

PURIFICATION OF MUTANT FORMS OF β -GLUCOSIDASE (*HIS*)₆ZM-P60.1) Z. MAYS

PURIFIKACE MUTANTNÍCH FOREM REKOMBINANTNÍ KUKUŘICNÉ β -GLUKOSIDAY (*HIS*)₆ZM-P60.1)

Filipi T., Dopitová R., Brzobohatý B.

Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: filipi@biomed.cas.cz, radkaf@sci.muni.cz, brzoboaha@ibp.cz

ABSTRACT

β -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 (Zouhar et al., 1999, Filipi, 2007, Dopitova et al., 2008). It was necessary to confirm purity of wild-type, as well as mutant forms (F461L, F193A, F200K, W373K and E401D), because of its biochemical data interpretation. Unfortunately, low molecular ballast proteins were still presented in the active (dimeric) fractions of enzyme, thus the purification routine (Filipi, 2007) have been supplemented with other second gel filtration run. By addition with second gel chromatography step, enzymes yield in high homogeneity without any ballast proteins. Moreover, we have occurred, that after 2nd gel filtration step of dimeric fraction of wild-type, F193A, F461L, only the dimeric fraction have been eluted. On the other hand, in case of F200K and W373K, both forms of enzyme have been isolated. According to gel filtration, the molecular weight of dimeric and monomeric enzymes have been correctly enumerate to 107-117 kDa, 40-47 kDa, respectively. It was also confirmed, that only dimeric form of enzyme fixed in gel (NATIVE-PAGE) was able to release staining indigo blue form chromogenic substrate 4-brom 3-chlor 3-indolyl- β -D-glucopyranoside (XGLU), while monomeric was not.

Key words: β -Glucosidase, maize, zymograme, NATIV-PAGE, 4-brom 3-chlor 3-indolyl- β -D-glucopyranoside

Acknowledgments: I would like to express my warm thanks to my supervisor Doc. RNDr. Břetislav Brzobohatý and my colleague Mgr. Radka Dopisová.

ÚVOD

Práce se zabývá ověřením účinnosti purifikační rutiny mutnantních forem rekombinantních kukuřičných β -glukosidas a důkazem, že dimerní forma proteinu je od monomerní dobře separovatelná pomocí gelové filtrace což lze validovat za pomoci námi upravené metodiky přípravy z Yamogramů.

1.1 β -Glukosidasy (EC 3.2.1.21)

β -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. β -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, fúsovaný 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 metagenesí aminokyselin v aktivním centru enzymu byly připraveny různé mutanty, např. H137D, H137Q, F200K, W373K, P2, E186Q, E401D, F461L, F193A, atd., které umožňují studovat interakci substát-enzym (Mazura, 2004, Dopisová, et al., 2008).

1.2 Purifikace

(Esen, 1992), (Zouhar et al., 1999), (Rotrelkl et al., 1999)(Cicek et al., 2000), Verdoucq et al. (2003), Filipi (2007), (Dopisová, 2008 in press) provedli purifikaci rekombinantní kukuřičné β -glukosidasy za pomoci stacionárních fází, umožňujících afinitní separaci proteinu fúsovaného s hexahistidinovou kotvou.

Filipi (2007) modifikoval purifikační rutinu modifikoval, čím získal protein ve vysokém stavu homogenity (95 %).

MATERIÁL A METODIKA

V experimentu bylo použito následující chemikálie a vybavení:

Glukosa, Cellobiosa, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, ampicilin, chloramfenikol, ddH₂O, Tris, EDTA, LB medium, NiSO₄·7H₂O, imidazol, glycerol, etanol, NaCl, amonium persulfát, laurylsíran sodný, Rohtiphorese 30, HCl, TEMED, proteinový marker (roztok rekombinantních makrerů pro SDS-PAGE), Triton X114, 4-brom-3-chlor-3-indolyl-β-D-glukopyranosid (XGLU)

