

## DESIGN, CREATING AND SCREENING OF MUTANT LIBRARY OF CORN ENZYME $\beta$ -GLUCOSIDASE Zm-p60.1

NÁVRH, TVORBA A SCREENING MUTANTÍ KNIHOVNY KUKŘIČNÉHO ENZYMU B-GLUKOSIDÁSY ZM-P60.1

**Turek D., Mazura P., Brzobohatý B.**

Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: dusanturek@seznam.cz

---

### ABSTRACT

This work deals with the study of a particular enzyme,  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1 coming from corn. Zm-p60.1 is an enzyme that is part of cytokinin metabolism and can convert the inactive glycosylated form of cytokinin to its active form. Zm-p60.1 is one component that regulates the level of active hormones. Altered activity or specificity of this enzyme provides a tool which would be possible to use for fine modulation of the cytokinin level in the plant and thereby affect individual processes such as cell division, differentiation, root growth, sprout growth and other processes. Protein engineering offers a means to change substrate specificity of this enzyme.

Substrate specificity of the enzyme Zm-p60.1 is determined by amino acid composition in the vicinity of active center. The tryptophan 373 position in Zm-p60.1 is involved in stacking interaction with aromatic system on the substrate. By structural folding of 33 glycosidases from GH1 family was found that the position of W373 is highly preserved. Likewise, by the multiple sequence comparison of characterized enzymes from GH1 family, it was found that the W373 is sequentially preserved with a few exceptions where in this position occur other amino acids. By saturation mutagenesis was created a library containing 20-mutants at position W373. On artificial substrates was carried out preliminary test studying the effects of mutations on the activity of mutant enzymes. None of the mutants had higher activity than the original wild enzyme form of Zm-p60.1 (W373W). As the second most active appears W373H followed by group of 4 mutants W373F, W373G, W373T and W373Y with significantly lower activity. Other mutants had little or no activity. New variants of functional  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1 will be further studied to determine changes in substrate specificity towards cytokinin conjugates. If such a change will be found, a new glucosidases could serve as a tool for studying the hormonal system of plants.

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase, screening, mutant library

**Acknowledgments:** This work was supported by grant P305/11/P768 from the Czech Science Foundation.

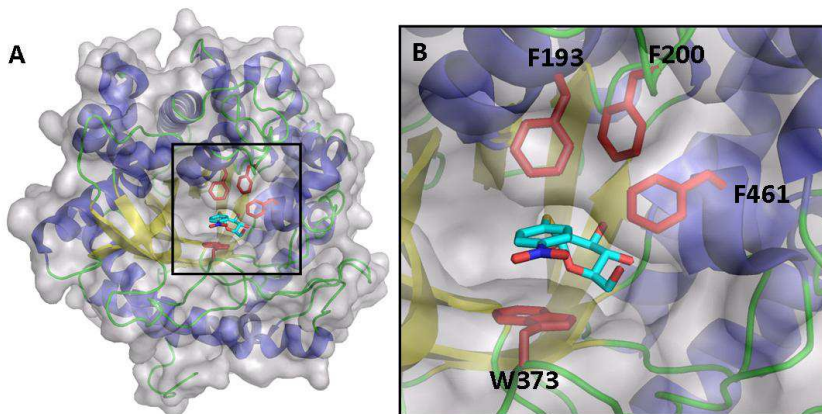
## ÚVOD

Život rostliny je omezen na jednu lokalitu. Její vývoj a růst je ovlivňován vnějšími faktory, jakými jsou počasí nebo kvalita půdy. Rostlina dokáže částečně kompenzovat vlivy z vnějšího prostředí tak, že mění hladinu aktivních rostlinných hormonů, čímž dojde ke změně fyziologických parametrů v těle rostliny. Množství fytohormonů je dynamicky řízeno řadou komplexních procesů, ve kterých se všechny dílčí kroky (biosyntéza, aktivace a degradace fytohormonu) neobejdou bez přítomnosti rostlinných enzymů. Jedním z enzymů, který dokáže přetvářet fytohormony z neaktivní (glykosylované) formy do aktivní formy, je enzym z kukuřice (*Zea mays*)  $\beta$ -glukosidáza (Zm-p60.1). Různé mutantní varianty enzymu Zm-p60.1 mají odlišnou substrátovou specifitu vůči přírodním (*trans*-zeatin-O- $\beta$ -D-glukopyranosid, *cis*-O- $\beta$ -D-glukopyranosid) či umělým (*para*-nitrophenol- $\beta$ -D-glukopyranosid, *p*NPG) substrátům. A právě tyto mutantní varianty mohou na molekulární úrovni fungovat jako nástroje jemně měnící hladinu aktivních hormonů v těle rostliny.

