

# A NEW, SENSITIVE METHOD FOR ENZYME KINETIC STUDIES OF SCARCE GLUCOSIDES

## NOVÁ CITLIVÁ METODA PRO STUDIUM ENZYMOVÉ KINETIKY VZÁCNÝCH SUBSTRÁTŮ

Mazura P.,<sup>1</sup> Fohlerová R.,<sup>2</sup> Brzobohatý B.,<sup>1</sup> Kiran N.S.,<sup>1</sup> Janda L.,<sup>1,2</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, brzoboha@ibp.cz

---

### ABSTRACT

$\beta$ -Glucosidases are a widespread group of enzymes that hydrolyze a broad variety of glucosides including aryl- and alkyl- $\beta$ -D-glucosides. 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. 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. Enzyme kinetics studies using these scarce substrates close to physiological concentrations are difficult due to two reasons: a) Available methods are mainly suited for end-point kinetics. b) These methods are not sufficiently sensitive when using scarce glucoside substrates. We developed a glucose assay using a system comprising three enzymes  $\beta$ -glucosidase, glucose oxidase and horseradish peroxidase, with the new substrate Ampex UltraRed. In comparison with the other methods this method is more sensitive, precise, and accurate.

**Key words:** Ampex Ultra Red reagent;  $\beta$ -Glucosidase; Glucose assay; Phytohormone conjugation; Zeatin-O-glucoside

### ABSTRAKT

$\beta$ -Glukozidázy jsou široce rozšířená skupina enzymů hydrolyzujících rozmanité druhy glukozidů včetně aryl- a alkyl- $\beta$ -D-glukozidů. Rostlinné  $\beta$ -glukozidázy jsou zodpovědné za regulaci rozličných aspektů vývoje zahrnujících aktivaci fytohormonů, degradaci stěn endospermálních buněk během klíčení a obranu proti patogenům. 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. Měření kinetických parametrů u těchto vzácných substrátů v oblasti jejich fyziologických koncentrací je obtížné ze dvou důvodů. a) Dostupné metody jsou zejména vhodné pro "end-point" kinetiku. b) Tyto metody nejsou dostatečně citlivé pro měření vzácných glukozidů. Vyvinuli jsme metodu pro

stanovení glukózy využívající systému, který obsahuje tři enzymy  $\beta$ -glukozidázu, glukózooxidázu a křenovou peroxidázu se substrátem Amplex UltraRed. Ve srovnání s ostatními metodami je tato metoda citlivější přesnější a správnější.

**Klíčová slova:** Amplex Ultra Red reagent;  $\beta$ -Glukozidáza; Detekce glukózy; Konjugace fytohormonů ; Zeatin-O-glukozid

