D267N mutant en (B) het resultaat van de ITC meting van 0.066mM SBD2 D267N, die bij pH=6.0 en 25.0°C werd uitgevoerd met 2.0mM glutamine.

substraatbinding leiden. Dit zal kunnen verklaren waarom glutaminezuur alleen in de in de neutrale, geprotoneerde vorm in de bindingssite van SBD2 kan binden. Door D267 te vervangen door een asparagine, die ook in GluR0 aanwezig is, was daarom verwacht dat de affiniteit voor het negatief geladen en gedeprotoneerde glutamaat verhoogd zou worden. De mutatie zorgt er echter wel voor dat de elektrostatische binding tussen D267 en K373 verdwijnt. Met de K373V mutant was al aangetoond dat deze elektrostatische binding erg belangrijk is in het binnenhalen en vasthouden van het substraat in de bindingssite. De K373 kan ook geen interactie aangaan met de amide zuurstof en op deze manier de schade beperken, want deze afstand is te groot. Het feit dat de elektrostatische binding door de mutatie verbroken wordt, zou dus een verklaring kunnen zijn waarom de affiniteit voor glutamaat toch niet verhoogd werd. De reden waarom de affiniteit voor glutamine zo laag is, heeft waarschijnlijk met een andere interactie te maken. De andere carbonyl zuurstof van D267 die geen interactie aangaat met het substraat, vormt namelijk een waterstofbrug met de α-aminogroep van S269 in de hoofdketen. Wanneer glutamaat gebonden is, zal de amide zuurstof van de aspargine deze waterstofbrug in stand kunnen houden. Als echter glutamine een interactie aangaat met de amide zuurstof, wordt de waterstofbrug verbroken. Dit kan er toe leiden dat de loop waarin S269 zich bevindt, zijn flexibiliteit terug krijgt en gaat verschuiven. Als gevolg daarvan kan ook F270 op een andere locatie komen te zitten en dit zou het uiteenvallen van de aromatische en hydrofobe pocket tot gevolg hebben. Het substraat wordt dan niet meer door sterke van der Waals interactie op zijn plaats gehouden en zou zelfs helemaal niet meer goed gebonden kunnen worden. Dus naast de elektrostatische binding tussen D267 en K373 is ook de waterstofbrug tussen D267 en S269 van groot belang om het substraat in de bindingssite te sluiten.

4. Conclusie

De resultaten van de ITC metingen en de DSC metingen voor de D417E mutant tonen aan dat de lagere affiniteit in SBD1 veroorzaakt zou kunnen worden door een iets andere locatie van een negatief geladen carboxylgroep in de bindingssite van SBD1. De bindingssites van beide domeinen bevatten een negatief geladen carboxylgroep op een vergelijkbare positie, maar in SBD2 behoort deze carboxylgroep tot een aspartaat en in SBD1 tot een glutamaat. De zijketen van de glutamaat is één methylgroep langer, waardoor de carboxylgroep op een andere locatie in de bindingssite van SBD1 terecht komt, in vergelijking met de locatie in de bindingssite van SBD2. Er zijn echter meerdere verschillen tussen SBD1 en SBD2, die verantwoordelijk kunnen zijn voor de lage affiniteit van SBD1 ten opzicht van die van SBD2.

De K373V mutatie heeft bewezen dat niet zo zeer de interactie tussen K373 en het

substraat, maar juist de elektrostatische binding tussen K373 en D267 van groot belang is voor een goede substraatbinding. Deze elektrostatische binding werkt namelijk als een soort portier, die het substraat de bindingssite in en uit kan laten gaan door het 'bovenste' en 'onderste' subdomein van SBD_2 dicht bij elkaar te brengen. Wanneer deze elektrostatische binding er niet is, zal het substraat misschien wel goed kunnen binden, maar zal het waarschijnlijk niet lang genoeg in de bindingssite aanwezig blijven, om ook transport van het substraat over de membraan mogelijk te maken. Ook zou het kunnen zijn dat de pocket niet goed genoeg sluit, waardoor de conformationele veranderingen die nodig zijn om het transport mogelijk te maken, niet op kunnen treden.

