

PREPARING, ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT PROTEINS OF β -GLUKOSIDASE ZM-P60.1

PŘÍPRAVA, IZOLACE A ČÁSTEČNÁ CHARAKTERIZACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ β -GLUKOSIDASY ZM-P60.1

Klimeš P.^{1,2}, Mazura P.¹, Filipi T.¹, Brzobohatý B.¹

¹Laboratory of Plant Molecular Biology, Institute of Biophysics AS CR, v.v.i. and Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech republic

E-mail: pavel.klimes@seznam.cz

ABSTRACT

The maize β -glucosidase (EC 3.2.1.21) Zm-p60.1 is an enzyme catalyzing the hydrolysis of trans-zeatin-O-glucopyranoside to glucose and trans-zeatin.

This thesis is focused on the production, purification and partial characterization of the mutants SB1 and SB2 of Zm-p60.1. The thesis includes a theoretical part devoted to a review of the literature on purification of recombinant proteins involved in cytokinin metabolism of plant. The practical part contains part of the study of two obtained mutant forms of Zm-p60.1. The Zm-p60.1 mutants SB1 and SB2 were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS-T1^R and purified by affinity chromatography on a 5 ml HisTrap HP column followed by gel filtration on a HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade column to purities of > 95%.

Enzyme kinetics was measured at 30 °C with the artificial substrate pNPG: the values for the SB1 mutant were $K_m = 0.48 \pm 0.02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ and $k_{cat} = 12.94 \pm 0.10 \text{ s}^{-1}$. For SB2 the values were $K_m = 0.50 \pm 0.02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ and $k_{cat} = 19.12 \pm 0.20 \text{ s}^{-1}$.

Hydrolytic efficiency of SB2 is about 30% higher than SB1 and is equal to approximately 60% of WT. These mutants of Zm-p60.1 can be a tool for subtle changes in cytokinin metabolism in plants. These and other mutated forms of Zm-p60.1 will be mobilized into transgenic plants as part of future research into the regulation of cytokinin homeostasis.

Key words: β -glucosidase, purification, recombinant protein

Acknowledgments: This project was supported by grant P305/11/P768 from the Czech Science Foundation and the project CEITEC – Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the ERDF.

ÚVOD

Cílem této práce byla exprese, purifikace a částečná charakterizace rekombinantních mutant SB1 a SB2 kukuřičné β -glukosidasy Zm-p60.1. Součástí byla taktéž literární rešerše rešerše purifikačních postupů využívaných při izolaci enzymů zapojených do cytokininového metabolismu rostlin exprimovaných jako rekombinantní proteiny.

Rekombinantní proteiny jsou takové proteiny, které jsou získávány expresí rekombinantní DNA v heterologních expresních systémech, jako jsou bakterie, kvasinky, hmyzí, či savčí buňky a transgenní rostliny.

Expresce rekombinantních proteinů je využívána převážně v případech, kdy je obtížné studovaný protein z přirozeného zdroje izolovat, nebo je-li míra exprese studovaného proteinu v daném organismu nízká [1].

Námi studovaný enzym, β -glukosidasa (EC 3.2.1.21) uvolňuje biologicky aktivní cytokininy z *O*-glukosidů, které jsou hydrolyticky štěpeny na monosacharid a aglykon [2,3].

MATERIÁL A METODIKA

Transformace bakterií

Každý z konstruktů mutant SB1 a SB2 β -glukosidasy Zm-p60.1 byl sterilně transformován do *E. coli* BL21(DE3)pLysS-T1R. Do mikrozkušavky typu Eppendorf bylo napipetováno 20 μ l KCM (5x koncentrovaný) a přidáno 80 μ l roztoku obsahujícího konstrukt pRSET A::Zm.p60.r (1 μ l konstrukt v 79 μ l ddH₂O). K roztoku bylo přidáno 100 μ l kompetentních buněk a mikrozkušavka byla dána na 20 minut do ledu. Po této době byl proveden teplotní šok (30 s, 42 °C) následovaný pětiminutovou temperancí na ledu. K tomuto roztoku bylo přidáno 1 ml SOC média a výsledná směs byla následně inkubována při teplotě 37 °C a 550 rpm po dobu 1 hodiny. Výsev byl proveden v množstvích 50 a 150 μ l na Petriho misky obsahující LB médium s ampicilinem (100 mg·ml⁻¹) a XGlcp (40 μ g·ml⁻¹). Bakterie byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Mikroexpresní analýza

Ze zatransformovaných buněk na Petriho miskách bylo vybráno 8 kolonií lišící se intenzitou modrozeleného zbarvení. Pro vytvoření nočních kultur bylo napipetováno do sterilních zkumavek 5 ml obohaceného LB média a sterilní špičkou, nebo párátkem byl přenesen střed kolonie do zkumavky s médiem. Zkumavky byly třepány při teplotě 37 °C a 300 rpm přes noc.