## ÚVOD

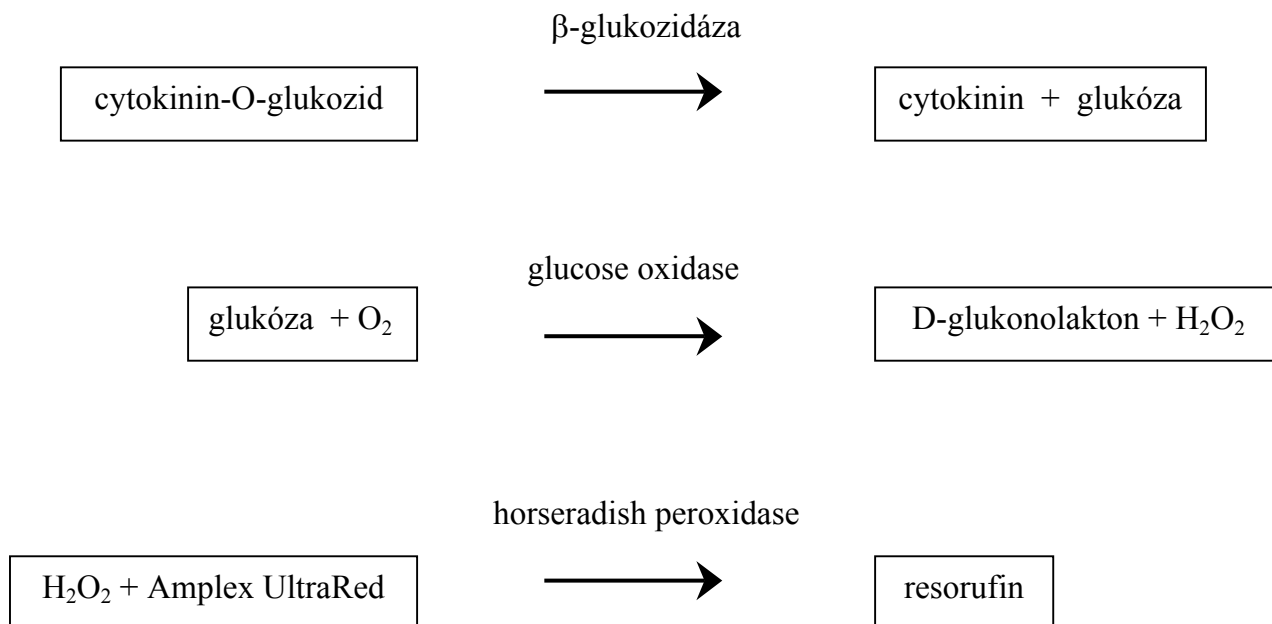
Metabolická přeměna při které dochází ke konjugaci malé molekuly se sacharidem se nazývá glykozylace. Deglykozylace je obrácený proces, kde je konjugát hydrolyzován opět na cukernou a aglykonovou složku. Glykozylace a deglykozylace zásadním způsobem mění vlastnosti zúčastněných látek. Jsou to změny v hydrofobicitě, stabilitě, chemických vlastnostech, subcelulární lokalizaci a často též v biologické aktivitě. Tyto procesy jsou v přírodě, hlavně v rostlinné říši, značně rozšířené.  $\beta$ -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]. Rostlinné  $\beta$ -glukozidázy jsou zodpovědné za regulaci rozličných aspektů vývoje zahrnujících aktivaci fytohormonů, degradace stěn endospermálních buněk během klíčení a obranu proti patogenům. 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]. Měření kinetických parametrů u těchto vzácných substrátů v oblasti jejich fyziologických koncentrací je obtížné, protože dostupné metody nesplňují nároky vyplývající z nutnosti měřit kinetiku průběžně. Zastavování reakce je komplikovaný a nekvantifikovatelný proces a také je třeba dostatečné citlivosti vinou nízkých fyziologických koncentrací těchto vzácných substrátů. Vyvinuli jsme metodu, která umožňuje tyto nedostatky překonat pomocí kombinace rychlosti a citlivosti spřaženého enzymového systému, který obsahuje tři enzymy  $\beta$ -glukozidázu, glukózooxidázu a křenovou peroxidázu se substrátem Amplex UltraRed. Ve výsledku je měřena fluorescence finálního produktu resorufinu.

## MATERIÁL A METODIKA

Pro standardní metodu určování kinetických parametrů jsme použili p-Nitrofenyl  $\beta$ -D-glucopyranozid (PNPG) (Sigma) a ELISA reader Rainbow (Tecan) podle původního postupu [3]. Pro novou fluorimetrickou metodu jsme použili Amplex Ultra Red (AUR) (Molecular probes) *trans*-Zeatin-O-glukozid (ZOG) (Olchemim). Enzymy glukózooxidáza (GO) a peroxidáza (HRP) obojí (Sigma). Rekombinantní  $\beta$ -glukozidáza Zm-p60.1 [4] byla exprimována v bakteriálním expresním systému *Escherichia coli* kmen BL21(DE3)pLysS. Postup a následná purifikace proteinu [Fohlerová et al., nepublikovaná data] Měření byla prováděna na fluorimetru FluoStar Galaxy (BMG co.).

