

Multiple Timescale Dynamic Analysis of Functionally-Impairing Mutations in Human Ileal Bile Acid-Binding Protein

Gergő Horváth ¹, Bence Balterer ¹, András Micsonai ², József Kardos ² and Orsolya Toke ^{1,*}

¹ NMR Research Laboratory, Centre for Structural Science, Research Centre for Natural Sciences, 2 Magyar tudósok körútja, H-1117 Budapest, Hungary

² ELTE NAP Neuroimmunology Research Group, Department of Biochemistry, Institute of Biology, ELTE Eötvös Loránd University, Pázmány Péter sétány 1/C, H-1117 Budapest, Hungary

* Correspondence: toke.orsolya@ttk.hu; Tel.: +36-1-382-6575

Supplementary Information

Table S1. Unfolding parameters of thermal denaturation experiments followed by CD

pH	WT		Q51A		Q99A	
	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)
5.8	58.4±0.1	85.4±2.0	57.2±0.1	83.7±1.4	57.5±0.1	87.3±1.9
6.3	58.9±0.1	80.9±1.7	57.3±0.1	79.5±1.9	57.9±0.1	82.1±1.6
8.0	59.0±0.1	89.4±2.0	56.8±0.1	90.5±2.1	57.5±0.1	82.7±1.8

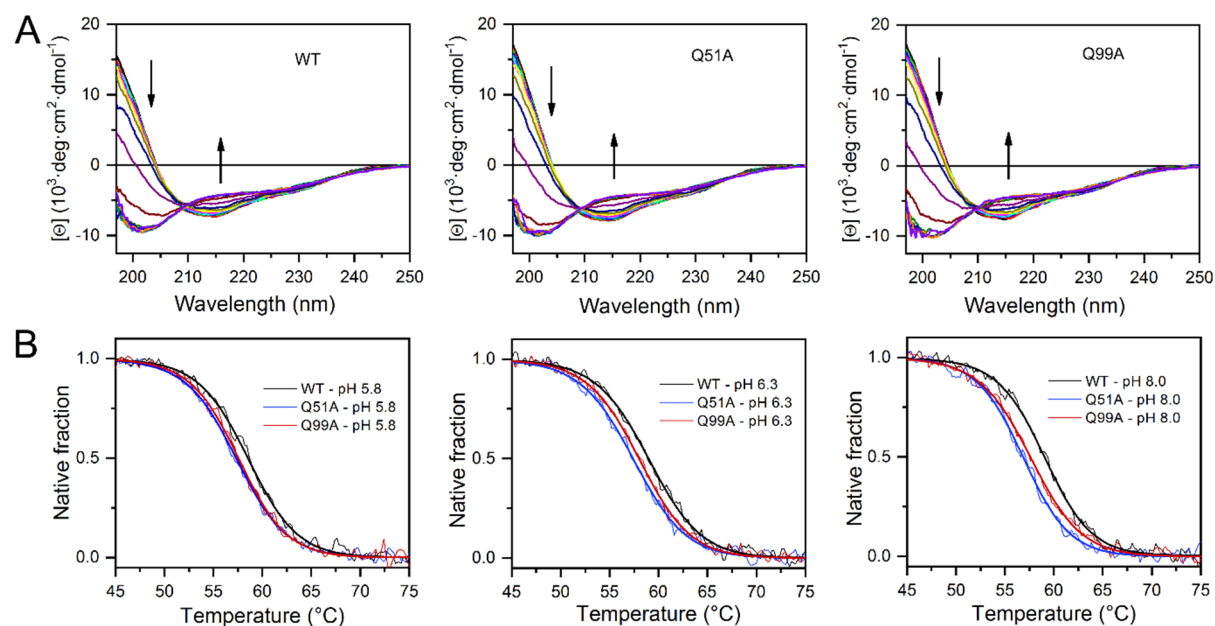
**Figure S1.** Thermal denaturation of *apo* human I-BABP variants followed by CD spectroscopy. (A) CD spectra were recorded at 5 °C steps from 20 to 85 °C. Arrows show the direction of changes. (B) Thermal denaturation of I-BABP variants using continuous heating with a rate of 2 °C/min was followed by the CD signal at 200 nm at pH 5.8, 6.3, and 8.0.