Okolí aktivního centra  $\beta$ -glukosidázy obsahuje určité uspořádání aminokyselin (klastř), o kterých se uvažuje, že jsou zodpovědné za specifické rozpoznávací interakce s aglykonem substrátu. Klastř se skládá z aminokyselin F193, F200, W373 a F461 (Dopitová et al, 2008) (*Obr. 1*). Strukturální uspořádání klastřu bylo porovnáno s dalšími podobnými rostlinnými enzymy přístupnými v databázi Carbohydrate-Active enZymes Database (zkráceně CAZY) (Henrisat et al., 1997). Na základě již dříve charakterizovaného mutantu W373K a provedené strukturální analýzy byla vytvořena kombinatorická mutagenese enzymu Zm-p60.1 v pozici W373. Naším cílem je tedy vytvořit mutantní knihovnu a následně charakterizovat mutanty vykazující aktivitu.

Obr. 1 – A) Monomerní podjednotka enzymu Zm-p60.1 (barevně jsou značeny sekundární struktury, šedá barva značí povrch enzymu).

B) Detailní pohled do okolí aktivního centra enzymu Zm-p60.1. Červeně je vyznačen klaster aminokyselin zprostředkovávající stacking interakce a Van der Waalsovy interakce s aglykonem substrátu pNPG (PDB ID: 1E1F). Pro pozici W373 byla zjišťována aminokyselinová variabilita.



## MATERIÁL A METODIKA

Bioinformatická analýza byla provedena vyhledáním všech dostupných struktur rostlinných enzymů podobných Zm-p60.1. Enzymy byly vyhledány v Glycoside Hydrolase family 1 (GH1) v databázi CAZy ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)). Strukturální porovnání těchto enzymů bylo provedeno programem PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.).

Výchozím bodem pro získání proteinových sekvencí byla databáze CAZy ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)). V rodině GH1 bylo vybráno 240 proteinů ze sloupce *Characterized*. Identické záznamy (celkem 9) byly z výběru vymazány. UniProt identifikátory posloužily k získání aminokyselinových sekvencí. Pro kvalitnější přeložení byly z této skupiny vyřazeny sekvence kratší než 400 aminokyselin, delší než 1000 aminokyselin a fragmenty sekvencí. Konečná skupina obsahovala 184 sekvencí, které byly základem mnohonásobného sekvenčního zarovnání. Přes webové rozhraní byly sekvence vloženy na server [ebi.ac.uk](http://ebi.ac.uk), kde byl k zarovnání použit program T-coffee verze 8.93 (Notredame, Higgins, & Heringa, 2000) (parametry v původním nastavení).

Vlastní mutagenese byla provedena pomocí kitu QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit. V původní DNA sekvenci pro Zm-p60.1 byl posunut čtecí rámec v pozici 373 (primer: 3'-ggaggataacccttttagtctagatgtacatgggactcccg-5'). Takto vytvořený templát byl ověřen sekvenováním. Templát byl mutován na pozici 373. Knihovna mutantů byla vytvořena jedním primerem o sekvenci 3'-ggaggataacccttttagtNNMtagatgtacatgggactcccg-5', kde *N* značí jakoukoliv

z bázi A, T, G, C a  $M$  jsou báze A, G. Po PCR reakci byla ve směsi specificky rozštěpena methylovaná templátová DNA. Tato směs se použila na transformaci do XJb *E. coli*. Kolonie byly selektovány na agarových miskách s antibiotikem ampicilinem a substrátem 5-bromo-4-chloro- $\beta$ -D-glukopyranosidem (X-Glu).

Velikost knihovny pro skríníng určuje počet variant, které chceme zachytit. Chceme-li zachytit 95% variant, lze na základě Poissonova rozdělení vypočítat velikost knihovny (Patrick, Firth, &

Blackburn, 2003). Výpočet je dán vztahem:  $L = V \cdot \ln\left(\frac{1}{1-p}\right)$ , kde  $L$  – je velikost knihovny,  $V$  –

počet variant,  $p$  – úplnost knihovny. Pro knihovnu W373X jsou parametry následující:  $V = 32$ ,  $p = 0,95 \rightarrow L = 95,9 \sim 96$ . Pokud knihovna bude mít 96 kolonií, je 32 variant pokryto z 95%. Knihovna není ale úplná – obsahuje pouze 95% všech variant.

