

## Kontrola genetyczna izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej u traw z rodzajów *Aegilops* i *Triticum*

Marcin Maciąga, Andrzej Paszkowski

Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa, Polska

**Abstrakt.** Zymogramy aminotransferazy asparaginianowej (AAT, EC 2.6.1.1) ekstraktów liściowych u traw z rodzajów *Aegilops* i *Triticum* ujawniły trzy pasma AAT, które oznaczono w kolejności malejącej ruchliwości elektroforetycznej w kierunku anody jako AAT-1, AAT-2 i AAT-3. Na podstawie obrazu izoenzymatycznego przedstawiającego lokalizację wewnątrzkomórkową poszczególnych pasm AAT z siewek *T. aestivum* stwierdzono, że pasmo AAT-1 jest charakterystyczne dla mitochondriów, AAT-2 dla chloroplastów, natomiast AAT-3 dla cytoplazmy. Główna część całkowitej aktywności AAT w liściach pszenicy pochodzi z chloroplastów i cytoplazmy. Pasma AAT-3 cechowała najmniejsza ruchliwość elektroforetyczna, ale występujące w jego obrębie 3 izoenzymy ulegały najwyraźniejszemu rozdzielaniu. Uzyskanie pojedynczego prążka w tym paśmie w pozycji AAT-3a (najbliższej anody) dla linii aneuploidalnej CS3ASDt AABBDD (brak ramion długich u 3 pary chromosomów homologicznych w genomie A) i w pozycji AAT-3c dla *Ae. umbellulata* (genom UU) oraz po trzy prążki w całym paśmie dla *T. durum* (AABB) i *T. aestivum* (AABBDD) pozwalało na ustalenie składu podjednostkowego izoenzymów w paśmie AAT-3. Prążek w pozycji AAT-3a na zymogramie utworzony jest z dimerów  $\beta\beta$ , AAT-3b z  $\alpha\beta$  i AAT-3c z  $\alpha\alpha$ . Na podstawie porównania rozkładu doświadczalnego intensywności zabarwienia chromoforu (wynik reakcji enzymatycznej) dla izoenzymów z modelami matematycznymi oszacowano częstotliwość występowania podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  w obrębie pasma AAT-3. W AAT-3 z *T. durum*  $\alpha$  i  $\beta$  występowały w stosunku 0.54 : 0.46 a z *T. aestivum* 0.62 : 0.38.

**Słowa kluczowe:** *Aegilops umbellulata*, aminotransferaza asparaginianowa, izoenzymy, frakcje subkomórkowe, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, zymogram.

### Wstęp

Roślinna aminotransferaza asparaginianowa (AAT) katalizuje odwracalną reakcję transaminacji pomiędzy *L*-asparaginianem i 2-oksoglutaranem z utworzeniem szczawiooctanu i glutaminianu. AAT jest dimerem o masie cząsteczkowej około 90 kDa z dwoma centrami aktywnymi utworzonymi z reszt aminokwasowych pochodzących z dwóch podjednostek i zawiera kowalencyjnie związany fosforan pirydoksalu, a zatem tylko dimer AAT jest aktywny enzymatycznie (Wilkie i in. 1996).

Temu najlepiej poznanemu enzymowi spośród aminotransferaz przypisuje się bardzo szeroki zakres funkcji metabolicznych (Ireland i Lea 1999). Nie jest zatem niespodzianką, że w różnych przedziałach komórkowych wykrywano wiele izoenzymów AAT u różnych gatunków. Huang i in. (1976) stwierdził występowanie izoenzymów AAT w cytoplazmie, mitochondriach, chloroplastach i peroksysomach z komórek liści szpinaku. Z kolei Taniguchi i in. (1995) w prosie oraz Schultz i in. (1998) w *Arabidopsis* zlokalizowali je we frakcjach cytoplazmatycznej, mitochondrialnej i plastydowej liści, natomiast Scandalios i in. (1975) we frakcjach cytoplazmatycznej, mitochondrialnej i glioksysomalnej liści kukurydzy. O pięciu izoenzymach AAT w liścieniach soi możliwych do wyróżnienia na podstawie wyników natywnej PAGE donosi Stephens i in. (1998). Cztery z nich zostały umiejscowione odpowiednio w glioksysomach, cytoplazmie, mitochondriach i plastydach (Stephens i in. 1998). Hart (1983) obserwował trzy pasma izoenzymatyczne (zgrupowanie izoenzymów o zbliżonej ruchliwości elektroforetycznej) na zymogramie AAT z komórek liści heksaploidalnej pszenicy (*T. Aestivum*). Ich lokalizacja subkomórkowa nie została dotąd ustalona.

