

## CREATING MUTANT LIBRARY OF THE MAIZE $\beta$ -D-GLUCOSIDASE Zm-p60.1

Turek D.<sup>1</sup>, Filipi T.<sup>1,2</sup>, Mazura P.<sup>1</sup>, Brzobohatý B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Plant Molecular Biology, Institute of Biophysics AS CR, v.v.i. and Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> CEITEC – Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: [dusanturek@seznam.cz](mailto:dusanturek@seznam.cz)

### ABSTRACT

At the molecular level, plants use hormone systems to achieve an optimal inner environment for their development and growth. The concentration of plant hormones (like cytokinins) is maintained by enzymes. In our laboratory, we use the maize (*Zea mays*)  $\beta$ -D-glucosidase Zm-p60.1 that is involved in regulation of many important processes in plant growth and development. These processes can be changed slightly with mutated forms of Zm-p60.1. Protein engineering offers a means to create variants of this enzyme. These variants have changed substrate specificity towards either natural (*trans*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, *cis*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) or artificial substrates (*p*-nitrophenyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, 4-methylumbelliferyl *O*- $\beta$ -D-glucopyranoside). This work deals with generating a mutant library of Zm-p60.1. Based on the previous description of the mutant W373K and bioinformatics analysis of seven plant enzymes similar in sequence to Zm-p60.1 the position 373 was chosen as suitable for combinatorial amino acid mutations.

**Key words:**  $\beta$ -D-glucosidase, *E.coli* transformations, mutant library

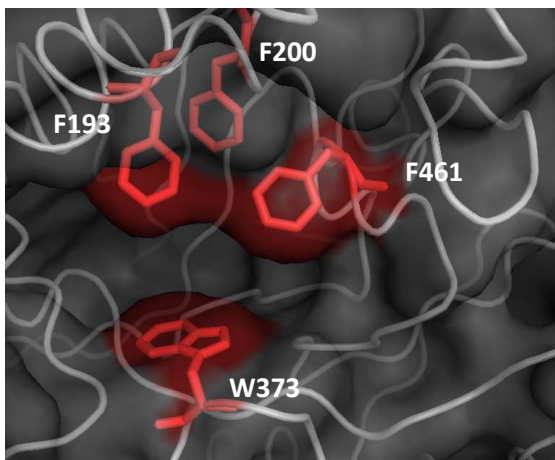
**Acknowledgement:** This project was supported by grant nos. LC06034 (Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), P305/11/P768 (to PM) from the Czech Science Foundation, AV050040507 and AV0Z50040702 from the Academy of Sciences of the Czech Republic. This work was supported by the project CEITEC – Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the ERDF.

Access to the MetaCentrum computing facilities provided under the program "Projects of Large Infrastructure for Research, Development, and Innovations" LM2010005, funded by the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic, is highly appreciated.

## ÚVOD

Hladiny aktivních hormonů (cytokininy) ovlivňují vývoj rostlin. Jedním z enzymů, který dokáže uvolňovat aktivní cytokininy z neaktivních forem, je  $\beta$ -D-glukosidasa Zm-p60.1. Různé mutantní varianty enzymu Zm-p60.1 mají odlišnou substrátovou specifitu vůči přírodním (*trans*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, *cis*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) či umělým (*p*-nitrophenol-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid) substrátům. A právě tyto mutantní varianty mohou na molekulární úrovni fungovat jako nástroje sloužící k jemným změnám rostlinného metabolismu.

Okolí aktivního centra  $\beta$ -D-glukosidasy obsahuje určité uspořádání aminokyselin (klastr), jež interaguje s aglykonem substrátu. Klastr se skládá z aminokyselin F193, F200, W373 a F461 (Dopitová et al, 2008) (Obr. 1). Prostorové uspořádání klastru bylo porovnáno s dalšími podobnými rostlinnými  $\beta$ -D-glukosidasami, přístupnými v databázi Carbohydrate-Active enZymes Database (CAZy, [www.cazy.org/](http://www.cazy.org/)) (Henrisat et al., 1997). Na základě již dříve charakterizovaného mutantu W373K a provedené strukturální analýzy byla vytvořena kombinatorická mutagenese enzymu Zm-p60.1 v pozici W373. Naším cílem je vytvořit mutantní knihovnu a následně charakterizovat mutanty vykazující aktivitu na umělých a přirozených substrátech.



