

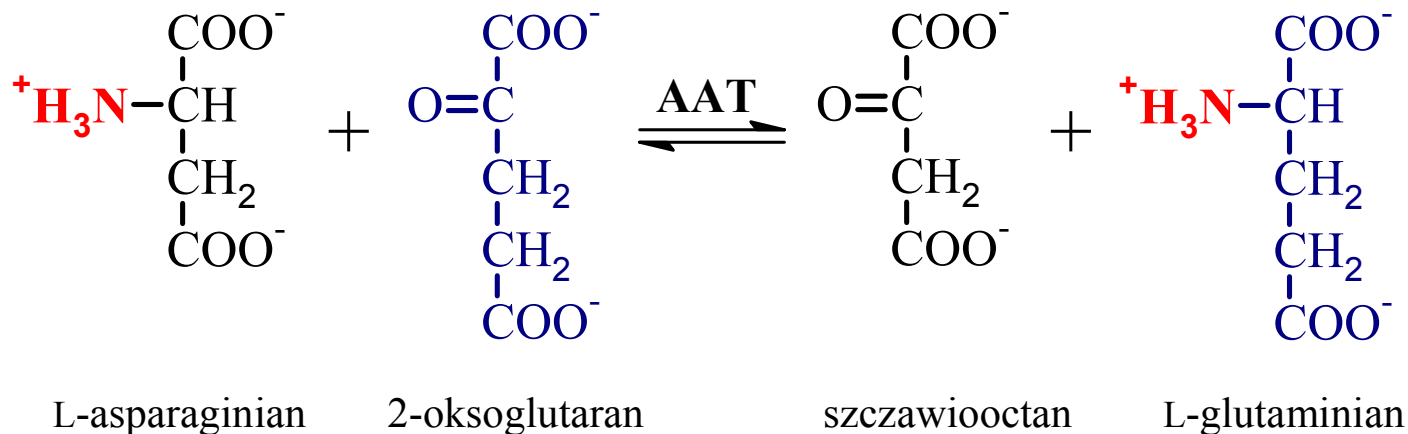
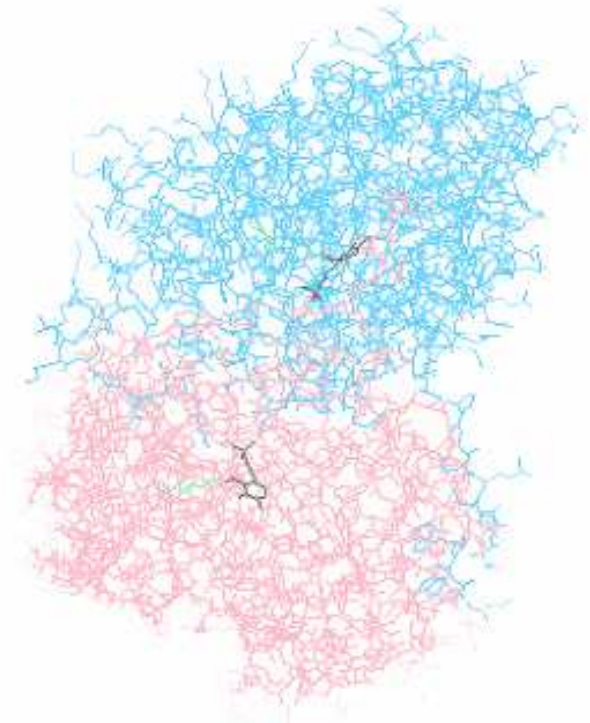
Charakterystyka izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej z siewek pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)

**Marcin Maciąga
&
Andrzej Paszkowski**



Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, SGGW

Aminotransferaza asparaginianowa (EC 2.6.1.1; AAT) – katalizuje reakcję przeniesienia grupy aminowej (-NH₂) z L-asparaginianu na 2-oksoglutaran z utworzeniem szczawiooctanu i L-glutaminianu. Reakcja jest odwracalna i przebiega z udziałem kofaktora 5'-fosforanu pirydoksalu zgodnie z mechanizmem zwanym Ping Pong Bi Bi. Enzym jest aktywny katalitycznie wyłącznie jako dimer o masie cząsteczkowej około 90 kDa.