Pokud chceme zachytit všechny varianty s 95%-ní jistotou, výpočet velikosti knihovny

je dán vztahem:  $L = -V \cdot \ln\left(-\frac{\ln P_s}{V}\right)$ ,  $L$  – je velikost knihovny,  $V$  – počet variant,

$P_s$  – pravděpodobnost výskytu každé varianty. Pro knihovnu W373X je opět  $V = 32$ ,  $P_s = 0,95 \rightarrow L = 205,6 \sim 206$ . Pokud knihovna bude mít 206 kolonií, můžeme si být z 95% jisti, že obsahuje všechny varianty. Tato velikost knihovny byla pro náš experiment vybrána jako optimální. Výpočet knihovny je dostupný z webu na adrese: <http://guinevere.otago.ac.nz/cgi-bin/ae/f/glue.pl>. Po transformaci knihovny mutantů do kompetentních XJb *E. coli* a jejich vysetí na Petriho misky, byly kolonie selektovány na antibiotiku ampicilin. Růst kolonií trval 24 hodin při 37 °C a pak dále 24 hodin při laboratorní teplotě. Princip skríníngu je založen na tom, že během kultivace kolonií na miskách dochází k neindukované expresi proteinu Zm-p60.1, který hydrolyzuje substrát X-Glu za zniku modrého barvíva.

Kolonie jednotlivých mutantů z misky na Obr. 3 byly přeneseny do 200  $\mu$ l LB média na MTP 96 desce (Iwaki). Kultivace desky probíhala při 37 °C, 700 rpm, poloměr 3 mm, po dobu 24 hodin (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Druhý den ráno byla změřena optická densita narostlých kultur ( $OD_{600} = 2,500 \pm 0,100$ ,  $n = 20$ ). Pipetou bylo z každé noční kultury přepipetováno 5  $\mu$ l do 200  $\mu$ l aLB obsahujícího navíc 2,5 mM koncentraci substrátu pNPG. Na desce byly vyhrazeny 4 jamky pro každého mutantu. Celá deska byla kultivována 17hod při 30 °C, 700 rpm. Během kultivace probíhala pouze neindukovaná exprese mutantních forem Zm-p60.1. Na konci růstu byla změřena optická densita všech jamek (Spectra Rainbow, Tecan). Deska byla centrifugována 20 minut, 3200 rpm, 4 °C. Z každé jamky bylo přepipetováno 20  $\mu$ l supernatantu do 180  $\mu$ l 0,2 M  $Na_2CO_3$ . Dle kalibrační přímky bylo dopočítáno množství uvolněného *para*-nitrofenolu (pNP) (absorbance měřena při 405 nm). Protože kultury nerostly stejně, kdy průměrná  $OD_{600}$  byla po 24

hodinách  $2,000 \pm 0,110$   $n = 80$ , musela být výsledná koncentrace *p*NP vztažena (vydělením OD600) pro danou densitu jamky.

Kultivace kolonií W373X na substrátech X-Glu (1 mM) a MUG (4-metylmberliferyl- $\beta$ -D-glukopyranosid) (1 mM) probíhala stejným způsobem jako na substrátu *p*PNG. Po 24 hodinách byla deska s X-Glu vyfocena. Deska se substrátem MUG byla vyfocena na transluminátoru (zdroj  $\lambda = 312$  nm). Množství vzniklého produktu bylo staveno pouze pro jeden substrát - *p*NPG.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

