

# IMPROVED METHOD FOR DIRECTED ENZYME EVOLUTION

## VYLEPŠENÁ METODA PRO ŘÍZENOU EVOLUCI ENZYMŮ

Mazura P.,<sup>1</sup> Brzobohatý B.,<sup>1</sup> Janda L.,<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav molekulární biologie a radiobiologie, Pracoviště molekulární biologie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

<sup>2</sup>Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Masarykova univerzita, Kampus Bohunice, Kamenice 3, 625 00 Brno, Česká republika

E-mail: mazura@sci.muni.cz, brzobo@ibp.cz

---

### ABSTRACT

In plants,  $\beta$ -glucosidases have been implicated in regulating several aspects of development, including phytohormone activation, degradation of endosperm cell wall during germination, and pathogen defense.  $\beta$ -glucosidases are a widespread group of enzymes that hydrolyze a broad variety of glucosides including aryl- and alkyl- $\beta$ -D-glucosides.

The maize  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1 is important for the regulation of plant development through its role in the targeted release of free cytokinins from cytokinin-O-glucosides, their inactive storage forms.

For research focused on  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1 substrate specificity we needed a procedure proving structure stability of the enzyme during mutagenesis. We developed a directed mutagenesis assay using a system comprising specially designed multi degenerated primers and direct screening of colonies containing positive mutations. This method performed in cycles is a suitable tool for directed evolution of enzymes concretely  $\beta$ -glucosidases in this particular setup.

**Key words:** Directed Enzyme Evolution, Directed mutagenesis,  $\beta$ -glucosidase, QuikChange<sup>®</sup> Multi Site-Directed Mutagenesis, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, X-Glu

### ABSTRAKT

Rostlinné  $\beta$ -glukozidázy jsou zodpovědné za regulaci rozličných aspektů vývoje zahrnujících aktivaci fytohormonů, degradace stěn endospermálních buněk během klíčení a obranu proti patogenům.  $\beta$ -glukozidázy jsou široce rozšířená skupina enzymů hydrolyzujících rozmanité druhy glukozidů včetně aryl- a alkyl- $\beta$ -D-glukozidů.

Kukuřičná  $\beta$ -glukozidáza Zm-p60.1 je důležitá pro regulaci vývoje rostlin pro svou schopnost cíleného uvolňování cytokininů z neaktivních forem cytokinin-O-glukozidů.

Pro náš výzkum zaměřený na substrátovou specifitu  $\beta$ -glukozidázy Zm-p60.1 bylo zapotřebí metody ověřující strukturní stabilitu tohoto enzymu v průběhu mutageneze. Vyvinuli jsme metodu řízené mutageneze obsahující speciálně navržené vícenásobně degenerované primery a přímý skrining kolonií nesoucích pozitivní mutace. Tato metoda prováděná v opakovaných krocích je vhodným nástrojem pro řízenou evoluci enzymů v tomto uspořádání  $\beta$ -glukozidáz.

**Klíčová slova:** řízená evoluce enzymů, řízená mutageneze,  $\beta$ -glukozidáza, QuikChange<sup>®</sup> Multi Site-Directed Mutagenesis, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucopyranosid, X-Glu

## ÚVOD

$\beta$ -D-glukozid- $\beta$ -D-glukohydrolázy (EC 3.2.1.21) patří do rodiny glykozid hydroláz GH1 klanu GH-A. Je to široce rozšířená skupina enzymů hydrolyzujících rozmanité druhy glukozidů včetně aryl- a alkyl- $\beta$ -D-glukozidů[1]. Metabolická přeměna, při které dochází ke konjugaci malé molekuly se sacharidem, se nazývá glykozylace. Deglykozylace je obrácený proces, kde je konjugát hydrolyzován opět na cukernou a aglykonovou složku. Tyto procesy jsou v přírodě, hlavně v rostlinné říši, značně rozšířené. Kukuřičná  $\beta$ -glukozidáza Zm-p60.1 je důležitá pro regulaci vývoje rostlin pro svou schopnost cíleného uvolňování cytokininů z vázaných neaktivních forem cytokinin-O-glukozidů [2,5]. Při výzkumu substrátové specifity  $\beta$ -glukozidázy Zm-p60.1 pomocí řízené mutagenese jsme opakovaně zjišťovali negativní vliv aminokyselinových záměn v aktivním centru na celkovou strukturu enzymu [Fohlerová et al., nepublikovaná data] Proto jsme se rozhodli vyvinout metodu umožňující generování variability aminokyselinového zastoupení na daných místech enzymu s možností selekce funkčních variant.