- ❑ Bierze udział w asymilacji azotu dostarczając 2-oksoglutaranu do cyklu GS/GOGAT;
- ❑ Dostarcza L-asparaginianu, który jest prekursorem w biosyntezie metioniny, tryptofanu i lizyny oraz asparaginy i ureidów;
- ❑ Uczestniczy w wewnątrzkomórkowym systemie wahadłowym jabłczanowo-asparaginianowym przenoszącym równoważniki redukcyjne w poprzek błon: mitochondrialnej, chloroplastowej i peroksysomalnej;
- ❑ Bierze udział w międzykomórkowym transporcie metabolitów między mezofilem a komórkami pochwy okołowiązkowej u roślin typu C₄.

Gatunek	Cytoplazma	Mitochondria	Chloroplasty	Peroksysomy	Glioksysomy	Liczba genów
Proso (<i>Panicum miliaceum</i>)	*	*	*			3
Ryż (<i>Oryza sativa</i>)	*	**	*			4
Szpinak (<i>Spinacia oleracea</i>)	*	*	*	*		4
Rzodkiewnik (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	**	*	*	*		5
Kukurydza (<i>Zea mays</i>)	**	*	*		*	5
Soja (<i>Glycine max</i>)	**	*	*		*	5

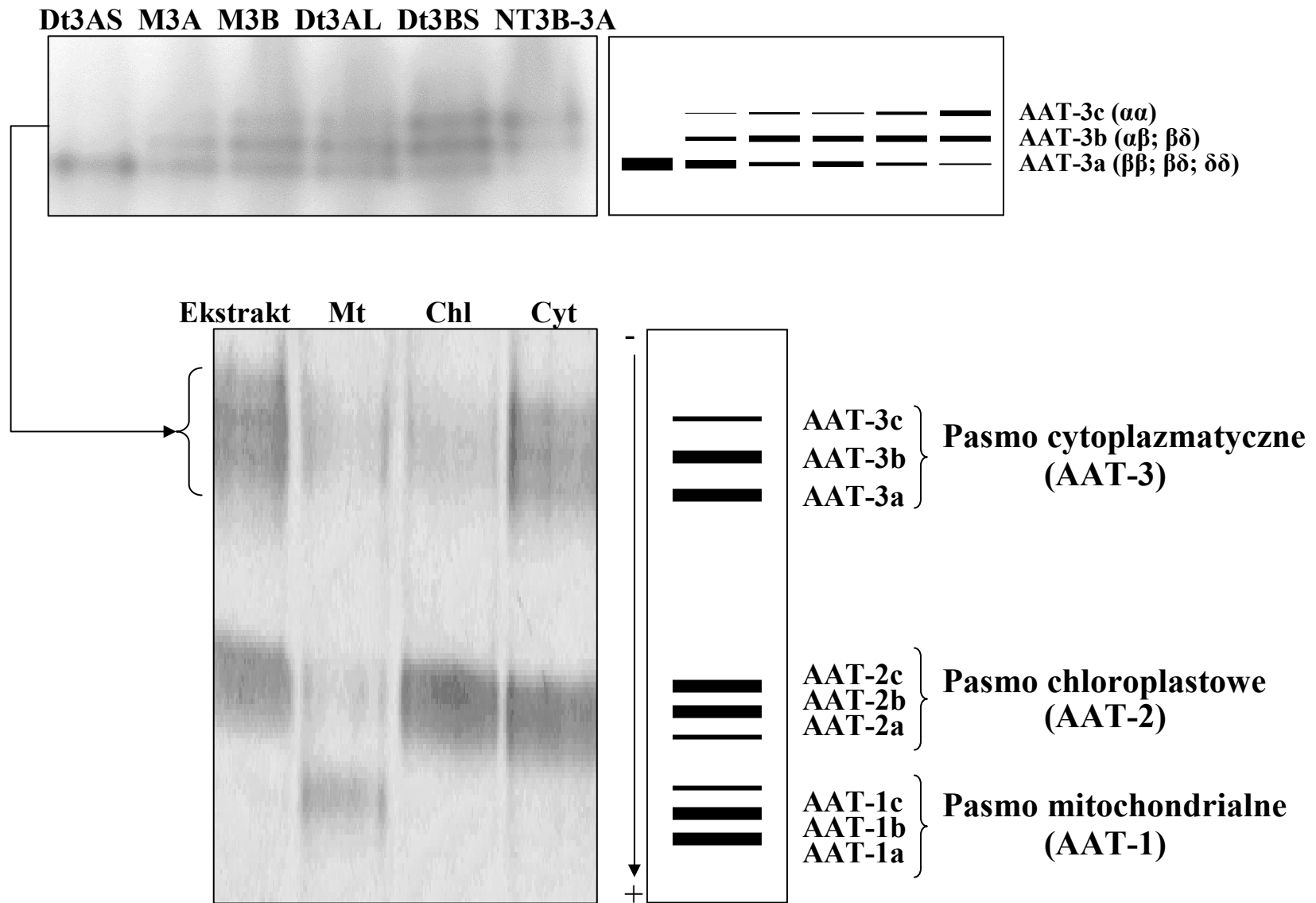


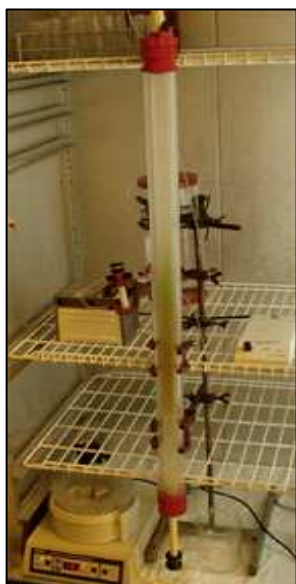
Foto: Maciaga i Paszkowski 2004

Celem mojej pracy było porównanie właściwości biochemicznych izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej z pasma chloroplastowego (AAT-2) i cytoplazmatycznego (AAT-3) z pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*), a następnie ustalenie ich sekwencji aminokwasowych i porównanie z dostępnymi sekwencjami dla tego enzymu u innych roślin.

Etap	Aktywność całkowita U	Zawartość białka mg	Aktywność właściwa U mg ⁻¹	Odzysk %	Stopień oczyszczenia -x
Homogenat	1648.60	1950.00	0.85	100.0	1.0
Siarczan amonu (40-80%)	911.95	510.00	1.79	55.3	2.1
Sephadex G-150	691.28	65.20	10.60	41.9	12.5

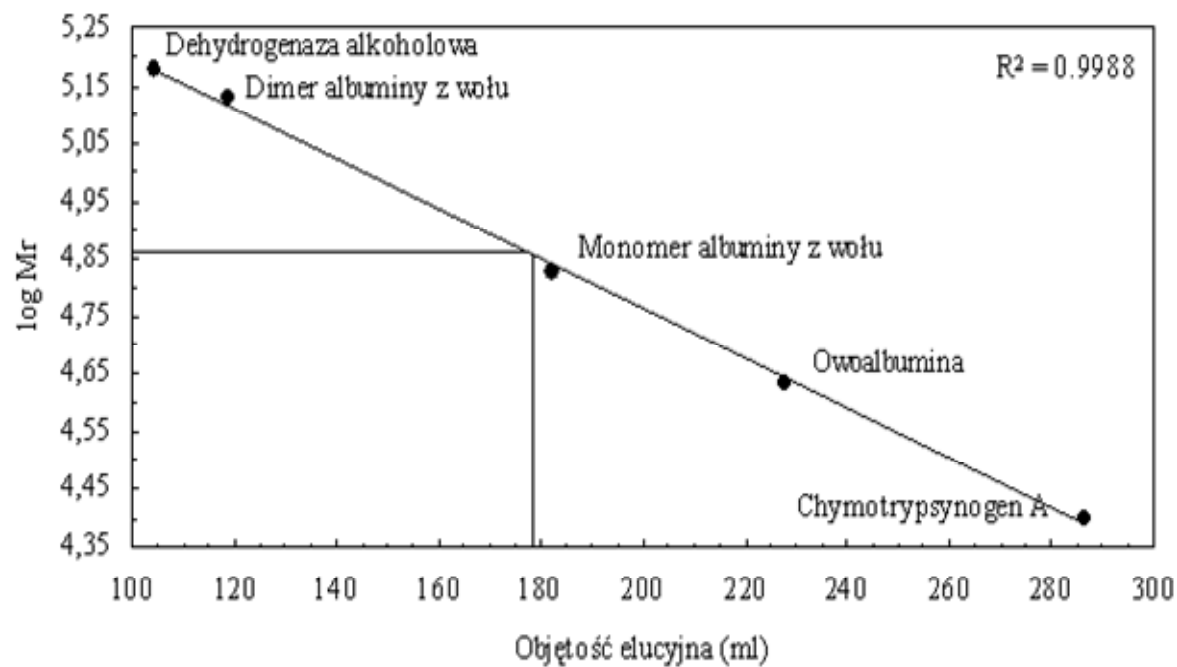


Rys. Materiał roślinny.



