

## Isoenzyme der Aspartat-Aminotransferase aus dem Endosperm von keimenden Rizinussamen

Von

G. Nahler und H. Ruis

Aus dem Institut für Allgemeine Biochemie der Universität Wien und der Ludwig-Boltzmann-Forschungsstelle für Biochemie, Wien, Österreich

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 13. Juli 1973)

### *Isoenzymes of Aspartate Aminotransferase from the Endosperm of Germinating Castor Beans*

The amino acid specificity of the aminotransferase activities of glyoxysomes, mitochondria and of the soluble fraction from the endosperm of germinating castor beans was tested with  $\alpha$ -ketoglutarate as amino acceptor. Glyoxysomes exhibit aspartate aminotransferase (E.C. 2.6.1.1) together with comparatively high asparagine (E.C. 2.6.1.14) and glutamine aminotransferase (E.C. 2.6.1.15) activities. Mitochondria and the soluble fraction contain alanine aminotransferase (E.C. 2.1.2) activity in addition to the glyoxysomal aminotransferases. Asparagine and glutamine aminotransferase activities are much lower in the soluble fraction than in the organelles. A number of isoenzymes of aspartate aminotransferase of mitochondria and glyoxysomes could be separated with the aid of polyacrylamide gel electrophoresis.

Bei der Charakterisierung von Glyoxysomen aus Rizinusendosperm ist gezeigt worden<sup>1</sup>, daß diese Zellorganellen, ebenso wie die Mitochondrien aus demselben Gewebe, eine relativ hohe Aspartat-Aminotransferase-Aktivität aufweisen. Diese Tatsache ist aus mehreren Gründen interessant. Aminotransferasen gehören zu den charakteristischen Enzymen pflanzlicher Peroxisomen; vor allem in Blattperoxisomen wurden mehrere Transaminasen nachgewiesen<sup>2, 3, 4</sup>. Während aber das Vorkommen von Aminotransferasen in Blattperoxisomen zumindest zum Teil durch deren Funktion im Glycolatweg erklärt wird<sup>5</sup>, ist die Bedeutung der glyoxysomalen Aspartat-Aminotransferase noch unbekannt.

Für die Funktion dieses Enzyms bieten sich zwei relativ naheliegende Erklärungsmöglichkeiten an:

1. Es kann, zusammen mit dem mitochondrialen Enzym der gleichen Spezifität, als Komponente eines Transportsystems angesehen werden, mit dessen Hilfe Reduktionsäquivalente aus den Glyoxysomen in die Mitochondrien gebracht werden. Es ist bekannt, daß Glyoxysomen, zumindest *in vitro*, nicht imstande sind, das im Rahmen der Fettsäure- $\beta$ -Oxidation und des Glyoxylatzyklus gebildete NADH zu reoxidieren<sup>6, 7</sup>. Neben einer Verwertung des reduzierten Coenzym beim Aufbau von Zuckern müßte dieses wahrscheinlich zum Teil in den Mitochondrien reoxidiert werden. Zu diesem Zweck wäre allerdings ein eigenes Transportsystem vielleicht nicht unbedingt erforderlich, da die Glyoxysomenmembran möglicherweise für NADH durchlässig ist und pflanzliche Mitochondrien extramitochondriales NADH direkt oxidieren können.

2. In einer Reihe von Arbeiten<sup>8, 9, 10</sup> ist die Beteiligung von Glyoxysomen am Stoffwechsel verschiedener Aminosäuren gezeigt worden. Es ist möglich, daß auch Aminotransferasen an solchen in diesen Zellorganellen ablaufenden Reaktionen von Aminosäuren beteiligt sind. Zu diesem Zweck wären entweder mehrere verschiedene Aminotransferasen oder ein Enzym mit relativ breiter Substratspezifität notwendig. Solche Enzyme aus keimenden Pflanzensamen sind mehrfach beschrieben worden<sup>11, 12, 13</sup>.

Es war der Zweck der vorliegenden Arbeit, die Aminotransferase-Aktivitäten der Glyoxysomen und anderer Zellfraktionen aus Rizinusendosperm näher zu charakterisieren und damit nach Möglichkeit weitere Aufschlüsse über die Funktion dieser Enzyme in keimenden Samen zu erhalten.

