

## MAIZE $\beta$ -GLUCOSIDASE ZM-P60.1 AND ITS MUTANT FORMS: OPTIMISATION OF PURIFICATION PROCEDURE

### OPTIMALISACE PURIFIKACE KUKUŘIČNÉ $\beta$ -GLUKOSIDASY A JEJÍCH MUTANTNÍCH FOREM

**Filipi T., Brzobohatý B.**

Ústav Molekulární biologie a radiobiologie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: [filipi@biomed.cas.cz](mailto:filipi@biomed.cas.cz), [brzoboha@ibp.cas.cz](mailto:brzoboha@ibp.cas.cz)

---

#### ABSTRACT

$\beta$ -Glucosidases serve different roles in planta and indeed we find that plants have several different groups of this enzyme. Some of them can release active zeatin from zeatin-O-glucoside, a cytokinin conjugate thought to be the transport or storage form. One such enzyme is Zm-p60.1 from *Zea mays*. We have over-expressed the cDNA encoding Zm-p60.1 in *E. coli* and subsequently purified the recombinant protein using a purification procedure (Zouhar et al., 1999, Verdoucq et al., 2003) which uses a phosphate buffer system, imidazole as eluent. This procedure has been successfully applied to purify the native protein, but attempts to purify His-tagged mutants were not successful. The presence of glycerol (a protection agent) in the elution solutions causes precipitation of some mutants, and protein denaturation occurred during hydrophobic column chromatography. We therefore had to completely revise the purification protocol. For purification of recombinant enzyme and its histidine mutant forms, we now use an improved, two-step purification procedure. This makes use of affinity chromatography containing Ni<sup>2+</sup> as affinity ligand (HisTrap) with a Tris/NaCl/imidazole/EDTA buffer system, without any glycerol. The imidazole used here is not part of elution buffer but is a component of the equilibration and column washing buffers (the column is washed to remove unbound chemical agents). The bound enzyme is then eluted with a high ionic strength EDTA buffer. Subsequently, enzyme fractions are pooled and the volume reduced to 1.5 ml. The second purification step is gel filtration chromatography (HiLoad 16/60 Superdex 200) with a Tris/NaCl buffer system. Using this improved two-step purification yields the enzyme with high homogeneity. This procedure is therefore well-suited for the purification of the histidine mutant H137D, other mutants like W373K, E186Q, F200K and H137Q as well as for the wild-type recombinant enzyme. This procedure has been used to purify the mutant form P2, which has proved very difficult to purify previously.

**Key words:** optimization, purification, Zm-p60.1, mutant form, 2007

## ÚVOD

### 1.1 $\beta$ -Glukosidasy (EC 3.2.1.21)

$\beta$ -Glukosidasy (EC 3.2.1.21) lze nalézt jak v prokaryotických, tak i v eukaryotických organismech. Tyto enzymy katalyzují hydrolysu glykosidové vazby v *N*-, nebo *O*-glukosidech. V jednoděložných rostlinách jsou tyto enzymy lokalizovány v plastidech, u dvouděložných v buněčných stěnách.

$\beta$ -glukosidasy se v rostlinách účastní různých fyziologických dějů – odpovědi na stresové faktory, hydrolysy kyanogenních glykosidů (ochrana proti živočišnému žíru), atd. Velmi důležitou skupinu tvoří glukosidasy, které jsou schopny hydrolyzovat monosacharidové glukosidy obsahující jako aglykonovou složku cytokininy, čímž ovlivňují koncentraci volného a v *N*-glukosidu, či *O*-glukosidu vázaného fytohormonu. Tyto glukosidy představují inaktivní, nebo méně metabolicky aktivní formu fytohormonu, nejčastěji však formu transportní, nebo zásobní.

V naší laboratoři byl exprimován heterogenní kukuřičný protein Zm-p60.1, pojmenovaný dle příslušné cDNA, fúsováný s hexahistidinovou doménou na *N*-konci proteinu, která umožňuje purifikaci metodou afinitní chromatografie. Protein Zm-p60.1 je schopen štěpit zeatin-*O*-glukosid a *N*3-glukosidy (Zouhar et al., 1999). Řízenou mutagenesí aminokyselin v aktivním centru enzymu byly připraveny různé mutanty, např. H137D, H137Q, F200K, W373K, P2, E186Q, atd., které umožňují studovat interakci substát-enzym (Mazura, 2004).

