

## Slajd\_1

Nazywam się Marcin Maciąga i jestem doktorantem pod opieką naukową prof. Andrzeja Paszkowskiego w Katedrze Biochemii Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie. Tematem wystąpienia, które mam zaszczyt Państwu przedstawić jest charakterystyka izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej z siewek pszenicy zwyczajnej.

## Slajd\_2

Aminotransferaza asparaginianowa katalizuje reakcję przeniesienia grupy aminowej z asparagianu na 2-oksoglutaran z utworzeniem szczawiooctanu i 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.

## Slajd\_3

U roślin aminotransferaza asparaginianowa:

- (1) Bierze udział w asymilacji azotu dostarczając 2-oksoglutaranu do cyklu GS/GOGAT;
- (2) Dostarcza asparagianu, który jest prekursorem w biosyntezie metioniny, tryptofanu i lizyny oraz asparaginy i ureidów;
- (3) Uczestniczy w wewnątrzkomórkowym systemie wahadłowym jabłczanowo-asparaginianowym przenoszącym równoważniki redukcyjne w poprzek błon: mitochondrialnej, chloroplastowej i peroksysomalnej;
- (4) W końcu, enzym bierze udział w międzykomórkowym transporcie metabolitów między mezofilem a komórkami pochwy okołowiązkowej u roślin typu C<sub>4</sub>.

## Slajd\_4

Izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej u roślin występują w cytoplazmie, mitochondriach i chloroplastach, natomiast sporną kwestią wydaje się ich lokalizacja w peroksysomach lub glioksysomach, ponieważ np. u prosa i ryżu w ogóle ich tam nie stwierdzono, u szpinaku i rzodkiewnika wykryto izoenzym peroksysomalny, podczas gdy u kukurydzy i soi izoenzym glioksysomalny.

Aminotransferaza asparaginianowa u roślin jest kodowana przez różną liczbę genów, np. u prosa przez 3, u ryżu 4, zaś u rzodkiewnika 5 genów.

## Slajd\_5

U pszenicy jest 9 izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej, które grupują się po 3 w tzw. pasma enzymatyczne. Izolując frakcję subkomórkową metodą wirowania różnicowego ustaliłem, że każde pasmo jest charakterystyczne dla innego przedziału subkomórkowego. Pasma AAT-1 o największej ruchliwości elektroforetycznej w kierunku anody, to izoenzymy mitochondrialne, pasmo AAT-2 to izoenzymy chloroplastowe, natomiast pasmo AAT-3 o najmniejszej ruchliwości elektroforetycznej, to izoenzymy cytoplazmatyczne.

Każde z pasm enzymatycznych jest kodowane w innym lokus przez 3 geny alleliczne. Zatem wszystkich genów jest 9. Jednakże w każdym z tych 3 potrójnych zestawów genów allelicznych 2 z nich mają prawie identyczną sekwencję nukleotydową w rezultacie każde pasmo enzymatyczne jest kodowane tylko przez 2 różne geny alleliczne. W przypadku enzymu dimerycznego jakim jest aminotransferaza asparaginianowa kombinacja produktów tych dwóch genów allelicznych odpowiada za powstanie w obrębie każdego z pasm 3 alloenzymów różniących się między sobą intensywnością zabarwienia chromoforu powstałego w wyniku reakcji enzymatycznej. Nietrudno to wykazać dysponując odpowiednimi liniami aneuploidalnymi pszenicy, takimi jak monosomiki, ditelosomiki, czy nulli-tetrasomiki znając przy tym lokalizację chromosomalną któregoś z 3 loci by dobrać odpowiednie linie pszenicy do takiego doświadczenia, jak pokazano na tym górnym zymogramie.

## Slajd\_6

Celem mojej pracy było porównanie właściwości biochemicznych izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej z pasma chloroplastowego i cytoplazmatycznego z pszenicy zwyczajnej, a następnie ustalenie ich sekwencji aminokwasowych i porównanie z dostępnymi sekwencjami dla tego enzymu u innych roślin.