Zgodnie z tym, co podaje Hart (1983) geny AAT w *T. aestivum* (AABBDD,  $2n=42$ ) występują w trzech loci na długich ramionach (L) 3-ciej pary chromosomów homeologicznych jak również na długich i krótkich ramionach (S) 6-tej pary tj. na 3AL, 3BL, 3DL, 6AL, 6BL, 6DL, 6AS, 6BS i 6DS (Hart i Langston 1977; Hart 1983). Na stronie <http://wheat.pw.usda.gov> zamieszczono zmapowane EST-y na 3AL, 3BS, 3DS i 6BS. Pierwsze trzy z nich są identyczne. Obserwowane przez Harta (1983) pasma, tj. AAT-1, AAT-2 i AAT-3 (ponumerowane w kolejności malejącej ruchliwości elektroforetycznej w kierunku anody) są produktami genów z różnych loci. Jeżeli dane loci kontroluje biosyntezy tylko jednego rodzaju podjednostek, to w paśmie obserwujemy pojedynczy prążek. Jeżeli kontrolą objęta jest biosynteza dwóch rodzajów podjednostek, to dla enzymu dimerycznego powinny pojawić się trzy prążki. Pasma AAT-3 w *T. aestivum* (AABBDD) tworzą dwa rodzaje podjednostek:  $\alpha$  i  $\beta$  – produkty genów znajdujących się na 3AL, 3BL i 3DL (Hart i in. 1976). Przyjmuje się, że za biosyntezy podjednostki  $\alpha$  odpowiada genom A, natomiast podjednostki  $\beta$  genomy B i D (Hart et al. 1976). Identyfikacja EST-ów zmapowanych na 3AL, 3BS i 3DS uniemożliwia bioanalityczne podejście do znalezienia różnic pomiędzy genami kodującymi podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$ , które wyjaśniałyby różnice w ruchliwości elektroforetycznej izoenzymów. Według Harta i in. (1976) ilość podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  w paśmie AAT-3 jest taka sama a wydajność katalityczna poszczególnych izoenzymów podobna. Jeżeli miałby on rację, to rozkład intensywności zabarwienia chromoforu pośrednio świadczący o ilości poszczególnych izoenzymów winien kształtować się jak 1:2:1 dla *T. durum* i 1:4:4 dla *T. aestivum*. Obserwowane przez nas asymetryczne rozmieszczenie intensywności barwy w paśmie AAT-3 dla *T. durum* oraz inne niż oczekiwano dla *T. aestivum* spowodowały nowe interesujące pytania na temat rzeczywistego przebiegu procesu powstawania pasm enzymatycznych widocznych na zymogramie.

Niniejsza praca ma na celu, (1) ustalenie lokalizacji subkomórkowej trzech pasm AAT, (2) potwierdzenie lokalizacji chromosomalnej genów kodujących izoenzymy w paśmie AAT-3 zaproponowanej przez Harta i in. (1976) i (3) udowodnić różną częstotliwość występowania podjednostek w paśmie AAT-3 z *T. durum* i *T. aestivum*.

Otrzymano: Styczeń 19, 2004. Zaakceptowano do druku: Lipiec 2, 2004.

Adres do korespondencji: M. Maciąga, Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Nowoursynowska 159/37, 02-776 Warszawa, Polska; e-mail: d-artagnan@wp.pl

## Material i metody

### Material roślinny

Ekstrakty 14-dniowych liści z *Ae. umbellulata*, *T. durum*, *T. aestivum* odmian Jasna (uprawiana do izolowania organelli) i Chinese Spring (CS) z liniami ditelosomicznymi pozbawionymi długich ramion z 3-ciej pary chromosomów homologicznych w genomach: A (3ASDt), B (3BSDt) i D (3DSDt) były używane. Rośliny rosły na pożywce płynnej. Nasiona były zaprawiane fungicydem Funaben (Organika-Azot S.A., Jaworzno) w kuwetach w fitotronie nastawionym na dzień/noc temperatura 22°C/18°C (12 godz. fotoperiod). Natężenie fotosyntetycznej czynnej radiacji wynosiło 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Po 7 dniach woda destylowana była zastąpiona przez pożywkę zawierającą 0.25% Florovit (Inco-Veritas S.A., Góra Kalwaria).

