

## DESIGNING MOLECULAR TOOLS FOR DISCOVERING AND MODULATING PLANT HORMONE SYSTEM

Turek D., Mazura P.

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

E-mail: [dusanturek@seznam.cz](mailto:dusanturek@seznam.cz)

---

### ABSTRACT

Development and growth of the plant is mostly controlled by plant hormones (phytohormones), whose concentration is regulated by enzymes. One of the enzymes that are involved in this regulation is the maize Zm-p60.1  $\beta$ -glucosidase. Protein engineering offers a means to change the substrate specificity of this enzyme. Changes in substrate specificity of enzymes can be achieved by mutations at the DNA level. Introduced mutation may have destructive side effects on protein structure. One of the ways to avoid these negative impacts of mutation is to increase the structural strength of the enzyme by adding new hydrogen bonds, whose side effect is an increase in thermostability of the enzyme.

The aim was to study available informations on the Glycoside Hydrolase 1 family (at [www.CAZy.org](http://www.CAZy.org)), to subjugate selected group of enzymes to bioinformatic analysis and on that basis to propose another possible direction of research, the enzyme Zm-p60.1  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) from maize (*Zea mays*). Based on the analysis of publications and informations contained in the CAZy database this work proposes to increase enzyme thermostability Zm-p60.1 by introducing single point mutations D112K, which should lead to new hydrogen bonds, which would contribute to the stabilization of the protein. New, more stable enzyme Zm-p60.1 should be the default option for the preparation of the next generation of enzymes with modified substrate specificity towards cytokines conjugates.

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase, thermostability, hydrogen bonds

## ÚVOD

Databáze CAZY ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)) popisuje skupinu enzymů, jejichž společnou vlastností je, že degradují, upravují nebo vytváří glykosidickou vazbu mezi sacharidy a jejich konjugáty. CAZY navíc třídí tyto enzymy i podle jejich strukturální podobnosti do 14 klanů. Enzym Zm-p60.1  $\beta$ -glukosidasa z kukuřice (EC 3.2.3.21) patří do rodiny GH1, kde všichni její členové sdílí stejný strukturální motiv –  $(\beta/a)_8$ . Databáze CAZY je dobrým zdrojem informací, porovnávalme-li vlastnosti podobných enzymů. Jednou z takových vlastností může být termostabilita. Cílem práce bylo najít v databázi CAZY skupinu podobných  $\beta$ -glukosidas a zjistit (z databáze UNIPROT), u kterých byla provedena mutagenese zaměřená na termostabilitu. Dalším krokem bylo odhadnout, zda je možné tyto mutace přenést na Zm-p60.1. Důvodem, proč vytvářet termostabilnější rostlinný enzym, je to, že zavádění nových vodíkových vazeb, disulfidických vazeb, solných můstků či hydrofobních aminokyselin vede také k celkovému zpevnění struktury proteinu. Tato nová pevnější struktura se pak může stát novou generací rostlinných enzymů, které budou mutovány ve smyslu změny substrátové specificity. V současné době měly některé nové mutace u  $\beta$ -glukosidasy destruktivní charakter a nebylo tedy možné charakterizovat tyto mutanty. Výsledkem této práce je navržení nových mutací, jež zpevní proteinovou strukturu enzymu  $\beta$ -glukosidasy.

## MATERIÁL A METODIKA

Bioinformatická analýza sekvencí (Clustal W) a strukturálních dat (UCSF Chimera).

