

## AMINOTRANSFERAZA ALANINOWA W ROŚLINACH WYŻSZYCH

### ALANINE AMINOTRANSFERASE IN HIGHER PLANTS

Maria Elżbieta KENDZIOREK, Barbara Maria ZAGDAŃSKA

Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii,  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

*Streszczenie:* Aminotransferaza L-alanina:2-oksoglutaran (EC 2.6.1.2) nazywana alaninową (AlaAT) katalizuje reakcję transaminacji między L-alaniną a 2-oksoglutaranem oraz odwrotną, między L-glutaminianem a pirogronianem. Jest jednym z najważniejszych enzymów uczestniczących w syntezie i degradacji L-alaniny. U roślin wykazano obecność kilku izoenzymów (2 do 6 w zależności od rośliny) tego enzymu. Lokalizacja subkomórkowa izoenzymów tej aminotransferazy w cytoplazmie, mitochondriach i peroksysomach wydaje się być ściśle powiązana z rolą metaboliczną: (i) u roślin typu  $C_4$  (*Paniculum miliaceum*) aminotransferaza alaninowa umożliwia transfer jednostek  $C_3$  (pirogronian) z mezofilu do do pochwy okołowiązkowej, (ii) peroksysomalna aminotransferaza alaninowa wykazująca aktywność transaminazy L-glutaminian : glioksalan zaangażowana jest w regulację aktywności fotooddychania, (iii) aminotransferaza alaninowa niewykazująca aktywności transaminazy L-glutaminian : glioksalan bierze udział w odpowiedzi nadwrażliwości na atak oraz (iv) enzym ten reguluje aktywność oksydazy alternatywnej w mitochondriach. Zaobserwowano także aktywację aminotransferazy alaninowej pod wpływem niedotlenienia i towarzyszącą jej akumulację L-alaniny. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że enzym ten może być zaangażowany w reakcje umożliwiające roślinie tolerowanie różnych niekorzystnych czynników, takich jak okresowe zalewanie pól czy zaleganie okrywy śniegu. Badania nad roślinami transgenicznymi wykazały także jej kluczową rolę w metabolizmie azotu. Ponadto peroksysomalna aminotransferaza alaninowa współdziałająca z glioksalanem jako akceptorem grupy aminowej jest zaangażowana w regulację stężenia seryny, cytruliny i glicyny w liściach.

*Słowa kluczowe:* aminotransferaza alaninowa, izoenzymy, hypoksja, deficyt azotu, fotooddychanie.

*Summary:* Alanine:2-oxoglutarate aminotransferase (EC 2.6.1.2), also called alanine aminotransferase (AlaAT), catalyses transamination reaction between L-alanine and 2-oxoglutarate and the reverse reaction between L-glutamate and pyruvate. It is one of the most important enzymes involved in the synthesis and degradation of L-alanine. There are multiple isoenzymes of this enzyme (2 to 6) present in plants. Subcellular location of these isoenzymes appears to be directly associated with their metabolic role: (i) in  $C_4$  plants (*Paniculum miliaceum*) alanine aminotransferase participates in the transfer of  $C_3$  units (pyruvate) from mesophyll to bundle sheath cells, (ii) peroxysomal alanine aminotransferase exhibiting L-glutamate : glyoxylate aminotransferase activity is involved in regulation of photorespiration, (iii) alanine aminotransferase lacking L-glutamate : glyoxylate aminotransferase activity participates in hyper-

sensitivity response to virus attack and (iv) regulates the alternative oxidase activity in mitochondria. Activation of alanine aminotransferase and simultaneous L-alanine accumulation was observed in plants subjected to hypoxia. On this base it was proposed, that this enzyme is involved in the response mechanisms that allow plants to survive under various adverse conditions such as periodic flooding of fields or lingering of snow cover. Research on transgenic plants also indicated its crucial role in nitrogen metabolism. Moreover peroxysomal alanine aminotransferase capable of using glyoxylate as amino group acceptor appeared to be involved in regulation of serine, citrulline and glycine contents in leaves.

*Key words:* alanine aminotransferase, isoenzymes, hypoxia, nitrogen deprivation, photorespiration.

## 1. WSTĘP

Aminotransferazy (EC 2.6.1.x) są enzymami powszechnie występującymi u roślin, zwierząt i mikroorganizmów. Reakcje katalizowane przez nie odgrywają istotną rolę w wielu szlakach metabolicznych, takich jak metabolizm aminokwasów i witamin, asymilacja azotu i węgla, fotooddychanie, a także glukoneogeneza [14]. Enzymy te należą do klasy transferaz i katalizują przeniesienie grupy aminowej z aminokwasu, będącego dawcą tej grupy, na 2-oksokwas, służący jako jej biorca. Produktami reakcji są 2-oksokwas (pochodny substratu aminokwasowemu) i aminokwas (odpowiadający substratu 2-oksokwasowemu). Jak wiele enzymów wykorzystujących substraty aminokwasowe, aminotransferazy potrzebują do działania kofaktora, fosforanu pirydoksalu (PLP), który jest kowalencyjnie związany z ich białkiem.