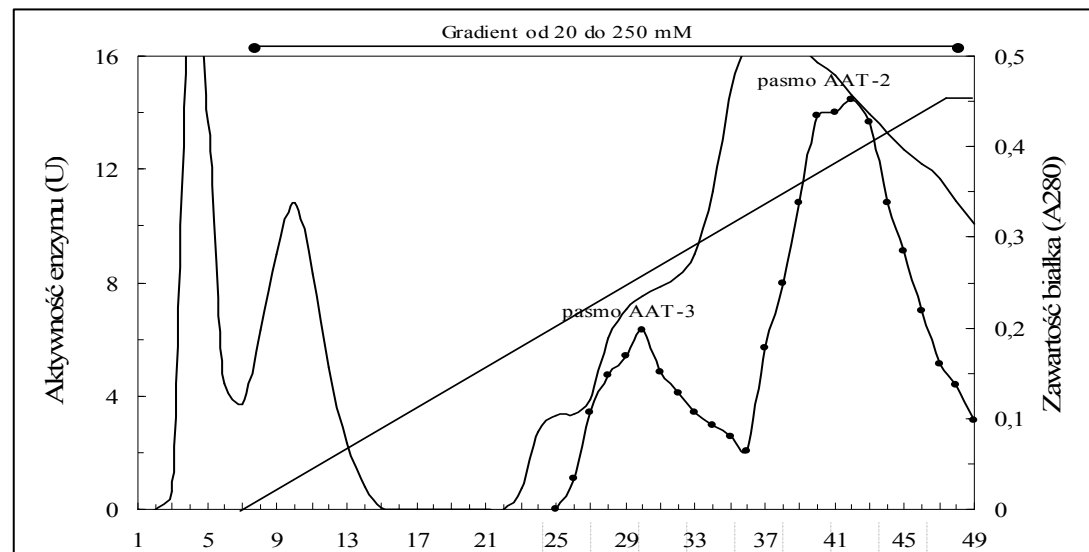
Rys. Kolumna z żelu Sephadex G-150.

72 kDa →

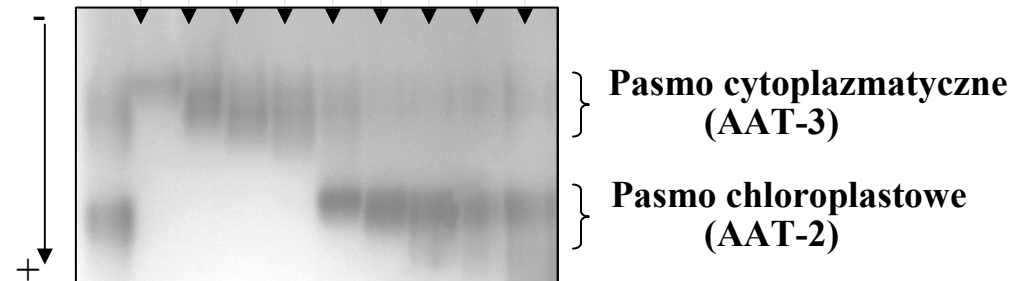


Przebieg oczyszczania izoenzymów z pasma chloroplastowego (AAT-2) i cytoplazmatycznego (AAT-3)

Etap	Aktywność całkowita U	Zawartość białka mg	Aktywność właściwa U mg ⁻¹	Odzysk %	Stopień oczyszczenia -x
DEAE-celuloza					
AAT-2	408.50	10.93	37.37	24.8	44.0
AAT-3	145.30	4.08	35.61	8.8	41.9



Rys. Kolumna z DEAE-celulozy podłączona do zestawu Bio-Rad.