2.2 Bakteriální kmen

E. coli BL21(DE3)pLysS [F- *ompT* [dcm] [lon] *hsdSB* (*r-BM-B*), with DE3, λ profage carrying T7 RNA polymerase gene]

2.3 Kolony:

Kolona:

HisTrap affinity column

Matrix: Highly cross-linked spherical agarose, 6%

Amerge particle size: 34 μm

Binding ion: Ni²⁺ [kolona „nabíjena“ NiSO₄ (50mM)]

Column volume (CV): 5 ml

Kolona:

HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade

Matrix: Dextran covalently bound to highly cross-linked agarose

Mean particle size: 34 μm

Column volume (CV): 124 ml

2.4 Přístrojové vybavení a další vybavení

Membrána Minisart s velikostí pórů 0,20 μm (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

Expres rekombinantních proteinů a bakteriálního lysátu:

LB medium, fosfát-fosfátový pufr (pH 7,0), cellobiosa (w/w 0,1 %), glukosa (w/w 40 %), ampicilin (50 mg/ml), chloramfenikol (34 mg/ml), IPTG (0,1 mM), inokulum (1,0 ml)

Bakterie jsou inkubovány při 37°C po dobu cca 3 hodin při 200 rpm, dokud není OD₆₀₀ min. 0,5. Indukce exprese proteinu je docílena přidavkem 0,1mM IPTG, přičemž bakterie jsou inkubovány při teplotě 22,5 °C a 200 rpm po dobu 3 hodin. Poté jsou centrifugací separovány (6000g, 4°C, 15 min) a resuspendovány v sonikačním pufru (Filipi, 2007) a zamraženy při teplotě -20°C. Následující den jsou rozmraženy a desintegrovány pomocí sonikační jehly Bandelin (3×1 minutu, při 50% účinnosti). Lysát je centrifugován při 30000g, 4°C, 30 minut. Získaný supernatant je přefiltrován přes polyethersulfonovou membránu Minisart s velikostí pórů 0,22 μm (Sartorius).

Lysát je purifikován dle Filipi (2007) – optimalizovaná dvoukroková purifikační procedura.

Aktivitní barvení (zymogramy) byly realizovány za použití 4-brom-3-chlor-3-indolyl-β-D-glukopyranosidu (12 mg/400 μl DMF) jako substrátu v 50 ml citrát-fosfátového pufru McIlvaine (50 mM; pH 5,5), při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.

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⁻¹

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) 1.gelová chromatografie

Pufr

A: Tris (50mM) + NaCl (0,5M), pH roztoku je upraveno na 7,0 (použita konc. HCl)

Rychlost eluce: 1,0 ml.min⁻¹

Objem sbíraných frakcí: 1,5 ml

Průběh purifikace

Kolona byla ekvilibrována 2 CV puforem A. Na kolonu bylo nanášeno 1,5 ml zkoncentrovaného vzorku. Enzym byl eluován puforem A1 (1,5 CV). Frakce obsahující dimerní a monomerní formu enzymu byly spojeny v jeden podíl (červeně), který byl pomocí Amicon Ultra - 4, Ultracel 10k; Regenerated celulóse 10,000 MWCO zkoncentrovány na požadovaný objem.

Pro ověření čistoty byly realizovány SDS-PAGE frakcí, obsahující dimer i monomer proteinu, stejně tak pak koncentrátu. Dimerní forma enzymu byla opětovně přečištěna gelovou filtrací.

3) 2.gelová chromatografie

Stejné podmínky a postupy jako v předchozím případě.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem testování bylo testování chování během purifikace mutnatých forem kukuřičné rekombinantní β -glukosidasy Zm-p60.1 (F193A, F200K, F461K, W373K, E401D, divoký typ) a determinace, zda dimerní forma proteinu je skutečně enzymaticky aktivní, tak jak jsme byli schopni dokladovat pomocí zymogramů. Druhým cílem bylo ověření, zda se získaný protein nachází ve vysokém stupni homogenity, popř. navrhnout modifikaci purifikační rutiny, vedoucí k vyšším čistotám.