#### Materialien und Methoden

*Isolierung der subzellulären Fraktionen:* Mitochondrien und Glyoxysomen aus dem Endosperm von keimenden Rizinussamen wurden nach früher beschriebenen Methoden<sup>8, 14</sup> mit Hilfe von Saccharosegradienten entweder in einem Ausschwingrotor (Beckman SW 25.1) oder in einem Zonalrotor (Beckman Ti 14) in einer Beckman L 2-65B Ultrazentrifuge isoliert. Außerdem wurde auch die bei der Isolierung der Zellorganellen erhaltene 10 000-g-Überstandsfraction auf Aminotransferase-Aktivitäten untersucht. Im folgenden Text wird dieses Material vereinfacht als „lösliche Fraktion“ bezeichnet, obwohl sie neben löslichen Proteinen auch mikrosomale Bestandteile enthält.

#### Aktivitätsmessungen

Die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase wurde entweder spektralphotometrisch oder auf radiochemischem Weg bestimmt. Enzymaktivitäten werden als  $\mu$ Mol umgesetzttes Substrat oder gebildetes Produkt pro Minute (*U*) angegeben.

*Spektralphotometrischer Test:* Die Inkubationslösungen (3 ml) enthielten  $10^{-1}$ M-Tricinpuffer (pH 7,5),  $3 \times 10^{-3}$ M-L-Glutaminsäure,  $3 \times 10^{-3}$ M-Oxal-

essigsäure (oder, bei einzelnen Spezifitätsbestimmungen, eine andere Keto-säure),  $8 \times 10^{-3} \text{M-MgCl}_2$ ,  $3 \times 10^{-3} \text{M-NH}_4\text{Cl}$ ,  $1,1 \times 10^{-4} \text{M-NADPH}$ , 9 U Glutamatdehydrogenase, 0,01% Triton X-100, und die zu untersuchende Enzym-lösung. Die Aktivität wurde durch Messung der Extinktionsabnahme bei 340 nm bestimmt.

*Radiochemischer Test:* 2,1 ml Inkubationslösung, bestehend aus  $2 \times 10^{-2} \text{M-Phosphatpuffer}$  (pH 7,5),  $3,9 \times 10^{-3} \text{M-L-Asparaginsäure}$  (oder eine andere L-Aminosäure),  $3,3 \times 10^{-3} \text{M-1-}^{14}\text{C-}\alpha\text{-Ketoglutarsäure}$  (0,014  $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ ),  $1,4 \times 10^{-4} \text{M-Pyridoxalphosphat}$ ,  $8 \times 10^{-3} \text{M-MgCl}_2$ , 0,01% Triton X-100 und Enzym, wurden in einem 25-ml-Erlenmeyerkolben 30 Min. geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml konz. HCl abgestoppt und anschließend 10proz. NaOH bis zum beginnenden Umschlag von Methylrot zugegeben. Die Kolben wurden nun mit einem Gummiseptum verschlossen, an dem ein Plastikschälchen befestigt war, das ein Stück Filterpapier enthielt („Reaction Flask“ der Kontes Glass Co., Vineland, N. J.). Durch das Gummiseptum wurden 0,2 ml L-Glutamatdecarboxylase-Lösung (2 U, Escherichia coli; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) in 0,2M-Acetatpuffer (pH 5,0) injiziert, und die Inkubationsmischung wurde nun weitere 30 Min. geschüttelt. 10 Min. vor Beendigung der Inkubation wurden 0,4 ml Hyaminhydroxidlösung (1M- in Methanol) in das Plastikschälchen injiziert. Die Reaktion wurde durch Injektion von 1 ml 20proz. Trichloressigsäure in die Inkubationslösung abgestoppt; durch weiteres Schütteln für 15 Min. wurde das gebildete  $^{14}\text{CO}_2$  aus der Lösung vertrieben und mit Hilfe der Hyaminhydroxidlösung absorbiert. Das Plastikschälchen samt Inhalt wurde in 15 ml Toluolszintillator im Szintillationszähler ausgezählt.

