

University of Groningen

Engineering the thermostability of *Bacillus* neutral proteases

Eijsink, Vincentius Gerardus Hendricus

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1991

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Eijsink, V. G. H. (1991). *Engineering the thermostability of Bacillus neutral proteases*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

construction of Npr's that are more thermostable than the most thermostable variant presently known.

SAMENVATTING

Protein engineering is multi-disciplinair onderzoek waarin de eigenschappen van eiwitten worden geanalyseerd met behulp van een combinatie van fysische, biochemische, wiskundige en genetische technieken. In de afgelopen jaren heeft protein engineering veel bijgedragen aan de toename in de kennis van de structuur-functie-stabiliteits relaties in eiwitten. Dit proefschrift beschrijft het gebruik van protein engineering voor de bestudering van de thermostabiliteit van neutrale proteases (Npr's), extra-cellulaire enzymen die worden geproduceerd door diverse leden van het bacteriële genus *Bacillus*. Deze homologe enzymen vormen een goed model systeem voor de bestudering van de stabiliteit van eiwitten, niet alleen omdat ze goed gekarakteriseerd zijn, maar tevens omdat ze grote verschillen in stabiliteit vertonen. Het onderzoek was gericht op het analyseren van de structurele verschillen binnen de groep van Npr's, die verantwoordelijk zijn voor de verschillen in thermostabiliteit. Bovendien is onderzoek gedaan naar algemeen toepasbare typen mutaties die tot de verhoging van de stabiliteit van een eiwit leiden.

Hoofdstuk I geeft een algemene inleiding, waarin aspecten van de structuur, vouwing en stabiliteit van eiwitten worden besproken. Factoren die de stabiliteit van eiwitten bepalen worden afzonderlijk behandeld. Op grond van de relevante literatuur gegevens blijkt dat protein engineering van grote waarde is bij het ophelderen van deze factoren. Vergelijkingen van de primaire en tertiaire structuren van homologe eiwitten, die een verschillende thermostabiliteit bezitten, heeft eveneens belangrijke informatie opgeleverd. Echter, aanwijzingen die uit dit soort vergelijkingen worden getrokken dienen geverifieerd te worden met behulp van protein engineering.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek betreft het relatief thermolabele neutrale protease van *B. subtilis* (Npr-sub) en het relatief thermostabele neutrale protease van *B. stearothermophilus* (Npr-ste). De aminozuur sequenties van deze enzymen zijn bekend en

de bijbehorende genen zijn gecloneerd in *B. subtilis*. De drie-dimensionale structuren van Npr-sub en Npr-ste zijn onbekend; daarom werden modellen van deze enzymen gebouwd, gebaseerd op de met behulp van röntgen diffractie opgehelderde structuur van het neutrale protease van *B. thermoproteolyticus* (thermolysine; zie Hoofdstuk V).

De hoofdstukken II en III beschrijven de ontwikkeling van snelle en efficiënte zuiveringsprocedures voor Npr's. Met behulp van hoge druk chromatografie (HPLC), gebruik makend van bacitracine-silica als een affiniteitsmedium, konden meerdere milligrammen zuiver enzym worden verkregen in een tijdsbestek van twee uur, waarbij cultuur supernatant van *Bacillus* als uitgangsmateriaal werd gebruikt. Dankzij de hoge snelheid van de procedure en de aanwezigheid van de effectieve Npr-remmer isopropanol in de buffers, bleef autolyse van de enzymen tijdens de zuivering tot een minimum beperkt.

Als maat voor de thermostabiliteit van Npr's werd de T50 gekozen. Dit is de temperatuur waarbij 50 procent van het enzym wordt geïnactiveerd gedurende dertig minuten incubatie bij pH 5.0. De assay voor de bepaling van de thermostabiliteit wordt uitvoerig besproken in Hoofdstuk IV. Op basis van in dit proefschrift verkregen en gepubliceerde gegevens wordt in Hoofdstuk IV waarschijnlijk gemaakt, dat locale ontvouwing het Npr gevoelig maakt voor autolyse. Deze ontvouwing wordt gezien als de snelheids-beperkende stap in het proces van hitte-inactivatie. Met andere woorden, autolyse is de oorzaak van de irreversibele inactivatie van Npr's bij hoge temperaturen, maar de snelheid van dit proces wordt bepaald door een reversibel ontvouwingsproces. Dit dient in overweging te worden genomen bij het ontwerpen van stabiliserende mutaties voor proteases, die bij voorkeur niet moeten worden aangebracht in relatief stabiele gebieden van het eiwit, omdat de locale ontvouwing van zo'n gebied maar weinig bijdraagt tot inactivering bij hoge temperaturen. Experimenten die in Hoofdstuk VII worden beschreven ondersteunen deze hypothese.