Obr. 1 – Pohled do okolí aktivního centra enzymu Zm-p60.1. Červeně je vyznačen klastr aminokyselin zprostředkující klíčové interakce se substrátem.

## MATERIÁL A METODIKA

Bioinformatická analýza vycházela ze vzájemného porovnání struktur sedmi rostlinných  $\beta$ -D-glukosidas (Glycoside Hydrolase family 1 – GH1) a Zm-p60.1 pomocí programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.). Vlastní mutagenese byla provedena za použití kitu QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit. V původní DNA sekvenci pro Zm-p60.1 byl posunut čtecí rámec v pozici 373 (primer: 3'-gggagatacccttagtcctagatgtacatgggactcccg-5'). Takto vytvořený templát byl ověřen sekvenováním. Templát byl zmutován na pozici 373. Knihovna mutantů byla vytvořena jedním primerem o sekvenci 3'-gggagatacccttagtNNMtagatgtacatgggactcccg-5'. Po PCR reakci byla ve směsi specificky rozštěpena methylovaná templátová DNA. Mutované templáty byly do chemokompetentních *E.coli* XJb. Kolonie byly selektovány na agarových miskách obohacených o ampicilin a chromogenní substrát 5-bromo-4-chloro-idolyl-O- $\beta$ -D-glukopyranosidem (XGlcP).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Ze strukturního srovnání sedmi rostlinných  $\beta$ -D-glukosidas GH1 rodiny se Zm-p60.1 vyplývá, že aminokyseliny na pozicích 193, 200 a 461 v klastru jsou variabilní. Tryptofan odpovídající pozici 373 v Zm-p60.1 je u všech enzymů jak strukturně tak sekvenčně zachován (*Tab. 1*).

Organismus	PDB ID:	Pozice aminokyseliny			
<i>Zea mays</i>	1hxj	<b>F 193</b>	<b>F 200</b>	<b>W 373</b>	<b>F 461</b>
<i>Sorghum bicolor</i>	1v02	V 196	L 203	W 376	S 462
<i>Triticum aestivum</i>	2dga	F 198	H 205	W 379	S 464
<i>Secale cereale</i>	3aiu	F 198	H 205	W 379	G 464
<i>Sinapis alba</i>	1e4m	R 194	D 201	-	N 466
<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>	3gno	Q 185	Q 192	W 366	A 453
<i>Trifolium repens</i>	1cbg	N 190	F 197	W 369	D 455
<i>Rauwolfia serpentina</i>	2jf7	N 214	F 221	W 388	N 474

*Tab. 1* Soupis rostlinných  $\beta$ -D-glukosidas z GH1 rodiny. Aminokyseliny a odpovídající pozice v řetězci jsou vztáhnuty vzhledem ke klastru v Zm-p60.1 (červeně).

Na pozici 373 lze vytvořit 18 z 20 možných aminokyselin pomocí jednoho speciálně navrženého primeru. V sekvenci primeru je kodon s degenerací NNM, jež ale nepokrývá aminokyseliny methionin a tryptofan. Tryptofan se nachází v této pozici přirozeně. Odstraněním tryptofanu z knihovny mutantů je zabráněno vzniku původní formě enzymu. Na základě počtu genetických variant, jichž je 32, a Poissonova rozdělení lze odhadnout minimální velikost knihovny (počet kolonií určených k sekvenování) tak, aby výběr kolonií statisticky pokryl z 95% všech 32 genetických variant. Velikost knihovny byla určena dle vztahu (Patrick et al., 2003):

$$L = -V \ln\left(\frac{\ln p}{V}\right)$$

kde  $p$  – pravděpodobnost s jakou chceme pokrýt všechny varianty (0,95),

$V$  – velikost knihovny (32),  $L$  – výsledná velikost knihovny.