#### *Elektrophoretische Untersuchungen*

*Herstellung der Enzymfraktionen:* Der 10 000 g-Überstand der differentiellen Zentrifugation wurde bei den elektrophoretischen Trennungen ohne weitere Vorbehandlung untersucht. Mitochondrien- und Glyoxysomenfraktionen wurden nach der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation 5 Min. mit Hilfe einer MSE Ultrasonic Power Unit aufgebrochen und anschließend 30 Min. bei 100 000g zentrifugiert. Die Überstände dieser Zentrifugation wurden mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf ihren Gehalt an Isoenzymen untersucht.

*Elektrophoresen:* Die Polyacrylamidgel-Elektrophoresen wurden mit 7,5proz. Trenngelen (Gelpuffer Tris-HCl, pH 8,9, Elektrodenpuffer Tris-Glycin, pH 8,3, 3proz. Sammelgel<sup>15</sup> durchgeführt. Die Trenngele wurden mit Hilfe von Ammoniumpersulfat polymerisiert, die Sammelgele mit Riboflavin durch Belichtung. Überschüssiges Ammoniumpersulfat wurde durch Vorelektrophorese (Gelpuffer als Elektrodenpuffer) entfernt.

*Spezifischer Nachweis der Aminotransferase-Aktivität auf den Elektrophorese-Gelen:* Der Nachweis von Aspartat-Aminotransferase wurde mit Hilfe von 6-Benzamido-4-methoxy-m-toluidin-diazoniumchlorid (Fast Violet B) durchgeführt, welches relativ spezifisch mit Oxalacetat reagiert<sup>16, 17</sup>. Die Anfärbung der Gele wurde nach *Rehfeld* und *Tolbert*<sup>4</sup> ausgeführt.

#### Ergebnisse und Diskussion

Die beiden in der Einleitung diskutierten Möglichkeiten für eine Stoffwechselfunktion der glyoxysomalen Aminotransferase sollten sich durch eine Untersuchung der Aminosäurespezifität des Systems unter-

scheiden lassen. Während aus Arbeiten mit anderen Organismen bekannt ist, daß am Transport von Reduktionsäquivalenten vom Cytoplasma in die Mitochondrien spezifische Aspartat-Aminotransferasen beteiligt sind, sollte bei einer Funktion der Aminotransferase im katabolischen oder anabolischen Stoffwechsel von Aminosäuren eine breitere Substratspezifität zu erwarten sein.

Tabelle 1. *Aminosäurespezifität der Aminotransferasen mit  $\alpha$ -Ketoglutarat als Aminogruppenakzeptor*

Aminosäure	Aktivität (mU/ml Enzym) in		
	Glyoxysomen	Mitochondrien	Überstand
Glycin	0,1	0,1	0,1
Alanin	6,2	25,4	56,7
Valin	0,3	0,0	0,1
Leucin	1,1	0,6	0,4
Isoleucin	0,4	0,2	0,4
Serin	0,1	0,0	0,2
Threonin	0,1	0,0	0,1
Cystein	0,4	1,8	2,1
Cystin	1,9	0,9	0,8
Methionin	0,1	0,4	1,3
Prolin	0,1	0,1	0,5
Phenylalanin	0,2	0,5	0,4
Tyrosin	1,0	0,4	1,0
Tryptophan	0,9	0,9	1,0
Asparaginsäure	113,3	85,0	56,9
Asparagin	22,7	39,3	7,0
Glutaminsäure	194,2	139,9	90,8
Glutamin	26,9	27,1	1,0
Lysin	0,1	0,2	0,2
Arginin	0,1	0,3	0,2
Histidin	0,0	0,2	0,4

Die Spezifität des Systems wurde mit  $\alpha$ -Ketoglutarat als Aminogruppenakzeptor und mit den verschiedenen Proteinamino-säuren als  $\text{NH}_2$ -Donoren untersucht. Zu Vergleichszwecken wurden analoge Versuche mit den Mitochondrien und mit der löslichen Fraktion ausgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tab. 1 zusammengefaßt. In der Glyoxysomenfraktion konnte, ebenso wie in den Mitochondrien und in der löslichen Fraktion, neben der Umsetzung von Asparaginsäure eine sehr hohe Austauschaktivität mit Glutaminsäure nachgewiesen werden. Eine derartige Aktivität ist auch von anderen Aspartat-Aminotransferasen bekannt<sup>18</sup>. Auffällig sind bei der sonst hohen Spezifität des Systems die starken Umsetzungen von Asparagin und Glutamin in den Glyoxysomen-

und Mitochondrienfraktionen. Für diese Beobachtung bieten sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten an:

1. Die Umsetzungen könnten durch eine Aspartat-Aminotransferase katalysiert werden, die zwischen den freien Säuren Asparaginsäure und Glutaminsäure einerseits und den entsprechenden Amiden andererseits nur unvollkommen unterscheiden kann.