### Fracjonowanie komórki

#### Mitochondria

Zielone części siewek pszenicy rozdrabniano delikatnie przez 5 s w homogenizatorze (Ultra Turrax T25) w proporcji 1 g materiału roślinnego na 3 mL 30 mM buforu morfolinopropanosulfonowego doprowadzonym do pH 7.5 za pomocą KOH i zawierającym: 0.3 M sacharozę, 0.2% albuminę z surowicy wołowej i 0.6% poliwinylopolipirrolidon, a następnie sączono przez miracloth i wirowano przy 5,000 \* g przez 2 min.. Osad, który w znacznej mierze stanowiły fragmenty tkanek roślinnych, a także duże ilości chloroplastów odrzucano a supernatant wirowano przy 20,000 \* g przez 3 min. Uzyskany kolejny osad rozpuszczano w 24 mL buforu próby tj. 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 z 10% gliceryną i wirowano przy 20,000 \* g przez 3 min. Osad, czyli frakcję mitochondrialną rozpuszczano w jak najmniejszej objętości tego samego buforu.

#### Chloroplasty

Zielone części siewek pszenicy rozdrabniano delikatnie przez 5 s w proporcji: 1 g materiału roślinnego i 3 mL 50 mM buforu Tricine doprowadzonego do pH 7.8 za pomocą KOH zawierającego 0.4 M sorbitol i 10 mM NaCl, a następnie sączono przez miracloth i wirowano przy 4,000 \* g przez 3 min. Osad rozpuszczono w 15 mL buforu przemysłowego o składzie (15 mM Tricine doprowadzony do pH 7.8 za pomocą KOH zawierającego 10 mM NaCl i 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) i wirowano przy 10,000 \* g przez 5 min. Osad rozpuszczono w jak najmniejszej objętości buforu próby (patrz wyżej).

#### Cytoplazma

Homogenat był przygotowany jak przy izolacji mitochondriów, a następnie sączono przez miracloth i wirowano 5,000 \* g przez 2 min. Uzyskany supernatant wirowano przy 100,000 \* g przez 60 min. Supernatant był przemywany kilka razy w buforze próby a następnie zagęszczony w aparacie Amicon z membraną PM30.

#### Oznaczanie aktywności enzymów

Aktywność enzymów markerowych była oznaczana spektrofotometrycznie: mitochondria – syntaza cytrynianowa (EC 4.1.3.7, Bergmayer 1974), chloroplasty - fruktozobisfosfataza (EC 3.1.3.11, Latzko i Gibbs 1974) i cytoplazma – dehydrogenaza mleczkowa (EC 1.1.1.27, Bergmayer 1974). Aktywność AAT była mierzona stosując metodę Bergmayera i Bernta (1974). Aktywność specyficzna przedstawiono w  $\mu\text{mol}$  produktu utworzonego w ciągu minuty przy 25°C (U) i na 1 mg białka. Białko oznaczano metodą Bradford (1976) stosując albuminę z surowicy wołu jako standard. Stopień oczyszczenia przedstawiający iloraz aktywności specyficznej odpowiedniego enzymu markerowego w otrzymanej po izolacji frakcji subkomórkowej do aktywności specyficznej tego enzymu w wyjściowym ekstrakcie był liczony by oznaczyć czystość każdej z wyizolowanych frakcji.

#### PAGE

Electroforezę przeprowadzano w aparacie Mini Protean (Bio-Rad) w gradiencie nieciągłym (Laemmli 1970). Żel rozwijający składał się z 7.5% akrylamidu do którego dodawano 10% (m/v) mannitol. Żel zagęszczający (wysokości 1 cm) składał się z 4% akrylamidu. Stosunek akrylamidu do bisakrylamidu wynosił jak 37.5 do 1. Elektroforezę prowadzono pod stałym napięciem 100 V przez 150 min lub 300 min (by uzyskać lepszy rozdział pasm AAT).

#### Wywoływanie aktywności AAT w żelu

Aktywność AAT wywoływano przez inkubację w roztworze składającym się z 0.1 M buforu Tris-HCl pH 7.5, 8 mM kwasu L-cysteino sulfonowego, 0.1 mM pyridoksalu-5-fosforanu, 0.5 mM 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromide, 5mM kwasu 2-oksoglutaranowego i 0.16 mM 5-metylo fenazyne metasulfonianu (Stejskal 1994).