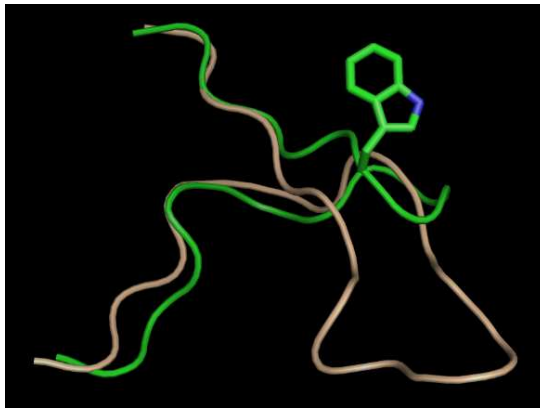
### Návrh mutantní knihovny

V rodině GH1 (databáze CAZY) je celkem 33 enzymů, včetně Zm-p60.1, jež mají vyřešenou 3D strukturu. Tento soubor 33 enzymů byl základem strukturálního porovnání. Všechny struktury byly zarovnané k enzymu Zm-p60.1 v programu PyMOL 1.3 (Molecular Graphic System; Schrödinger, LLC). Z 3D zarovnání se určila aminokyselinová variabilita, která pozičně odpovídá W373 v Zm-p60.1 (*Obr. č. 1 B*). U 30 enzymů se na této pozici nachází tryptofan. V jednom případě (enzym myrosinasa 1 pocházející z mšice zelné - *Brevicoryne brassicae*) byl k této pozici přiřazen tyrosin. Ve druhém případě (enzym MA1 pocházející z hořčice bílé - *Sinapis alba*) nelze jednoznačně určit, jaká aminokyselina strukturálně odpovídá pozici W373, protože 3D struktura enzymu MA1 je v oblasti smyčky výrazně prodloužena vzhledem k Zm-p60.1 (*Obr. 2*). Relativní zastoupení nalezených aminokyselin ze strukturální analýzy je zobrazeno v *Grafu 1*.

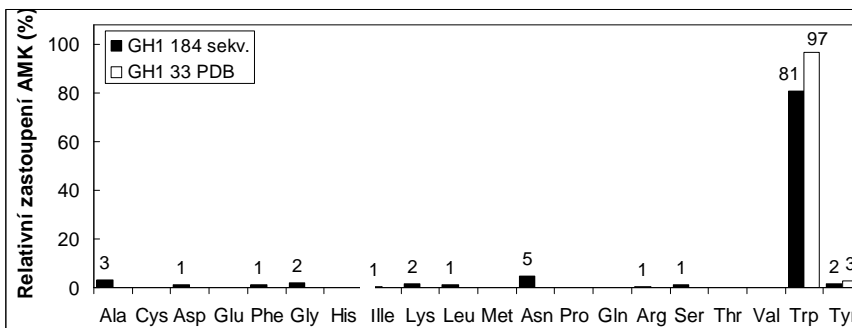
Abychom získali přehled o tom, jak je sekvenčně zachován tryptofan napříč skupinou enzymů podobných Zm-p60.1, byla databáze CAZY využita jako výchozí bod pro bioinformatickou analýzu. Námi studovaný enzym je zařazen do rodiny GH1 čítající 5 200 zástupců (ke dni 20.4.2012). Malá část je charakterizována (235 enzymů) a z této skupiny byl udělán výběr pro mnohonásobné sekvenční zarovnání. K zarovnání byl použit program T-coffee (Notredame et al., 2000).

Z výsledného zarovnání vyplývá, že pozice W373 je málo variabilní. Nejvíce zastoupenou aminokyselinou je tryptofan (153 výskytů, 81%), druhou je asparagin (9 výskytů, 4%) a ostatní leží v intervalu <0 - 6> výskytů (<0 - 3%>) (*Graf č. 1*). V rámci vybrané skupiny sekvencí se tryptofan jeví jako sekvenčně zachovalý. Obecně existuje několik důvodů, proč je daná aminokyselina konzervována. Prvním z nich je, že aminokyselina je důležitá pro správné strukturální uspořádání proteinu nebo se účastní katalytické reakce, vazby ligandu nebo je v oblasti, která zodpovídá za interakce mezi proteiny (Mayrose, Graur, Ben-Tal, & Pupko, 2004). Význam W373 spočívá v rozeznávání ligandu pomocí stacking interakce (Zouhar et al., 2001).

Obr. 2 - Strukturální zarovnání enzymů Zm-p60.1 (PDB 1XHJ, zelená barva) a myrosinasy MAI (PDB 1E4M, béžová barva) ze *Sinapis alba*. Smyčky obou enzymů mají odlišnou délku a uspořádání v prostoru. V tomto případě nelze strukturálně přiřadit aminokyselinu odpovídající pozici W373.



Graf 1 - Relativní aminokyselinová variabilita pozice W373 enzymu Zm-p60.1. Srovnání výstupů sekvenčních zarovnání ze zarovnání 184 sekvencí a 33 sekvencí ze struktur. Data shodně ukazují, že W373 je konzervován. Obě dvě skupiny dat pochází z GH1 rodiny (www.cazy.org).