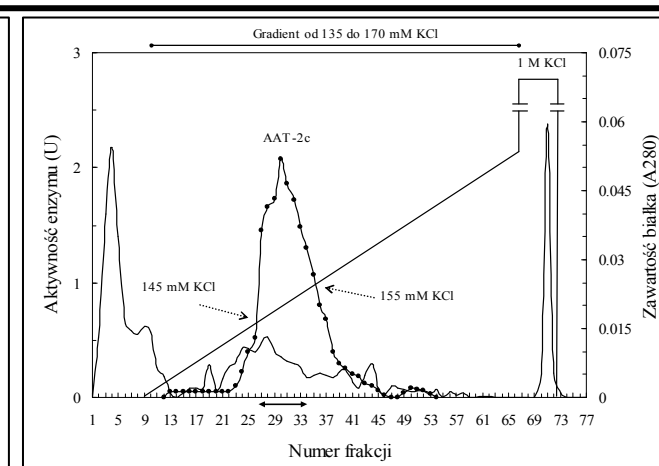
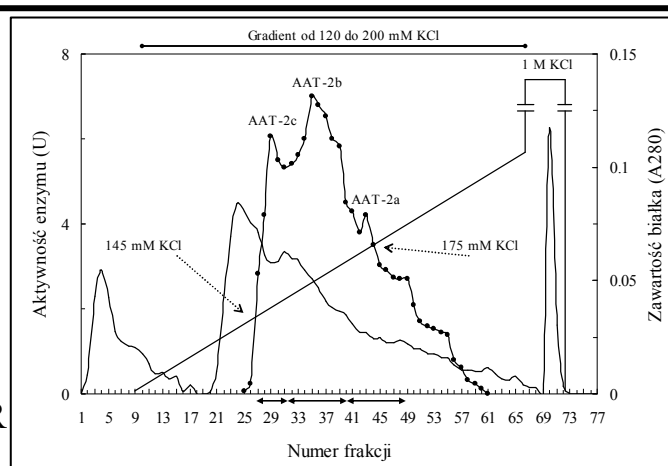


Przebieg oczyszczania izoenzymów z pasma chloroplastowego (AAT-2) i cytoplazmatycznego (AAT-3)

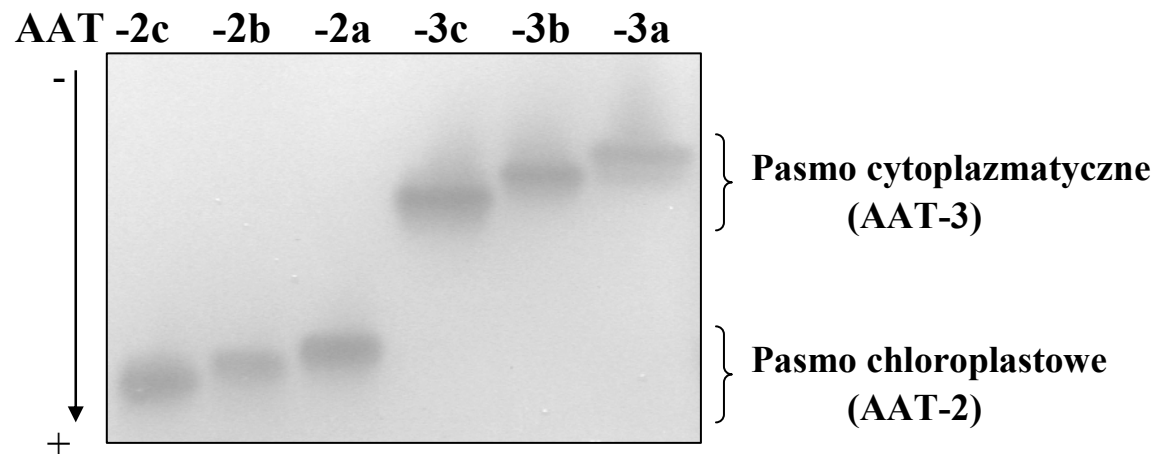
Etap	Aktywność całkowita U	Zawartość białka mg	Aktywność właściwa U mg-1	Odzysk %	Stopień oczyszczenia -x
L-ornityna-Sepharose 4B					
AAT-2	293.70	3.30	89.00	17.8	104.7
Protein-Pak Q 8HR					
AAT-2a	25.60	0.150	168.30	1.6	198.0
AAT-2b	57.97	0.319	181.65	3.5	213.7
AAT-2c	23.84	0.097	246.00	1.5	209.1
Protein-Pak Q 8HR (Re)					
AAT-2a	13.60	0.066	206.06	0.8	242.4
AAT-2b	31.39	0.139	225.83	1.9	265.7
AAT-2c	15.30	0.074	206.77	0.9	243.2



Rys. Kolumna Protein-Pak Q 8HR podłączona do zestawu do HPLC.