Większość reakcji transaminacji jest łatwo odwracalna. Jednakże niektóre z nich uchodzą za nieodwracalne w warunkach fizjologicznych, jak te z udziałem glioksalanu (substrat 2-oksokwasowy), gdyż zachodzą ze znacznym spadkiem energii swobodnej, lub nie mogą zajść w odwrotnym kierunku z powodu niestabilności produktów, czy niskiego powinowactwa enzymu do substratu [25]. Zazwyczaj jeden enzym jest zdolny katalizować reakcje z wieloma parami substratów aminokwas : 2-oksokwas [35]. Z tego powodu jedno białko enzymatyczne było często znane pod kilkoma różnymi nazwami i numerami klasyfikacyjnymi. Przez ostatnie kilkanaście lat poczyniono ogromne postępy w identyfikacji i charakterystyce genów kodujących aminotransferazy. Przeszukanie bazy danych genomu *Arabidopsis thaliana* ([www.arabidopsis.org/BLAST/](http://www.arabidopsis.org/BLAST/)) doprowadziło do znalezienia 60 sekwencji pokrewnych im enzymów zależnych od PLP, z czego 16 nie pełniło funkcji aminotransferaz. Zatem pozostałe 44 białka są potencjalnie zaangażowane w katalizowanie reakcji transaminacji w komórce roślinnej. Dalsza analiza tych sekwencji pozwoliła stwierdzić, że w niektórych przypadkach występuje kilka spokrewnionych form enzymu (np. aminotransferaza asparaginianowa czy alaninowa), zlokalizowanych w różnych przedziałach subkomórkowych, w innych przypadkach występowała tylko jego jedna forma (np. aminotransferaza seryna : glioksalan). Z tych 44 potencjalnych aminotransferaz występujących u rzodkiewnika około 20 zostało przebadanych, a także odpowiedniki czterech enzymów pochodzących z innych roślin [14]. Zatem ponad 40% potencjalnych aminotransferaz pozostaje jeszcze niescharakteryzowane.

Reakcję przeniesienia grupy aminowej między L-glutaminianem a pirogronianem i odwrotną, między L-alaniną a 2-oksoglutaranem, katalizują: aminotransferaza L-alanina : 2-oksoglutaran (EC 2.6.1.2), nazywana alaninową (AlaAT), oraz często traktowana jako jej izoenzym wykazujący dodatkową aktywność z glioksalanem jako akceptorem grupy aminowej – aminotransferaza glutaminian : glioksalan (GGAT, EC 2.6.1.4). Ze względu na duże znaczenie w diagnostyce chorób serca i wątroby, aminotransferaza alaninowa człowieka i zwierząt, jest jednym z najlepiej przebadanych enzymów. Izoenzymy tej aminotransferazy uczestniczą w metabolizmie aminokwasów w komórkach zwierzęcych. Izoforny cytoplazmatyczne tego enzymu przede wszystkim biorą udział w syntezie L-alaniny z pirogronianu, podczas gdy mitochondrialna izoforma, występująca w tkankach zdolnych prowadzić glukoneogenezę, bierze udział w przekształcaniu alaniny do pirogronianu, wykorzystywanego do syntezy glukozy. Ponadto aminotransferaza alaninowa neuronów katalizuje syntezę L-glutaminianu z L-alaniny i 2-oksoglutaranu, co ma szczególne znaczenie przy regeneracji tkanki nerwowej po niedotlenieniu, gdy poziom L-alaniny znacznie wzrasta. Jednocześnie enzym ten odgrywa bardzo dużą rolę w degradacji L-glutaminianu – neurotransmitera obficie wydzielanego w warunkach silnego pobudzenia, co chroni neurony przed uszkodzeniem spowodowanym jego toksycznym działaniem w wysokim stężeniu [15].

Poziom aminotransferazy alaninowej we krwi, a także stosunek aktywności aminotransferazy asparaginianowej do alaninowej jest wskaźnikiem stosowanym w diagnostyce uszkodzeń wątroby spowodowanych żółtaczką typu B i C, autoagresją, cukrzycą, alkoholizmem, lekami, a także choroby wieńcowej serca [4] czy uszkodzeń mięśni szkieletowych [19].

W organizmach roślinnych stwierdzono obecność kilku (2 do 6) izoenzymów tej aminotransferazy w różnych przedziałach komórkowych. W zielonych tkankach roślin występowały one głównie w peroksysomach, mitochondriach i cytoplazmie [13], natomiast nie wykryto ich obecności w chloroplastach. W genomie rzodkiewnika pospolitego zidentyfikowano cztery geny kodujące białka enzymatyczne katalizujące reakcję przeniesienia grupy aminowej między L-alaniną a 2-oksoglutaranem [8, 14]. Dwa z nich charakteryzują się niską specyficznością substratową i dodatkowo katalizują reakcję transaminacji L-glutaminian : glioksalan [13, 38]. Na C-końcu białka tych izoenzymów występuje peptyd sygnałny (PTS1) kierujący je do przestrzeni peroksysomalnej, a ich sekwencje aminokwasowe odpowiadają aminotransferazom zidentyfikowanym jako GGAT1 i GGAT2 (numery akcesyjne NCBI odpowiednio: AAK25905 i AAL34156). Pozostałe dwa białka enzymatyczne (numery akcesyjne NCBI odpowiednio: AAF82781 i AAF82782) to AlaAT1 i AlaAT2 [8]. Zgodnie z tym, co podają Liepman i Olsen [14], AlaAT1 zlokalizowana jest w cytoplazmie, a AlaAT2 w mitochondriach. Podział na 2 grupy w ramach izoenzymów aminotransferazy L-alanina : 2-oksoglutaran z rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) ma swoje uzasadnienie nie tylko w specyficzności substratowej, ponieważ sekwencje aminokwasowe GGAT1 i GGAT2 oraz AlaAT1 i AlaAT2 wykazują odpowiednio: 93% i 85% podobieństwa natomiast wskaźnik identyczności sekwencji dla wszystkich czterech wynosi ok. 44%. U lucerny (*Medicago truncatula*) Ricoult i wsp. [27]

stwierdzili występowanie dwóch genów kodujących izoenzymy: mitochondrialnej (m-AlaAT) i cytoplazmatycznej (c-AlaAT) aminotransferazy alaninowej.