Metoda je založena na spřažených reakcích viz. schéma přičemž množství vzniklé glukózy je ekvimolární výslednému produktu resorufinu jehož fluorescenci měříme. Všechny

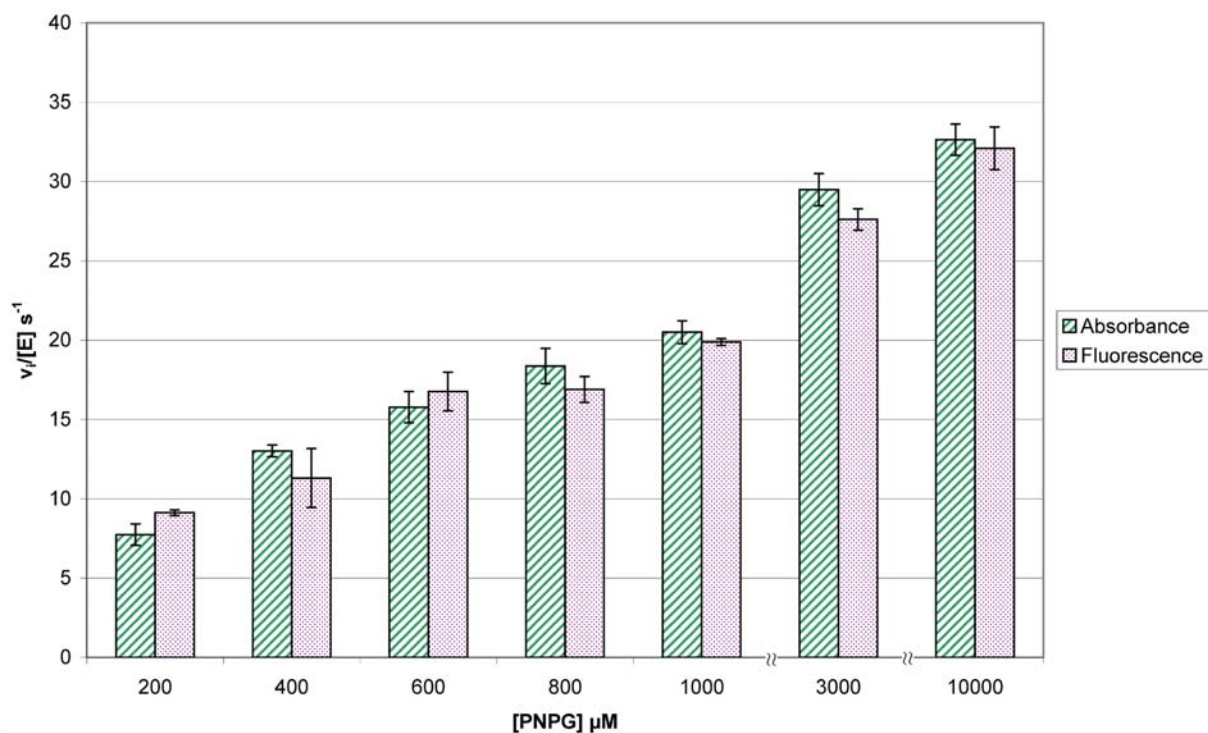
komponenty reakční směsi jsou připraveny v citrát fosfátovém pufru pH 5,5. Měření je prováděno při 30 °C množství všech složek reakční směsi je optimalizováno [5].