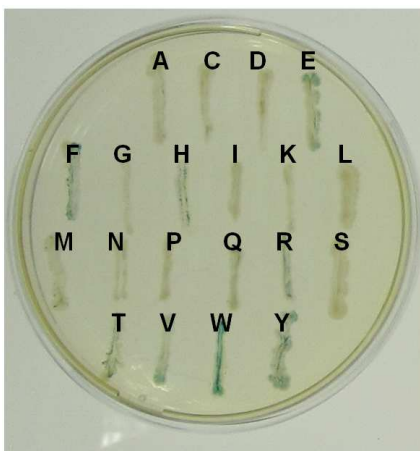
Závěr bioinformatické analýzy je, že v pozici odpovídající W373 v Zm-p60.1 je konzervován tryptofan. Zachovalost této pozice indikuje, že W373 hraje důležitou roli v rozpoznávání substrátu pro  $\beta$ -glukosidasy z rodiny GH1 (Czjzek et al., 2000). V rámci 184 sekvencí rodiny GH1 se ale v dané pozici vyskytují i další aminokyseliny. Není jasné, jestli jiné aminokyseliny, které v této pozici vidíme na sekvenčním zarovnání jsou funkční jen v rámci konkrétních glykosidas, nebo jsou to možnosti pro záměnu. Otázka, která vzešla z bioinformatické analýzy je, jak variabilita

aminokyseliny W373 získaná ze zarovnání sekvencí souvisí s mutabilitou této pozice v  $\beta$ -glukosidase Zm-p60.1.

### Tvorba a screening mutanční knihovny W373X

Kombinatorická knihovna enzymu Zm-p60.1 byla připravena místně řízenou mutagenézou (QuikChange, Agilent). Jako templát posloužila DNA pRSET:::(His)<sub>6</sub>Zm-p60.r. - W373\_DEL. K mutaci byla použita směs 32 různých primerů. Po mutagenézní reakci, kdy vznikla mutanční knihovna, byla směs inkubována s enzymem *Dpn I* a transformována do chemokompetentních *XJb E. coli*. Kvůli nízkému počtu získaných kolonií po transformaci byla reakce kitem Quik Change prováděna 3x. Celkový počet kolonií, který se podařilo zachytit, byl překvapivě nízký – 20 kolonií namísto potřebných 206 pro pokrytí variability v knihovně. Ze všech kolonií byla postupně izolována plasmidová DNA. Úspěšně osekvenovat se podařilo 8 různých mutantů z 20 kolonií. Z ekonomických důvodů, kdy by bylo celý proces izolace a sekvenace opakovat, a statistických důvodů nebylo zbylých 12 kolonií sekvenováno. Náhodné vybírání klonů z kombinatorické knihovny má svá úskalí. Obecně, v průběhu sekvenování mutanční knihovny může nastat situace, kdy se zvyšujícím se počtem osekvenovaných mutantů je stále náročnější najít nové mutanty. Z tohoto důvodu, bylo jednodušší ukončit prohledávání knihovny a vytvořit zbývajících 12 mutantů jednotlivě. Pro jednotlivé mutanty byly navrženy samostatné primery a provedena mutagenézní reakce kitem QuikChange. Tímto způsobem bylo postupně získáno zbylých 12 variant. Úplná knihovna obsahovala 20 mutantů enzymu Zm-p60.1 v pozici W373. Všechny kolonie nesoucí mutace byly přečárkovány na Petriho misky (s agarem, ampicilinem a substrátem X-Glu) (Obr. 3).

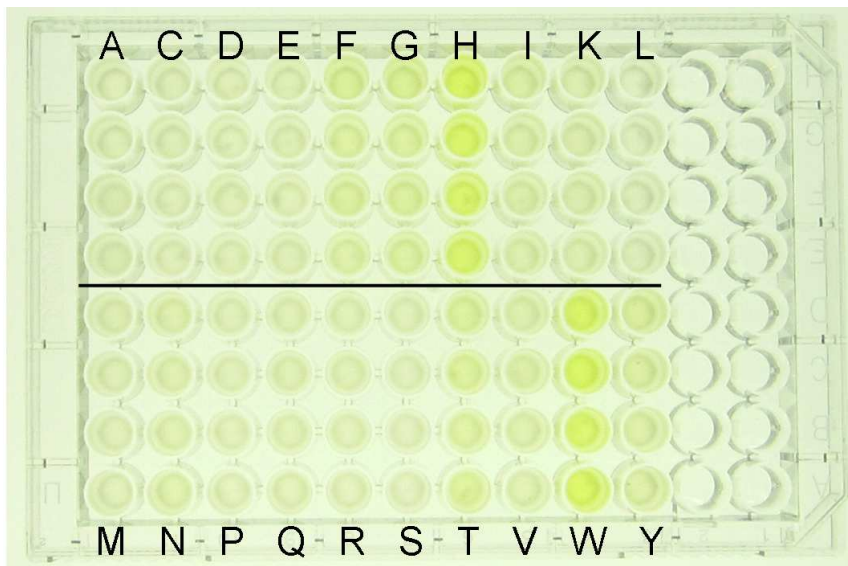
Obr. 3 - Petriho miska (s agarem a substrátem X-Glu) se všemi W373X varianty enzymu Zm-p60.1. Jednotliví mutantí vykazují různou aktivitu vůči umělému substrátu X-Glu.