Table S2 Motional parameters derived from Model Free analysis of ^{15}N backbone relaxation measurements obtained for WT, Q51A, and Q99A human I-BABP in 20 mM K-phosphate, 50 mM KCl, 0.05% NaN_3 , 10% D_2O , pH=6.3 at 283 K.

Residue	WT			Q51A			Q99A		
	S^2	R_{ex}	τ_e	S^2	R_{ex}	τ_e	S^2	R_{ex}	τ_e
3	0.91±0.02		1581±353	0.84±0.02		1691±291	0.86±0.02		1106±204
4	0.94±0.02			0.99±0.02			0.94±0.02		
5	0.84±0.02	1.8±0.3		0.92±0.02			0.88±0.02		
6	0.98±0.02			0.98±0.02			0.93±0.02		
7	0.97±0.02			0.92±0.02		1974±210	0.96±0.02		
8	0.98±0.02			0.98±0.02			N/A		
9	0.98±0.02			0.87±0.02		1855±307	0.93±0.02		
10	0.99±0.02			0.98±0.02			0.95±0.02		
11	0.95±0.02		1988±211	N/A			0.96±0.02		515±115
12	0.93±0.02			0.97±0.02			0.97±0.02		
13	0.84±0.02	1.1±0.2		0.80±0.02	1.7±0.3		0.85±0.02		
14	0.98±0.02			N/A			0.98±0.02		
15	0.91±0.02			0.94±0.02			0.95±0.02		
16	0.82±0.02	1.8±0.3		0.89±0.02			0.93±0.02		
17	0.86±0.02	2.1±0.3		0.94±0.02	2.1±0.3		0.96±0.02		
18	0.94±0.02			0.94±0.02			0.93±0.02		
19	0.89±0.02	1.5±0.2		0.93±0.02			0.91±0.02		
20	0.80±0.02	3.4±0.3		0.86±0.02			0.90±0.02		
21	0.79±0.02	2.8±0.3		0.83±0.02	1.6±0.3		0.90±0.02		
22	0.82±0.02	1.3±0.2		0.82±0.02			0.85±0.02		
23	0.90±0.02			N/A			0.88±0.02		
24	0.89±0.02			0.87±0.02			0.89±0.02		
25	0.98±0.02			0.99±0.02			0.98±0.03		
26	0.91±0.02		1933±302	N/A			0.89±0.02		1839±239
27	0.89±0.02	1.5±0.3		0.89±0.02			0.90±0.02		
28	0.91±0.02	1.3±0.3		0.96±0.02			N/A		
29	0.86±0.02	3.4±0.3		N/A			0.95±0.03	3.1±0.3	
30	0.82±0.02	1.6±0.3		0.90±0.02	2.3±0.3		N/A		
31	0.90±0.02	2.8±0.3		0.99±0.02			N/A		
32	0.99±0.02	2.0±0.3		N/A			0.98±0.03	1.8±0.3	
33	0.98±0.02			0.85±0.02		1911±224	0.98±0.02		
34	0.98±0.02			0.89±0.02		1861±251	0.91±0.02		1104±181
35	0.89±0.02	4.3±0.3		0.98±0.02			0.86±0.03	5.9±0.4	
36	0.98±0.00	6.4±0.3		N/A			0.95±0.02		
37	0.98±0.02			0.94±0.02		1753±304	0.96±0.02		
38	0.97±0.02			0.88±0.02		1961±274	0.85±0.02		1904±361
39	0.98±0.02			0.97±0.02			0.91±0.02		1158±294
40	0.90±0.02	1.4±0.3		0.93±0.02			0.94±0.02		
41	0.91±0.02			0.99±0.02			N/A		
42	0.95±0.02			N/A			N/A		
43	0.91±0.02			0.93±0.02			N/A		
44	0.90±0.02			N/A			0.87±0.02		
45	0.83±0.02			0.85±0.02			0.83±0.02		
46	0.95±0.02			0.94±0.02			0.93±0.02		
47	0.94±0.02			0.97±0.02			0.93±0.02		
48	0.90±0.02			0.97±0.02			0.93±0.02		
49	0.98±0.02			0.98±0.02			1.00±0.02		
50	0.99±0.02			N/A			0.98±0.02		
51	0.95±0.02		1891±322	N/A			0.91±0.02		1961±255