De resultaten van de DSC en ITC metingen van de D267N mutant waren anders dan verwacht. Deze mutatie was namelijk gemaakt om de affiniteit voor glutamaat over glutamine te verhogen. Uit de DSC metingen bleek wel dat de affiniteit van de mutant voor glutamaat/glutaminezuur iets hoger was dan voor glutamine, maar voor beide zou de substraatbinding erg zwak zijn. Zo zwak, dat deze met ITC metingen niet waar te nemen was. Verklaring voor de slechte binding van glutamine is dat de waterstofbrug tussen D267 en S269 door de mutatie verbroken worden. Hierdoor valt de aromatische en hydrofobe pocket die het substraat stevig in de bindingssite gebonden houdt, uit elkaar en kan het substraat veel minder goed binden. Deze waterstofbrug blijft wel in tact als glutamaat bindt, maar dat wordt de elektrostatische binding met K373 verbroken en kan het substraat weer op een andere manier uit de bindingssite ontsnappen.

De S328L mutant heeft nog geen informatie opgeleverd, omdat het lysaat dat deze mutant bevatte, nog niet gezuiverd was. Hierdoor konden er geen DSC en ITC metingen met deze mutant worden uitgevoerd.

5. Dankbetuiging

L.J.Y.M. Swier wil G.K. Schuurman-Wolters bedanken voor de goede en prettige begeleiding en de leerzame informatie. Daarnaast dank aan B. Poolman, voor het mogelijk maken van dit onderzoek in zijn onderzoeksgroep en voor het nuttige commentaar.

6. Referenties

[1] G.K. Schuurman-Wolters, B. Poolman, *J. Biol. Chem.* **2005**, *25* (280), 23785-23790

[2] H. Takahashi, E. Inagaki, C. Kuroishi, T.H. Tahirov, *Acta Cryst.* **2004**, *D60*, 1846-1854

[3] C.-D. Hsiao, Y.-J. Sun, J. Rose, B.-C. Wang, *J. Mol. Biol.* **1996**, *262*, 225-242

[4] G.F.-L. Ames, *Ann. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 397-425

[5] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, in *Biochemistry*, Ch. 13 pp. 359-360, W.H. Freeman and Company, New York, **2007**

[6] M.L. Mayer, R. Olson, E. Gouaux, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 815-836

[7] Y.-J. Sun, J. Rose, B.-C. Wang, C.-D. Hsiao *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 219-229

[8] C.M. Johnson, Microcal, Differential Scanning Calorimetry: Theory and Practice Application Note, *http://www.microcal.com/documents/faa_dsc-theory-and-practice.pdf*, 14-05-2010

[9] MicroCal™, DSC Data analysis in Origin® **1998** *http://www.uic.edu/orgs/ctrstbio/manuals/dscOrigin.pdf*, 03-07-2010

[10] MicroCal™, *http://www.microcal.com/functional-application-areas/binding/protein-interactions/dsc-binding.asp*, 21-06-20-10

[11] S. Leavitt, E. Freire, *Current Opinion in Structural Biology* **2001**, *11* (5), 560-566

[12] MicroCal™, iTC_{200} Microcalorimeter User's Manual

[13] Actava, Analytical Services, *http://www.avacta.com/images/uploads/im/itc_graph.jpg*, 02-07-2010

[14] G.A. Holdgate, *BioTechniques* **2001**, *31*, 164-184

[15] Promega, Wizard ® Plus SV Minipreps DNA purification system protocol **2009**, *http://www.promega.com/tbs/tb225/tb225.pdf*, 16-06-2010

[16] Macherey-Nagel, User Manual NucleoSpin® Extract II **2009**, *http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakte*

ure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gelex_NSExII.pdf, 17-06-'10

[17] A.G. de la Campa, S.S. Springhorn, P. Kale, S.A. Lacks, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (29), 14696-14702

[18] Stratagene, QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual **1998,** *http://www.physics.ucsb.edu/~deborah/pro/pro_pdf/Stratagene%20QuikChange.pdf*, 21-05-2010

[19] R. Schleif, *BioEssays* **2003**, *25* (3), 274-282