

## L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa de embrión de maíz con propiedades cinéticas complejas para L-alanina

M. Martín, I. García de la Banda y B. Sabater

Cátedra de Fisiología Vegetal  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense  
Madrid

(Recibido el 24 de octubre de 1975)

M. MARTIN, I. GARCIA DE LA BANDA and B. SABATER. *L-Alanine:2-Ketoglutarate Aminotransferase from Maize Embryo With Complex Kinetic Properties for L-Alanine*. Rev. esp. Fisiol., 32, 131-136. 1976.

The activity of L-Alanine:2-oxoglutarate aminotransferase (E.C. 2.6.1.2) has been studied in maize (*Zea mays*) embryo. Crude extracts were fractionated with ammonium sulfate to obtain low activity preparations of other aminotransferases present in crude extracts.

The enzyme shows normal hyperbolic saturation curves for the substrates: Pyruvate ( $K_m$  1 mM), 2-oxoglutarate ( $K_m$  0.4 mM) and L-Glutamate ( $K_m$  0.07 mM). However, it shows complex kinetics properties for the substrate L-Alanine, giving sigmoid saturation curves for L-Alanine at low but not at high fixed 2-oxoglutarate concentrations. These last results point to a regulation of the of L-Alanine degradation, which takes place during the germination of maize.

Together with L-Glutamate and L-Alanine, the enzyme only seems to use L-Serine and L-Cysteine and their cetoacids.

Del examen de la composición de aminoácidos de las proteínas del embrión y del endospermo de las semillas de maíz, FOLKES y YEMM (3) concluyeron que glutamato, glutamina, asparagina y prolina de proteínas del endospermo, eran fuentes importantes de nitrógeno para la síntesis de nuevos aminoácidos de proteína de embrión. DUPUY *et al.* (2) observaron durante la germinación del maíz un incremento en la cantidad total de aspartato,

glicina y lisina y una disminución de glutamato, prolina, leucina y alanina.

Resultados semejantes encontraron SODEK y WILSON (8), que además demostraron, durante la formación de la semilla, una conversión de lisina en glutamato.

Parece lógico suponer que la síntesis de nuevos aminoácidos, así como la degradación de los que se encuentran en exceso en el endospermo, tiene lugar en el embrión, donde ambas, síntesis y degrada-

ción, han de regularse para poder dar la composición de aminoácidos propia de las proteínas de embrión.

Se conoce muy poco del control enzimático de la síntesis y degradación de aminoácidos en el embrión durante la germinación, un problema sin duda relevante en el control de la germinación y en la regulación enzimática en general.

Nosotros nos hemos centrado en el estudio de algunas de las propiedades cinéticas y especificidad de la actividad L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa (C.E. 2.6.1.2), que se han identificado en embrión de maíz.

Como ya se ha dicho, la alanina es un aminoácido cuya cantidad total disminuye a lo largo de la germinación. En principio la alanina puede ser degradada bien por la acción de la L-alanina deshidrogenasa (C.E. 1.4.1.1.) o por acción de alguna transaminasa, en ambos casos formando piruvato. No se conoce en plantas superiores la existencia de la actividad L-alanina deshidrogenasa frecuentemente identificada en bacterias (6) y en estudios realizados en nuestro laboratorio tampoco se ha conseguido detectar esta actividad en embrión de maíz. Parece, pues, lógico pensar que la degradación de la alanina durante la germinación ocurra vía transaminación.

### Material y métodos

Los trabajos que se presentan se realizaron en semillas de maíz (*Zea mays*) «raza Basto» (5), mantenidas sobre agua durante cinco días.

Los sustratos, enzimas auxiliares y coenzimas utilizados para la medida de la actividad enzimática procedían de la casa Sigma. El resto de los compuestos procedían de casas comerciales conocidas y eran químicamente puros.