52	0.99±0.02			0.98±0.02			0.98±0.03		
53	0.98±0.02			N/A			N/A		
54	0.85±0.02		1810±271	0.94±0.02			0.84±0.02		1443±191
55	0.98±0.02			0.98±0.02			0.99±0.03		
56	0.87±0.02		88±21	N/A			0.88±0.02		89±34
58	0.98±0.02			0.98±0.02			0.98±0.03		
59	0.87±0.02		1906±290	0.82±0.02		1881±244	0.85±0.02		1968±286
60	0.94±0.02		1518±243	0.82±0.04	1.1±0.2	1630±305	0.85±0.02		1755±251
61	0.97±0.02			0.89±0.02		1902±288	0.99±0.02		
62	0.79±0.02	1.4±0.3		0.88±0.02			0.90±0.02		
63	0.98±0.02			0.99±0.02			0.94±0.02		
64	0.98±0.02			0.87±0.02		1769±320	0.98±0.02		
65	0.93±0.02			0.94±0.02			0.95±0.02		
66	0.93±0.02			0.99±0.02			0.82±0.03	2.4±0.3	
67	0.96±0.02		1821±345	0.89±0.02		1922±341	0.98±0.02		
68	0.91±0.02			0.88±0.02		68±20	N/A		
69	0.88±0.02		1877±309	0.99±0.02			0.98±0.02		
70	N/A			N/A			0.64±0.03		2062±233
71	0.88±0.02			0.88±0.02			0.87±0.02		
72	0.85±0.02	1.4±0.2		0.92±0.02			0.95±0.02		
73	0.98±0.02			0.98±0.02			0.92±0.03	3.7±0.3	
74	0.99±0.02			0.98±0.02			N/A		
75	0.98±0.02			0.76±0.04	3.5±0.3	1918±256	0.98±0.02		
76	0.98±0.02			N/A			0.98±0.03		
77	0.75±0.03		544±108	0.67±0.03		828±93	0.74±0.03		596±95
78	0.92±0.02		124±32	N/A			0.90±0.02		123±21
79	0.86±0.02	1.2±0.3		0.96±0.02			0.90±0.02		
80	0.77±0.02	1.7±0.3					0.90±0.02		
81	0.89±0.02			0.87±0.02			0.93±0.02		
82	0.92±0.02			0.97±0.02			0.92±0.02		
83	0.89±0.02		1806±255	0.98±0.02			0.89±0.03		1913±208
84	0.83±0.02	1.3±0.2		0.89±0.02			0.92±0.02		
85	0.73±0.02	2.4±0.3		0.84±0.02			0.84±0.02		
86	0.83±0.02			0.86±0.02		59±21	0.85±0.02		
87	0.98±0.02			N/A			0.99±0.04		
88	0.96±0.02	2.1±0.3		0.98±0.02			0.96±0.03	3.9±0.3	
89	0.96±0.02			0.91±0.02		852±129	0.90±0.02		
90	0.93±0.02			0.98±0.02			0.99±0.02		
91	0.85±0.02	3.4±0.3		0.85±0.02	4.2±0.3		N/A		
92	0.96±0.02			0.99±0.02			0.86±0.03	1.8±0.3	
93	0.87±0.02			0.88±0.02			0.84±0.03	1.9±0.3	
94	0.90±0.02			0.96±0.02			0.84±0.02		
96	0.85±0.02	5.6±0.3		0.87±0.02	6.2±0.3		0.92±0.03	11.1±0.4	
97	0.88±0.02			0.90±0.02			0.79±0.03	4.4±0.3	
98	0.98±0.02	2.3±0.3		0.98±0.00	3.9±0.3		0.98±0.00	6.8±0.3	
99	0.98±0.02			0.98±0.02			0.98±0.02		
100	0.99±0.02			0.99±0.02			0.99±0.02		
101	0.89±0.02			0.98±0.02			0.97±0.02		
102	0.99±0.02			0.98±0.02			0.98±0.02		
103	0.92±0.02			0.87±0.02	1.3±0.2		0.91±0.02		
104	0.86±0.02	1.6±0.3		0.93±0.02			0.85±0.03	1.6±0.3	
105	0.98±0.02			0.98±0.02			0.98±0.02		
106	0.93±0.02			N/A			N/A		
107	0.91±0.02			0.92±0.02		121±29	0.89±0.02		
108	0.86±0.02	1.8±0.3		0.95±0.02		1349±208	0.92±0.02		
109	0.98±0.02			0.98±0.02			0.98±0.02		