Po realizaci první gelové filtraci bylo zřejmé, že se ve frakcích, obsahující monomer a dimer enzymu, byť ve velmi malé míře, nalézají kontaminující proteiny (*obr. 1*). SDS-PAGE a denzitometrická měření ukázala, že čistota β -glukosidasy je ≥ 94 %. Western blot potvrdil, že to nejsou degradační produkty enzymu, které by mohly vzniknout během elektroforesy. MALDI-MS a MALDI-MS/MS náš předpoklad potvrdilo.

Pro odstranění balastních proteinů jsme se rozhodli zavést opakovanou gelovou filtraci, která následně poskytla enzym s velmi vysokou homogenitou ≥ 96 , a to bez přítomnosti kontaminujících proteinů (SDS-PAGE).

Divoká forma proteinu, mutanta F193A a F461L se nalézají především v dimerní formě, nicméně minoritní monomerní formu lze také nalézt, E401D se vyskytuje především

v monomerní formě (dimer se téměř netvoří), mutanty F200K a W373 tvoří jak dimerní, tak i minometní formu s vyšší převahou dimeru.

Během opakovaných gelových filtrací byly zaznamenány rozdíly v elučních profilech testovaných enzymů (*obr. 2*). Po druhé gelové filtraci nebyla u divoké formy, mutanty F193A a F461L nalezena žádná monomerní forma proteinu, zatímco u mutant F200K a W373K ano. Z porovnání obou chromatogramů a ploch píků je evidentní, že poslední dvě uvedené mutanty mají tendenci vytvářet směs monomer-dimer a opakovaná purifikace nevede k jejich separaci. Zde se pravděpodobně, dle mého názoru, bude výrazně uplatňovat termodynamická rovnováha mezi oběma formami.

K testování determinace aktivit bylo třeba skutečně ověřit, zda monomerní a dimerní frakce jsou relevantně detekovatelné pomocí gelové elektroforesy za nedenaturujících podmínek a zda lze experimentálně dokázat, že aktivní formou je skutečně dimerní forma proteinu. Z elučních objemů (časů) jsme byli schopni vypočítat molekulovou hmotnost [kDa] eluovaných enzymů (monomer/dimer) a porovnat ji s teoreticky vypočítanými hodnotami, zjištěnými na základě aminokyselinové sekvence (*Tab. 1*). Námi vypočtené hodnoty pro dimer se pohybovaly v rozmezí 107 – 117 kDa, 40 – 46 kDa pro monomer. (I když se hodnoty od teoretických údajů mírně odlišují – 118,5 kDa pro dimer, 59,2 kDa pro monomer, nalézají se však v rámci tolerované chyby. Mimoto gelová filtrace pracuje s premisou, že izolované proteiny jsou ideálně globulární).

