

# MAIZE BETA-GLUCOSIDASE ZM-P60.1 AND ITS MUTANT FORMS: NOVEL SUBSTRATE SPECIFICITIES

Filipi T., Mazura P., Brzobohatý B.

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

E-mail: filipi@biomed.cas.cz

---

## ABSTRACT

$\beta$ -Glucosidase Zm-p60.1 was isolated from chloroplasts of maize coleoptyles. This  $\beta$ -hydrolase is able to cleave artificial (p-NP-O- $\beta$ -D-Glup, 4-MUG-O- $\beta$ -D-Glup and XGLU) and natural substrates (trans-zeatin-O- $\beta$ -D-glucopyranoside and kinetin-N3- $\beta$ -D-glucopyranoside). Hydrolytic activities also influence levels of free cytokinins (active) and cytokinin conjugates (non-active) in plants. O-Glucosylation of cytokinins represents reversible way of its inactivation, whereas N-glucosylation (N7- and N9-derivates) irreversible pathway. Moreover, plant  $\beta$ -glucosidases activities which might hydrolyse N7- and N9-glucosides were not isolated till now. Our research brings novel information at the field of substrate specificities of maize  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1. It was found, that Zm-p60.1 is able to hydrolyse cis-zeatin-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, and partly (trans-zeatin-N9- $\beta$ -D-glucopyranoside, while mutant forms W373K, W373K2 and W373K4 hydrolyse only cis-zeatin-O- $\beta$ -D-glucopyranoside and trans-zeatin-O- $\beta$ -D-glucopyranoside. Hydrolysis of trans-zeatin-N7- $\beta$ -D-glucopyranoside was not observed at all. Amino acid residue W373 also influences substrate specificity of Zm-p60.1. Enzyme hydrolytic activities were confirmed by TLC analysis. Subsequently, it was found, that trans-zeatin-N7- $\beta$ -D-glucopyranoside and trans-zeatin-N9- $\beta$ -D-glucopyranoside have no inhibition impact on enzyme activity.

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase, maize, substrate specificity, cytokinin, mutant form, glucosylation, TLC

**Acknowledgments:** Research is supported by REMOROST LC06034 (Ministry of Education of the Czech Republic)

## ÚVOD

Cytokinininy patří mezi klíčové fytohormony, které zastávají ve vývoji rostlinného organismu nezastupitelnou roli. Svým působením především ovlivňují růst a diferenciaci buněk a pletiv, podílejí se také na oddalování jejich stárnutí, dále jsou zapojeny do drah reagujících na stres atd. Hladiny aktivních a neaktivních forem cytokininů jsou v rostlině regulovány na několika úrovních. Náš výzkum se zabývá úlohou hydrolas, které jsou schopné štěpit glukosidy *t*-zeatinu, čímž ovlivňují koncentrace volného (metabolicky aktivní forma) a vázaného (metabolicky neaktivní forma) fytohormonu v rostlině.

Brzobohatý et al. [1] a Kristoffersen et al. [2] ze semenáčků kukuřice isoloval  $\beta$ -glukosidasu, u níž bylo následně zjištěno, že je schopna rozkládat umělé substráty *p*-NP-*O*- $\beta$ -D-Glup, 4-MUG-*O*- $\beta$ -D-Glup [1, 3] a XGLU [3], ale především deriváty cytokininů – *t*ZOG a K3G [1]. *t*ZOG byl rostlinným extraktem obsahující kukuřičnou  $\beta$ -glukosidasu Zm-p60.1 do 15 minut zcela hydrolyzován, zatímco K3G až za 120 minut. Celkem bylo testováno 7 glukosidů, avšak hydrolyzovány byly pouze zmíněné *t*ZOG a K3G. Soubor testovaných glukosidů obsahoval i *t*Z7G a *t*Z9G, které do 15. minuty hydrolyse nepodléhaly. Existuje všeobecně přijímaná hypotéza, že *O*-glukosylace cytokininů představuje jejich reversibilní a dočasnou inaktivaci, zatímco *N*-glukosylace v pozici *N*7- a *N*9- ireversibilní a trvalou inaktivaci. Do současné doby nebyla zatím nalezena žádná rostlinná  $\beta$ -glukosidasová aktivita, která by byla schopna hydrolyzovat *N*7- a *N*9- glykosidy cytokininů. Podobně zatím nebyla nikdy testována hydrolytická aktivita Zm-p60.1 za použití *c*ZOGu jako substrátu.