Aminotransferaza L-alanina : 2-oksoglutaran pochodząca z różnych roślin wykazywała najczęściej budowę dimeryczną i masę cząsteczkową około 100 kDa. Na szczególną uwagę zasługują wyniki uzyskane przez Wiśniewskiego i wsp. [38]. Za pomocą sączenia molekularnego na kolumnie Zorbax SE-250 wyznaczyli oni masy izoenzymów aminotransferazy L-alanina : 2-oksoglutaran z liści *Arabidopsis thaliana*. Wynosiły one odpowiednio 61,8 kDa i 62,9 kDa, dla izoenzymów wykazujących obydwie aktywności (L-alanina : 2-oksoglutaran, AlaAT i L-glutaminian : glioksalan, GGAT) oraz około 54,7 kDa i 55,3 kDa dla izoform tylko z aktywnością L-alanina : 2-oksoglutaran (AlaAT). Zatem wszystkie cztery izoenzymy okazały się aktywne enzymatycznie w formie monomerów.

Powszechnie przyjmuje się, że reakcje katalizowane przez aminotransferazy przebiegają zgodnie z mechanizmem zwanym ping pong bi bi [11]. Reakcja przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie substrat aminokwasowy przekształcany jest w pochodny do niego 2-oksokwas. Proces ten można podzielić na trzy kroki: utworzenie zasady Shiffa, tautomeryzację i hydrolizę. W pierwszym kroku substrat aminokwasowy tworzy zasadę Shiffa z fosforanem pirydoksalu, czemu towarzyszy przeniesienie grupy  $\alpha$ -aminowej na enzym. Następnie alodimina utworzona przez fosforan pirydoksalu i substrat aminokwasowy w wyniku szeregu reakcji tautomeryzacji zostaje przekształcona w ketoiminę, która w ostatnim kroku hydrolizuje do fosforanu pirydoksaminy (PMP) i produktu 2-oksokwasowego. Drugi etap tej reakcji stanowi odwrócenie pierwszego. Grupa aminowa zostaje przeniesiona z PMP na substrat 2-oksokwasowy z utworzeniem pochodnego mu aminokwasu i jedno-czesnym przekształceniem PMP na powrót do wewnętrznej aldoiminy na skutek odwrócenia reakcji tautomeryzacji z pierwszego etapu. W trakcie reakcji transaminacji katalizowanej przez aminotransferazę alaninową L-alanina powoduje odłączenie koenzymu od lizyny w centrum aktywnym i uwolnienie go w postaci fosforanu pirydoksaminy, z kolei 2-oksoglutaran stabilizuje wewnętrzną aldoiminę utworzoną przez enzym i PLP [1].

Badania specyficzności substratowej AlaAT z różnych źródeł pokazały, że enzym ten katalizuje reakcje transaminacji w szerokim zakresie kombinacji dawca : biorca grupy aminowej. Niektóre izoformy tej aminotransferazy dodatkowo zdolne były katalizować reakcję transaminacji między L-glutaminianem a glioksalanem. U wielu izoform roślinnych AlaAT stwierdzano zdolność do katalizowania reakcji transaminacji pomiędzy L-alaniną a glioksalanem. Jednakże ani izoforma AlaAT oczyszczona z liści kukurydzy [21], ani indukowana niedotlenieniem AlaAT z korzeni jęczmienia [6] nie współdziałały z glioksalanem jako akceptorem grupy aminowej.

Pewnych informacji na temat fizjologicznej roli izoenzymów AlaAT dostarcza powinowactwo enzymu do substratu, o którym świadczy wartość stałej  $K_m$ . Wartość tej stałej dla substratu aminokwasowego jest zazwyczaj wyższa, niż dla 2-oksokwasowego zarówno w przypadku aminotransferazy alaninowej, jak i innych transaminaz. Dla większości przebadanych enzymów wartość  $K_m$  dla L-alaniny w reakcji z 2-oksoglutaranem była podobna do tej, jaką uzyskiwano dla L-glutaminianu w reakcji z pirogronianem.

TABELA 1. Wartości stałych Michaelisa-Menten ( $K_m$ ) dla AlaAT  
 TABLE 1. Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) values for AlaAT

Material	Substrat o zmiennym stężeniu	$K_m$ [mM]	Substrat o stałym stężeniu	Literatura
Rzodkiewnik (AlaAT1)	L-alanina	1,53	2-oksoglutaran	Wiśniewski i wsp. [2006]
	2-oksoglutaran	0,18	L-alanina	
Proso (AlaAT2)	L-alanina	6,67	2-oksoglutaran	Son i wsp. [1991]
	2-oksoglutaran	0,15	L-alanina	
	L-glutaminian	5,00	pirogonian	
	pirogonian	0,33	L-glutaminian	
Kukurydza	L-alanina	1,50	2-oksoglutaran	Orzechowski i wsp. [1999]
	2-oksoglutaran	0,50	L-alanina	
	L-glutaminian	1,90	pirogonian	
	pirogonian	0,90	L-glutaminian	