Základní porovnání aktivit na agarových miskách se substrátem je vhodné k získání přehledu. Nicméně, není použitelné pro přesnější porovnání aktivit v rámci knihovny W373X. Deska o 96-ti jamkách poskytuje vhodný prostor pro kultivaci mutantní knihovny v XJb *E. coli* v médiu obsahující substrát.

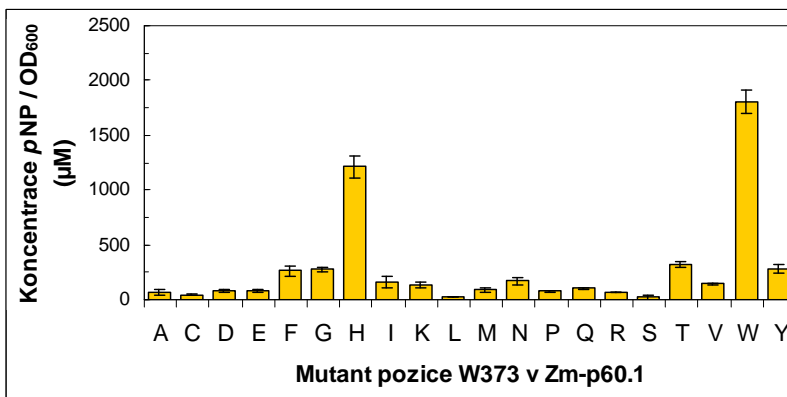
Celá knihovna W373X byla kultivována v médiu se substrátem *p*NPG (2,5 mM) (Obr. 4), X-Glu (1 mM) a MUG (1 mM) (viz Metody). Cílem kultivace na substrátech je především předběžné porovnání aktivit. Přesná kvantifikace byla možná pouze pro *para*-nitrofenol uvolněný z *p*NPG. Na *p*NPG je jednoznačně neaktivnější WT (W373) a druhým v pořadí je W373H. Na základě měření bylo zjištěno, že na tomto substrátu vytvářejí 4 mutanti (W373F, W373G, W373T a W373Y) skupinku s podobnou aktivitou (Graf 2).

Obr. 4 - Vzhled MTP96 desky obsahující LB médium se substrátem *p*NPG (2,5 mM) po 24 hodinové kultivaci. Každý mutant je zastoupen ve 4 svislých jamkách. Čára uprostřed dělí horní a dolní sekci mutantů.





Graf 2 - Měření množství uvolněného pNP za 24 hodin kultivace knihovny W373X. Směrodatná odchylka byla určena pro  $n = 4$ .

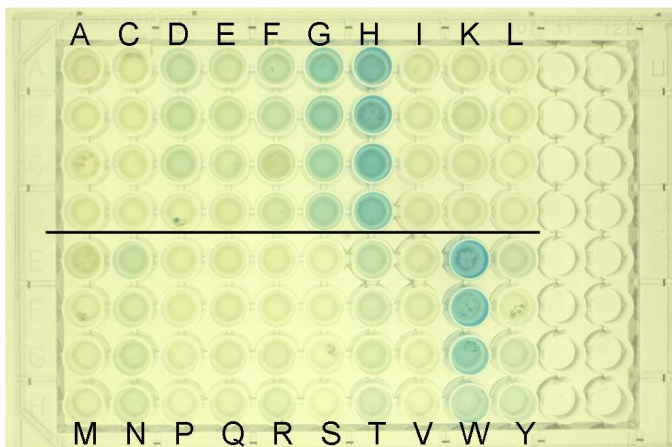


Boční řetězec Trp 373 se účastní stacking interakce s aromatickým systémem na aglykonu substrátu (Obr. 1 B). Tato interakce pak napomáhá správně orientovat glykosydickou vazbu ke štěpení (Tribolo, Berrin, Kroon, Czjzek, & Juge, 2007). Aminokyseliny His (H), Phe (F) a Tyr (Y) obsahují residua, jež mohou rovněž zprostředkovávat stacking interakci substrátem. Tímto je možné vysvětlit jejich aktivitu. Nicméně tato analogie již neplatí pro Gly (G) a Thr (T), které žádný aromatický systém neobsahují a jsou také aktivní. Pokud se jejich aktivita potvrdí, bude to nový vhled do interakce se substrátem.