Los embriones de las semillas embebidas en agua se separaban del endospermo con una cuchilla y previo machacado se

desengrasaban con éter de petróleo. A continuación, se suspendían en tres volúmenes del siguiente medio de extracción: tampón fosfato potásico pH 7,50 mM; EDTA 1 mM y mercaptoetanol 5 mM; se sometía a la acción de ultrasonidos durante 1 minuto en un sonicador MSE a amplitud 8. La preparación se centrifugaba a  $3.000 \times g$  durante 30 minutos. Todas estas operaciones se realizaron a 4° C. El sobrenadante así obtenido constituía el extracto crudo.

Para medir la actividad L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa se utilizaron dos métodos de acoplamiento a oxidación de piridin nucleótidos que se sigue espectrofotométricamente a  $340 \mu\mu$ , en un caso midiendo la actividad en el sentido de formación de 2-cetoglutarato acoplado a L-glutamato deshidrogenasa (C.E. 1.4.1.2), en un sistema de ensayo que, para un volumen final de 3 ml, contiene (en  $\mu$ moles): Tris-ClH pH 8, 150;  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , 150; piruvato potásico, 20; L-glutamato potásico, 40; NADH, 0,30; piridoxal fosfato, 0,20; 3 unidades de L-glutamato deshidrogenasa y cantidades adecuadas de la preparación enzimática. En otros casos se mide en el sentido de formación de piruvato acoplado a lactato deshidrogenasa (C.E. 1.1.1.27) (1), en un sistema de ensayo que para un volumen final de 3 ml contiene (en  $\mu$ moles): Tris-ClH pH 8, 150; L-alanina, 20; 2-cetoglutarato potásico, 40; NADH, 0,30; piridoxal fosfato, 0,20; 3 unidades de lactato deshidrogenasa y cantidades apropiadas de preparación enzimática. Los sustratos de la reacción se neutralizaban previamente y la reacción se realizaba a temperatura ambiente (aproximadamente 20 grados centígrados).

Se define la unidad de actividad enzimática como aquella que transforma 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto. La actividad específica se refiere a mg de proteína. Las proteínas se determinaron por el método de LOWRY *et al.* (4).

## Resultados

En extractos crudos de embriones de maíz que habitualmente contienen 5 mg de proteínas/ml se encuentra una actividad L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa que presenta unas velocidades en los sentidos de formación de L-glutamato y L-alanina, respectivamente, de 0,005 y 0,006 unidades por mg de proteína en las condiciones de ensayo.

La medida de la actividad es dependiente de la presencia en el sistema de ensayo de cada uno de los sustratos y enzimas auxiliares, pero no del piridoxal fosfato, probablemente debido a que éste ya se encuentra fuertemente unido al enzima en el extracto crudo.

La actividad de los extractos medida en ambos sentidos se pierde totalmente por tratamiento de éstos a 60° C durante 5 minutos. Tratamientos de los extractos entre 40 y 60° C durante 5 minutos ocasionan una pérdida parcial de las actividades.

La actividad enzimática muestra una velocidad máxima a un pH entre 7 y 9,

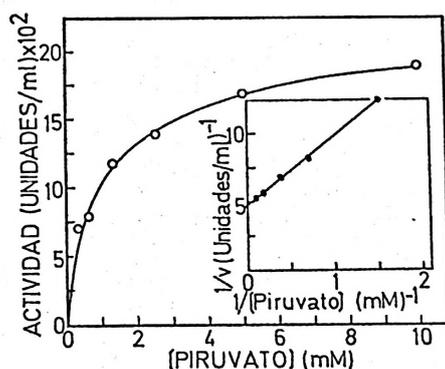


Fig. 1. Efecto de la concentración de piruvato sobre la actividad enzimática.

La medida de la actividad se realizó con la fracción parcialmente purificada, en el sentido de formación de alanina, según se indica en Materiales y Métodos, excepto que la concentración de piruvato se varió tal como se indica en la gráfica. Se representan en directos y dobles recíprocos.

medida en la dirección de formación de L-glutamato y de 8,5 a 10 en la de formación de L-alanina.