110	0.99±0.02			0.98±0.02			0.98±0.03		
111	0.83±0.02			0.95±0.02			0.91±0.02		1613±
112	0.98±0.02			N/A			N/A		
113	0.98±0.02			0.98±0.02			0.98±0.02		
114	1.00±0.02			0.91±0.02		1907±259	N/A		
115	0.94±0.02			0.97±0.02			0.98±0.02		
116	0.98±0.02			0.98±0.02			0.98±0.02		
117	0.89±0.02			0.89±0.02			0.89±0.02		
118	0.93±0.02			0.91±0.02	1.1±0.2		0.98±0.02		
119	1.00±0.02			N/A			0.91±0.03	1.9±0.3	
120	0.99±0.02			0.96±0.02			0.88±0.03	2.6±0.3	
121	0.98±0.02			0.99±0.02			0.92±0.02		
122	0.98±0.02			0.98±0.02			0.98±0.02		
123	0.99±0.02			0.98±0.02			0.99±0.03		
124	0.97±0.02			0.98±0.02			0.96±0.02		
125	0.92±0.02			0.85±0.02		1133±256	0.92±0.02		
126	0.87±0.02			0.89±0.02			0.88±0.02		
127	0.68±0.03		1017±344	0.61±0.03		1423±418	0.63±0.03		1413±377

Table S3 Exchange parameters derived from global fit analysis of ^{15}N relaxation dispersion curves obtained for [80% ^2H , 99% ^{15}N -labeled] WT and Q99A human I-BABP in 20 mM K-phosphate, 50 mM KCl, 0.05% NaN_3 , 10% D_2O , pH=6.3 at 283 K, 287 K, and 291 K. Parameters obtained for residues in cluster II in case of the wild-type protein are shown in blue.

Residue	WT				Q99A			
	T (K)	R_{ex} (Hz)	Φ (Hz ²)	$\Delta\omega$ (Hz)	T (K)	R_{ex} (Hz)	Φ (Hz ²)	$\Delta\omega$ (Hz)
E7	283	2.4±0.2	59±6	44±3	283			
	287	2.5±0.2	74±6		287			
	291	2.0±0.2	81±7		291			
E11	283	3.1±0.2	62±8	59±3	283			
	287	2.9±0.2	68±8		287			
	291	2.7±0.2	75±5		291			
N13	283	2.9±0.2	53±7	55±3	283			
	287	2.5±0.2	59±7		287			
	291	2.4±0.2	64±5		291			
F17	283	N/A	N/A	67±4	283			
	287	N/A	N/A		287			
	291	3.4±0.2	96±7		291			
K30	283	N/A	N/A	43±4	283			
	287	N/A	N/A		287			
	291	1.5±0.2	39±4		291			
K35	283	3.6±0.2	96±12	74±4	283			
	287	4.0±0.2	106±12		287			
	291	4.0±0.2	116±8		291			
I36	283	N/A	N/A	71±3	283			
	287	3.8±0.2	99±11		287			
	291	N/A	N/A		291			
T38	283	2.5±0.2	40±5	47±3	283			