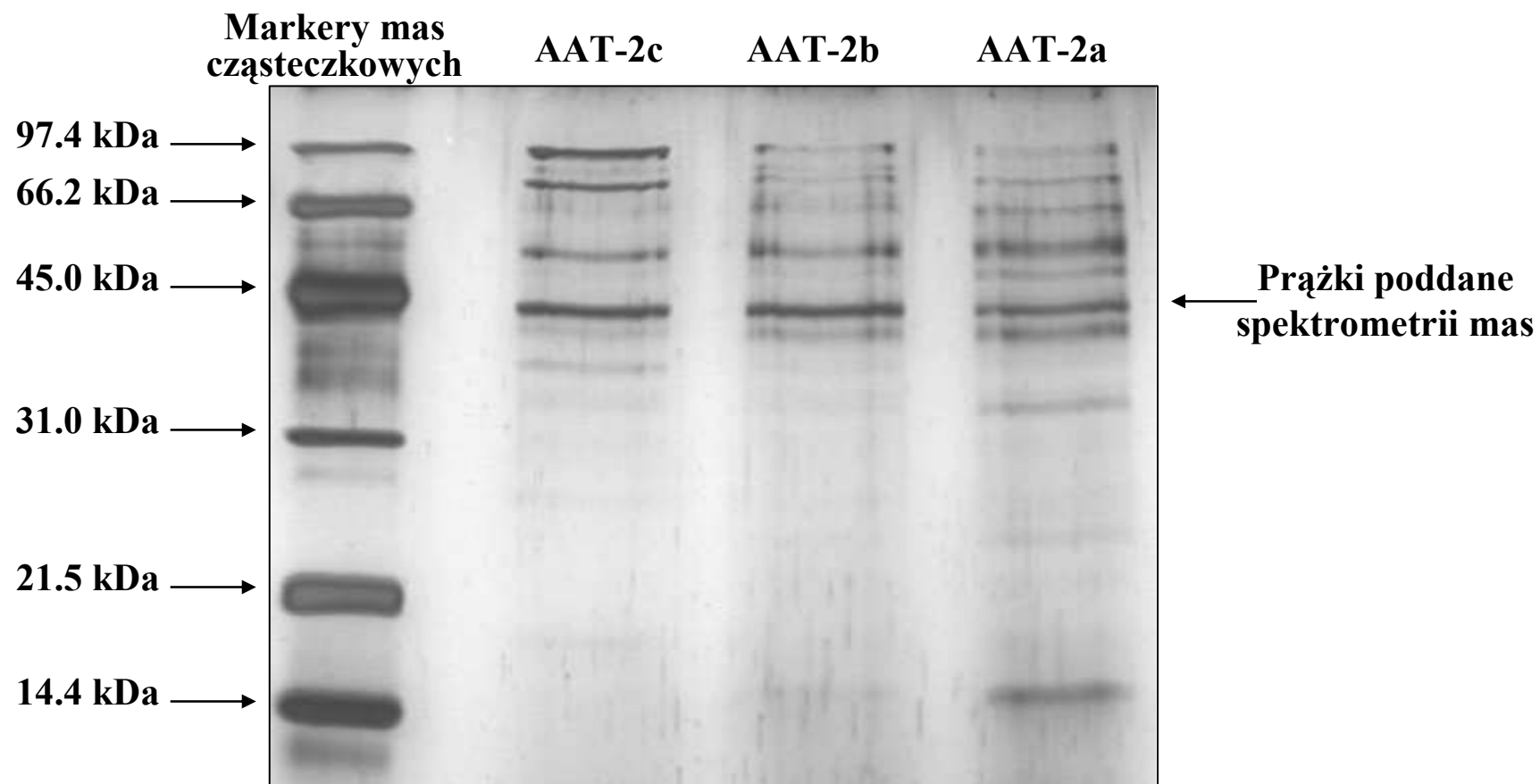


Przebieg oczyszczania izoenzymów z pasma chloroplastowego (AAT-2)



Alloenzym	L-asparaginian mM	2-oksoglutaran mM	L-glutaminian mM	Szczawiooctan mM	k_{cat} s^{-1}	k_{cat}/K_m $s^{-1} mM^{-1}$
AAT-2a	6.85	0.19	11.60	0.020	347.91	50.79
AAT-2b	6.70	0.29	19.40	0.015	381.28	56.91
AAT-2c	5.60	0.20	12.00	0.020	401.77	71.74
AAT-3a	5.00	0.17	13.65	0.016	NB	NB
AAT-3b	8.60	0.09	10.03	0.019	NB	NB
AAT-3c	7.70	0.30	15.75	0.022	NB	NB