*Fraccionamiento con sulfato amónico.* Al objeto de disponer de una preparación de L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa con mayor pureza se intentó un fraccionamiento de la actividad con sulfato amónico. Ensayos preliminares mostraron que la mayor parte de la actividad precipitaba cuando se añadía 1,4 volúmenes de una solución saturada de sulfato amónico y neutralizada por volumen de extracto; en cambio, no se precipitaba prácticamente actividad L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa cuando se añadía 0,8 volúmenes de solución de sulfato amónico por volumen de extracto.

La actividad precipitada y centrifugada durante 30 minutos a 3.000 × g se puede resuspender casi totalmente en medio de extracción.

En los ensayos habituales se fraccionaba el extracto con solución saturada de sulfato amónico recogiendo la fracción de entre 0,8 y 1,4 volúmenes de ésta. La preparación resultante se purifica unas 10 veces respecto al extracto crudo con una recuperación del 60 %.

Esta fracción purificada muestra una relación de actividades L-aspartato:2-cetoglutarato aminotransferasa a L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa de 1,4, mientras que en el extracto crudo esta relación es 11. Como se explica en el apartado de especificidad, ambas actividades de la fracción purificada son debidas a enzimas distintos.

Esta fracción parcialmente purificada no pierde sensiblemente actividad al cabo de una semana mantenida a -15° C.

*Propiedades cinéticas.* Una representación en directos e inversos de la velocidad de la actividad enzimática a distintas concentraciones de piruvato (fig. 1), muestra una curva de saturación hiperbólica de la que puede estimarse una  $K_m$  de 1 mM.

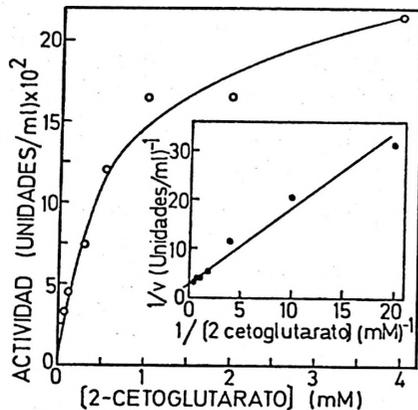


Fig. 2. Efecto de la concentración de 2-cetoglutarato sobre la actividad enzimática. La medida de la actividad se realizó con la fracción parcialmente purificada, en el sentido de la formación de glutamato, según se indica en Materiales y Métodos, excepto que la concentración de 2-cetoglutarato se varió tal como se indica en la gráfica. Se representa en directos y dobles recíprocos.

En la representación de directos e inversos de la velocidad de la actividad enzimática a distintas concentraciones de 2-cetoglutarato (fig. 2), el enzima muestra una curva de saturación hiperbólica de la que se calcula una  $K_m$  de 0,4 mM.

En la figura 3 se muestra una representación en directos e inversos de la velocidad de la actividad enzimática a distintas concentraciones de L-glutamato, cuya curva de saturación es hiperbólica y se puede estimar una  $K_m$  de 0,07 mM.

La representación de las curvas de velocidad de actividad enzimática en función de la concentración de alanina en distintas condiciones de ensayo (fig. 4) incluyen el uso de extracto crudo, fracción purificada y distintas concentraciones de 2-cetoglutarato. La actividad enzimática del extracto crudo a concentración de 2-cetoglutarato de 13,3 mM, muestra una curva de saturación para alanina ligera, pero sensiblemente sigmoide. En la fracción purificada no se aprecia sigmoicidad

para esa misma concentración; en cambio, es muy acusada para concentraciones de 6,7 y 0,3 mM. Esta aparición de la sigmoicidad a bajas concentraciones de 2-cetoglutarato es paulatina y consistente a concentraciones intermedias no representadas en la figura.

**Especificidad de sustrato.** El 2-cetoisovalerato a concentración final de 3,3 mM no muestra actividad ni como sustrato, sustituyendo al 2-cetoglutarato, ni como inhibidor de la actividad enzimática cuando ésta se mide en la dirección de alanina a piruvato.

El 3-hidroxipiruvato puede sustituir al piruvato como sustrato del enzima; en estas condiciones la actividad no es aditiva con la actividad del enzima con piruvato y así en un experimento típico en que la preparación muestra una actividad de 0,021 unidades/ml con 3-hidroxipiruvato y de 0,033 U./ml con piruvato, la actividad con ambos sustratos presentes es sólo de 0,029 U./ml.