### Slajd\_7

Alloenzymy aminotransferazy asparaginianowej z pasma chloroplastowego i cytoplazmatycznego były oczyszczane z 14 dniowych siewek pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*; odmiany Jasna), które uprawiano w warunkach hydroponicznych. Początkowe wspólne etapy oczyszczania izoenzymów obejmowały wysalanie siarczanem amonu w zakresie stężeń od 40 do 80% nasycenia oraz sączenie molekularne na kolumnie z żelu Sephadex G-150. Wszystkie izoenzymy wypływały w tej samej objętości elucyjnej, co oznaczało że wszystkie izoenzymy posiadają zbliżoną masę cząsteczkową, którą po skalibrowaniu kolumny białkami wzorcowymi wyznaczono na 72 kDa. Stopień oczyszczenia enzymu po tych dwóch etapach wynosił około 12 razy.

### Slajd\_8

Kolejnym etapem była chromatografia jonowymienna na kolumnie z DEAE-celulozy podłączonej do zestawu Bio-Radu, na której alloenzymy z pasma chloroplastowego oddzielano od alloenzymów z pasma cytoplazmatycznego i od tego etapu osobno je doczyszczano. Stopień oczyszczenia każdego z obydwu pasm enzymatycznych po tym etapie wynosił już ponad 40 razy.

### Slajd\_9

Dla przykładu, pasmo chloroplastowe w dalszej części było oczyszczane na specjalnie zsyntetyzowanej w naszej pracowni kolumnie z L-ornityny-Sepharose 4B w celu pozbycia się barwników. Następnie, pasmo poddawano chromatografii na kolumnie Protein-Pak Q 8HR podłączonej do zestawu HPLC, gdzie w gradiencie soli od 120 do 200 mM alloenzymy z tego pasma były oddzielane od siebie. W celu ich doczyszczania każdy z alloenzymów był jeszcze dodatkowo osobno poddany re-chromatografii na tej samej kolumnie w jeszcze węższym gradiencie soli, na przykład alloenzym AAT-2c w gradiencie od 135 do 170 mM.

Opracowana przez nas 6 etapowa procedura oczyszczania alloenzymów z pasma chloroplastowego i cytoplazmatycznego pozwala uzyskać po końcowym etapie po około 15 U każdego z alloenzymów o stopniu oczyszczenia około 250 razy wychodząc z 1500 U aktywności enzymu w homogenacie, który sporządzono mniej więcej z pół kilograma siewek pszenicy.

### Slajd\_10

Dla oczyszczonych 6 alloenzymów z pasma chloroplastowego i cytoplazmatycznego różniących się lokalizacją subkomórkową wyznaczono stałe  $K_m$  wobec wszystkich 4 substratów. Pomiedzy 6 alloenzymami nie stwierdzono większych różnic w badanych parametrach. Wartości stałej  $K_m$  wobec asparagianu kształtowały się na poziomie około 6 mM, dla glutaminianu około 15 mM, natomiast dla substratów oksokwasowych były znacznie niższe i wynosiły około dwóch dziesiątych mM dla 2-oksoglutaranu i dwóch setnych mM dla szczawiooctanu.

Również parametr  $k_{cat}/K_m$  określający wydajność enzymu w warunkach niepełnego wysycenia substratem kształtował się na podobnym poziomie dla alloenzymów z pasma chloroplastowego.

### Slajd\_11

Alloenzymy z pasma chloroplastowego poddano elektroforezie w warunkach denaturujących z SDS. Masa cząsteczkowa wyznaczona w tych warunkach dla wszystkich alloenzymów z tego pasma była zbliżona i wynosiła około 44 kDa. Następnie, prążki odpowiadające enzymowi zostały wycięte z żelu i dostarczone do Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki w Warszawie w celu ustalenia fragmentów sekwencji aminokwasowych badanych alloenzymów.

### Slajd\_12

Równolegle zająłem się rekonstrukcją genów kodujących izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy na podstawie etykiet sekwencji ulegających ekspresji zdeponowanych w komputerowych bazach danych, takich jak: NCBI, TIGR, czy KOMUGI. EST-y są to losowo pozyskane sekwencje mRNA o długości około 100 - 200 par zasad, przepisane na nić cDNA a następnie poddane sekwencjonowaniu. W 2000 roku, w bazie NCBI było zdeponowanych zaledwie 9 EST-ów dla pszenicy, a obecnie na stan z dnia 1 września bieżącego roku, w tej samej bazie znajduje się ponad 850 tys. EST-ów dla tej rośliny. Tak duża liczba zdeponowanych aktualnie EST-ów umożliwiła mi ustalenie pełnych sekwencji 5 genów spośród 9 kodujących izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy.