Z každé noční kultury bylo do mikrozkušavky odebráno 1,3 ml bakteriální suspenze, která byla následně centrifugována při 4 °C a 6000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odlit a pelet jemně

resuspendován ve 100 μ l sterilního glycerolu (10 % m/m). Tyto roztoky byly šokově zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80 °C.

Do každé Erlenmayerovy baňky (250 ml) bylo převedeno 50 ml obohaceného LB média a následně 1 ml noční kultury. Následná kultivace probíhala při 37 °C a 200 rpm 3,5 hodiny do doby než zákal roztoku měřený při vlnové délce 600 nm dosahoval absorbance v rozmezí 0,45 – 0,65 proti blanku (obohacené LB médium). Expres rekombinantního proteinu byla zahájena přidávkem 5 μ l IPTG a roztoky s bakteriemi byly dále kultivovány při 22,5 °C a 200 rpm po dobu 3 hodin. Bakterie byly centrifugovány při 4 °C a 6000 rpm po 10 minut, supernatant byl odlit, pelet resuspendován v 2,5 ml sonikačním pufru zamražen na -20 °C.

Zkumavky s resuspendovanými buňkami byly další den rozmrazeny na ledu a následně čtyřikrát desintegrovány 20 sekund. Centrifugací při 4 °C a 30000 g po dobu 30 minut byl oddělen supernatant od peletu. Supernatant s rekombinantním proteinem byl převeden do mikrozkušavky a umístěna na led. Koncentrace proteinů v roztocích byla zjištěna fotometricky dle Bradfordovy.

Míra exprese mutant SB1 a SB2 β -glukosidasy Zm-p60.1 byla zjištěna denzitometrickou analysou SDS gelu, NATIV gelu a zymogramu obsahující vzorky lysátů.

Příprava bakteriálních lysátů

Do dvou Erlenmaerových baněk (3000 ml) bylo nalito 1000 ml obohaceného LB média a přidáno 0,5 ml bakteriální konzervy. Následná kultivace při 37 °C a 200 rpm probíhala do doby než zákal roztoku měřený při vlnové délce 600 nm dosahoval absorbance v rozmezí 0,45 – 0,65 proti blanku (obohacené LB médium). Expres rekombinantního proteinu byla zahájena přidávkem 100 μ l sterilního IPTG (1 mol \cdot l⁻¹). Další kultivace probíhala 3 hod při 22,5 °C a 200 rpm.

Kultury byly centrifugovány 10 min při 6000 rpm a pelet byl resuspendován v 100 ml sonikačního pufru. Takto připravený roztok byl skladován při -20 °C.

Purifikace rekombinantních proteinů

Kultury v příslušném pufru byly desintegrovány v čtyřech cyklech po dobu 1 min při 50 % výkonu desintegrátoru. Roztok byl centrifugován 30 min při 30000 g a supernatant byl filtrován přes filtr Minisart 0,20 μ m.

Prvním krokem purifikace byla afinitní chromatografie. Kolona HisTrap HP (5 ml) byla ekvilibrována 25 ml roztoku 50 mmol \cdot l⁻¹ NiSO₄ a následně promyta 25 ml ddH₂O. Následná ekvibrace kolony byla provedena 25 ml směsí roztoků A1 a B s výslednou koncentrací imidazolu 20 mmol \cdot l⁻¹. Filtrovaný roztok s rekombinantním proteinem byl na kolonu nanesen rychlostí 3 ml \cdot min⁻¹. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 5 ml směsí pufru A1 a B obsahující 20 mmol \cdot l⁻¹ imidazol a 15 ml směsí pufru A1 a B při použití lineárního gradientu imidazol 20 – 50 mmol \cdot l⁻¹. Eluce proteinu probíhala 30 ml pufru A2.