### 1.2 Purifikace

(Esen, 1992) provedl purifikaci kukuřičné  $\beta$ -glukosidasy z koleoptilí 6denních semenáčků metodou katexové chromatografie Accell-CM. Kolona byla ekvilibrována roztokem NaAc (50 mM; pH 4,6). Navázaný protein byl eluován pH gradientem roztoku 50mM NaAC v rozmezí 4,8 – 6,8. Získané frakce obsahující podíly enzymu byly spojeny a dialyticky odsoleny oproti roztoku NaAC (10 mM; pH 5,0).

(Zouhar et al., 1999) testoval řadu purifikačních procedur vedoucí k izolaci (His)<sub>6</sub>Zm-p60.r proteinu jak za nativních, tak i denaturačních podmínek. Nativní purifikace byla provedena metodou afinitní chromatografie pomocí kolony PORCOS MC/M, (nabitá buď Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, nebo Zn<sup>2+</sup> – byly testovány různé afinity proteinu k matrixu). Kolona byla ekvilibrována pufrem A obsahující Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM), NaCl (1 M), pH 7. Následně byl nanesen vzorek a kolona byla promývána pufrem A. Kolona dále byla promyta směsí pufru A a B s lineárním gradientem imidazolu 0 – 50 mM. Enzym byl následně eluován pufrem obsahující EDTA (0,1 M), NaCl (1 M).

Purifikace na koloně Sepharose NTA-Ni<sup>2+</sup> Superflow Matrix byla provedena za pomoci pufru A.

(Rotrelkl et al., 1999) provedl purifikaci Zm-p60.1 a některých mutantů jedнокrokovou purifikační procedurou pomocí kolony Sepharose nitrilotriacetic acid/Ni<sup>2+</sup> Superflow.

(Cicek et al., 2000) provedl purifikaci rekombinantní  $\beta$ -glukosidasy Glu1, která nebyla fusovaná s afinitním tagem. Bakteriální lysát byl satureován síranem amonným a neprecipitovaný roztok obsahující  $\beta$ -glukosidasu byl purifikován metodou hydrofobní chromatografie.

Verdoucq et al. (2003) provedl v roce 2003 purifikaci rekombinantní kukuřičné  $\beta$ -glukosidasy fusované s hexahistidinovou kotvou. Získaný bakteriální lysát obsahující  $\beta$ -glukosidasu byl purifikován metodou afinitní chromatografie na koloně His-Bind (Novagen). Kolona byla ekvilibrována pufrům obsahující NaCl (300 mM), fosforečnan sodný (50 mM) a imidazol (20 mM), pH 8,0. Enzym byl eluován pufrům obsahující NaCl (300 mM), fosforečnan sodný (50 mM), imidazol (250 mM), pH 8,0. K purifikovanému proteinu byl přidán síran amonný (výsledná koncentrace síranu amonného v roztoku činila 1 M). Protein byl za pomoci FPLC a hydrofobní kolony HiTrap Phenyl-HP (Amersham Biosciences) purifikován lineárním gradientem síranu amonného (0,8 M – 0,2 M (pH 7,0)). Čistota proteinu byla ověřena SDS-PAGE.

## MATERIÁL A METODIKA

### 2.1 Chemikálie:

Glukosa, Cellobiosa, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ampicilin, chloramfenikol, ddH<sub>2</sub>O, Tris, EDTA, LB medium, NiSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, imidazol, glycerol, etanol, NaCl, amonium persulfát, laurylsíran sodný, Rohtiphorese 30, HCl, TEMED, proteinový marker (roztok rekombinantních makrerů pro SDS-PAGE), Triton X100.