Další dva substráty (X-Glu a MUG) nebyly vzhledem k technologické obtížnosti hodnoceny kvantitativně. Přesto naznačují podobné spektrum aktivních mutantů.

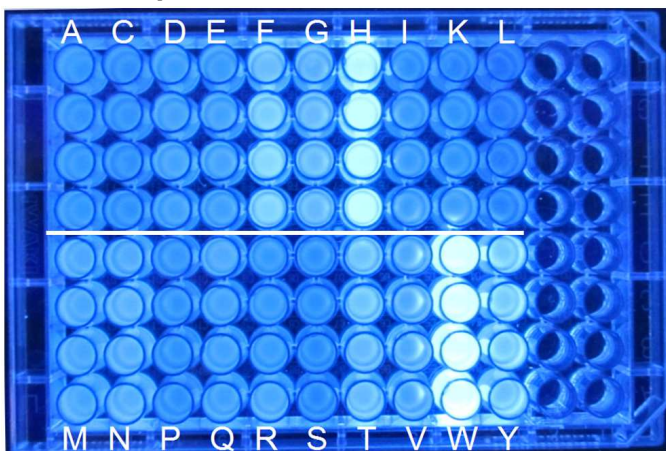
Po hydrolyze X-Glu vzniká dibromdichloroindigo. Barva produktu je modrá, jež dobře kontrastuje s nažloutlým LB médiem. Na desce s X-Glu dominuje dvojice opět W373 a W373H. Viditelnou aktivitu měla i stejná skupina jako u pNPG (W373F, W373G, W373T a W373Y), kterou rozšiřuje navíc W373D, W373E a W373N (Obr. 6).

Obr. 6 - Vzhled desky obsahující médium se substrátem X-Glu (1,0 mM) po 24 hodinové kultivaci. Každý mutant je zastoupen ve 4 svislých jamkách. Čára dělí horní a dolní skupinu mutant.



Vizualizace fluorescenčního produktu 4-methylumbelliferonu ( $\lambda_{\text{EX}} = 372 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EM}} = 455 \text{ nm}$ ) u substrátu MUG byla provedena tak, že nakultivovaná deska byla vyfocena na transluminátoru ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ). Z fotografie je vidět, že hydrolyza MUG nejefektivněji probíhá, stejně jako v předešlých případech, W373 a mutantem W373H. Dvojici doplňují méně aktivní mutanti W373F, W373G, W373N a W373Y (Obr. 7).

Obr. 7 - Vzhled desky obsahující médium se substrátem MUG (1,0 mM) po 24 hodinové kultivaci. Každý mutant je zastoupen ve 4 svislých jamkách. Deska byla vyfocena podsvícená transluminátorem při excitační vlnové délce  $\lambda = 312 \text{ nm}$ .



Na všech 3 substrátech se ukazuje vždy stejná skupina, jež má viditelnou aktivitu (W373F, W373G, W373H, W373T, W373Y). Nejvyšší má aktivitu WT = W373.

Pozice W373 byla v minulosti mutována na W373K. Tato mutace vedla k poklesu aktivity na 0,5% velikost původní formy Zm-p60.1 (na substrátech pNPG a MUG) (Dopitová et al., 2008).

Pozice W373 v Zm-p60.1 odpovídá W388 v enzymu striktosidin-O- $\beta$ -D-glukosidasy (PDB 2JF7, *Rauvolfia serpentina*). Mutace W388A způsobila výraznou změnu v aktivitě enzymu, jež po mutaci dosahovala 1% původní aktivity (substrátem byl striktosidinglukosid) (Barleben, Panjikar, Ruppert, Koepke, & Stöckigt, 2007).

Pozice W373 v Zm-p60.1 odpovídá W345 v enzymu  $\beta$ -glukosidasy (PDB 2E9L, *Homo sapiens*). Zavedením mutací W345M a W345A mělo opět výrazný vliv na aktivitu, která klesla na až 0,1% původní aktivity na všech studovaných substrátech (*para*-nitrofenolglukosidy) (Tribolet et al., 2007). Pozice tryptofanu ve dvou předěšlých případech je velice klíčová pro funkci enzymu.

Z předběžných testů aktivit mutantní knihovny W373 enzymu Zm-p60.1 vyplývá, že tryptofan může být nahrazen i jinou aminokyselinou. Výsledky jsou ve shodě s předchozími studiemi, kde se ukazuje, že vliv záměn na pozici W373 na aktivitu enzymu je vždy výrazný.