Ze zvolených parametrů činí vypočítaná velikost knihovny 206 kolonií. Jedním z klíčových kroků tvorby knihovny je přenos mutantní DNA směsi (po provedení PCR) do chemokompetentních *E.coli*. Tento krok se ukázal v našem případě kritickým. Z teoretického rozboru je známo, že požadovaná minimální velikost knihovny je 206 kolonií. Doposud se povedlo získat celkem 19 kolonií. Je předpokládáno, že nízká výtěžnost je způsobena především špatným nasedáním primeru na DNA templát. Samotná degenerace zavedená kodonem NNM v primeru pravděpodobně způsobuje nepříliš dobrou hybridizaci s templátem, a tím se tedy snižuje možnost vzniku mutované DNA. Celý proces tvorby knihovny lze usnadnit navržením i druhého komplementárního primeru, což je předmětem současného řešení problému. Dalším limitujícím bodem je samotný DNA templát a schopnost bakterií přijímat tuto DNA. Kombinatorická knihovna byla vytvořena z DNA templátu, který má posunutý čtecí rámeček  $\beta$ -D-glukosidasy v pozici 373. Templát nese označení W373\_DEL. Porovnáním transformační účinnosti (počet kolonií na  $\mu\text{g}$  použité DNA) použité mezi DNA (WT = Zm-p60.1) a W373\_DEL byl nalezen výrazný rozdíl (Tab. 2). Templát W373\_DEL, použitý při PCR reakci, přijímá kmen *E.coli* XJb daleko hůře než WT. Jednou z nejpravděpodobnějších příčin je, že delece (pouze jedné báze) pozměnila nativní konformaci DNA W373\_DEL natolik, že do *E.coli* hůře proniká. Aby DNA lépe pronikala do *E.coli*, nabízí se možnost změnit faktory, které ovlivňují schopnost kompetence *E.coli*. Jedním z faktorů je teplota růstu či složení média. Doposud byl vyzkoušen vliv teploty, kdy kultivace probíhala při nižší teplotě (30°C a 25°C) vůči standardu (37°C). Snižování teploty růstu bakterií vedlo ke zvýšení kompetence, která však byla nestejněměrná pro WT (47x vyšší kompetence) a W373\_DEL (3,8x vyšší kompetence). Efektivita transformační účinnosti expresního kmene *E.coli* XJb byla porovnána s DH5 $\alpha$ , což je kmen upraven speciálně pro klonovací účely. DH5 $\alpha$  mají řádově vyšší transformační účinnost, nicméně nejsou ideální pro vyhledávání aminokyselिनových variant v knihovně. V DH5 $\alpha$  totiž neprobíhá příliš velká exprese proteinu.

Následujícím krokem bude vyzkoušení dalšího faktoru (složení média) vedoucí ke zvýšení přijímání mutované DNA z PCR reakcí. Popřípadě přejít z transformace na elektrotransformaci, kde je obecně vyšší výtěžnost, ale i náročnější přístrojové vybavení.

Kmen <i>E.coli</i> - druh DNA	Počet kolonií / µg DNA		
	37°C	30°C	25°C
XJb - WT	2 500	3 600	170 000
XJb - W373_DEL	1 500	1 500	5 800
DH5α - WT	-	-	9 000 000

Tab. 2 Porovnání transformační účinnosti *E.coli* kmenů XJb a DH5α kultivovaných za různých podmínek (teplota 37°C, 30°C a 25°C). Pro transformaci byla použita různá DNA (WT, W373\_DEL).

## ZÁVĚR

Cílem této práce je vytvořit a charakterizovat kombinatorickou knihovnu Zm-p60.1 mutovaného ve vybrané pozici 373. Aby byly pokryty s 95% pravděpodobností všechny genetické varianty (celkem 32), musí knihovna obsahovat po transformaci mutované DNA minimálně 206 kolonií. V současné době bylo získáno 19 kolonií. Malá výtěžnost se vysvětluje špatnou hybridizací jednoho mutantního primeru na templát DNA při PCR reakci. Snaha vyřešit tento problém je zaměřena na navržení druhého komplementárního primeru, což by mělo vést ke zvýšení počtu mutantních DNA po PCR reakci. Dalším krokem je optimalizace přípravy chemokompetentního kmene *E.coli* XJb použitého při transformaci mutantní DNA knihovny. V současné době se podařilo snížením kultivační teploty zvýšit transformační účinnost 48x v případě WT DNA a 3,8x v případě templátové DNA (W373\_DEL). Dalším krokem může být přechod na elektrotransformaci ze současné teplotní transformace teplotním šokem.

## LITERATURA

- Dopitová R., et al (2008): Functional analysis of the aglycone-binding site of the maize  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1. FEBS J., 275:6123-6135
- Henrissat B., Davies G. J, (1997): Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. CURR. OP. STRUCT. BIOL., 7:637-644
- Patrick M. W., et al (2003): User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. PROTEIN ENGINEERING, 16: 451-457