W przypadku aminotransferazy glutaminian:glioksalan wartości  $K_m$  dla dwóch rekombinowanych izoenzymów GGAT1 i GGAT2 rzodkiewnika wobec L-alaniny, 2-oksoglutaranu oraz pirogonianu i L-glutaminianu, a także wobec L-glutaminianu i glioksalanu w reakcjach transaminacji między tymi parami substratów największe różnice zanotowano dla L-alaniny i 2-oksoglutaranu [13].  $K_{m(\text{Ala})}$  była dwukrotnie niższa dla GGAT2 (3,32 mM) niż dla GGAT1 (1,97 mM), natomiast w przypadku  $K_{m(\text{2-oksoglu})}$  sytuacja wyglądała odwrotnie (dla GGAT1 – 0,21 mM, dla GGAT2 – 0,14 mM). Ponadto stwierdzono, że wartość  $K_m$  dla L-alaniny w reakcji z 2-oksoglutaranem jest wyższa od uzyskanej dla L-glutaminianu w reakcji z glioksalanem. Podobne wyniki dla enzymu oczyszczonego z siewek żyta uzyskali [23] ci, którzy stwierdzili, że w przypadku wyżej wspomnianych reakcji  $K_{m(\text{Ala})}$  (4,7 mM) była blisko dwukrotnie wyższa niż  $K_{m(\text{Glu})}$  (2,6 mM).

Bardzo istotnymi parametrami wskazującymi na wydajność i preferencje katalityczne enzymu jest liczba obrotów ( $k_{\text{cat}}$ ) i  $k_{\text{cat}}/K_m$ . Wiśniewski z współpracownikami [38] wyznaczyli  $k_{\text{cat}}$  i  $k_{\text{cat}}/K_m$  w transaminacji pomiędzy L-alaniną a 2-oksoglutaranem dla AlaAT1 uzyskując bardzo wysoką wartość (dla  $k_{\text{cat}}$  – 124,6 s<sup>-1</sup>, a dla  $k_{\text{cat}}/K_m$  81449,5 1/Ms). Tak wysoka wydajność katalityczna w połączeniu z wysokim powinowactwem enzymu do obydwu substratów wskazuje, że cytoplazmatyczna AlaAT z rzodkiewnika odgrywa kluczową rolę w syntezie i degradacji L-alaniny.

## 2. LOKALIZACJA SUBKOMÓRKOWA IZOENZYMÓW ALAAT A ICH ROLA METABOLICZNA

Lokalizacja subkomórkowa izoform AlaAT wydaje się być powiązana z ich rolą metaboliczną. Dlatego sugerowano, że niektóre z nich mogą brać udział w syntezie i degradacji L-alaniny i wzajemnych przemianach aminokwasów [22]. Inne z kolei miały pełnić bardziej specyficzne funkcje, takie jak uczestniczenie w międzykomórkowym przepływie węgla pomiędzy komórkami mezofilu a pochwy

okołowiązkowej u roślin typu C4 [31], fotooddychaniu [20], odpowiedzi nadwrażliwości na atak wirusa [12], niedobór azotu [32] i adaptacji do warunków niedotlenienia [26, 27, 16].

Kluczową sprawą pozostaje ustalenie funkcji pełnionej przez poszczególne izoenzymy w roślinie. Noguchi i Fujiwara [20] stwierdzili obecność aktywności AlaAT zdolnej katalizować transaminację pomiędzy L-glutaminianem a glioksalanem zarówno u roślin rosnących w ciemności, jak i na świetle, jednakże obserwowali wzrost poziomu jej aktywności pod wpływem światła. Ponadto stwierdzili, że w trakcie zielenienia aktywność ta zanika w cytozolu, a pojawia się w peroksysomach. Wskazywało to na udział tego enzymu w fotooddychaniu. Podobnie transkrypty genów kodujących GGAT1 i GGAT2 znaleziono zarówno w siewkach rosnących na świetle, jak i w ciemności [13]. Parametry kinetyczne rekombinowanych GGAT1 i GGAT2 były bardzo podobne, co doprowadziło do przypuszczeń, że najprawdopodobniej odgrywają one w metabolizmie rośliny tę samą rolę i obecność aż dwu izoform GGAT u rzodkiewnika może być zbędna [13]. Aby stwierdzić, czy GGAT1 rzodkiewnika rzeczywiście działa jako peroksysomalna aminotransferaza glutaminian : glioksalan, Igarashi i wsp. [8] wyizolowali linię transgeniczną komórek tytoniu (BY-2) wytwarzającą fuzyjne zielone białko fluoryzujące (GFP). W wektor ekspresyjny tego białka wstawili cDNA kodujące ten izoenzym (GFP-AOAT1) oraz fragment cDNA bez C-końcowej sekwencji, która odpowiada za kierowanie białek do peroksysomów (GFP-AOAT1 $\Delta$ C). W komórkach, które wytwarzały białko GFP-AOAT1, jego fluorescencję obserwowano w peroksysomach, natomiast w komórkach syntetyzujących białko GFP-AOAT1 $\Delta$ C występowała na terenie cytoplazmy [8].