### 2.2 Bakteriální kmen:

*E. coli* BL21(DE3)pLysS [F<sup>-</sup> *ompT* [dcm] [lon] *hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>)*, with DE3,  $\lambda$  profage carrying T7 RNA polymerase gene]

### 2.3 Kolony:

Kolona: HisTrap affinity column

Matrix: Highly cross-linked spherical agarose, 6%

Amerge particle size: 34  $\mu\text{m}$

Binding ion:  $\text{Ni}^{2+}$  [kolona „nabíjena“  $\text{NiSO}_4$  (50mM)]

Column volume (CV): 5 ml

Kolona: HiLoad 16/60 Superdex prep grade

Matrix: Dextran covalently bound to highly cross-linked agarose

Mean particle size: 34  $\mu\text{m}$

Column volume (CV): 124 ml

### 2.4 Přístrojové vybavení a další vybavení

Membrána Minisart s velikostí pórů 0,20  $\mu\text{m}$  (Sartorius, DE), Amicon Ultra - 15, Ultracel 10k; Regenerated cellulose 10,000 MWCO (Millipore, USA), Amicon Ultra - 4, Ultracel 10k; Regenerated cellulose 10,000 MWCO (Millipore, USA), Centrifuga Beckman, Kapalinový chromatograf ÄKTA FPLC

## VÝSLEDKY A DISKUZE

### 3.1 Expres proteinu:

*E. coli* zamražené v glycerolu (10%) byly zaočkovány do LB media doplněného fosfátovým pufrům (pH 7), ampicilinem, chloramfenikolem, glukosou a cellobiosou. Výsledný objem roztoku byl 1000 ml.

- 1) Buňky byly separovány centrifugací a zamraženy v sonikačním pufru. Sonikační pufr: Tris.HCl (20mM; pH 7,9) + NaCl (0,5M) + Triton X100 (w/v 1%)
- 2) Na ledu rozmražené buňky byly desintegrovány sonikací.

Suspenze byla zcentrifugována a supernatant byl přefiltrován přes hydrofilní membránu Minisart s velikostí pórů 0,20  $\mu\text{m}$  (Sartorius, DE).

### 3.2 Tříkroková purifikační procedura

Vyvíjená purifikační procedura sledovala několik kritérií – minimalisaci počtu purifikačních kroků, revisi systému pufrů, maximalisaci účinnosti purifikační procedury. Všechny purifikace byly realizovány pomocí chromatografu ÄKTA FPLC.

Jako první byl testován tříkrokový purifikační systém – afinitní chromatografie HisTrap Ni<sup>2+</sup>, hydrofobní chromatografie HiLoad Phenyl HP a gelová chromatografie HiLoad 16/60 Superdex 200. Jako protektiva, přidávané k enzymatickým preparátům bývají často polyoly, nebo glycerol, které enzymy stabilisují a chrání je před degradací, proto bylo rozhodnuto, že glycerol bude součástí elučního pufru při afinitní chromatografii.

#### 1) Afinitní chromatografie HisTrap Ni<sup>2+</sup>

##### *Pufry*

A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM), NaCl (1 M), pH 7,9

B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM), NaCl (1 M), imidazol (50 mM), glycerol (v/w = 10 %), pH 7,9

Kolona byla ekvilibrována 5 CV pufrem A. Poté byl na kolonu nanesen přefiltrovaný bakteriální lysát. Enzym byl eluován 5 CV pufru B. Frakce, obsahující enzym (většinou se jednalo o 4x1,5 ml) byly spojeny purifikovány metodou hydrofobní chromatografie.

#### 2) Hydrofobní chromatografie HiLoad Phenyl HP

##### *Pufry*

A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (s různou koncentrací) pH 7,9

B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM)

Roztok obsahující  $\beta$ -glukosidasu Zm-p60.1 byl saturován pevným síranem amonným na požadovanou koncentraci (1M, 0,8 M nebo 0,5 M). Této koncentraci odpovídala i koncentrace síranu amonného v pufru B. Kolona byla ekvilibrována 2 CV pufrem A. Poté byl nanesen vzorek a eluován 2 CV směsí pufru A a B s lineárním gradientem síranu amonného. Ani při jedné z testovaných počátečních koncentrací síranu amonného nebylo možné enzym na koloně zachytit a z kolony vycházel již s čelem a v denaturovaném stavu. Po několika neúspěšných opakováních bylo rozhodnuto, že purifikace metodou hydrofobní chromatografie bude vynechána.

### 3.3 Dvou kroková purifikační procedura

Při afinitní chromatografii byl použit pufrací systém shodný se systémem tříkrokové procedury (viz. 3.2). Poté byla aplikována gelová filtrace. Před užitím této metody je nutné spojené frakce obsahující enzym redukovat na min. 2 ml. Při zkoncentrování frakcí na Amicon Ultra - 15, Ultracel 10k; Regenerated celULOse 10,000 MWCO (Millipore, USA) s enzymem Zm-p60.1 – wild-type nenastával žádný problém. Zcela odlišně se chovaly Zm-p60.1 – H137D a H137Q, které z roztoku zcela vyprecipitovaly, což bylo potvrzeno následnou gelovou filtrací a SDS-PAGE. Příčinou precipitace těchto dvou mutant se ukázala přítomnost glycerolu v pufru B používaného při afinitní chromatografii.