2. Die Organellen enthalten neben einer Aspartat-Aminotransferase auch Asparagin- und Glutamin-Aminotransferasen.

3. Die Organellen enthalten Asparaginase- und Glutaminase-Aktivität.

Beim derzeitigen Stand der Arbeiten kann keine dieser Möglichkeiten mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Erklärung 3 erscheint aber recht unwahrscheinlich. Der Vergleich der Spezifitäten zeigt, daß Asparagin und Glutamin gute Substrate des glyoxysomalen und des mitochondrialen Aminotransferasesystems sind, während sie in der löslichen Fraktion kaum bzw. nicht umgesetzt werden. Asparaginase oder Glutaminase würde man aber am ehesten in der löslichen Fraktion und kaum in den beiden Organellenfraktionen vermuten.

Die Mitochondrien und die lösliche Fraktion unterscheiden sich außerdem von den Glyoxysomen durch eine ziemlich hohe Alanin-Aminotransferase-Aktivität, wobei in der löslichen Fraktion Alanin so rasch wie Asparaginsäure transaminiert wird. Auch hier kann aus den Resultaten noch nicht geschlossen werden, ob diese Aktivität durch die unterschiedliche Spezifität verschiedener Aspartat-Aminotransferasen in den einzelnen Fraktionen zu erklären ist oder durch die Existenz einer eigenen Alanin-Aminotransferase in Rizinusendosperm, die in Glyoxysomen nicht oder nur mit geringer Aktivität, in den Mitochondrien und in der löslichen Fraktion hingegen in relativ großer Menge vorhanden ist.

Die Reversibilität der Aspartat- und der Alanin-Aminotransferase konnte für die untersuchten Fraktionen mit Hilfe des im Methodenteil beschriebenen spektralphotometrischen Tests nachgewiesen werden. Neben Oxalessigsäure und Brenztraubensäure wurden noch einige weitere Ketosäuren auf ihre Eignung als Aminogruppenakzeptor geprüft, wobei nur negative Resultate erhalten wurden. Hier soll nur darauf hingewiesen werden, daß mit dem Substratpaar Glutaminsäure—Glyoxylsäure, ebenso wie mit dem radiochemisch getesteten Paar  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure—Glycin, keine Aminotransferase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die in Blattperoxisomen vorhandene Glutaminsäure—Glyoxylsäure-Aminotransferase, die in diesen Organellen an der Bildung von Glycin aus Glyoxylsäure beteiligt ist, ist also in Glyoxysomen nicht nachweisbar.

Aus den geringen Unterschieden in der Spezifität der glyoxysomalen und der mitochondrialen Aminotransferasen ergibt sich die Frage, ob in

den beiden Zellorganellen identische Enzymmoleküle oder verschiedene Isoenzyme vorliegen. Aus der Literatur sind mehrere Fälle bekannt, in denen Peroxisomen und Mitochondrien verschiedenartige Isoenzyme enthalten. Besonders im Fall der Malatdehydrogenase wurde dieses Phänomen relativ genau untersucht<sup>19, 20, 21</sup>. *Rehfeld* und *Tolbert* konnten zeigen, daß Peroxisomen von Spinatblättern ein in Mitochondrien und Chloroplasten nicht nachweisbares Isoenzym der Aspartat-Aminotransferase enthalten<sup>4</sup>.