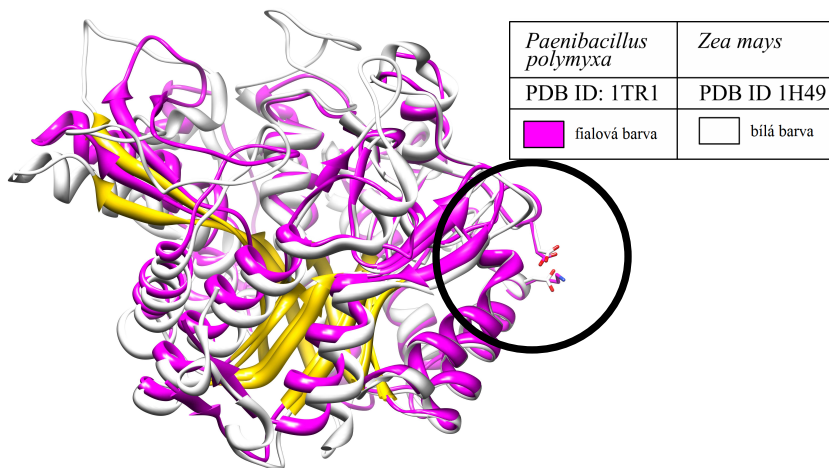
## VÝSLEDKY A DISKUZE

Z GH1 rodiny obsahující více než 2200 záznamů bylo nalezeno 1200 enzymů, jež jsou detailněji popsány v databázi UNIPROT. Na základě referencí byla určena skupina 12-ti inženýrovaných enzymů. Z této skupiny byly mutovány celkem tři různé enzymy za cílem získat termostabilnější varianty. Z detailnější sekvenční a strukturální analýzy těchto enzymů s  $\beta$ -glukosidasou z kukuřice vyplývá, že mutace provedené na enzymu  $\beta$ -glukosidasa A (BglA) z bakterie *Paenibacillus polymyxa* je přenositelná na Zm-p60.1:

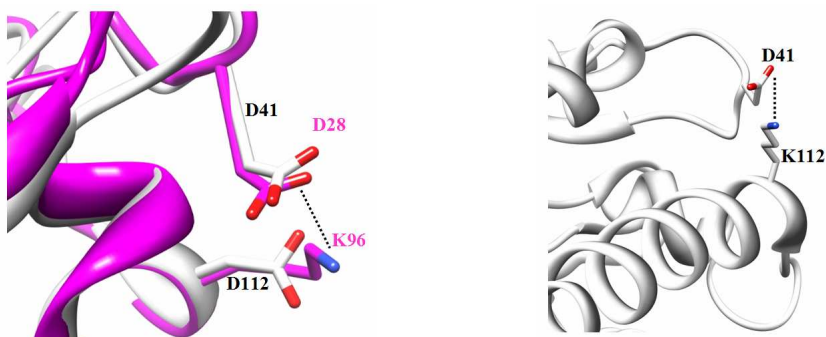
Pozice	96	106	116
Zachovalost	****:*:*	:* :*	*:*. **
Bgl A	WPRIFPNG--	DGEVQKGLD	YYH
Zm-p60.1	WPRILPKGTK	EGGINPDGIK	YYR

Obr. č. 1 – Srovnání aminokyselin enzymů Zm-p60.1 (*Zea mays*) a BglA (*Paenibacillus polymyxa*) ukazuje, že okolí centra mutace je zachovalé. Šipka značí mutaci na pozici 112 u Zm-p60.1.

Dalším důkazem přenositelnosti mutace je strukturální analýza, která potvrdila, že vytipované pozice aminokyselin si odpovídají polohou v prostoru (Obr. č. 2). Zvětšená oblast je ukázána na Obr. č. 3.



Obr. č. 2. - Strukturní přeložení kukuřičné  $\beta$ -glukosidasy Zm-p60.1 (PDB ID: 1HXJ, bílá) a  $\beta$  glukosidasy z *Paenibacillus polymyxa* (PDB ID: 3CMJ, fialová). Ve vyznačeném kruhu je vidět, že pozice (K96, D112) si v enzymech odpovídají.



Obr. č.3.a – Naznačená vodíková vazba (tečky) v enzymu BglA (PDB ID: 3CMJ, fialová) vzniká mezi D28 a K96. Současný stav u Zmp60.1 (PDB ID: 1HXJ, bílá) neumožňuje vzniku vodíkového můstku mezi aminokyselinou D41 a D112. V části 3.b je zobrazen teoretický model mutace D112K u Zm-p60.1. Je pravděpodobné, že dojde ke vzniku vodíkové vazby.

---

**ZÁVĚR**

Porovnání enzymů GH1 rodiny s  $\beta$ -glukosidasou z kukuřice vedlo k nalezení jednobodové mutace D112K, jež je odvozena od příbuzného enzymu Bgl A. Mutace pravděpodobně vytvoří nový vodíkový můstek zpevňující proteinovou kostru enzymu. V současné době dochází k charakterizaci tohoto mutanta.