Porównanie stałych K_m i k_{cat}/K_m dla alloenzymów z pasma chloroplastowego i cytoplazmatycznego





dbEST: database of "Expressed Sequence Tags"

dbEST release 090106

Summary by Organism - September 1, 2006

Number of public entries: 38,643,398

Homo sapiens (human)	7,893,983
Mus musculus + domesticus (mouse)	4,720,049
Oryza sativa (rice)	1,188,545
Zea mays (maize)	1,143,830
Bos taurus (cattle)	1,137,353
Danio rerio (zebrafish)	1,098,188
Xenopus tropicalis	1,044,182
Rattus norvegicus + sp. (rat)	871,148
<u>Triticum aestivum (wheat)</u>	<u>855,066</u>
Ciona intestinalis	686,396
Sus scrofa (pig)	623,929
Arabidopsis thaliana (thale cress)	622,972
Gallus gallus (chicken)	599,140
Xenopus laevis (African clawed frog)	537,424
Drosophila melanogaster (fruit fly)	498,214
Hordeum vulgare + subsp. vulgare (barley)	437,321
Canis familiaris (dog)	365,946

Aat-3 MA---SPSVFAGIAQGPEDPILGVTVAYNKD PSPVKVNLGVGAYRTEEGKP LVLNVVRRRA
 Aat-2 MALAVDASRFEGVFMAPDPILGVSEAFKAD TSDLKLNLVGVGAYRTEELQP AVLNVVKKR
 Aat-1 MA----SIFGHVEPAPKDPILGVTEAFLAD PSPDKVNVGVGAYRDDSGKP VVLD CVREA

Aat-3 EQMLI-QNESRVKEYLPITGLADFNKLSAKL IFGAD SPAIQENRVATVQCLSGTGSLRVG
 Aat-2 EKLMLEKGEN--KEYLP IEGFAAFNKATADL LLGAD NPVIKQGRVATLQSLSGTGSLRLA
 Aat-1 ERRIA-GNLN--MEYLP MGGSIHMIEESLKLAYGED SEFIKDKRIAAVQALSGTGACRLF

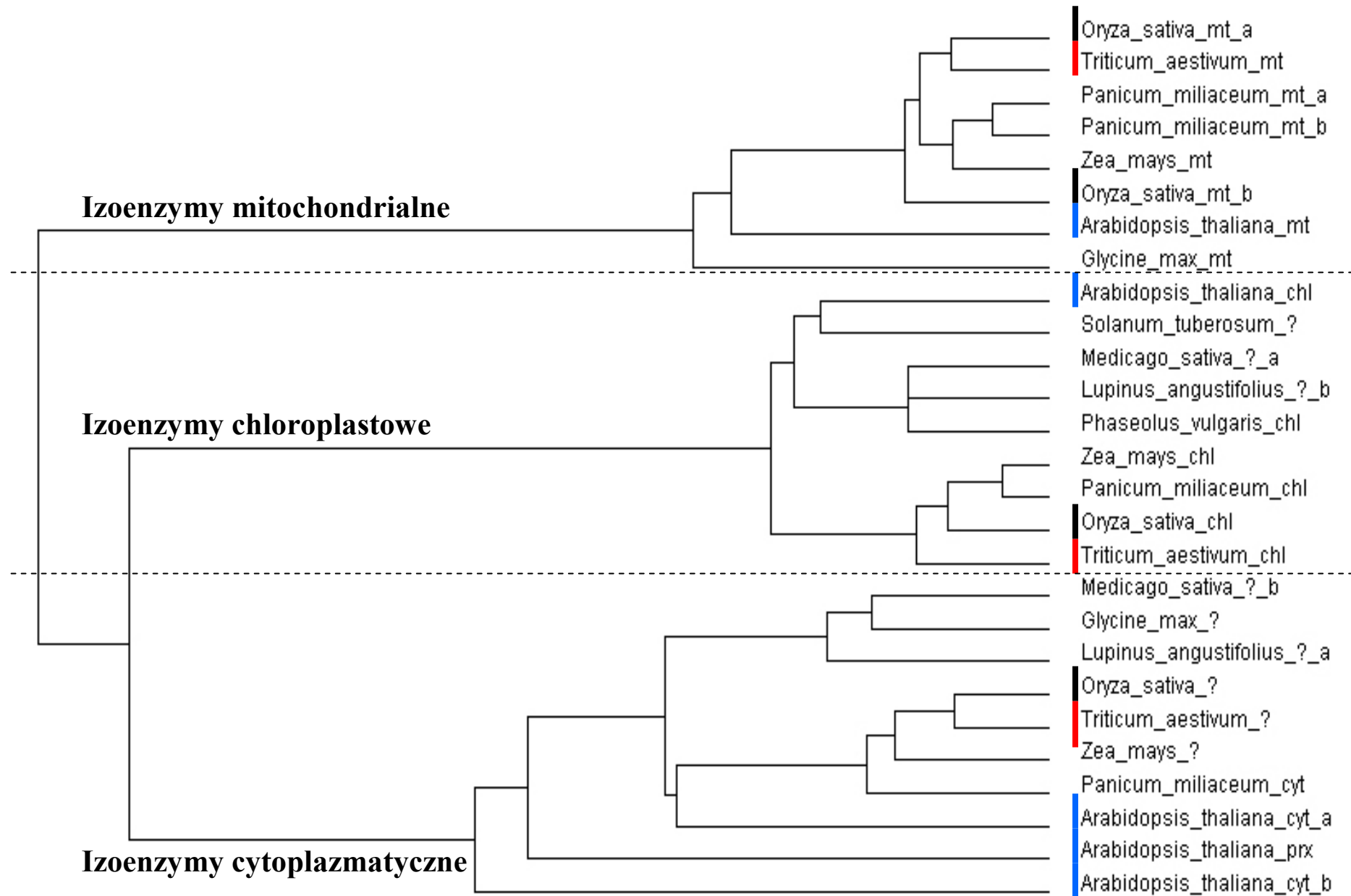
Aat-3 GEF LARHYHERTIYI P QPTWGNHPKVFTLAGLTARS YRYYD PATRGLDFQG LLED LSSAP
 Aat-2 AAFIQRYFPDAKVLIS SPTWGNHKNI FNDARV[PQSEYRYYD PKTVGLDFEGMIADIQAAP
 Aat-1 ADFQKRFLPDS QIYI PTPTWSNHHNIWRDAQVPQRTFSYYHPE SRGLDFAG LMDD IKNAP