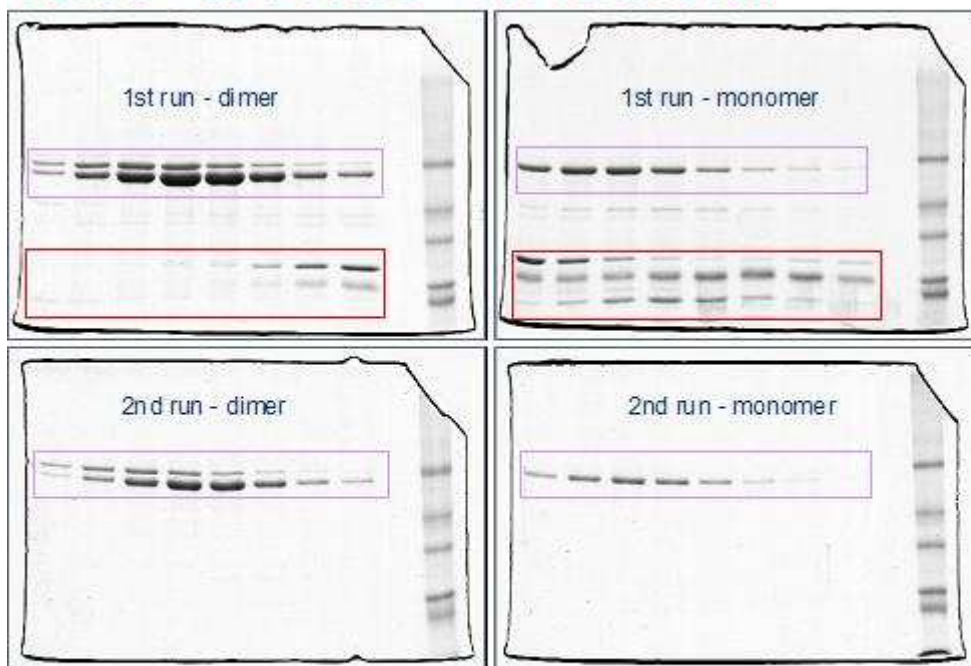
Frakce odpovídající dimerní a monomerní formě enzymů byly separovány metodou gelové elektroforesy za nedenaturujících podmínek. Gel byl poté barven substrátem XGLU (dle metodiky) (Filipi et Mazura, nepublikovaná data).

Tento substrát byl vybrán proto, že dovoluje srovnávat enzymy, které jej rozkládají různou rychlostí, neb vzniká modré indigo, které není citlivé na světlo jako v případě naftylových substrátů a nezpůsobuje žádné rušivé pozadí. Intenzita zbarvení je tak dána rychlostí štěpení substrátu. Menší nevýhodou může být jeho mírná difuze do okolí (detekovatelná až po cca 1,5 hodině –záleží na koncentraci enzymu, nebo substrátu).

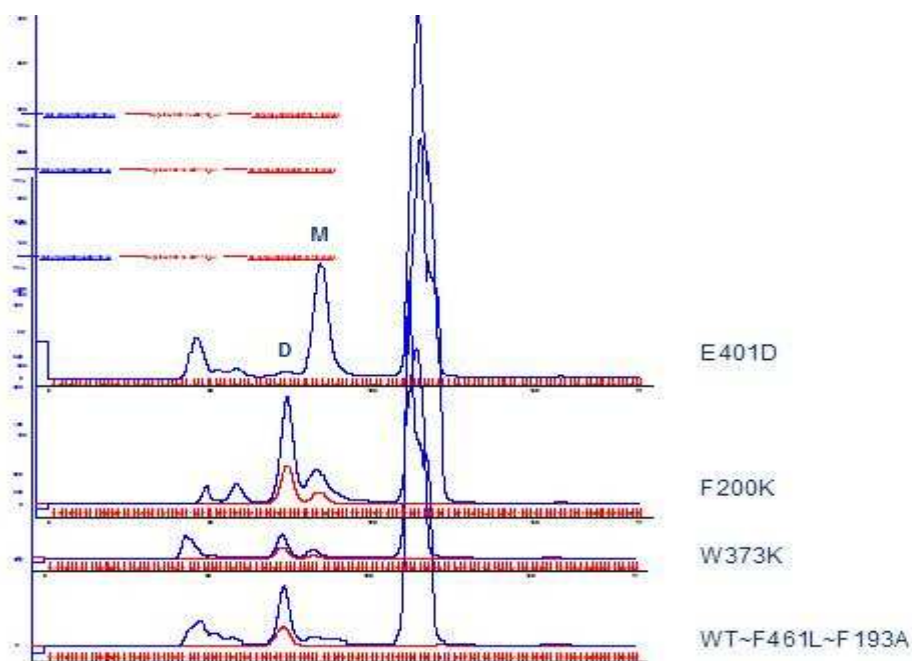
Získaný zymogram (*obr. 3*) byl následně přebarven BioSafe Coomassie blue (*obr. 3*), čímž jsme získali doplňující informaci o proteinovém složení frakcí. Jak gelová filtrace, tak i aktivní barvení jasně dokázaly, že enzymaticky aktivní forma je pouze forma dimerní, monomerní forma substrát nerozkládá ani po 1 hodině.