Frakce obsahující rekombinantní protein byly spojeny a zkoncentrovány ultracentrifugací přes Amicon ultra 30 k MWCO (Millipore) a naneseny na gelovou kolonu HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade ekvilibrovanou pufrům o složení 50 mmol·l⁻¹ Tris, 1 mol·l⁻¹ NaCl (pH 7,0). Eluce probíhala přes noc stejným pufrům rychlostí 1 ml·min⁻¹. Druhý den byly frakce s dimerní složkou enzymu zkoncentrovány ultracentrifugací přes Amicon ultra 10 k MWCO (Millipore), byla zjištěna koncentrace rekombinantního proteinu a provedena SDS-PAGE, Nativ-PAGE a zymogram.

Enzymová kinetika

Bylo připraveno 100 ml 0,2 mol·l⁻¹ Na₂CO₃.

Kalibrační koncentrace *p*-nitrofenolu v 50 mmol·l⁻¹ citrát-fosfátovém pufru (pH 5,5): 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40 mmol·l⁻¹

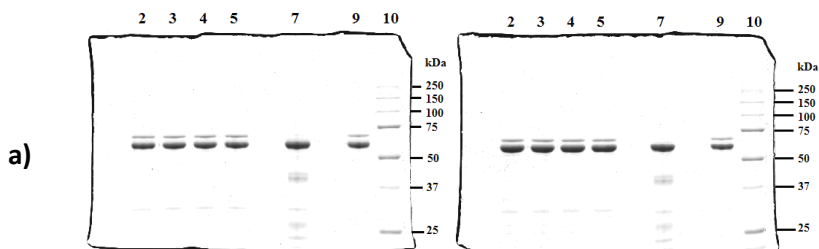
Kalibrační roztok: 120 μl roztoku Na₂CO₃ + 80 μl kalibračního roztoku *p*-nitrofenolu

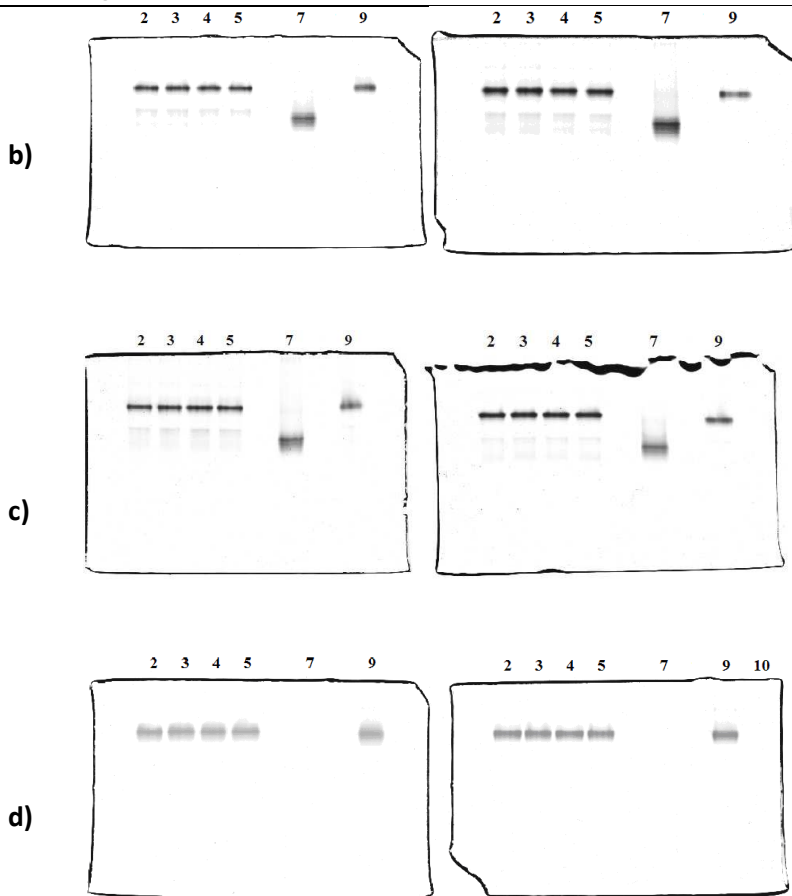
Blank: 120 μl roztoku Na₂CO₃ + 80 μl citrát-fosfátového pufru

Enzymová kinetika probíhala na umělém substrátu pNPG (při teplotě 30 °C) v koncentracích 0,25; 0,50; 1,0; 1,25; 1,5; 3,0; 10,0; 20,0 a 40,0 mmol·l⁻¹. Po smíchání enzymu s roztokem substrátu bylo v pravidelných časových intervalech odebráno 80 μl reakční směsi, která byla napipetována do 120 μl roztoku Na₂CO₃. Následně byla měřena absorbance roztoku při 405 nm na fotometru Tecan Rainbow. Každé stanovení bylo provedeno minimálně ve třech opakování a z naměřených absorbancí byly dle kalibrační přímky odvozeny počáteční rychlosti reakce, ze kterých byly vypočteny kinetické parametry K_m a k_{cat} daného enzymu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