## MATERIÁL A METODIKA

Místně řízená mutagenese byla realizována pomocí komerčního kitu QuikChange<sup>®</sup> Multi Site-Directed Mutagenesis od firmy Stratagene. Metoda je založena na vnášení mutací do sekvence templátové plazmidové DNA pomocí primerů s žádanou změnou v sekvenci a následné PCR. Klony cirkulární jednořetězcové DNA jsou dále transformovány do superkompetentních buněk *Escherichia coli* kmen Xl-gold, kde je dosyntetizován komplementární řetězec a plazmidy jsou připraveny pro izolaci, sekvenování a další použití.

K místně řízené mutagenesi byl jako templát použit konstrukt rekombinantní  $\beta$ -glukozidázy Zm-p60.1 ve vektoru pRSET:: (*His*)<sub>6</sub>Zm-p60.r. [4] . Speciální vícenásobně degenerované primery byly připravovány podle našeho návrhu firmou Generi biotech. Pro zjištění frekvencí vnášených mutací byly uskutečněny výpočty za pomoci programů Visual basic a ZRandom.

Pro selekci pozitivních kolonií na Petriho miskách na základě barevné změny byl použit substrát 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucopyranosid (X-Glu) v množství 100 ug/ml LB agaru.

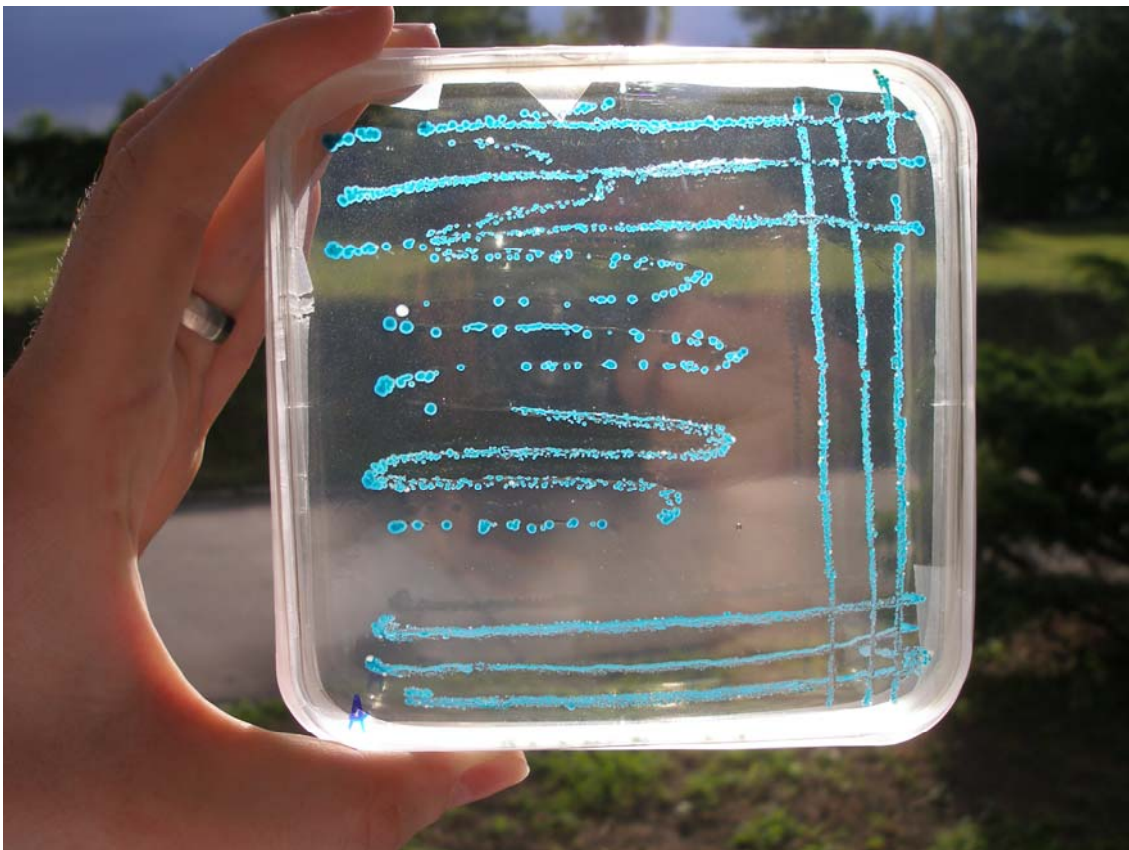
## VÝSLEDKY A DISKUZE

V naší práci jsme zlepšovali metodu řízené mutagenese a to ve dvou směrech. První směr je vytvoření sofistikovaného postupu pro návrh mutagenních primerů. Pro tento účel se podařilo naprogramovat proceduru ve Visual basicu, která řeší směsné poměry bazí při syntéze oligonukleotidu. Výsledný poměr je 96:2:2:2. V takto syntetizovaných primerech dochází k mutacím ve frekvenci převážně 1-3 aminokyselinové záměny vnášené jedním primerem. Druhý směr je vytvoření jednoduchého skríningu na funkční varianty  $\beta$ -Glukozidázy po mutagenesi. Zde se podařilo selektovat pozitivní kolonie jednoduše na základě změny

zbarvení. Využívá se zde zbytkové aktivity T7 promotoru vektoru pRSET:: (*His*)<sub>6</sub>Zm-p60.r. v buňkách *Escherichia coli* kmen XI-gold. Pokud mutantní forma  $\beta$ -glukozidázy štěpí 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucopyranosid projeví se to změnou zbarvení kolonií z bílého na modré viz. obr.1.