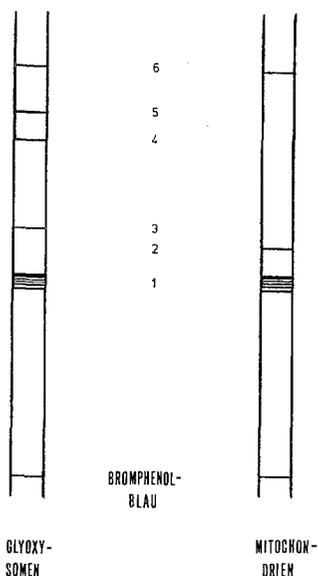


Abb. 1. Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Glyoxysomen- und Mitochondrien-Aspartat-Aminotransferase

In einem Versuch, verschiedene Isoenzyme der Aspartat-Aminotransferase auch in Zellorganellen des Rizinusendosperms nachzuweisen, wurden die zu untersuchenden Enzyme aus Glyoxysomen und Mitochondrien durch Ultraschallbehandlung in Lösung gebracht und anschließend mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese untersucht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Aktivität des Enzyms durch spezifisches Anfärben der Gele nachgewiesen. Neben den reinen Organellenfraktionen wurden zur Kontrolle auch Mischungen der Fraktionen mit Hilfe der Elektrophorese aufgetrennt. Die Ergebnisse dieser Versuche werden durch Abb. 1 illustriert. Sowohl Glyoxysomen als auch Mitochondrien weisen ein kompliziertes Isoenzymmuster auf, dessen Hauptbanden in der Abbildung wiedergegeben werden. Eine Reihe von schwächeren Banden, die zum Teil nur gelegentlich nach-

gewiesen werden konnten, wurden nicht abgebildet. Die in Glyoxysomen und Mitochondrien auftretende Nummer 1 der nach sinkender elektrophoretischer Beweglichkeit nummerierten Hauptbanden ist nicht als einzelne Enzymbande zu betrachten. Es handelt sich dabei in Wirklichkeit um etwa fünf nicht vollständig auflösbare Einzelbanden mit sehr ähnlicher Wanderungsgeschwindigkeit. Isoenzym 2 ist nur in Mitochondrien nachweisbar, die Banden 3, 4 und 5 sind charakteristisch für Glyoxysomen. Sie wurden gelegentlich mit wechselnder Intensität auch in Mitochondrienfraktionen gefunden, was aber mit größter Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen ist, daß Mitochondrienfraktionen aus Rizinusendosperm auch nach Dichtegradientenzentrifugation oft durch beschädigte Glyoxysomen verunreinigt sind<sup>22</sup>. Isoenzym 6 scheint wieder beiden Organellen gemeinsam zu sein, wobei hier allerdings die Möglichkeit nicht ganz ausgeschlossen werden konnte, daß in Glyoxysomen und Mitochondrien in Wirklichkeit zwei verschiedene, aber fast gleich schnell wandernde Isoenzyme vorliegen.

Aus der Intensität der Anfärbung der Banden läßt sich abschätzen, daß in beiden untersuchten Fraktionen die Aktivität der Bandengruppe 1 überwiegt. Es ist daher anzunehmen, daß diese Banden auch im kinetischen Verhalten der Enzymaktivitäten in Mitochondrien und Glyoxysomen dominieren. Das in Zellorganellen aus Rizinusendosperm nachgewiesene Isoenzymmuster ist wesentlich komplizierter als das bei analogen Untersuchungen mit Peroxisomen, Mitochondrien und Chloroplasten aus Spinatblättern erhaltene Spektrum<sup>4</sup>.

Elektrophoreseversuche mit der löslichen Fraktion konnten nicht eindeutig klären, ob in Rizinusendosperm eine spezifisch cytoplasmatische Aspartat-Aminotransferase existiert, oder ob die Enzymaktivität dieser Fraktion nur auf eine teilweise Solubilisierung mitochondrialer und vor allem glyoxysomaler Isoenzyme während der Isolierung der Zellorganellen zurückzuführen ist.