SDS-PAGE, nativ-PAGE a zymogram purifikovaných mutantů



**Obrázek 1: SB1**

a) SDS-PAGE: : 2 – 5: purifikovaný enzym SB1; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru); 10: marker molární hmotností proteinů

b) nativ-PAGE hned po purifikaci: 2 – 5: purifikovaný enzym SB1; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru)

c) nativ-PAGE v den enzymové kinetiky: 2 – 5: purifikovaný enzym SB1; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru)

d) zymogram: 2 – 5: purifikovaný enzym SB1; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru) (barveno 3 min 40 s)

SB2

a) SDS-PAGE: : 2 – 5: purifikovaný enzym SB2; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT; 10: marker molární hmotností proteinů

b) nativ-PAGE hned po purifikaci: 2 – 5: purifikovaný enzym SB2; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru)

c) nativ-PAGE v den enzymové kinetiky: 2 – 5: purifikovaný enzym SB2; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru)

d) zymogram: 2 – 5: purifikovaný enzym SB2; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru) (barveno 4 min)

Enzymová kinetika mutant SB1 a SB2

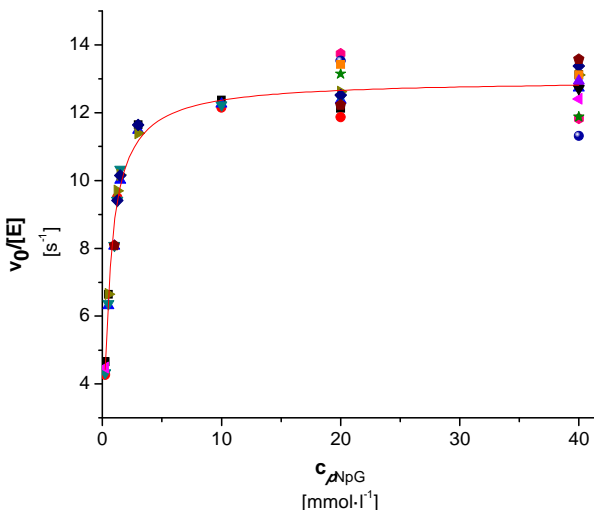
Určení kinetických parametrů obou mutant bylo provedeno na umělém substrátu pNPG při 30 °C den po purifikaci. Substrát je používán pro měření kinetických parametrů in vitro a po enzymové reakci poskytuje barevný produkt *p*-nitrofenol.

Pro vyhodnocení byla použita kinetická rovnice Michaelis-Mentenové.

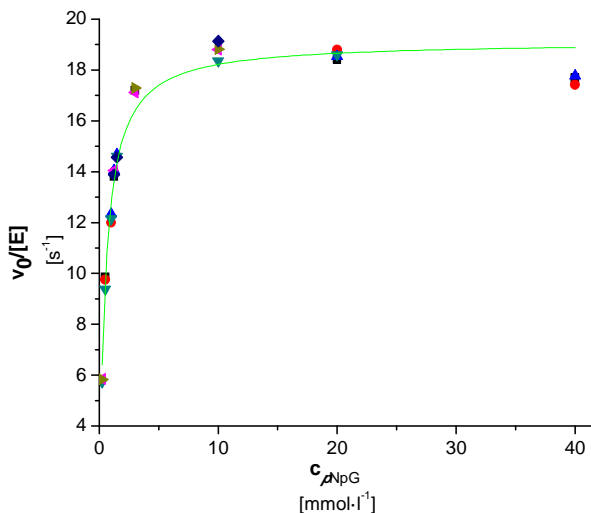
Rovnice závislosti:
$$y = \frac{k_{cat} \cdot x}{K_m + x}$$

Z naměřených dat vyplývá, že obě mutanty sice vykazují nižší rychlost hydrolysy umělého substrátu pNPG než WT, avšak mají k němu vyšší afinitu. Zatímco mutanta SB1 vykazuje 3,3 krát menší k_{cat} než WT, rychlost mutanty SB2 byla snížena jen 2,2 krát. Afinita obou mutant vůči substrátu byla téměř shodná a oproti WT vzrostla asi 1,4 krát. Z porovnání hydrolytických eficientí vyplývá, že mutanta SB2 hydrolyzuje pNPG asi o 30 % efektivněji, než mutanta SB1 a dosahuje 60 % hydrolytické eficientie WT.