Tato práce předkládá předběžné výsledky popisu nově objevených substrátových specifit kukuřičné  $\beta$ -glukosidasy Zm-p60.1 a jejich mutaních forem W373K, W373K2 a W373K4.

## MATERIÁL A METODIKA

Substráty enzymů: *t*Z, *t*ZOG, *c*Z, *c*ZOG, *t*Z7G a *t*Z9G (OChemIm).

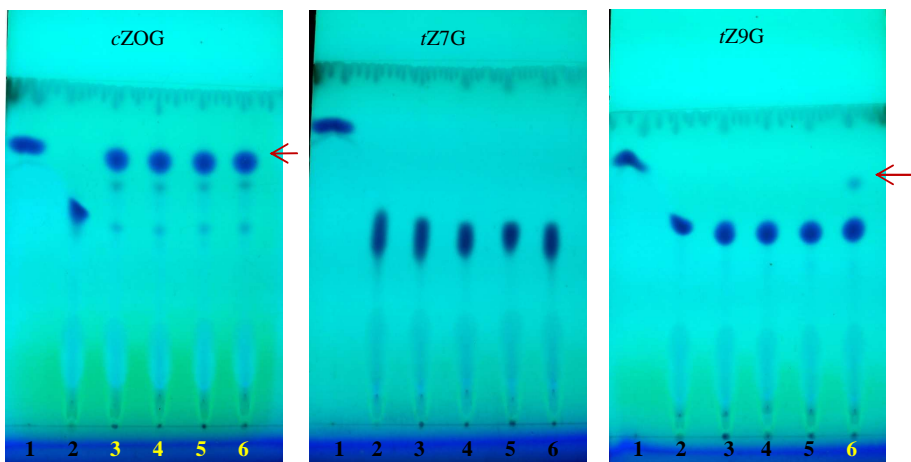
TLC: Sil G (UV 254) (Macherey-Nagel)

Mobilní fáze: buthan-1-ol:CH<sub>3</sub>COOH (ledová): H<sub>2</sub>O (12:3:5)

K roztokům substrátů v citráto-fosfátovém pufru McIlvaine (50 mM; pH 5,50) bylo přidáno alikvotní množství purifikovaného enzymu. Reakční směs byla inkubována při teplotě 30°C. V daných časových intervalech byly odebírány alikvoty reakční směsi a nanášeny na TLC desku. Aby byl vyloučen falešně pozitivní výsledek (nespecifická hydrolysa substrátu v kyselém prostředí pufru), byl vzorek rozpuštěného standardu v pufru rovněž ponechán po stejně dlouhou dobu při teplotě 30 °C jako reakční směs. Po 5hodinovém vyvíjení byl TLC chromatogram vyhodnocen, kdy byly R<sub>f</sub> spotů substrátů a produktů reakcí porovnány s R<sub>f</sub> spotů standardů.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Tab. 1 Štěpitelnost *cZOG*, *tZ7G* a *tZ9G* enzymy *Zm-p60.1*, *W373K*, *W373K2* a *W373K4* (30 °C, 1100 minut)



1 – Substrát (*cZOG*, *tZ7G*, *tZ9G*) – standard

2 – *cZ*, *tZ* - standard

3 – *W373K4* + substrát

4 – *W373K2* + substrát

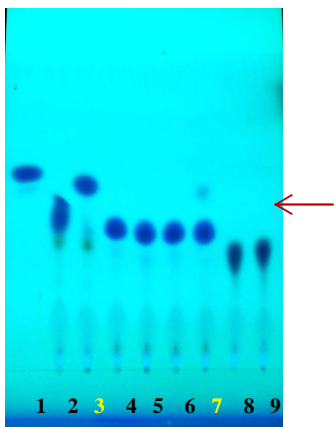
5 – *W373K* + substrát

6 – *WT* + substrát

Červená šipka naznačuje uvolněný *cZ*, *tZ*

(žlutě jsou označeny reakce, kde byla zaznamenána hydrolysa substrátu)

Tab. 2 Štěpitelnost *cZOG*, *tZ7G* a *tZ9G* enzymem *Zm-p60.1* (30 °C, 15 a 1100 minut)