#### Analiza densytometryczna

Zymogramy z ciemno niebieskim nierozpuszczalnym chromoforem na żelu (efekt aktywności izoenzymów) skanowano (300 PPI) i analizowano programem komputerowym (NIH Image, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Program wyświetlał średnią wartość (na skali od 0 do 255) dla wszystkich pikseli w zaznaczonym obszarze. Wynikiem była różnica między wartością wybranego prążka a tą samą powierzchnią tła.

#### Analizy statystyczne

##### *T. durum*

Podstawiając różne częstotliwości dla podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  tworzących aktywne enzymatycznie izoenzymy w obrębie pasma AAT-3 do wzoru  $(\alpha + \beta)^2 = \alpha^2 + 2\alpha\beta + \beta^2$ , otrzymano szereg teoretycznych proporcji o ogólnym zapisie  $\alpha^2 : 2\alpha\beta : \beta^2$ . Dla każdego z pomiarów densytometrycznych pasm AAT-3 z różnych roślin liczone sumę wartości uzyskanych dla pojedynczych prążków w obrębie pasma. Następnie dzielono ją według teoretycznych proporcji uzyskując szereg rozkładów teoretycznych, czyli oczekiwanych wartości dla poszczególnych izoenzymów w paśmie. Dla każdej rośliny wybrano rozkład teoretyczny najbardziej zbliżony do doświadczonego. Odległość statystyczną między tymi rozkładami mierzono przy pomocy funkcji  $X^2$ , tj. różnica pomiędzy densytometrycznym pomiarem a oczekiwaną wartością dla pojedynczego prążka podniesiono do kwadratu i podzielono przez wartość oczekiwaną, następnie uzyskane wartości dla każdego z trzech prążków dodawano do siebie ( $X^2$ ). Im mniejsza wartość  $X^2$  tym większa zgodność była pomiędzy teoretycznym modelem a doświadczalnymi rezultatami. Każdemu z wybranych rozkładów teoretycznych odpowiadała określona częstotliwość podjednostki  $\alpha$  i co za tym idzie  $\beta$  ( $\alpha + \beta = 1$ ).

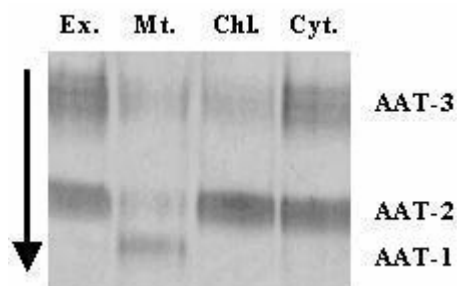
##### *T. aestivum*

W celu otrzymania szeregu teoretycznych proporcji o ogólnym zapisie  $\alpha^2 : 4\alpha\beta : 4\beta^2$ , częstotliwości dla podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  podstawiano do wzoru  $(\alpha + 2\beta)^2 = \alpha^2 + 4\alpha\beta + 4\beta^2$ . Następnie otrzymane teoretyczne proporcje odpowiednio zmniejszono tak by suma składników proporcji była równa jedności. Dalej postępowano analogicznie jak w przypadku *T. durum*.

## Rezultaty

### Lokalizacja subkomórkowa izoenzymów AAT

Z liści *T. aestivum* uzyskano mitochondria, chloroplasty i cytoplazmę o stopniu oczyszczenia wynoszącym odpowiednio 2.2, 2.0 i 1.7. Częściowo oczyszczone frakcje subkomórkowe naniesiono do studzienek w żelu i po rozdziale elektroforetycznym barwiono żel na aktywność AAT (Rysunek 1).

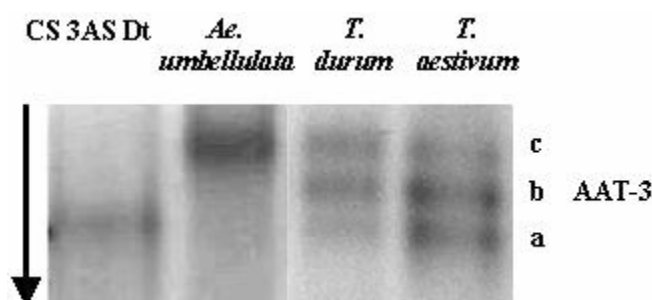


Rysunek 1. Lokalizacja subkomórkowa pasm izoenzymatycznych aminotransferazy asparaginianowej (AAT) z *T. aestivum*. Ścieżka 1 (od lewej do prawej) 1, ekstrakt komórkowy (Ex.); 2, mitochondria (Mt.); 3, chloroplasty (ChL); 4, cytoplazma (Cyt.). We wszystkich studzienkach znajdowała się taka sama aktywność AAT (0.6 U). Elektroforezę prowadzono 150 min.