De Hoofdstukken V-VII beschrijven plaatsgerichte mutaties in Npr-sub en Npr-ste die erop zijn gericht de interacties tussen het midden- en C-terminaal-subdomein in deze enzymen te analyseren. Twee interacties werden onderzocht: 1) contacten tussen een hydrofoob residu op positie 315 en een hydrofobe pocket die wordt gevormd door de residuen 217 en 236, gelegen in het midden-subdomein, en residuen 281, 282, 285, 310 en 313, gelegen in het C-terminaal-subdomein; 2) contacten tussen een 'β-hairpin' (residuen 248-257) en oppervlakte residuen uit beide subdomeinen. De eerste interactie is aanwezig in alle neutrale proteases, terwijl de tweede alleen voorkomt in thermostabiele varianten.

Hoofdstuk V laat zien dat de thermostabiliteit van Npr-sub sterk werd beïnvloed door het muteren van residu 315, terwijl de thermostabiliteit van Npr-ste hierdoor nauwelijks veranderde. Hoofdstuk VI beschrijft dat de introductie in Npr-sub van de β-hairpin, zoals aanwezig in Npr-ste, de thermostabiliteit van het enzym deed toenemen. Om deze toename te bewerkstelligen moest het oppervlak van Npr-sub op twee posities met behulp van extra mutaties worden aangepast, om goede contacten met de β-hairpin mogelijk te maken. Voordat deze aanpassingen waren aangebracht vond autolytische klieving plaats in de geïntroduceerde β-hairpin, waarschijnlijk omdat deze in de oplossing steekt en niet, zoals in Npr-ste, vast tegen de rest van het molecuul aanligt. In hoofdstuk VII worden enkel- en dubbelmutante Npr's besproken die verder inzicht geven in de interactie tussen de subdomeinen. De thermostabiliteit van Npr-ste werd niet beïnvloed door mutaties op positie 315 die de hydrofobe interacties verslechteren of door het weghalen van de β-hairpin. Echter, na combineren van beide typen mutaties werd een duidelijke afname van de thermostabiliteit gevonden. Soortgelijke gegevens, maar dan in tegengestelde richting, werden verkregen met Npr-sub: het destabiliserende effect van de mutaties Leu315 -> Ala of Leu315 -> Gly verminderde aanzienlijk door de introductie van de 248-257 β-hairpin. Deze resultaten worden besproken in de context van een theoretisch

model voor de hitte-inactivatie van Npr's, dat mede is gebaseerd op de waarnemingen die in Hoofdstuk IV zijn beschreven.

Het voorkomen van positief geladen residuen aan de N-terminale zijde van α-helices lijkt energetisch ongunstig, omdat zich daar, bij benadering, een halve positieve lading bevindt. Succesvolle pogingen om Npr-sub te stabiliseren door middel van het weghalen van dat soort residuen worden beschreven in Hoofdstuk VIII. De thermostabiliteit van Npr-sub nam toe met 0.3 tot 1.2 °C, nadat lysines waren vervangen door Ser of Asp. De introductie van Asp leidde tot het grootste effect, hetgeen aangeeft dat verbeterde electrostatische interacties inderdaad leiden tot een toename van de stabiliteit.

Hoofdstuk IX behandelt mutaties die ontworpen werden om Npr-ste te stabiliseren door middel van het verdichten van de pakking in het hydrofobe binnenste van dit enzym. Ten gevolge van deze mutaties werd de thermostabiliteit van Npr-ste weliswaar positief, maar slechts beperkt, beïnvloed. Dit ondanks het feit dat de aangebrachte veranderingen soms vrij drastisch waren, zoals bijvoorbeeld het vervangen van Met of Leu door Trp. De resultaten die hier worden beschreven ondersteunen het algemene beeld dat neutrale proteases het meest effectief gestabiliseerd kunnen worden door het aanbrengen van mutaties in de buitenste regionen van het molecuul. Dit beeld wordt verder ondersteund door de resultaten die in Hoofdstuk XIII worden gepresenteerd.

Onderzoek naar de bijdrage van waterstofbruggen aan de thermostabiliteit van Npr-ste wordt beschreven in de hoofdstukken X en XI. De zijketen van Asn241 in dit enzym heeft een ongepaarde waterstof-brug acceptor. Deze energetisch ongunstige situatie werd op twee manieren opgeheven. Hoofdstuk X beschrijft de vervanging van Asn241 door Leu, waarmee, naast de verwijdering van de ongepaarde waterstof-brug acceptor, ook een verbetering van de hydrofobe pakking in het binnenste van het eiwit werd bereikt. Hoofdstuk XI beschrijft de

voor de hitte-inactivatie van Npr's, dat gebaseerd op de waarnemingen die in Hoofdstuk IV zijn beschreven.

Voorkomen van positief geladen residuen op de N-terminale zijde van α -helices lijkt vaak ongunstig, omdat zich daar, bij bijvoorbeeld Asp, een halve positieve lading bevindt. Verskeide pogingen om Npr-sub te stabiliseren door middel van het weghalen van dat soort residuen worden beschreven in Hoofdstuk VIII. De thermostabiliteit van Npr-sub nam toe met de introductie van 1.2 °C, nadat lysines waren vervangen door Asp. De introductie van Asp leidde tot het grootste effect, hetgeen aangeeft dat de electrostatische interacties inderdaad tot een toename van de stabiliteit.