	287	2.0±0.2	44±5		287			
	291	N/A	N/A		291			
E39	283	N/A	N/A	63±3	283			
	287	3.2±0.2	78±9		287			
	291	3.1±0.2	86±6		291			
	283	3.3±0.2	73±9		283			
V40	287	3.3±0.2	81±10	64±4	287			
	291	3.2±0.2	89±7		291			
	283	N/A	N/A		283			
H52	287	2.3±0.2	51±6	51±4	287			
	291	2.1±0.2	56±5		291			
	283	N/A	N/A		283			
Y53	287	2.4±0.2	54±7	52±4	287			
	291	N/A	N/A		291			
	283	3.5±0.2	85±11		283			
H57	287	3.7±0.2	94±11	69±4	287			
	291	3.6±0.2	103±8		291			
	283	3.6±0.3	89±11		283	1.1±0.2	41±4	37±3
T58	287	3.5±0.2	98±11	68±3	287	N/A	N/A	
	291	N/A	N/A		291	2.0±0.2	54±7	
	283	N/A	N/A		283			
M59	287	3.4±0.2	81±8	64±2	287			
	291	N/A	N/A		291			
	283	3.6±0.2	97±12		283	N/A	N/A	53±4
T60	287	4.1±0.2	108±12	74±4	287	N/A	N/A	
	291	4.0±0.2	118±8		291	2.6±0.3	110±10	
	283	3.4±0.2	82±10		283	2.5±0.3	64±8	46±5
N61	287	3.6±0.2	91±10	68±3	287	2.2±0.3	72±9	
	291	3.5±0.2	100±6		291	2.0±0.2	84±10	
	283	3.6±0.2	91±12		283	3.6±0.3	96±10	57±5
K62	287	3.9±0.3	101±12	72±5	287	3.6±0.2	109±11	
	291	3.8±0.2	111±9		291	3.3±0.3	126±13	
	283	2.3±0.2	36±5		283			
F63	287	1.8±0.2	40±5	45±3	287			
	291	1.7±0.2	44±4		291			
	283	N/A	N/A		283			
E68	287	N/A	N/A	75±5	287			
	291	5.4±0.3	234±19		291			
	283	N/A	N/A		283			
S69	287	2.5±0.2	74±6	44±3	287			
	291	N/A	N/A		291			
	283	N/A	N/A		283			
N70	287	N/A	N/A	55±3	287			
	291	2.9±	123±9		291			
	283	3.8±0.3	98±8		283	N/A	N/A	56±4
I71	287	4.0±0.3	122±9	57±3	287	N/A	N/A	
	291	3.2±0.2	134±9		291	2.9±0.2	122±11	
	283	3.1±0.2	78±6		283	3.3±0.3	87±9	54±4
Q72	287	3.3±0.2	98±6	51±2	287	3.0±0.3	99±9	
	291	2.6±0.2	107±7		291	2.7±0.2	115±10	
	283	14.4±0.2	677±49		283	8.3±0.3	271±27	95±7
T73	287	18.1±0.2	845±52	150±5	287	8.3±0.3	309±29	
	291	17.7±0.2	928±53		291	7.9±0.3	358±32	
	283	5.5±0.2	152±13		283			
M74	287	5.9±0.2	190±14	71±4	287			
	291	4.8±0.2	208±15		291			