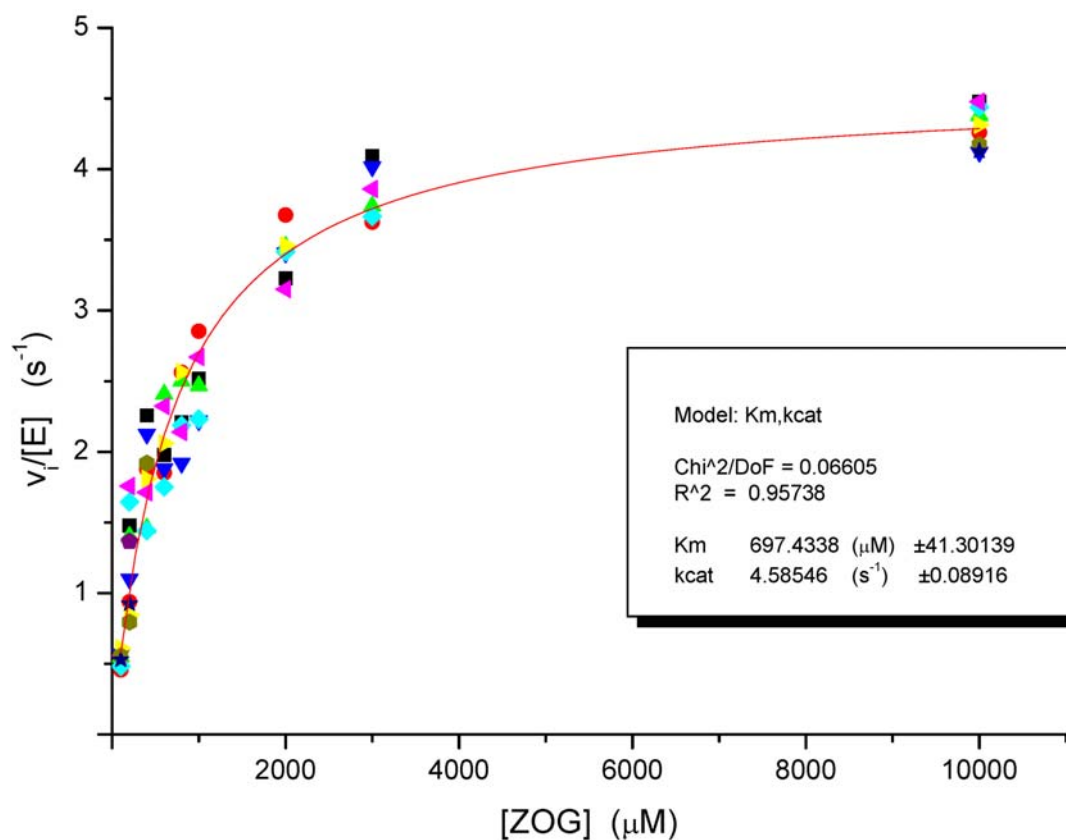
## VÝSLEDKY A DISKUZE

Vytvořili jsme metodu pro stanovení glukózy v mikro molárních koncentracích. Procedura byla optimalizována pro rychlá měření kinetiky v řádu sekund. Reakce startuje přidáním směsi  $\beta$ -glukozidázy GO a HRP pomocí automatického injektoru do termostatované 96 jamkové desky, kde byly předtím naneseny vzorky s různými koncentracemi substrátu a konstantním přídatkem AUR. Výsledkem je typicky devět měření narůstající koncentrace produktu během 2,5s. Počet měření je dostatečný pro zjištění počáteční rychlosti katalýzy pro danou koncentraci substrátu a tudíž umožňuje výpočet konstant  $K_M$  a  $k_{cat}$ . Metoda byla validována srovnáním se standardním postupem (obr. 1). Byly stanoveny kinetické parametry hydrolýzy fytohormonu Zeatin-O-glukozidu  $K_M$  697,43  $\pm$  41.30  $\mu\text{M}$   $k_{cat}$  4.58  $\pm$  0,09  $\text{s}^{-1}$  (obr. 2).

Obr. 1 Srovnání nové fluorescenční metody (fluorescence) se standardní chromogenní procedurou (absorbance). V obou případech je měřena hydrolyza substrátu PNPG.



Obr. 2 Michaelis-Mentenovská kinetika měřená na substrátu ZOG štěpeného  $\beta$ -glukozidázou Zm-p60.1. Výsledná hyperbolická závislost umožnila výpočet hodnot  $K_M$  a  $k_{cat}$  (v rámečku)



## ZÁVĚR

Díky rychlosti měření je možné naši metodu použít pro stanovení kinetických parametrů  $\beta$ -glukozidázové reakce v našem případě u konjugátu fytohormonu. Potenciální použití metody je široké od možnosti studovat hydrolyzu různých farmakologicky nebo průmyslově zajímavých glukokonjugátů po možnost rychlého stanovení glukózy v biologických vzorcích. V kombinaci s moderním fluorimetrickým vybavením je procedura vhodným kandidátem pro automatizaci.

## 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., Fohlerová 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