Hoofdstuk IX behandelt mutaties die worden gebruikt om Npr-ste te stabiliseren. Het doel van het verdichten van de pakking van hydrofobe binnenste van dit enzym. Ten gevolge van deze mutaties werd de stabiliteit van Npr-ste weliswaar positief, maar slechts beperkt, beïnvloed. Dit ondanks het feit dat de aangebrachte veranderingen drastisch waren, zoals bijvoorbeeld het vervangen van Met of Leu door Trp. De mutaties die hier worden beschreven veranderen het algemene beeld dat neutrale residuen het meest effectief gestabiliseerd worden door het aanbrengen van positieve lading in de buitenste regionen van het eiwit. Dit beeld wordt verder ondersteund door de resultaten die in Hoofdstuk XIII worden besproken.

De zoek naar de bijdrage van waterstofbruggen aan de thermostabiliteit van Npr-ste wordt besproken in de hoofdstukken X en XI. De introductie van Asn241 in dit enzym heeft een positieve bijdrage aan de waterstof-brug acceptor. Deze ongunstige situatie werd op twee manieren opgeheven. Hoofdstuk X beschrijft de introductie van Asn241 door Leu, waarmee de verwijdering van de ongepaarde waterstof-brug acceptor, ook een verbetering van de pakking in het binnenste van het eiwit bereikt. Hoofdstuk XI beschrijft de

vervanging van Ala170 door Ser, waarmee een hydroxyl groep werd geïntroduceerd die een waterstof-brug kan vormen met de acceptor van Asn241. De Asn241 -> Leu en de Ala170 -> Ser mutatie brachten elk een thermostabiliteitsverhoging teweeg van 0.7 °C.

Zoals wordt beschreven in Hoofdstuk XII, heeft de Ala166 -> Ser mutatie tot gevolg dat een holte in het eiwit, waar zich een water molecuul bevond, wordt gevuld met een covalent gebonden hydroxyl groep. Deze groep kan ongeveer dezelfde waterstof-bruggen vormen als het water molecuul. Het lijkt daarom aannemelijk dat de 1.2 °C stabilisatie ten gevolge van de Ala166 -> Ser mutatie een gevolg is van de winst in entropie van het water molecuul, dat zich na deze mutatie vrijelijk door de oplossing kan bewegen.

De mutaties die in de hoofdstukken X-XII worden beschreven hebben enkele opmerkelijke karakteristieken. De Ala166 -> Ser en de Ala170 -> Ser mutatie werden in eerste instantie geselecteerd op basis van een automatische mutant-voorspellingsmethode van het programma WHAT IF, dat gebruikt wordt voor het modelleren van eiwit-structuren. Deze methode is gebaseerd op statistische analyse van lokale contact-patronen die voorkomen in een databank van eiwit-structuren. Het feit dat deze twee mutaties inderdaad tot stabilisatie leidden geeft aan hoe waardevol de huidige computer-technologie is voor het bestuderen en modelleren van eiwitten. De mutaties in Hoofdstukken X-XII betreffen geconserveerde residuen. Ala166 en Asn241 komen voor in alle Npr's. De Ala170 -> Ser mutatie lijkt op het eerste gezicht erg ongunstig aangezien thermolabiele Npr's een Ser hebben op positie 170, terwijl in thermostabiele varianten de Ala geconserveerd is. Het is duidelijk, dat ook geconserveerde residuen aandacht verdienen bij het ontwikkelen van mutatie-strategieën voor het stabiliseren van eiwitten.

Theoretische overwegingen en gepubliceerde gegevens suggereren dat de introductie van Pro residuen een eiwit stabiel maakt. Thermolysine heeft een Pro op positie 69, welke afwezig is in het meer labiele (-14 °C) Npr-ste. De rol van

residu 69 is onderzocht door Ala69 in Npr-ste te vervangen door Pro. De Pro69 variant van Npr-ste liet een verhoging in thermostabiliteit zien van 5.5 °C. De Ala69 -> Pro mutatie is dus verantwoordelijk voor ongeveer 40 procent van het totale verschil in thermostabiliteit tussen thermolysine en Npr-ste, ondanks het feit dat residu 69 aan het oppervlak van het eiwit ligt, en ondanks het feit dat de verandering op positie 69 slechts één van de 45 aminozuur veranderingen tussen thermolysine en Npr-ste betreft.

Samenvattend kan gesteld worden, dat het mogelijk is plaats-gerichte mutaties te ontwerpen die de stabiliteit van een eiwit op voorspelbare wijze veranderen. Het is mogelijk gebleken de Npr's te stabiliseren door middel van verschillende soorten mutaties, waarbij diverse typen interacties in de eiwitten werden veranderd. Experimentele gegevens en theoretische overwegingen doen vermoeden dat de voornaamste structuur-verschillen die verantwoordelijk zijn voor de variatie in de thermostabiliteit van Npr's gelegen zijn aan het oppervlak van het eiwit. De huidige kennis van de Npr's en de beschikbare faciliteiten om deze enzymen gericht te veranderen doen vermoeden dat het binnenkort mogelijk zal zijn een Npr te maken dat stabiel is dan de meest thermostabiele, in de natuur voorkomende, bekende variant.