T78	283	7.0±0.2	208±17	83±4		283	N/A	N/A	53±4
	287	7.8±0.2	260±18			287	3.2±0.3	96±9	
	291	6.5±0.2	285±19			291	2.6±0.2	111±10	
A81	283	5.0±0.2	137±11	68±3		283	N/A	N/A	52±4
	287	5.4±0.3	171±12			287	3.1±0.2	91±10	
	291	4.4±0.2	187±12			291	3.0±0.3	106±11	
T82	283	3.4±0.2	86±6	54±2		283	3.7±0.3	98±11	57±5
	287	3.6±0.2	107±7			287	3.4±0.3	112±12	
	291	2.8±0.2	118±7			291	3.1±0.2	129±13	
V83	283					283	N/A	N/A	62±4
	287					287	N/A	N/A	
	291					291	3.6±0.3	152±12	
G88	283	5.5±0.2	155±12	72±3		283	4.8±0.3	132±13	67±5
	287	6.0±0.3	193±13			287	4.4±0.3	151±14	
	291	4.9±0.2	212±13			291	4.1±0.3	175±16	
K89	283					283	N/A	N/A	54±4
	287					287	N/A	N/A	
	291					291	3.3±0.3	116±10	
L90	283	2.5±0.2	61±6	45±3		283			
	287	2.6±0.2	76±6			287			
	291	N/A	N/A			291			
V91	283	16.6±0.2	953±65	178±4		283	N/A	N/A	60±4
	287	21.8±0.2	1189±67			287	N/A	N/A	
	291	22.6±0.2	1305±67			291	3.4±0.3	144±12	
V92	283	N/A	N/A	46±3		283	4.6±0.3	129±13	66±5
	287	2.7±0.3	80±7			287	4.3±0.2	147±14	
	291	N/A	N/A			291	4.0±0.3	170±15	
N93	283	N/A	N/A	56±4		283			
	287	3.9±0.2	117±10			287			
	291	3.1±0.2	129±11			291			
F94	283	N/A	N/A	48±3		283			
	287	N/A	N/A			287			
	291	2.3±0.2	95±7			291			
N96	283	11.4±0.2	431±35	120±6		283			
	287	13.6±0.3	537±38			287			
	291	12.3±0.2	590±40			291			
Y97	283	6.6±0.2	193±16	80±4		283	5.3±0.3	152±13	71±4
	287	7.3±0.2	241±17			287	5.0±0.3	174±14	
	291	6.1±0.2	265±18			291	4.6±0.2	201±15	
H98	283	10.5±0.2	376±30	112±5		283	N/A	N/A	67±4
	287	12.3±0.2	469±32			287	4.4±0.3	151±12	
	291	11.0±0.2	515±33			291	4.1±0.2	174±13	
Q99/A99	283	6.2±0.2	179±15	77±4		283			
	287	6.8±0.2	223±16			287			
	291	5.6±0.2	245±17			291			
T100	283	5.3±0.2	147±11	70±3		283	9.6±0.3	331±29	105±6
	287	5.8±0.2	183±12			287	9.7±0.3	377±30	
	291	4.7±0.3	201±13			291	9.4±0.3	436±33	
S101	283	4.8±0.2	130±10	66±3		283	2.5±0.3	64±7	46±4
	287	5.2±0.2	162±11			287	2.3±0.3	73±8	
	291	4.2±0.2	177±12			291	2.0±0.2	85±8	
E102	283	3.3±0.2	84±7	53±3		283	2.4±0.3	61±6	45±3
	287	3.5±0.2	105±8			287	2.2±0.2	70±6	
	291	2.7±0.2	115±8			291	1.9±0.2	81±7	
G105	283	N/A	N/A	52±2		283			
	287	N/A	N/A			287			