### 3.4 Optimalisovaná dvou kroková purifikační procedura

Vzhledem k faktu, že během realizace experimentů vzešel požadavek na změnu složení pufrů, které musely být zcela prosté fosfátu (důvodem jsou další studie enzymů), bylo rozhodnuto o přechodu na Tris base. Optimalisovaná procedura také částečně vychází z práce (Zouhara et al., 1999). Uvedená purifikační rutina je vhodná nejen k purifikaci Zm-p60.1, ale i mutantních forem W373K, F200K, E186Q, H137D, H137Q, ale i do té doby velmi obtížně purifikovatelné mutanty P2. Čistota proteinů byla hodnocena po každém purifikačním kroku metodou SDS-PAGE a nativního PAGE. Z SDS-PAGE jasně vyplývá, že po nanesení vzorku, které je následováno promýváním kolony pufrů A1 a B s daným gradientem imidazolu, dochází výraznému odmytí nespecificky navázaných proteinů, jsou získány relativně čisté frakce obsahující separovaný enzymu (*Obr. 3*). Gelovou filtrací je pak obdržen homogenní protein (viz *Obr.2, Obr. 4*).

#### 1) Afinitní chromatografie:

##### *Pufry*

A1: Tris (20 mM) + NaCl (1 M), pH roztoku bylo upraveno na 7,9 (použita 5M HCl)

B: Tris (20 mM) + NaCl (1 M) + imidazol (50mM), pH roztoku bylo upraveno na 7,9 (použita 5M HCl)

A2: Tris (20 mM) + NaCl (1 M) + EDTA (100 mM), pH roztoku bylo upraveno na 7,9 (použita 5M HCl)

Rychlost eluce: 3,0 ml.min<sup>-1</sup>

Objem sbíraných frakcí: 1,5 ml

### *Průběh purifikace*

Kolona byla ekvilibrována 5 CV směsí pufru A1 a B, při stálém 40% gradientu imidazolu. Posléze byl na kolonu nanesen vzorek. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 1 CV směsí pufru A1 a B (40% gradient imidazolu) a poté 3 CV směsí pufru A1 a B (gradient 40% → 100% imidazol). K eluci enzymu byl použit pufr A2 (5 CV). Frakce byly sbírány po 1,5 ml. Frakce byly spojeny v 1 podíl, který byl zkoncentrován přes Amicon Ultra - 15, Ultracel 10k; Regenerated cellulose 10,000 MWCO (Millipore, USA) na objem 1,5 ml a purifikován metodou gelové fitrace.

## 2) Gelová chromatografie

### *Pufr*

A: Tris (50mM) + NaCl (1M), pH roztoku je upraveno na 7,0 (použita konc. HCl)