1 – <i>tZ</i> – Standard	(1100 minut)
2 – <i>tZOG</i> – Standard	(1100 minut)
3 – <i>tZOG</i> + WT	(1100 minut)
4 – <i>tZ9G</i>	(15 minut)
5 – <i>tZ9G</i> + WT	(15 minut)
6 – <i>tZ9G</i>	(1100 minut)
7 – <i>tZ9G</i> + WT	(1100 minut)
8 – <i>tZ7G</i>	(1100 minut)
9 – <i>tZ7G</i> + WT	(1100 minut)

Červená šipka naznačuje uvolněný *tZ*

(žlutě jsou označeny reakce, kde byla zaznamenána hydrolysa substrátu)

Bylo zjištěno, že kukuřičná  $\beta$ -glukosidasa Zm-p60.1 je schopna do 15 minut při teplotě 30 °C kompletně hydrolyzovat nejen *tZOG*, ale i *cZOG*, a že za 1100 minut částečně hydrolyzuje *tZ9G*, což do této doby nikdy nebylo pozorováno. Opakování experimentu dle Bzroboghatého et al. jasně potvrdilo, že v 15. minutě k hydrolyze *tZ9G* nedochází. Je tedy možné, že *N9*-glukosylace nemusí představovat trvalou ireversibilní inaktivaci *t*-zeatinu, nicméně na potvrzení této teorie bude třeba realizovat příslušné experimenty in planta. Mutanty W373K, W373K2 a W373K4 jsou také schopny za stejně definovaných podmínek jako v případě w-t formy enzymu kompletně rozštěpit *cZOG* do 15 minut. Je nepochybné, že amonikyselinové residuum W373 se spolupodílí na substrátové specifitě, neboť *tZ9G* (1100 minut) štěpen mutantními formami nebyl. Štěpitelnost *tZ7G* nebyla potvrzena u žádného enzymu ani po 4 dnech inkubace. Lze konstatovat, že substrátová specifita klesá v řadě – *O*-, *N3*-, *N9*- a *N7*-. Analýza enzymové kinetiky odhalila, že *tZ7G* a *tZ9G* nevykazují inhibiční efekty na aktivitu Zm-p60.1 při [S]=[I], [2S]=[I] a [S]=[2I],

## ZÁVĚR

Z počátečních výsledků vyplývá, že kukuřičná  $\beta$ -glukosidasa Zm-p60.1 schopna štěpit následující substráty: *p*-NP-*O*- $\beta$ -D-Glup, 4-MUG-*O*- $\beta$ -D-Glup, XGLU, *tZOG*, K3G, *cZOG* a částečně i *tZ9G*. Mutanty W373K, W373K2 a W373K4 štěpí: *p*-NP-*O*- $\beta$ -D-Glup, 4-MUG-*O*- $\beta$ -D-Glup, XGLU, *tZOG*, K3G a *cZOG*. Štěpitelnost *tZ7G* pozorována nebyla vůbec u žádného enzymu ani po 4 dnech inkubace. *tZ7G* a *tZ9G* nevykazují inhibiční vlivy na aktivitu Zm-p60.1.

## SEZNAM ZKRATEK

<i>p</i> -NP- <i>O</i> - $\beta$ -D-Glup	4-nitrofenyl- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopyranosid
4-MUG- <i>O</i> - $\beta$ -D-Glup	4-methumbelliferyl- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopyranosid
K3G	kinetin- <i>N3</i> - $\beta$ -D-glukopyranosid
XGLU	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopyranosid
<i>tZOG</i>	<i>trans</i> -zeatin- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopyranosid
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin

<i>cZOG</i>	<i>cis</i> -zeatin- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopyranosid
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>tZ7G</i>	<i>trans</i> -zeatin- <i>N7</i> - $\beta$ -D-glukopyranosid
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin- <i>N9</i> - $\beta$ -D-glukopyranosid
TLC	Thin layer chromatography

## LITERATURA

Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos L., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokine by a  $\beta$ -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262(5136): 1051-1054.

Kristoffersen P., Brzobohatý B., Hohfeld I., Bako L., Melkonian M, Palme K. (2000): Developmental regulation of the maize Zm-p60.1 gene encoding a  $\beta$ -glucosidase located to plastids. *Planta*, (210),407–415.

Dopitová R., Mazura P., Janda L., Chaloupková R., Jeřábek P., Damborský J., Filipi T., Kiran N. S., Brzobohatý B. (2008): Functional analysis of the aglycone-binding site of the maize  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1. *FEBS J.*, 275(24): 6123-6135.