Na bazie porównania intensywności pasm enzymatycznych ustalono ich lokalizację subkomórkową. We frakcji mitochondrialnej najbardziej intensywne było pasmo AAT-1, w chloroplastach pasmo AAT-2, natomiast we frakcji cytoplazmatycznej obserwowano dwie intensywności, tj. AAT-2 i AAT-3 (Rysunek 1). Przyjęto, że pasmo AAT-1 jest zlokalizowane w mitochondriach, AAT-2 w chloroplastach, natomiast AAT-3 w cytoplazmie. Naszym zdaniem wysoka intensywność pasma AAT-2 we frakcji cytoplazmatycznej (Rysunek 1) była wynikiem zanieczyszczenia frakcją chloroplastową. Należy również podkreślić, że pasma chloroplastowe oraz cytoplazmatyczne były najintensywniejsze (Rysunek 1).

### Rozdział elektroforetyczny izoenzymów w paśmie AAT-3

W celu potwierdzenia składu podjednostkowego izoenzymów w obrębie pasma AAT-3, tj. AAT-3a =  $\beta\beta$ , AAT-3b =  $\alpha\beta$  i AAT-3c =  $\alpha\alpha$  po raz pierwszy zaproponowanego przez Harta i in. (1976) wykonano zymogramy aktywności AAT z liści z różnych gatunków pszenicy. Na rysunku 2 przedstawiono jedynie obraz interesującego nas pasma uzyskany po trwającym 300 min rozdziale elektroforetycznym. Dla ditelosomicznej linii pozbawionej długich ramion z 3-ciej pary chromosomów homologicznych w genie A *T. aestivum* odmiany Chinese Spring o formule genomowej AABBDD (CS3ASDt AABBDD) w paśmie AAT-3 widoczny jest jeden prążek w pozycji AAT-3a (zymogramy pasma AAT-3 uzyskane dla CS3BSDt i CS3DSDt, wyniki nie zamieszczone, były identyczne jak do tych dla *T. aestivum* odmiany Chinese Spring); dla *Ae. umbellulata* (UU) jeden prążek występuje w pozycji AAT-3c (Rysunek 2). Z kolei dla *T. durum* (AABB) i *T. aestivum* odmiany Chinese Spring (AABBDD) widoczne są po 3 prążki w paśmie (Rysunek 2). Warto zwrócić uwagę na to, że dla *T. durum* najwyższą intensywność zabarwienia chromoforu obserwowano dla prążków w pozycjach AAT-3b i AAT-3c, natomiast dla *T. aestivum* prążków – AAT-3a i AAT-3b (Rysunek 2).



Rysunek 2. Trzecie pasmo aminotransferazy asparaginianowej (AAT-3) u różnych gatunków pszenic. Ścieżka (od lewej do prawej) 1, CS 3AS Dt; 2, *Ae. umbellulata*; 3, *T. durum*; 4, *T. aestivum* odmiany Chinese Spring. We wszystkich studzienkach znajdowała się taka sama aktywność AAT (0.6 U). Elektroforezę prowadzono 300 min.

### Częstotliwość podjednostek ( $\alpha$ i $\beta$ ) w paśmie AAT-3 dla *T. durum* i *T. aestivum*

Zakładając następujący skład podjednostkowy izoenzymów w paśmie cytoplazmatycznym (AAT-3): AAT-3a =  $\beta\beta$ , AAT-3b =  $\alpha\beta$  i AAT-3c =  $\alpha\alpha$ , podjęto próbę oszacowania częstotliwości występowania podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  w obrębie tego pasma. Kolumna z intensywnością zabarwienia chromoforu (Tabeli 1) przedstawia wyniki uzyskane z pomiarów densytometrycznych prążków w obrębie pasma AAT-3 z losowo wybranych studzienek na zymogramach AAT. Pomiary były dokonane na różnych poziomach aktywności enzymu dla wyciągów z pojedynczych roślin *T. durum* i *T. aestivum*. Kolumna z rozkładem teoretycznym (Tabela 1) przedstawia rozkład teoretyczny najbardziej zbliżony do wyników doświadczalnych. W Tabeli 1 zamieszczono również średnie wartości częstotliwości występowania podjednostki  $\alpha$  i odchylenie standardowe średniej arytmetycznej. Otrzymano następującą