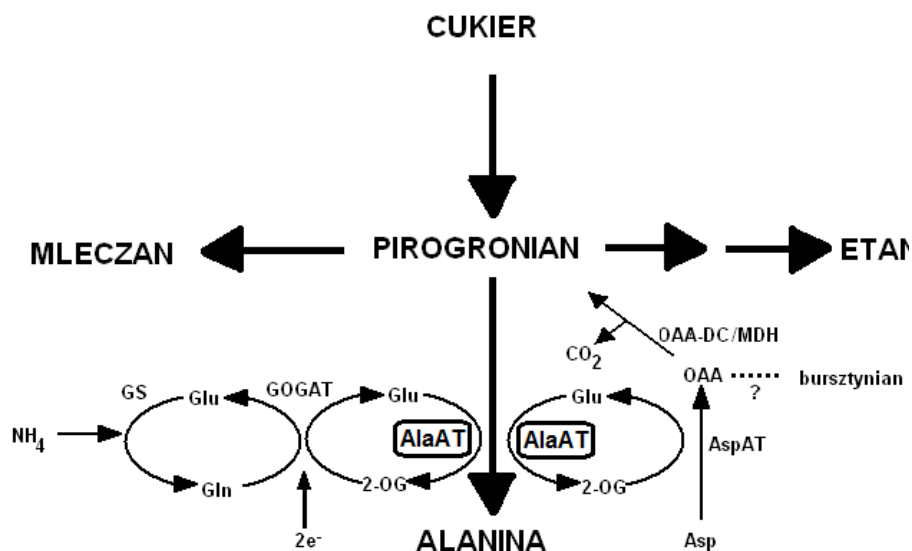
Drastyczny spadek aktywności L-alanina : 2-oksoglutaran u mutantów linii *alaat1-1* rzodkiewnika niewytwarzających aminotransferazy alaninowej 1 wskazywał, że jest ona głównym izoenzymem AlaAT w tej roślinie [16]. Wyniki badań na roślinach typu dzikiego i mutantach OxAlaAT o zwiększonej ekspresji aminotransferaz alaninowych sugerują ich udział w odpowiedzi roślin *Arabidopsis* na niedotlenienie, bowiem wzrostowi poziomu transkrypcji genów kodujących te izoenzymy w obu typach roślin poddanych warunkom hypoksji towarzyszyła gwałtowna produkcja L-alaniny (ibid). Wiadomo też, że transkrypcja genów kodujących AlaAT jest indukowana przez dostarczenie azotu do podłoża [33, 17], a drastyczne zahamowanie pobierania NO<sub>3</sub><sup>-</sup> przez rośliny poddane wysokim stężeniom metali ciężkich, takich jak: Cd<sup>2+</sup> czy Ni<sup>2+</sup>, powodowało spadek aktywności tego enzymu [3]. Wyniki badań na transgenicznym roślinach o zwiększonej aktywności AlaAT potwierdziły znaczenie tego enzymu dla metabolizmu azotu w warunkach jego niedoboru [5, 30]. Rośliny rzepaku (*Brassica napus* L.) z wprowadzonym fragmentem cDNA kodującym AlaAT wyizolowanej z jęczmienia przez Muench i Good [18] poddano niedoborowi azotu [5]. U roślin tych obserwowano zwiększone pobieranie azotanów w stosunku do roślin kontrolnych. Charakteryzowała je też zwiększona produkcja L-alaniny, łatwo transportowanej z korzeni do części nadziemnych, co mogło poprawić wydajność gospodarki azotem [5].



### 3. ROLA ALaAT W WARUNKACH NIEDOTLENIENIA

Niedobór tlenu, spowodowany zazwyczaj okresowym zalewaniem terenu, prowadzi do stopniowej nekrozy tkanek korzenia i tworzenia skupisk miększu powietrznego (aerenchimy), początkowo obejmującej stożek wzrostu i postępującej do walca osiowego [34]. Hypoksja jest zjawiskiem groźnym zwłaszcza dla kiełkujących roślin, gdyż może redukować ich liczbę lub zaburzać wzrost, a w przypadku roślin użytkowanych rolniczo przyczynia się do spadku plonu i strat ekonomicznych [34].

W warunkach niedoboru tlenu następuje zahamowanie oksydacyjnej fosforylacji przy jednoczesnym wzmożeniu glikolizy i szlaków fermentacyjnych, co prowadzi do akumulacji różnych produktów tych szlaków, jak etanol, mleczan, bursztynian czy jabłczan. Obserwowano również znaczny wzrost stężenia dwóch aminokwasów: L-alaniny i kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) [24]. Ponieważ L-alanina powstaje z pirogronianu, głównego produktu glikolizy, jej wzmożona produkcja w odpowiedzi na niedotlenienie była szczególnie interesująca jako konkurencyjny szlak w stosunku do fermentacji alkoholowej, czy mlekowej. Synteza alaniny pozwala na zachowanie węgla, który byłby zużyty w tych procesach do produkcji etanolu lub mleczanu z pirogronianu (ryc. 1). Ponadto jest procesem bardzo istotnym dla regulacji poziomu pirogronianu w komórce, gdyż jego podwyższone stężenie prowadzi do aktywacji



RYCINA 1. Metabolizm pirogronianu w warunkach niedoboru tlenu: GS – syntetaza glutaminowa, GOGAT – syntetaza glutaminianowa, 2-OG – 2-oksoglutaran, AspAT – aminotransferaza asparaginianowa, OAA – szczawiooctan, OAA-DC – dekarboksylaza szczawiooctanowa, MDH – dehydrogenaza jabłczanowa

FIGURE 1. Pyruvate metabolism in oxygen deficiency conditions: GS – glutamine synthetase, GOGAT – glutamate synthase, 2-OG – 2-oxoglutarate, AspAT – aspartate aminotransferase, OAA – oxaloacetic acid, OAA-DC – oxaloacetate decarboxylase, MDH – malate dehydrogenase

alternatywnej oksydazy w mitochondriach przyczyniając się do zwiększonego zużycia tlenu [7]. Akumulacja L-alaniny wydaje się być kluczową dla przetrwania hypoksji, gdyż następuje niezależnie od dostępności azotu dla roślin [28, 29]. Stąd też dużym zainteresowaniem cieszyły się badania nad rolą aminotransferazy alaninowej w metabolizmie alaniny w warunkach niedotlenienia.