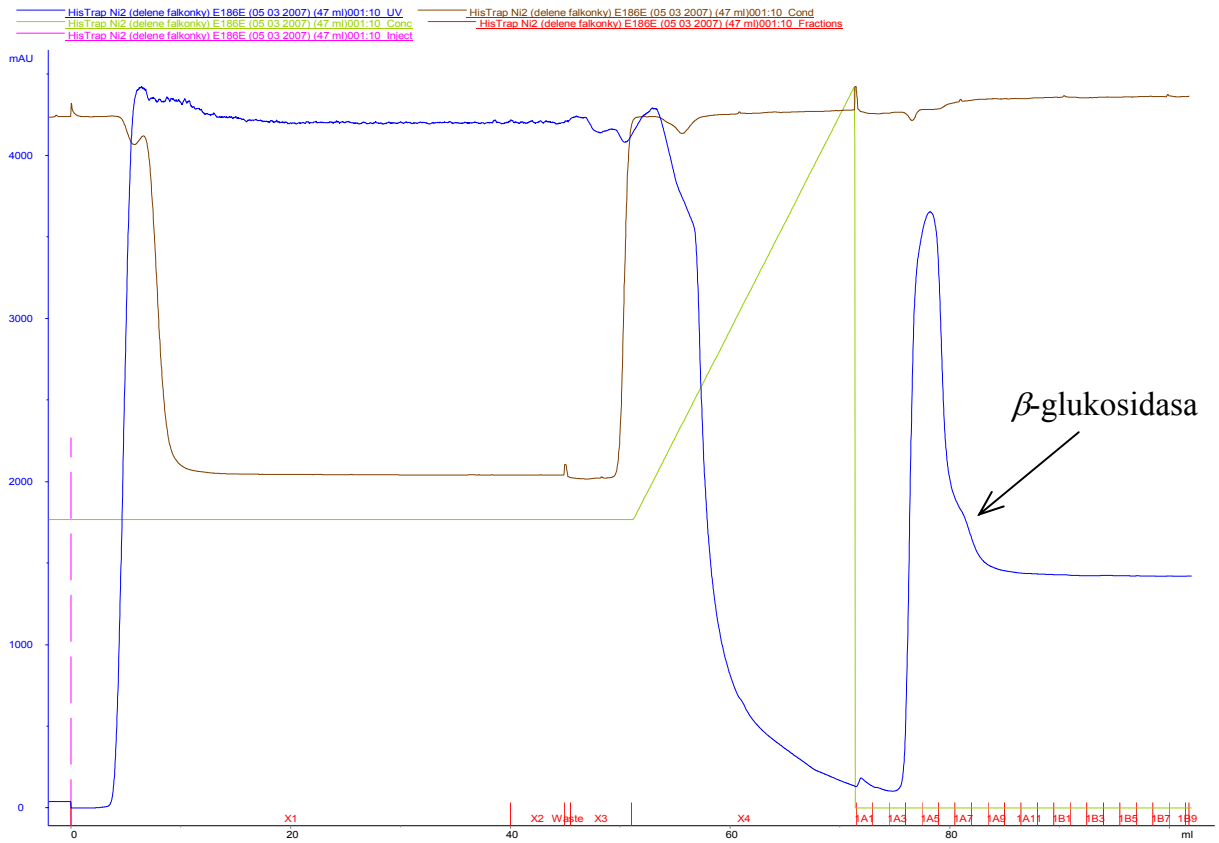
Rychlost eluce: 1,0 ml.min<sup>-1</sup>

Objem sbíraných frakcí: 1,5 ml

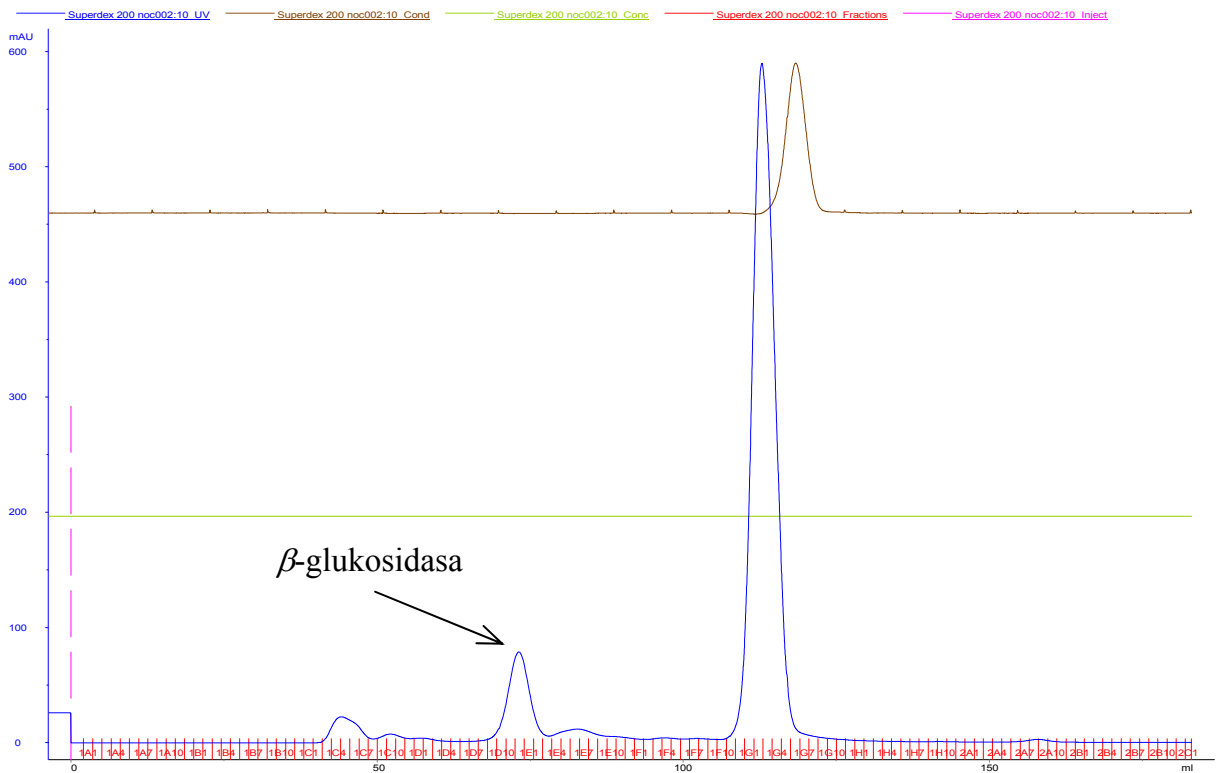
### *Průběh purifikace*

Kolona byla ekvilibrována 2 CV pufrům A. Na kolonu bylo nanášeno 1,5 ml zkoncentrovaného vzorku. Enzym byl eluován pufrům A1 (1,5 CV). Frakce obsahující enzym byly spojeny v jeden podíl (červeně), který byl pomocí Amicon Ultra - 4, Ultracel 10k; Regenerated cellulose 10,000 MWCO (Millipore, USA) zkoncentrován na objem cca 120 µl.