średnie częstotliwości występowania podjednostek:  $\alpha = 0.54 \pm 0.01$  i  $\beta = 0.46 \pm 0.01$  dla *T. durum*;  $\alpha = 0.62 \pm 0.02$  i  $\beta = 0.38 \pm 0.02$  dla *T. aestivum* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Wyznaczanie średniej częstotliwości występowania podjednostki  $\alpha$  w obrębie 3-go pasma aminotransferazy asparaginianowej (AAT-3) z liści *T. durum* lub *T. aestivum*. Szczegóły analiz statystycznych zamieszczono w Materiałach i metodach.

Gatunek	Intensywność zabarwienia chromoforu			Odległość statystyczna ( $\chi^2$ )	Rozkład teoretyczny			Częstotliwość występowania podjednostki $\alpha$	Średnia częstotliwość występowania podjednostki $\alpha$
	AAT-3c	AAT-3b	AAT-3a		AAT-3a	AAT-3b	AAT-3c		
<i>T. durum</i>	8.02	9.75	5.57	0.56	7.06	11.55	4.73	0.55	<b>0.54 ± 0.01</b>
	14.30	17.72	12.10	1.68	11.93	22.02	10.17	0.52	
	45.28	51.25	32.29	4.95	38.97	63.77	26.09	0.55	
	15.55	19.89	12.52	1.34	28.09	49.82	22.09	0.53	
	15.85	20.52	12.99	1.36	13.86	24.59	10.90	0.53	
	25.51	30.43	20.45	3.05	21.46	38.06	16.88	0.53	
	22.83	27.11	17.44	2.44	19.65	33.47	14.26	0.54	
	8.56	9.92	6.17	0.87	7.46	12.20	4.99	0.55	
<i>T. aestivum</i>	8.69	14.22	12.47	1.25	7.14	17.51	10.73	0.62	<b>0.62 ± 0.02</b>
	10.37	17.36	14.86	1.31	8.60	21.08	12.92	0.62	
	12.30	19.13	15.63	1.59	10.42	23.45	13.19	0.64	
	29.18	48.66	43.45	4.23	23.36	59.74	38.19	0.61	
	17.77	35.55	30.30	1.42	15.36	40.96	27.30	0.60	
	15.26	26.79	23.67	1.62	12.67	32.37	20.70	0.61	
	10.09	20.70	18.85	0.94	8.35	23.99	17.37	0.58	
	18.86	25.80	23.43	3.89	15.08	33.93	19.09	0.64	

## Dyskusja

W niniejszej pracy, w zgodzie z tym, co podawał Hart (1983) wykryto co najmniej trzy izoenzymy AAT a ściślej mówiąc 3 pasma izoenzymatyczne w liściach heksaploidalnej pszenicy (*T. aestivum*). Różnią się one lokalizacją subkomórkową. Największą ruchliwość elektroforetyczną wykazuje pasmo AAT-1 zlokalizowane w mitochondriach, pośrednią AAT-2 z chloroplastów i najmniejszą AAT-3 pochodzące z cytoplazmy. Podobne właściwości elektroforetyczne wykazywały trzy pasma z liści prosa (Taniguchi i in. 1995), a więc rośliny należącej do tej samej rodziny – Graminae, co pszenica. Przy czym za większość aktywności AAT w liściach pszenicy odpowiadają frakcje cytoplazmatyczna i chloroplastowa, natomiast u prosa mitochondrialna i cytoplazmatyczna. Być może różnice te wiążą się z odmiennym przebiegiem fotosyntezy u prosa i pszenicy – roślin, odpowiednio  $C_4$  i  $C_3$  (Drincovich i in. 2001). W liściach prosa (roślina  $C_4$ ) *L*-asparaginian (substrat AAT) stanowi formę przenośnikową  $CO_2$  (Taniguchi i in. 1995).