Znaczny wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej i poziomu transkryptu ją kodującego [26, 27, 28, 29] obserwowany u roślin poddanych niedotlenieniu sugerował, iż enzym ten odgrywa bardzo istotną rolę we wzmożonej syntezie L-alaniny. Hipotezę tę potwierdzał fakt wzmożonej syntezy enzymów cyklu syntetazy glutaminowej – syntazy glutaminianowej (GS-GOGAT), będącego źródłem L-glutaminianu biorącego udział w produkcji L-alaniny z pirogronianu. Ponadto wyniki badań z użyciem L-glutaminianu znakowanego  $^{15}\text{N}$  wskazywały, że powstawała ona w wyniku przenoszenia grupy aminowej z tego aminokwasu na pirogronian [26, 27]. Syntezie L-alaniny z pirogronianu wskutek transaminacji towarzyszy przekształcanie L-glutaminianu w 2-oksoglutaran, który może brać udział w produkcji bursztynianu w mitochondriach w trakcie cyklu kwasów trójkarboksylowych. Katalizująca tą reakcję aminotransferaza alaninowa łączy zatem glikolizę z cyklem kwasów trójkarboksylowych podczas niedoboru tlenu [28].

Nowe spojrzenie na rolę aminotransferazy alaninowej w niedoborze tlenu przyniosły badania, które przeprowadzili de Sousa i Sodek [2]. Stwierdzili oni, że znaczny wzrost stężenia L-alaniny następuje wcześniej niż szczyt wzrostu aktywności AlaAT w korzeniach soi poddanej niedotlenieniu. Natomiast stężenie L-alaniny gwałtownie spadało po powrocie do normalnych warunków dostępności tlenu. Obserwacja ta sugeruje, że aminotransferaza alaninowa odgrywa ograniczoną rolę w syntezie tego aminokwasu, który może powstawać na innych szlakach, natomiast odgrywa znaczącą rolę w jej degradacji po ustąpieniu stresu (ibid). Przypuszczenie to potwierdziły wyniki badań na mutantach rzodkiewnika pozbawionych aminotransferazy alaninowej 1 (alaat1-1) i o zwiększonej ekspresji aminotransferaz alaninowych (OxAlaAT). Stwierdzili oni, że rośliny linii alaat1-1 szybko akumulowały L-alaninę w warunkach niedotlenienia i znacznie dłużej utrzymywały jej wysoką zawartość po przeniesieniu do warunków normalnych niż rośliny typu dzikiego [16].

#### 4. FOTOODDYCHANIE

Fotooddychanie jest bardzo kosztownym energetycznie procesem, powodującym obniżenie wydajności fotosyntezy przez spore zużycie węgla. Dlatego było postrzegane jako niekorzystne dla produktywności roślin [37]. Jednakże fotooddychanie jest procesem istotnym dla rozproszenia nadmiaru energii, przez co stanowi swego rodzaju mechanizm ochronny rośliny przed fotoutlenieniem pod wpływem zbytnej intensywności światła, a także w warunkach suszy, czy wysokiego zasolenia [37]. Szlak ten wykorzystuje 2-fosfoglikolan powstały w obecności światła, jako produkt utleniania rybulozo-1,5-bisfosforanu. Najpierw 2-fosfoglikolan jest hydrolizowany do glikolanu przez chloroplastową fosfatazę fosfoglikolanową i zostaje przetransportowany do peroksy-



somów, w których zostaje utleniony do glioksalanu przez oksydazę glikolanową. Może on dalej zostać przekształcony w glicynę przez aminotransferazę seryna : glioksalan (SGAT) lub glutaminian : glioksalan, która w tym procesie wykorzystuje glutaminian powstały w cyklu GS/GOGAT jako dawcę grupy aminowej. Glicyna bierze udział w syntezie seryny, która w peroksysomach zostaje przekształcona przez SGAT do hydroksypirogronianu, który ulega redukcji do glicerynianu, który ufosforylowany jest zużyty do syntezy rybulozo-1,5-bisfosforanu w cyklu Calvina [37].

Aby stwierdzić, czy GGAT1 rzeczywiście bierze udział w fotooddychaniu, wyizolowano linię mutantów rzodkiewnika niewytwarzających tego enzymu nazwaną *aoat1-1* [8]. W region odpowiedzialny za jego kodowanie wstawili oni T DNA z jednoczesną delecją 14 par zasad. W normalnych warunkach stężenia CO<sub>2</sub> i oświetlania mutant ten wykazywał zmiany typowe dla mutantów o ograniczonej zdolności do prowadzenia fotooddychania: zahamowany wzrost i jasno zielone liście. W warunkach wysokiego natężenia światła rośliny te rozwijały się gorzej od roślin typu dzikiego, natomiast podwyższone stężenie CO<sub>2</sub> w środowisku sprzyjało lepszemu rozwojowi tych roślin. U mutantów tych mRNA dla GGAT1 było niewykrywalne. Ponadto aktywności aminotransferazowe: L-alanina : 2-oksoglutaran, L-alanina : glioksalan, L-glutaminian : pirogronian i L-glutaminian : glioksalan były niższe, niż u typu dzikiego. Otrzymane wyniki pozwoliły wnioskować, że GGAT1 faktycznie funkcjonuje jako peroksysomalna aminotransferaza glutaminian : glioksalan, a niewielka aktywność L-glutaminian : glioksalan u mutantu *aoat1-1* oraz jego zdolność do przeżycia w normalnych warunkach jest wynikiem obecności GGAT2 [8]. Na to, że GGAT1 jest peroksysomalną aminotransferazą glutaminian : glioksalan wskazuje fakt, że stężenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach mutantów z utraconą zdolnością do syntezy tego izoenzymu wystawionych na działanie światła jest zdecydowanie wyższe niż u roślin typu dzikiego [36].