Obr. 1 Chromatogram z purifikace Zm-p60.1-W373K – afinitní chromatografie

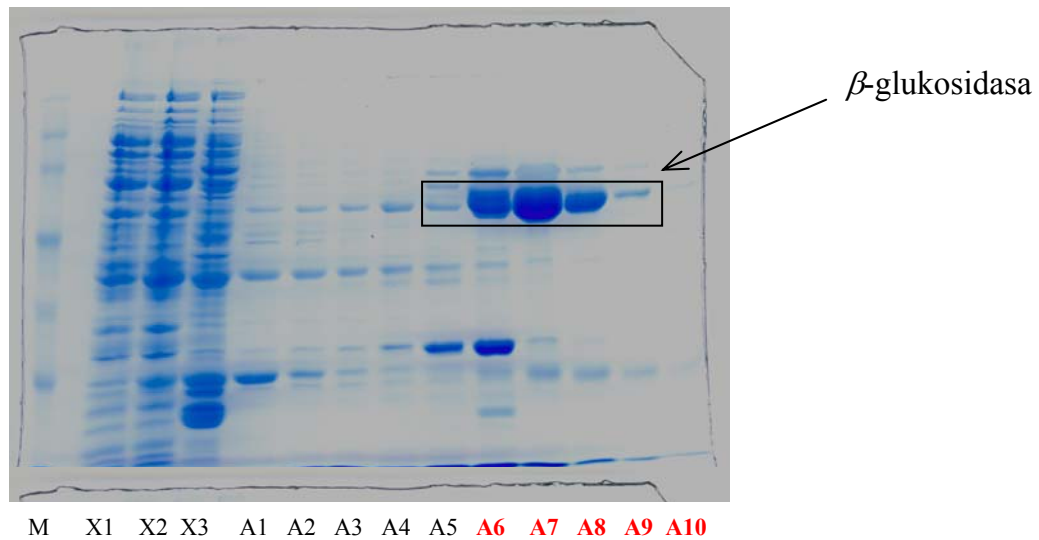


Obr. 2 Chromatogram z purifikace Zm-p60.1-W373K – gelová filtrace





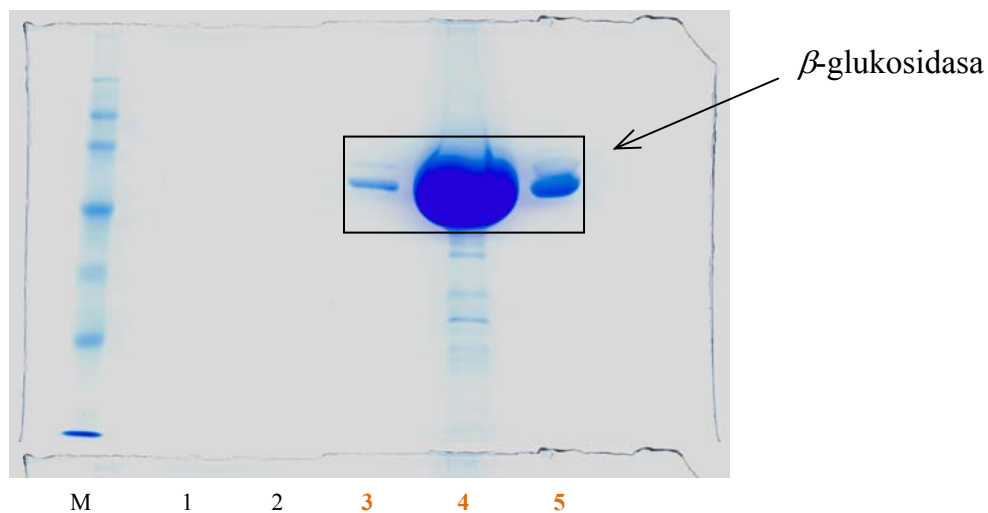
Obr. 3 SDS-PAGE Zm-p60.1-W373K – afinitní chromatografie



M - marker

Frakce **A6**, **A7**, **A8**, **A9**, **A10** byly spojeny, zkoncentrovány na 1,5 ml a naneseny na Superdex 200.

Obr. 4 SDS-PAGE Zm-p60.1-W373K – afinitní chromatografie



- 1 – Prošlo membránovou filtrací po HisTrap (ze spojených frakcí **A6**, **A7**, **A8**, **A9**, **A10**)
- 2 – Prošlo membránovou filtrací po Superdex (ze spojených frakcí **D9**, **D10**, **D11**, **D12**, **E1**)
- 3 – 25x zředěný původně zkoncentrovaný podíl z frakcí **D9**, **D10**, **D11**, **D12**, **E1**
- 4 – Zkoncentrovaný podíl z frakcí **D9**, **D10**, **D11**, **D12**, **E1**
- 5 – 15x zředěný původně zkoncentrovaný podíl z frakcí **D9**, **D10**, **D11**, **D12**, **E1**
- M – Marker

(Během zakoncentrování spojených podílů frakcí nebyla ve filtrátu pozorována přítomnost  $\beta$ -glukosidasy)

## ZÁVĚR

Optimalisovaná procedura purifikace je vhodná nejen pro kukuřičnou  $\beta$ -glukosidasu Zm-p60.1, ale i pro její mutantní formy E186Q, W373K, H137D, H137Q, F200K. Mj. se osvědčila při purifikaci mutanty P2, která byla do té doby běžně používanými postupy purifikovatelná velmi obtížně.

## LITERATURA

Esen A., 1992. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.)  $\beta$ -glucosidase. *Plant Physiol.*, 98: 174 – 182.

Rotrelk V., Nejedlá E., Kučera I., Abdallah F., Palme K., Brzobohatý B., 1999. The role of cysteine residues in structure and enzyme activity of maize  $\beta$ -glucosidase. *Eur. J. Biochem.*, 266: 1056 – 1065.

Zouhar J., Nanak E., Brzobohatý B., 1999. Expression, single-step purification, and matrix-assisted refolding of a maize cytokinin glucoside-specific  $\beta$ -glucosidase. *Protein. Expres. Purif.*, 17: 153 – 162.

Cicek M., Blanchard D., Bevan D. R., Esen A., 2000. The Aglycone Specificity-determining sites are different in 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (Maize  $\beta$ -glucosidase) and Dhurrinase (Sorghum  $\beta$ -glucosidase). *J. Biol. Chem.*, 275: 20002 – 20011.

Verdoucq L., Czjzek M., Moriniere J., Bevan D. R., Esen A., 2003. Mutational and structural analysis of aglycone specificity in maize and sorghum  $\beta$ -glucosidases. *J. Biol. Chem.*, 278: 25055 – 25062.

Mazura P., 2004. Studium funkční architektury katalytického centra kukuřičné  $\beta$ -glukosidasy Zm-p60.1. Diplomová práce, Masarykova univerzita v Brně.