## ZÁVĚR

Při použití metody řízené evoluce je každý krok charakterizován vnášením nové genetické variability, v našem případě metodou řízené mutagenese, a následuje selekce nejlepších variant v našem případě funkčních  $\beta$ -glukozidáz. Oba tyto hlavní aspekty se nám podařilo vylepšit a to definováním a cílením genetické variability prostřednictvím speciálních mutagenních primerů a zavedením jednoduchého skrínungu využívajícího přímo katalytické funkce studovaného enzymu. Takto postavená metoda řízené evoluce je vhodným nástrojem pro hledání strukturně funkčních souvislostí u rodiny  $\beta$ -glukozidáz a je dále zobecnitelná na další enzymy, u nichž lze jejich funkce využít pro přímý skrínung.



Obr. 1. Test aktivity mutantní formy  $\beta$ -glukozidázy Zm-p60.1 v buňkách *Escherichia coli* kmen XI-gold po řízené mutagenese. Téměř ve všech klonech dochází ke štěpení substrátu 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucopyranosidu a výsledkem je modré zbarvení kolonií

## LITERATURA

1. Babcock GD., Esen A. (1994): Substrate specificity of maize b-glucosidase. *Plant Sci*, 101: 31-39
2. Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bakó L., Campos N., Schell J. and Palme K. (1993). Release of Active Cytokinin by a  $\beta$ -Glucosidase Localized to the Maize Root Meristem. *Science* 262: 1051-1054.
3. Zouhar J., Vévodová J., Marek J., Damborský J., X.-D. Su and Brzobohatý B. (2001). Insights into the Functional Architecture of Catalytic Center of a Maize b-Glucosidase ZM-p60.1. *Plant Physiology* 127: 1-13
4. Zouhar J., Nanak E. and Brzobohatý B. (1999) Expression, single-step purification, and matrix-assisted refolding of a maize cytokinin glucoside-specific  $\beta$ -glucosidase, *Protein Expr. Purif.*, 17 153-62.
5. Mazura P., Föhlerová R., Brzobohatý B., Kiran NS., Janda L. (2006) A new method for enzyme kinetic studies of scarce glucosides, *J Biochem Biophys Methods* 68(1):55-63