## 5. UDZIAŁ W SYNTEZIE AMINOKWASÓW

Badania ostatnich lat dostarczyły bardzo interesujących wyników korelacji aktywności GGAT oraz stężenia wybranych aminokwasów w liściach mutantu rzodkiewnika z utraconą zdolnością do biosyntezy GGAT1 (*ggat1-1*), wytwarzającego zwiększoną ilość tego izoenzymu (GTox) i rośliny typu dzikiego [9]. Stwierdzono, że w *Arabidopsis* największa korelacja występuje między aktywnością GGAT a zawartością seryny, cytruliny i glicyny. Sugerowało to, że aminotransferaza glutaminian : glioksalan może brać bezpośredni udział w regulacji poziomu tych trzech aminokwasów. Ponadto istotne różnice w zawartości dziewięciu wybranych aminokwasów między trzema wymienionymi liniami roślin wskazywały, że badany izoenzym uczestniczy w metabolizmie tych związków [9].

Wyniki doświadczeń z użyciem L-alaniny i L-glutaminianu znakowanych <sup>15</sup>N wskazywały na udział GGAT z lucerny w syntezie glicyny. W warunkach niedoboru tlenu aktywność tego enzymu była hamowana i jednocześnie obserwowano znaczny spadek szybkości biosyntezy glicyny [27].

## 6. PODSUMOWANIE

Aminotransferaza alaninowa jest enzymem zaangażowanym w reakcje biochemiczne o podstawowym znaczeniu dla rośliny. Katalizując odwracalną reakcję transaminacji pomiędzy L-glutaminianem a pirogronianem i odwrotną między L-alaniną a 2-oksoglutaranem wiąże pierwotny metabolizm węgla z syntezą różnych aminokwasów. Badania ostatnich lat potwierdzają, że szczególną rolę odgrywa ona w tolerancji hypoksji przez rośliny, niezależnie czy obniżona dostępność tlenu wywołana została przez zatopienie roślin, np. przez powódzie, czy przez gwałtowne tajanie śniegu lub zaleganie skorupy śniegu [29]. Tworzenie L-alaniny z pirogronianu jest niezwykle ważne dla regulacji poziomu pirogronianu w komórce, gdyż reguluje aktywność alternatywnej oksydazy w mitochondriach [7], która obok szlaku fotooddychania odgrywa podstawową rolę w tolerancji przez rośliny innych niekorzystnych czynników środowiska, takich jak: mróz, wysoka temperatura czy susza [10]. Przeprowadzone do tej pory badania nad charakterystyką izoenzymów aminotransferazy alaninowej z różnych roślin pozwoliły nie tylko na próbę określenia znaczenia poszczególnych izoenzymów w funkcjonowaniu rośliny w różnych warunkach środowiska, ale otwierają nowe perspektywy badawcze. Jak dotąd bowiem brak jest w literaturze danych o roli tego enzymu w odpowiedzi roślin na tak ważne dla jej funkcjonowania warunki, jak: stres termiczny (chłód, mróz, przegrzanie) czy susza. Wiele także pozostaje do wyjaśnienia w kwestii jego udziału w odpowiedzi na atak patogenów i szkodników.

## LITERATURA

- [1] BERÁNEK M, DRŠATA J, PALIČKA V. Inhibitory effect of glycation on catalytic activity of alanine aminotransferase. *Mol Cell Biochem* 2001; **218**: 35–39.
- [2] de SOUSA CAF, SODEK L. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Env Exp Bot* 2003; **50**: 1–8.
- [3] EL-SHINTINAWY F, EL-ANSARY A. Differential effect of Cd<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> on amino acid metabolism in soybean seedlings. *Biol Plant* 2000; **43**: 79–84.
- [4] GIBONEY PT. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *Am Fam Physician* 2005; **71**(6): 1105–1110.
- [5] GOOD AG, JOHNSON SJ, DePAUW M, CARROL RT, SAVIDOV N, VIDMAR J, LU Z, TAYLOR G, STROEHER V. Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Can J Bot* 2007; **85**: 252–262.
- [6] GOOD AG, MUENCH DG. Purification and characterization of an anaerobically induced alanine aminotransferase from barley roots. *Plant Physiol* 1992; **99**: 1520–1525.
- [7] GUPTA KJ, ZABALZA A, van DONGEN JT. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiol Plant* 2009; **137**: 383–391.
- [8] IGARASHI D, MIWA T, SEKI M, KOBAYASHI M, KATO T, TABATA S, SHINOZAKI K, OHSUMI C. Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in *Arabidopsis*. *Plant J* 2003; **33**: 975–987.
- [9] IGARASHI D, TSUCHIDA H, MIYAO M, OHSUMI C. Glutamate:glyoxylate aminotransferase modulates amino acid content during photorespiration. *Plant Physiol* 2006; **142**: 901–910.
- [10] JUSZCZUK IM, RYCHTER AM. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Polon* 2003; **4**(50): 1257–1271.

