

## DESIGNING RECOMBINANT MAIZE $\beta$ -GLUCOSIDASE Zm-p60.1: DEVELOPMENT OF NOVEL ENZYMES MODULATING CYTOKININ METABOLISM

Filipi T.<sup>1</sup>, Mazura P.<sup>1</sup>, Dopitová R.<sup>2</sup>, Janda L.<sup>2</sup>, Damborský J.<sup>3</sup>, Kiran N.S.<sup>1</sup>, Brzobohatý B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Functional Genomics and Proteomics, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Loschmidt Laboratories, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

E-mail: filipi@biomed.cas.cz

---

### ABSTRACT

Maize  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1 is one of many enzymes which are important for plant development. It liberates free zeatin from its transport and/or storage form zeatin-*O*-glucoside. Using an adapted site specific non-saturated random mutagenesis approach, it were prepared five multi-site mutants surrounding the active site (W373K/M376L, W373K/P372S/M376L, W373K/P372T/M376L, W373K/P372S and W373K/P372T) derived from the single mutant W373K to study the effect(s) of amino-acid changes on substrate specificity towards natural (*trans*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside and *cis*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) and artificial (4-nitrophenyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside and 4-methylumbelliferyl *O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) substrates. Kinetic and substrate specificity studies confirmed large differences among set of mutated enzymes. All enzymes surprisingly preferred *cis*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside over *trans*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, whereas differences in hydrolytic efficiencies are considerable. Quantitative TLC confirmed the best *cZOG*/*tZOG* hydrolysis ratio toward *cis*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside in the triple mutant W373K/P372T/M376L. Moreover, it was also confirmed that only wild-type hydrolyzed *trans*-zeatin-*N9*- $\beta$ -D-glucopyranoside. No known plant  $\beta$ -glucosidase hydrolyzes this substrate. Hydrolysis of *trans*-zeatin-*N7*- $\beta$ -D-glucopyranoside was not observed at all.

**Key words:** Zm-p60.1,  $\beta$ -glucosidase, maize, *tZOG*, *cZOG*, cytokinin, protein evolution, protein mutagenesis

**Acknowledgments:** Research is supported by grant LC 06034.

## ÚVOD

Metabolismus cytokininů společně s dalšími metabolickými drahami fytohormonů rostlin ovlivňuje celou řadu vývojových procesů. Fytohormony bývají dočasně, nebo trvale inaktivovány konjugací s monosacharidy, aminokyselinami atd. V případě cytokininů existují dvě možnosti jejich deaktivace – *N*-glukosylace vytváří trvale inaktivované glukosidy, které jsou dále enzymaticky definitivně eliminovány, zatímco *O*-glukosylace vytváří glukosidy, které mohou být v případě potřeby pomocí specifické  $\beta$ -glukosidasy opět uvolněny (Sakakibara, 2006). Kukuřičná  $\beta$ -glukosidasa Zm-p60.1 je schopna štěpit kinetin-*N*3- $\beta$ -D-glukospyranosid a *trans*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glukopyranosid (Brzobohatý et al., 1993). Struktura a funkce Zm-p60.1 byla podrobně studována (Rotrekl et al., 1999; Zouhar et al. 2001; Kiran et al., 2006; Dopitová et al., 2008). Studium aktivního centra enzymu odhalilo řadu aminokyselin, které se podílejí na interakci se substrátem (Rotrekl et al., 1999; Zouhar et al., 2001; Dopitová et al., 2008).

Řešená práce představuje analýsu substrátové specifity pěti nových vícenásobných mutantů W373K/M376L, W373K/P372S/M376L, W373K/P372T/M376L, W373K/P372S a W373K/P372T, odvozených z mutanty W373K (Dopitová et al., 2008), vůči přirozeným (*trans*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glukopyranosid, *cis*-zeatin-*O*- $\beta$ -D-glukopyranosid) a umělým (4-nitrofenyl-*O*- $\beta$ -D-glukopyranosid a 4-methylumbellyferyl-*O*- $\beta$ -D-glukopyranosid) substrátům.

## MATERIÁL A METODIKA

Řízená mutagenese, purifikace rekombinantních proteinů, enzymová kinetika, kvantitativní TLC

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Bylo zjištěno, že všechny nové mutanty, včetně W373K a WT, více preferují *c*ZOG než *t*ZOG jako substrát. Mutanta W373K/P372T/M376L vykazuje největší posun v hydrolytické preferenci vůči oběma přirozeným substrátům. Zatímco hydrolysa *t*ZOG je oproti WT velmi redukována, schopnost hydrolysy *c*ZOG je snížena podstatně méně.

## ZÁVĚR

Specifickou změnou aminokyselin v okolí aktivního centra  $\beta$ -glukosidasy Zm-p60.1 lze cíleně měnit hydrolytické parametry vůči svým substrátům. Touto cestou je tedy možné vytvářet molekulární nástroje pro jemné ovlivňování cytokininového metabolismu rostlin.

**LITERATURA**

- B. Brzobohatý, I. Moore, P. Kristoffersen, L. Bako, N. Campos, J. Schell, K. Palme: Release of active cytokinin by  $\beta$ -glucosidase localized to the maize root meristem, *Science*, **262**, 1051-1054, (1993).
- R. Dopitová, P. Mazura, L. Janda, R. Chaloupková, P. Jeřábek, J. Damborský, T. Filipi, N. S. Kiran, B. Brzobohatý: Functional analysis of the aglycone-binding site of the maize  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1, *FEBS Journ.*, **275**, 6123-6135, (2008).
- N. S. Kiran, L. Polanská, R. Föhlerová, P. Mazura, M. Válková, M. Šmeral, J. Zouhar, J. Malbeck, P. I. Dobrev, I. Macháčková, B. Brzobohatý. Ectopic over-expression of the maize  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1 perturbs cytokinin homeostasis in transgenic tobacco, *J. Exp. Bot.*, **57**, 985-996, (2006).
- V. Rotrekl, E. Nejedlá, I. Kučera, F. Abdallah, K. Palme, B. Brzobohatý. The role of cysteine residues in structure and enzyme activity of a maize  $\beta$ -glucosidase, *Eur. J. Biochem*, **266**, 1056-1066, (1999).
- H. Sakakibara: CYTOKININS: Activity, biosynthesis, and translocation, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 431-449, (2006).
- J. Zouhar, J. Vévodová, J. Marek, J. Damborský, Xiao-Dong Su and B. Brzobohatý. Insights into the functional architecture of the catalytic center of a maize  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1, *Plant Physiol.*, **127**, 973-985, (2001).