### Slajd\_13

Sekwencje nukleotydowe genów kodujących izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej zrekonstruowane na podstawie EST-ów zostały przepisane na sekwencje aminokwasowe. Ponieważ podobieństwo sekwencji aminokwasowych podjednostek enzymu kodowanych przez geny alleliczne wynosiło 98%, dlatego też wybrałem tylko po jednej sekwencji aminokwasowej charakterystycznej dla każdego pasma enzymatycznego i których podobieństwo każdej względem pozostałych wynosi około 50%. By to uwypuklić kolorem czerwonym zaznaczono aminokwasy występujące w tych samych pozycjach u 3 różnych sekwencji. Z kolei w ramach zaznaczono fragmenty polipeptydów uzyskane metodą spektrometrii mas dla alloenzymu z pasma chloroplastowego (Aat-2).

### Slajd\_14

Na podstawie dostępnych w komputerowych bazach danych sekwencji aminokwasowych kodujących izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej u roślin oraz sekwencji zrekonstruowanych na podstawie EST-ów u pszenicy (zaznaczonych na slajdzie czerwoną kreską) skonstruowano drzewko filogenetyczne. Wszystkie rozpatrywane sekwencje grupują się na drzewku w obrębie 3 gałęzi oznaczonych tu jako izoenzymy mitochondrialne, chloroplastowe i cytoplazmatyczne. 2 argumenty przemawiają za taką interpretacją, że nie ma więcej już izoenzymów:

(1) Po pierwsze, u rzodkiewnika mamy 5 izoenzymów (zaznaczonych tu niebieską kreską), z czego 3 to izoenzymy cytoplazmatyczne (to te u dołu slajdu). Jednemu z izoenzymów cytoplazmatycznych jest przypisywana lokalizacja peroksysosomalna (to jest ten drugi od dołu), jednak ten izoenzym wykazuje wyższy stopień podobieństwa do pozostałych roślinnych izoenzymów cytoplazmatycznych, aniżeli izoenzym cytoplazmatyczny u samego dołu.

(2) Po drugie, u ryżu którego również zsekwencjonowano genom i który posiada 4 izoenzymy (oznaczone tu czarną kreską) mamy tylko jeden izoenzym cytoplazmatyczny, a co ciekawe dwa izoenzymy mitochondrialne.

### Slajd\_15

(1) Masa cząsteczkowa aminotransferazy asparaginianowej z pszenicy wyznaczona w warunkach natywnych wynosi około 72 kDa, natomiast w warunkach denaturujących dla alloenzymów z pasma chloroplastowego około 44 kDa. Zatem, enzym jest dimerem o masie cząsteczkowej podjednostki około 45 kDa, taką też wartość można otrzymać bezpośrednio z sekwencji aminokwasowych. Natomiast do wyniku uzyskanego metodą sączenia molekularnego należy podejść ostrożnie. Nie pierwszy raz spotkałem się już z tym, że tą metodą uzyskuje się takie odbiegające wyniki;

(2) Między alloenzymami z pasma chloroplastowego i cytoplazmatycznego nie stwierdzono większych różnic we właściwościach kinetycznych ( $K_m$ ,  $k_{cat}/K_m$ ). A zatem, mało jest prawdopodobne, aby izoenzymy były w szczególności przystosowane do pełnienia przypisywanym im funkcjom metabolicznym w określonym przedziale wewnątrzkomórkowym;

(3) Ustalono 5 pełnych spośród 9 sekwencji kodujących izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy. Na ich podstawie można stwierdzić, że w przypadku enzymu dimerycznego jakim jest aminotransferaza asparaginianowa alloenzymy widoczne na zymogramie w obrębie każdego z pasm enzymatycznych różnią się między sobą o około 20 aminokwasów, natomiast alloenzymy z dwóch różnych pasm już o około 400 aminokwasów;

(4) Izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej występują u roślin tylko w cytoplazmie, mitochondriach i chloroplastach. Przynajmniej do takiej konkluzji można dojść przeprowadzając analizę filogenetyczną, która pozwala wyróżnić 3 rodzaje ich sekwencji aminokwasowych. Tym samym występowanie izoenzymów w peroksysomach lub glioksysomach wg nas jest mało prawdopodobne.

### Slajd\_16

Dziękuję za uwagę.