Uzyskane zymogramy pasma AAT-3 dla odmiany Chinese Spring (CS) z liniami ditelosomicznymi bez długich ramion w 3-ciej parze chromosomów homologicznych w genomach: B (3BSDt), D (3DSDt) były takie same jak dla CS (wyniki nie zamieszczone). Potwierdza to tezę wysuniętą przez Harta (1983) mówiącą, że geny znajdują się na długich ramionach chromosomów 3B i 3D. Nasze wyniki są zgodne z mapowanymi EST-ami na 3BS i 3DS (<http://wheat.pw.usda.gov>). Pojawienie się tylko jednego prążka w pozycji AAT-3a w CS3ASDt potwierdza tezę, że geny zlokalizowane na długich ramionach 3-ciej pary chromosomów homologicznych odpowiadają za biosyntezę izoenzymów w tym paśmie (Hart i in. 1976). 3 para chromosomów homologicznych w genomie A badanej linii aneuploidalnej nie ma długich ramion, a zatem roślina nie może syntezować podjednostek  $\alpha$  i stąd brak prążków utworzonych z dimerów  $\alpha\beta$  i  $\alpha\alpha$  występujących w pozycjach odpowiednio AAT-3b i AAT-3c (Hart i in. 1976). Z kolei obecność prążka w pozycji AAT-3c dla diploidu *Ae. umbellulata* (UU) świadczy o tym, że genom U podobnie jak genom A kontroluje biosyntezę podjednostki  $\alpha$ . W sumie prowadzi to do wniosku potwierdzającego słuszność hipotezy Harta i in. (1976) dotyczącej składu podjednostkowego poszczególnych prążków: AAT-3a –  $\beta\beta$ , AAT-3b –  $\alpha\beta$  i AAT-3c –  $\alpha\alpha$ .

Zastosowana metoda porównywania oczekiwanego rozkładu z doświadczalnym pozwoliła ustalić, że w składzie dimerów AAT zlokalizowanych w cytoplazmie i pochodzących zarówno z *T. durum* jak i *T. aestivum* częściej występują podjednostki typu  $\alpha$ . Dla tetraploidu częstotliwość występowania wyniosła 0.54, natomiast dla heksaploidu 0.62. Najprawdopodobniej szybkość syntezy mRNA podjednostek  $\alpha$  kierowanej przez genom A jest większa od szybkości syntezy mRNA podjednostek  $\beta$  kontrolowanej przez genom B. Wyniki doświadczeń wykonanych przez Harta (1977), który po spowodowaniu dysocjacji jednakowych ilości dimerów  $\alpha\alpha$  i  $\beta\beta$  i ich rekombinacji uzyskiwał rozkład: 1:2:1 wykluczają możliwość większej wydajności katalitycznej dimerów  $\alpha\alpha$ . Hipotezę zakładającą, że użycie różnych substratów ma wpływ na rozkład aktywności jako mało prawdopodobną. Stosując *L*-aspartate (Harris and Hopkins 1976), zamiast kwasu *L*-sufinylo cysteinowego przy sporządzaniu zymogramów uzyskano takie same obrazy (wyniki nie zamieszczone).

Sądzymy, że zaproponowana przez nas metoda porównawcza może znaleźć zastosowanie zarówno w badaniach mechanizmów biosyntezy białek enzymatycznych jak i do oceny efektów pracy hodowlanej, gdzie izoenzymy pełnią rolę wiarygodnych markerów pojedynczych genów a poza tym pozwalają na szybką ocenę badanej linii (Drefahl and Buschbeck 1991; Agarwal i in. 2001; Karcicio i Izbirak 2003).

## Konkluzja

W komórkach liści heksaploidalnej pszenicy (*T. aestivum*) wykryto trzy różniące się ruchliwością elektroforetyczną i lokalizacją subkomórkową pasma izoenzymów AAT: AAT-1 – mitochondrialne; AAT-2 – chloroplastowe i AAT-3 – cytoplazmatyczne. Geny znajdujące się na długich ramionach 3-ciej pary chromosomów homologicznych w genomie A odpowiadają za powstanie izoenzymów występujących w obrębie pasma AAT-3. Loci to kontroluje biosyntezą podjednostki  $\alpha$ , która razem z podjednostką  $\beta$

tworzy aktywne dimery AAT zlokalizowane w cytoplazmie. Genomy A i U kierują biosyntezą podjednostki  $\alpha$  u różnych gatunków z rodzajów *Aegilops* i *Triticum*, natomiast genomy B i D – podjednostki  $\beta$ . W paśmie AAT-3 prążek w pozycji AAT-3a jest utworzony z dimerów  $\beta\beta$ , AAT-3b z  $\alpha\beta$ , natomiast AAT-3c z  $\alpha\alpha$ . Stwierdzono, że dwa gatunki pszenic (*T. durum* i *T. aestivum*) różnią się pod względem częstotliwości występowania podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  w obrębie pasma AAT-3.