Obrázek 2: Závislost počáteční rychlosti reakce mutanty SB1 β -glukosidasy Zm-p60.1 na koncentraci substrátu pNPG (Výstup programu Origin Pro 8.0 dle kinetické rovnice Michaelis-Mentenové)



Obrázek 3: Závislost počáteční rychlosti reakce mutanty SB2 β -glukosidasy Zm-p60.1 na koncentraci substrátu pNPG (Výstup programu Origin Pro 8.0 dle kinetické rovnice Michaelis-Mentenové)



Tab. 1: Kinetické parametry mutant SB1, SB1 β -glukosidasy Zm-p60.1 a β -glukosidasy Zm-p60.1-wild-type získané z kinetické analýzy hydrolýzy substrátu pNPG[4]

Enzym	K_m (mmol·l ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m	Relativní eficience
WT	0,68 ± 0,03	42,8 ± 0,1	62,94	100,00
SB1	0,48 ± 0,02	12,9 ± 0,1	26,96	42,83
SB2	0,50 ± 0,02	19,1 ± 0,2	38,24	60,76

Relativní eficience: $(k_{cat}/K_m)_{mutant}/(k_{cat}/K_m)_{WT} \times 100$ (Výstup programu Origin Pro)

ZÁVĚR

Práce řeší problematiku produkce, izolace a charakterizace mutant SB1 a SB2 kukuřičné β -glukosidasy Zm-p60.1.

Teoretická část práce je věnována literární rešerši purifikace rekombinantních proteinů zapojených do cytokininového metabolismu rostlin obsahující 14 článků. Nejčastěji používanou technikou pro purifikaci rekombinantních proteinů cytokininového metabolismu rostlin byla kombinace afinitní

chromatografie s gelovou filtrací, iontově výměnnou chromatografií nebo chromatografií s hydrofobními interakcemi. Chromatofokasace byla využita pouze ve dvou případech. Nejpoužívanějším expresním systémem byly bakterie *Escherichia coli*. Ve dvou případech byly použity kvasinky *Pichia pastoris* a v jednom případě *Saccharomyces cerevisiae*.

Praktická část práce je zaměřena na produkci, purifikaci a enzymovou kinetiku mutant SB1 a SB2 kukuřičné β -glukosidasy Zm-p60.1. Exprese proteinů probíhala v bakteriích *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS-T1R. Částečná purifikace byla realizována afinitní chromatografií za použití kolony HisTrap HP (5 ml). Vysoké homogenity proteinů (> 95 %) bylo docíleno purifikací gelovou filtrací na koloně HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade.

Kinetické parametry obou mutantů byly získány hydrolyzou umělého substrátu p-nitrofenyl- β -D-glukopyranosidu: u mutantů SB1 byly zjištěny hodnoty $K_m = 0,48 \pm 0,02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $k_{cat} = 12,9 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$; u mutantů SB2 byly hodnoty zjištěny vyšší, a to $K_m = 0,50 \pm 0,02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $k_{cat} = 19,1 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$. Obě mutace mají sice nižší rychlost hydrolyzy substrátu než WT, ale vyšší afinitu k tomuto substrátu. Hydrolytická eficeience mutantů SB2 je asi o 30 % vyšší než u mutantů SB1 a představuje 60 % hydrolytické eficeience WT.

U mutantů SB1 a SB2 nebyl zaznamenán téměř žádný rozpad dimeru na monomerní jednotky enzymu. Lze proto očekávat, že zavedené mutace nemají výraznější vliv na stabilitu kvarterní struktury enzymu.

LITERATURA

- [1] Watson J. D., Tooze J., Kurtz D. T. (1988): Rekombinantní DNA, Krátký kurz. Academica Praha, 296 s.
- [2] Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of Active Cytokinin by a β -Glucosidase Localized to the Maize Root Meristem. *Science* 262, 1051 – 1054
- [3] Cairns J. R. K., Esen A. (2010): β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Science* 67, 3389 – 3405
- [4] Dopitová R. (2009): Funkční architektura aktivního místa kukuřičné β -glukosidasy Zm-p60.1. Brno, 84 s. Disertační práce. Masarykova univerzita.