Celkové srovnání elučních profilů, elektroforesy za denaturujících, tak nedenaturujících podmínek (barveno XGLU a coomassie) jsou shrnuty (*obr. 4*), ze kterého jasně plyne, že aktivní barvení pomocí XGLU je vhodné pro porovnání jak divoké, tak i mutantní formy proteinu navzdory skutečnosti, že obě mají výrazně odlišnou reakční rychlost (např. W373K) a nakonec, že jsme schopni přesně detekovat a separovat monomerní a dimerní formu enzymu jak metodou gelové filtrace, tak i gelové elektroforesy za nedenaturujících podmínek.

F200K – SDS-PAGE – 1st vs. 2nd run



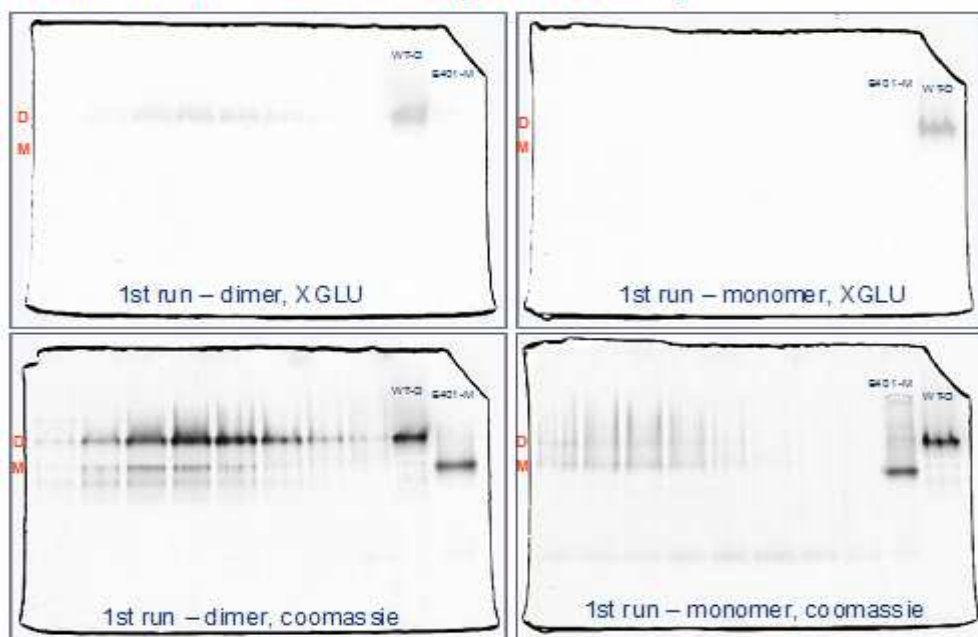
Obr. 1 Porovnání frakcí píku dimeru a monomeru po první a po druhé gelové filtraci