Das gleichzeitige Vorkommen von wahrscheinlich identischen Isoenzymen der Aspartat-Aminotransferase in Glyoxysomen und Mitochondrien läßt einen gemeinsamen Synthesort und eine gemeinsame Regulation der Synthese dieser in verschiedenen Zellorganellen nachgewiesenen Enzyme vermuten. Dies macht auch eine gleichartige oder gemeinsame Funktion der mitochondrialen und glyoxysomalen Enzyme wahrscheinlich. Diese Überlegung und die Resultate der Spezifitätsuntersuchungen scheinen eine Funktion der glyoxysomalen Aminotransferase im Stoffwechsel verschiedener Aminosäuren weitgehend auszuschließen, obwohl die Bedeutung der in den Organellen nachgewiesenen Asparagin- und Glutamin-Aminotransferasen für den Stoffwechsel dieser Verbindungen noch schwer abzuschätzen ist. Insgesamt erscheint jedoch auf Grund der erhaltenen Ergebnisse die Hypothese wahr-

scheinlicher, daß die Aspartat-Aminotransferasen der Glyoxysomen und Mitochondrien gemeinsam an einem System zur Regenerierung der oxidierten Form des glyoxysomalen Nicotinamidadenindinucleotids beteiligt sind. Völlig unbekannt ist beim derzeitigen Stand unseres Wissens, ob sich die in den Organellen nachgewiesenen verschiedenartigen Isoenzyme vielleicht doch zum Teil auch in ihren Stoffwechselfunktionen unterscheiden.

Die vorliegende Arbeit wurde durch den Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien, in dankenswerter Weise unterstützt. Herrn Professor Dr. O. Hoffmann-Ostenhof danken wir für hilfreiche Diskussionen.

### Literatur

- <sup>1</sup> T. G. Cooper und H. Beevers, J. Biol. Chem. **244**, 3507 (1969).
- <sup>2</sup> T. Kasaki und N. E. Tolbert, Plant Physiol. **44**, 242 (1969).
- <sup>3</sup> R. K. Yamazaki und N. E. Tolbert, J. Biol. Chem. **245**, 5137 (1970).
- <sup>4</sup> D. W. Rehfeld und N. E. Tolbert, J. Biol. Chem. **247**, 4803 (1972).
- <sup>5</sup> N. E. Tolbert, Ann. Rev. Plant Physiol. **22**, 45 (1971).
- <sup>6</sup> T. G. Cooper und H. Beevers, J. Biol. Chem. **244**, 3514 (1969).
- <sup>7</sup> J. M. Lord und H. Beevers, Plant Physiol. **49**, 249 (1972).
- <sup>8</sup> H. Ruis und H. Kindl, Z. Physiol. Chem. **351**, 1425 (1970).
- <sup>9</sup> H. Kindl und H. Ruis, Phytochem. **10**, 2633 (1971).
- <sup>10</sup> H. Kindl und H. Ruis, Z. Naturforsch. **26 b**, 1379 (1971).
- <sup>11</sup> D. G. Wilson, K. W. King und R. H. Burris, J. Biol. Chem. **208**, 863 (1954).
- <sup>12</sup> T. A. Truelsen, Physiol. Plant. **26**, 289 (1972).
- <sup>13</sup> J. C. Forest und F. Wightman, Canad. J. Biochem. **50**, 813 (1972).
- <sup>14</sup> C. Bieglmayer, J. Graf und H. Ruis, Europ. J. Biochem. (im Druck).
- <sup>15</sup> H. R. Maurer, Disc-Elektrophorese, S. 42. Berlin: Walter de Gruyter, 1968.
- <sup>16</sup> A. L. Babson, P. O. Shapiro, P. A. R. Williams und G. E. Phillips, Clin. Chim. Acta **7**, 199 (1962).
- <sup>17</sup> J. L. Brubaker, M. D. Upadhyya, Y. Makinen und T. MacDonald, Physiol. Plant. **21**, 930 (1968).
- <sup>18</sup> I. Trautschold und E. Wehrle, in: Hoppe-Seyler, Thierfelder, Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse, Bd. 6 B, S. 306. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1966.
- <sup>19</sup> R. K. Yamazaki und N. E. Tolbert, Biochim. Biophys. Acta **178**, 11 (1969).
- <sup>20</sup> V. Rocha und I. P. Ting, Arch. Biochem. Biophys. **140**, 398 (1970).
- <sup>21</sup> V. Rocha und I. P. Ting, Plant Physiol. **46**, 754 (1971).
- <sup>22</sup> B. Gerhardt und H. Beevers, J. Cell Biol. **44**, 94 (1970).