**Podziękowania.** Autorzy dziękują dr Bogusławowi ŁAPIŃSKIEMU (za linie ditelosomiczne) i dr Wiesławowi PODYMIE (za gatunki z rodzajów *Aegilops* i *Triticum*) z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin w Radzikowie, Polska.

#### REFERENCES

- Agarwal S, Nath AK, Sharma DR, 2001. Characterisation of peach (*Prunus persica* L.) cultivar using isozymes as molecular markers. *Scientia Horticulturae* 90: 227-242.
- Bergmayer HU, 1974. Enzymes as biochemical reagents. In: Bergmayer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 1. Verlag Chemie Weinheim Academic Press: 425-522.
- Bergmayer HU, Bernt E, 1974. Glutamate-oxaloacetate transaminase. In: Bergmayer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 2. Verlag Chemie Weinheim Academic Press: 727-732.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Drefahl S, Buschbeck R, 1991. Gene localization of aspartate aminotransferase and endopeptidase isozymes in wheat and rye using developmental and organ specific patterns. *Plant Breeding* 107: 218-225.
- Drincovich MF, Casati P, Andreo CS, 2001. NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Lett.* 490: 1-6.
- Harris H, Hopkins DA, 1976. Glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT). *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North Holland Publishing: Chapter 4-1.
- Hart GE, Langston PJ, 1977. Glutamate oxaloacetate transaminase isozymes of the *Triticinae*: dissociation and recombination of subunit. *Theor Appl Genet* 50: 47-51.
- Hart GE, 1983. Hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). In: Tanksley SD, Orton TJ, eds. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part B. Elsev Sci Pub: 35-55.
- Hart GE, McMillin DE, Sears ER, 1976. Determination of the chromosomal location of a glutamate oxaloacetate transaminase structural gene using *Triticum-Agropyron* translocations. *Genetics* 83: 49-61.
- Huang AHC, Liu KDF., Youle RJ, 1976. Organelle specific isozymes of aspartate –  $\alpha$ -ketoglutarate transaminase in spinach leaves. *Plant Physiol* 58: 110-113.
- Ireland RJ, Lea PJ, 1999. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine, and aspartate metabolism. In: Singh BK, ed. *Plant amino acids*. Marcel Dekker: 49-109.
- Karcicio M, Izbirak A, 2003. Isozyme variations in some *Aegilops* L. and *Triticum* L. species collected from central Anatolia. *Turk J Bot* 27: 433-440. <http://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-03-27-6/bot-27-6-1-0211-3.pdf>
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Latzko E, Gibbs M, 1974. Alkaline C<sub>1</sub>-fructose-1,6-diphosphatase. In: Bergmayer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 2. Verlag Chemie Weinheim Academic Press: 881-884.
- Scandalios JG, Sorenson JC, Ott LA, 1975. Genetic control and intracellular localization of glutamate oxaloacetic transaminase in maize. *Biochem Genet* 13: 759-769.
- Schultz CJ, Hsu M, Miesak B, Coruzzi GM, 1998. *Arabidopsis* mutants define an in vivo role for isoenzymes of aspartate aminotransferase in plant nitrogen assimilation. *Genetics* 149: 491-499.
- Stejskal J, 1994. Aspartate aminotransferase isozymes in plants: comparison of two staining methods in polyacrylamide gels. *Biol Plant* 36: 359-364.
- Stephens AS, Gebhardt JS, Matthews BF, Wadsworth GJ, 1998. Purification and preliminary characterization of the soybean glyoxysomal aspartate aminotransferase isozyme. *Plant Sci* 139: 233-242.
- Taniguchi M, Kobe A, Kato M., Sugiyama T, 1995. Aspartate aminotransferase isozymes in *Panicum miliaceum* L., an NAD-malic enzyme-type C<sub>4</sub> plant: Comparison of enzymatic properties, primary structures, and expression patterns. *Arch Biochem Biophys* 318: 295-306.
- Wilkie SE, Lambert R, Warren MJ, 1996. Chloroplastic aspartate aminotransferase from *Arabidopsis thaliana*: an examination of the relationship between the structure of the gene and the spatial structure of the protein. *Biochem J* 319: 969-976.