1. běh – modře
2. běh – červeně

Obr. 2 Porovnání elučních profilů testovaných enzymů

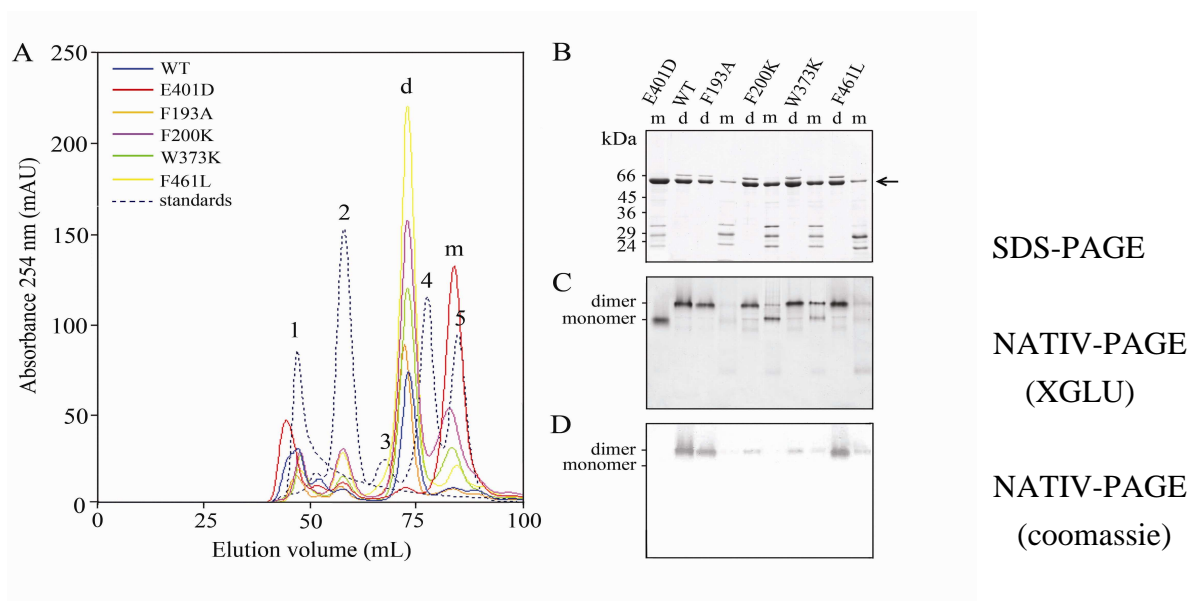
F200K – NATIV-PAGE – compare of activity



Obr. 3 Porovnání frakcí píku dimeru a monomeru po 1. gelové filtaci (aktivitní barvení vs. barvení coomassie)

ENZYME	APPARENT MOLECULAR WEIGHT (KDA)	
	DIMER	MONOMER
WT	107	41
E401D	114	42
F193A	117	43
F200K	109	46
W373K	109	44
F461L	109	40

Tab. 1 Porovnání vypočítaných velikostí enzymu (monomer, dimer)



Obr. 4 Závěrečné porovnání běhů 1. gelové filtrace, SDS-PAGE, NATIV-PAGE

ZÁVĚR

Experiment prokázal, že dvoukroková gelová filtrace prokazatelně eliminuje balastní proteiny, které byly přítomny jak v monomerní, tak i dimerní frakci enzymů. Zařazením tohoto kroku by mohlo ulehčit následnou krystalisaci enzymů.

Za pomoci kalibrované kolony HiLoad 16/60 Superdex 200 prep. grade a PAGE za nativních podmínek jsme jasně determinovali a separovali dimerní a monomerní formu enzymu.

Rovněž bylo prokázáno, že aktivní barvení za pomocí XGLU je vhodné pro detekci dimerní (aktivní) formy enzymu, čímž ji lze bezpečně identifikovat a odlišit od monomerní frakce proteinu.

LITERATURA

Esen A., 1992. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -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 β -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 β -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)- β -glucosidase (Maize β -glucosidase) and Dhurrinase (Sorghum β -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 β -glucosidases. *J. Biol. Chem.*, 278: 25055 – 25062.

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

Filipi, T., 2007. Maize β -glucosidase Zmp60.1 and its mutant forms: Optimization of purification procedure. *Proceeding of International Ph. D. Students Conference, Brno*, 103

Dopisová, R., Mazura, P., Janda, L., Chaloupková, R., Jeřábek, P., Tamborský, J., Filipi, T., Kiran, N. V., Brzobohatý, B. (2008). Functional analysis of the aglycone-binding site of the maize β -glucosidase Zm-p60. *FEBS*. (in press)