Aat-3 SGAIVLLHACAHNPTGVDPTLEQWEQIRQLMRSKAL LPFFD SAYQGFASGSLDKDAQSVR
 Aat-2 EGSFVLLHGCAHNPTGIDPTPEQWEK LADVIEEKKHMPFFD VAYQGFASGSLDEDASSVR
 Aat-1 NGSFLLHACAHNPTGVDPTEEQWREISYQFKLKNHFPFFD MAYQGFASGD PERDAKATR

Aat-3 MFVADGGELLMQSYAKNMGLYGERSV GALSIVCGSADI AVKVESQL KLVIRPMYSHPP LH
 Aat-2 LFVKRGLEV FVQSYSKNLGLYAERIGAINVICSAPEVADRVKSQL KRLARPMYSHPP IH
 Aat-1 IFLEDGHQIGC QSYAKNMGLYGQRAGCLSLCEDEMQA VAVKSQL QQIARPMYSHPPVH

Aat-3 GASIVATILKD SAMFDEW TLE LKAMADRIISMREQL FNALKIRETPG-DWSHI IKQIGMF
 Aat-2 GAKIVANVVGDFTFMG EWKEEMEQMAGRIKKNVRQKLYDSL TAKDQSGKDW SFILSQIGMF
 Aat-1 GALVVSII LSD PELKNVWLGEVKGADRIIGMRKAL RENLEKLGSP L-SWEHVTNQIGMF

Aat-3 TFTGLNSDQVA FMRQYHIYMTSDGRISMAG LSSRTVPHLADAIHAAVTKLK
 Aat-2 SFTGLNRPQSDNMTDKWHIYMTKGRISLAG LNLAKCEYLADAIID SFHNVN
 Aat-1 CYSGMTPEQVDRLTSEYHIYMTNRGRISMAGVTTGNVAYLANAIHDV---TK



- ❑ Masa cząsteczkowa aminotransferazy asparaginianowej z pszenicy wyznaczona w warunkach natywnych (sączenie molekularne – Sephadex G-150) wynosi około 72 kDa, natomiast w warunkach denaturujących (SDS/PAGE) dla alloenzymów z pasma chloroplastowego około 44 kDa.
- ❑ Między alloenzymami z pasma chloroplastowego i cytoplazmatycznego nie stwierdzono większych różnic we właściwościach kinetycznych (K_m , k_{cat}/K_m).
- ❑ Ustalono 5 pełnych spośród 9 sekwencji kodujących izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy.
- ❑ Izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej występują u roślin tylko w cytoplazmie, mitochondriach i chloroplastach.

Dziękuję za uwagę