- [11] KARSTEN WE, OSHIRO T, IZUMI Y, COOK P. Initial velocity, spectral and pH studies of the serine:glyoxylate aminotransferase from *Hypomicrobium metylovorum*. *Arch Biochem Biophys* 2001; **338**(2): 267–275.
- [12] KIM KJ, PARK CJ, AN JM, HAM BK, LEE BJ, PAEK KH. CaAlaAT1 catalyzes the alanine : 2-oxoglutarate aminotransferase reaction during the resistance response against Tobacco mosaic virus in hot pepper. *Planta* 2005; **221**: 857–867.
- [13] LIEPMAN AH, OLSEN LJ. Alanine aminotransferase homologs catalyse the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003; **131**: 215–227.
- [14] LIEPMAN AH, OLSEN LJ. Genomic analysis of aminotransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Crit Rev Plant Sci* 2004; **23**: 73–89.
- [15] MATTHEWS CC, ZIELKE HR, PARKS DA, FISHMAN PS. Glutamate-pyruvate transaminase protects against glutamate toxicity in hippocampal slices. *Brain Res* 2003 **978**: 59–64.
- [16] MIYASHITA Y, DOLFERUS R, ISMIND KP, GOOD AG. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2007; **49**: 1108–1121.
- [17] MUENCH D, CHRISTOPHER ME, GOOD AG. Cloning and expression of a hypoxic and nitrogen inducible maize alanine aminotransferase gene. *Physiol Plant* 1998; **103**: 503–512.
- [18] MUENCH D, GOOD AG. Hypoxically inducible barley alanine aminotransferase : cDNA cloning and expression analysis. *Plant Mol Biol* 1994; **24**: 417–427.
- [19] NATHWANI RA, PAIS S, REYNOLDS TB, KAPLOWITZ N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* 2005; **41**: 380–382.
- [20] NOGUCHI T, FUJIWARA S. Development of glutamate:glyoxylate aminotransferase in the cotyledons of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Biochem J* 1982; **201**: 209–214.
- [21] ORZECZOWSKI S, SOCHA-HANC J, PASZKOWSKI A. Purification and properties of alanine aminotransferase from maize (*Zea mays* L.) leaves. *Acta Physiol Plant* 1999; **21**: 323–330.
- [22] OTTER T, PENTHER JM, MOHR H. Control of the appearance of alanine aminotransferase in the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedling. *Planta* 1992; **188**: 376–383.
- [23] PASZKOWSKI A, NIEDZIELSKA A. Glutamate:glyoxylate aminotransferase from the seedlings of rye (*Secale cereale* L.). *Acta Biochim Polon* 1989; **36**: 17–29.
- [24] REGGIANI R, NEBULONI M, MATTANA M, BRAMBILLA I. Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. *Amino Acids* 2000; **18**(3): 207–217.
- [25] REUMANN S. The structural properties of plant peroxisomes and their metabolic significance. *Biol Chem* 2000; **381**: 639–648.
- [26] RICOULT C, CLIQUET JB, LIAMMI AM. Stimulation of alanine aminotransferase (AlaAT) gene expression and alanine accumulation in embryo axis of the model legume *Medicago truncatula* contribute to anoxia stress tolerance. *Physiol Plant* 2005; **123**: 30–39.
- [27] RICOULT C, ECHEVERRIA LO, CLIQUET JB, LIAMMI AM. Characterisation of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 2006; **57**(12): 3079–3089.
- [28] ROCHA M, SODEK L, LICAUSI F, HAMEED MW, DORNELAS MC, van DONGEN JT. Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. *Amino Acids* 2010; **39**: 1043–1053.
- [29] ROCHA M, LICAUSI F, ARAÚJO WL, NUNES-NESE A, SODEK L, FERNIE A, van DONGEN JT. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 2010; **152**: 1501–1513.
- [30] SHRAWAT AK, CARROLL RT, DePAUW M, TAYLOR GJ, GOOD AG. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotech J* 2008, **6**: 722–732.
- [31] SON D, SUGIYAMA T. Molecular cloning of an alanine aminotransferase from NAD-malic enzyme type C<sub>4</sub> plant *Panicum miliaceum*. *Plant Mol Biol* 1992; **20**: 705–713.
- [32] SON D, JO J, SUGIYAMA T. Purification and characterization of alanine aminotransferase from *Panicum miliaceum* leaves. *Arch Biochem Biophys* 1991; **289**: 262–266.
- [33] SON D, KOBE A, SUGIYAMA T. Nitrogen dependent regulation of the gene for alanine aminotransferase which is involved in the C<sub>4</sub> pathway of *Panicum miliaceum*. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**(4): 507–509.

- [34] SUBBAIAH C, SACHS M. Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. *Ann Bot* 2003; **90**: 119–127.
- [35] TRUSZKIEWICZ W, PASZKOWSKI A. Serine:glyoxylate aminotransferases from maize and wheat leaves: purification and properties. *Photosynth Res* 2004; **87**: 35–47.
- [36] VERSLUES PE, KIM Y-S, ZHU J-K. Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Mol Biol* 2007; **64**: 205–217.
- [37] WINGLER A, LEA PJ, QUICK WP, LEEGOOD RC. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Phil Trans R Soc Lond B* 2000; **355**: 1517–1529.
- [38] WIŚNIEWSKI P, SZKLARCZYK J, MACIĄGAM, PASZKOWSKIA. L-Alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase isoenzymes from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Acta Physiol Plant* 2006; **28**(6): 577–588.

*Redaktor prowadzący – Janusz Maszewski*

*Otrzymano: 28.03. 2011 r.*

*Przyjęto: 05.05. 2011 r.*

*Barbara Zagdańska*

*Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, SGGW*

*Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa*

*e-mail: barbara\_zagdanska@sggw.pl*