## ZÁVĚR

Enzym kukuřičná  $\beta$ -glukosidasa Zm-p60.1 patří mezi glykosidhydrolasy (GH). V databázi CAZY ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)) je zařazen do rodiny GH1. Rodina GH1 obsahuje skupinu 235 charakterizovaných enzymů a 33 vyřešených 3D struktur. Na základě mnohonásobného sekvenčního přeložení skupiny příbuzných 184 sekvencí a analýzy 33 struktur glykosidas z rodiny GH1 se ukázalo, že nejvíce konzervovanou aminokyselinou odpovídající pozici odpovídající W373 byl tryptofan. Mimo něj byla tato pozice obsazena i několika jinými aminokyselinami. Je pravděpodobné, že aminokyseliny odlišné od tryptofanu, které se objevily v mnohonásobném sekvenčním přeložení, budou ve stejné pozici jako W373. Z toho lze vyvodit, že sekvenční variabilita by mohla v případě Zm-p60.1 ukazovat na možnost mutability pozice W373.

Na základě této bioinformatické analýzy byla testována skutečná mutabilita W373 saturační mutagenézí. Vzhledem k překvapivě vyššímu počtu aktivních klonů bylo rozhodnuto zkonstruovat celou knihovnu W373X.

Po získání celé knihovny W373X byl proveden předběžný skrínig aktivity mutantů. Skrínig probíhal formou kultivace XJb *E. coli* (nesoucí plasmid jednotlivých mutantů) ve 200  $\mu$ l média v jamkách na desce formátu MTP 96. Kultivační LB médium bylo obohaceno o substráty *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid (*p*NPG), 5-chloro-4-bromo-indolyl- $\beta$ -D-glukopyranosid (X-Glu) a 4-metylmberliferyl- $\beta$ -D-glukopyranosid (MUG). Po 24 hodinové kultivaci byla aktivita mutantů kvantitativně hodnocena na substrátu *p*NPG. Nejvyšší aktivitu z mutantů měl WT (W373). Jako

druhou nejvyšší aktivitu projevil mutant W373H. Další aktivní mutanti byli W373F, W373G, W373T a W373Y. Zbývající mutanti vykazovali velmi nízkou nebo téměř žádnou aktivitu na substrátu pNPG. Na ostatních substrátech (MUG, X-Glu) knihovna W373X mutantů naznačuje podobnou tendenci v aktivitě.

Kombinace bioinformatických metod a proteinového inženýrství se ukázala jako vhodný postup pro získání zajímavých nových variant enzymu  $\beta$ -glukosidasy Zm-p60.1. V návazné práci bude sledována změna specifity těchto glukosidas vůči konjugátům cytokininů v rámci vývoje nástrojů pro studium hormonálního systému rostlin.

## LITERATURA

Barleben, L., Panjikar, S., Ruppert, M., Koepke, J., & Stöckigt, J. (2007). Molecular architecture of strictosidine glucosidase: the gateway to the biosynthesis of the monoterpenoid indole alkaloid family. *The Plant cell*, 19(9), 2886–97. doi:10.1105/tpc.106.045682

Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D. R., Henrissat, B., & Esen, a. (2000). The mechanism of substrate (aglycone) specificity in beta -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize beta -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13555–60. doi:10.1073/pnas.97.25.13555

Dopitová, R., Mazura, P., Janda, L., Chaloupková, R., Jerábek, P., Damborský, J., Filipi, T., et al. (2008). Functional analysis of the aglycone-binding site of the maize beta-glucosidase Zm-p60.1. *The FEBS journal*, 275(24), 6123–6135. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19016858>

Mayrose, I., Graur, D., Ben-Tal, N., & Pupko, T. (2004). Comparison of site-specific rate-inference methods for protein sequences: empirical Bayesian methods are superior. *Molecular biology and evolution*, 21(9), 1781–91. doi:10.1093/molbev/msh194

Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology*, 302(1), 205–17. doi:10.1006/jmbi.2000.4042

Patrick, W. M., Firth, A. E., & Blackburn, J. M. (2003). User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein engineering*, 16(6), 451–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874379>

Tribolo, S., Berrin, J.-G., Kroon, P. a., Czjzek, M., & Juge, N. (2007). The Crystal Structure of Human Cytosolic  $\beta$ -Glucosidase Unravels the Substrate Aglycone Specificity of a Family 1 Glycoside Hydrolase. *Journal of Molecular Biology*, 370(5), 964–975. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.034

Zouhar, J., Vévodová, J., Marek, J., Damborský, J., Su, X. D., & Brzobohatý, B. (2001). Insights into the functional architecture of the catalytic center of a maize beta-glucosidase Zm-p60.1. *Plant physiology*, 127(3), 973–85. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=129268&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>