	291	2.6±0.2	110±7			291			
V109	283	3.5±0.2	90±9	55±4		283			
	287	3.7±0.2	112±10			287			
	291	2.9±0.2	123±11			291			
E110	283	3.7±0.2	96±8	57±3		283			
	287	3.9±0.2	120±9			287			
	291	3.1±0.2	132±9			291			
V111	283					283	N/A	N/A	66±4
	287					287	N/A	N/A	
	291					291	4.0±0.3	172±13	
T113	283	2.2±0.2	54±5	43±3		283	2.0±0.2	51±5	41±3
	287	2.3±0.2	68±6			287	1.8±0.2	58±5	
	291	1.8±0.2	75±6			291	1.6±0.2	67±6	
G115	283	2.6±0.2	64±6	46±3		283			
	287	2.7±0.3	80±7			287			
	291	2.1±0.2	88±7			291			
Y119	283	3.1±0.3	78±8	51±4		283	N/A	N/A	57±4
	287	3.3±0.2	98±9			287	3.6±0.2	113±10	
	291	2.6±0.2	107±10			291	4.0±0.4	128±14	
R121	283	3.8±0.3	98±8	57±3		283	3.7±0.3	98±9	57±4
	287	4.0±0.3	122±9			287	N/A	N/A	
	291	N/A	N/A			291	N/A	N/A	
V122	283	N/A	N/A	55±2		283	N/A	N/A	58±4
	287	N/A	N/A			287	3.4±0.2	113±10	
	291	3.0±0.2	126±7			291	N/A	N/A	

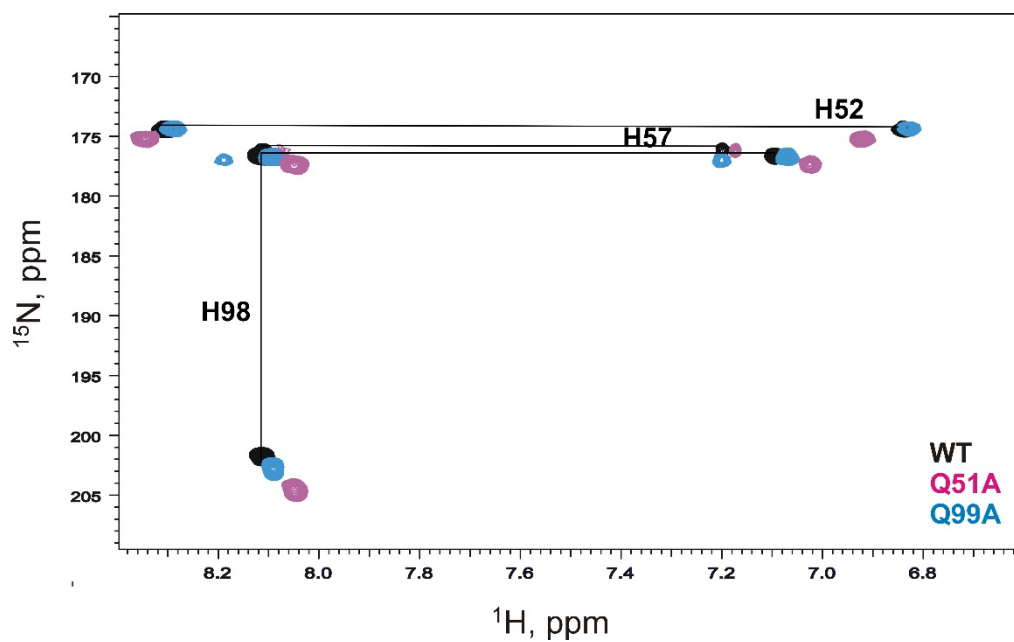


Figure S2. ^1H - ^{15}N long-range HSQC spectra of WT, Q51A, and Q99A *apo* human I-BABP at pH 6.3, 10 °C correlating histidine $^{15}\text{N}_{\delta 1}$ and $^{15}\text{N}_{\epsilon 2}$ chemical shifts with nonexchangeable C-H ring protons. The similar pattern of chemical shifts obtained for the three variants indicates no significant mutation-induced change in the tautomer equilibria of histidines.