En la tabla I se muestra el efecto de la

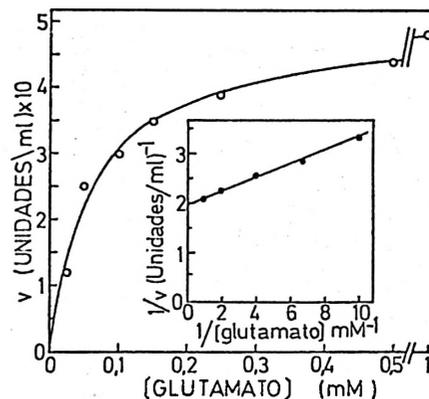


Fig. 3. Efecto de la concentración de glutamato sobre la actividad enzimática. La medida de la actividad se realizó con la fracción parcialmente purificada, en el sentido de formación de alanina, según se indica en Materiales y Métodos, excepto que la concentración de glutamato se varió tal como se indica en la gráfica. Se representa en directos y dobles recíprocos.

adición de distintos aminoácidos probados a una concentración final de 6,6 mM sobre la actividad enzimática medida en

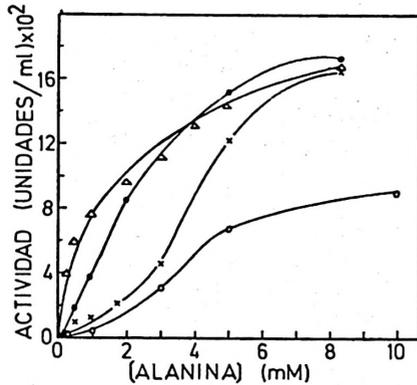


Fig. 4. Efecto de la concentración de alanina sobre la actividad enzimática.

La medida de la actividad se realizó tal y como se indica en Materiales y Métodos excepto que la concentración de alanina se varió tal como se indica en las gráficas y se usaron: extracto crudo y 13,3 mM 2-cetoglutarato (●), fracción purificada y 13,3 mM 2-cetoglutarato (Δ), fracción purificada y 6,7 mM 2-cetoglutarato (×) y fracción purificada y 0,3 mM 2-cetoglutarato (○).

Tabla I. Actividad con L-alanina en presencia de otros aminoácidos.

La actividad se midió usando la fracción parcialmente purificada y en el sentido de formación de glutamato tal como se indica en Materiales y Métodos excepto que además de alanina, el sistema podía incluir, según se indica, otro aminoácido a una concentración final de 6,6 mM. En ningún caso se encontró actividad de la preparación con los aminoácidos de la tabla sin alanina.

Actividad U/ml	Aminoácidos
—	0,037
L-fenilalanina	0,031
L-leucina	0,038
L-isoleucina	0,034
L-valina	0,031
L-treonina	0,034
L-ornitina	0,036
L-cisteína	0,0185
L-arginina	0,035
L-glicina	0,036

la dirección de alanina a piruvato comparada con el sistema normal de ensayo. Como puede verse, de todos ellos sólo la cisteína se muestra claramente como inhibidor de la actividad medida en estas condiciones llegando a inhibir aproximadamente un 50 % de la misma. Con este sistema de ensayo, sin alanina, pero con aspartato, la preparación enzimática muestra una actividad que es aditiva con la actividad encontrada con alanina, por lo que debe atribuirse a una aminotransferasa distinta de la L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa.

### Discusión

Las aminotransferasas son unos enzimas ampliamente distribuidos en todos los organismos y que han sido ampliamente estudiados en plantas (7) y, aunque en muchos casos se ha encontrado variación de su actividad en respuesta a distintas condiciones fisiológicas (9), se conoce muy poco de sus propiedades cinéticas. La L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa de maíz es un enzima cuya actividad disminuye en embrión después de alcanzar un máximo durante la germinación; esta disminución de actividad es impedida por la adición de alanina externa. Estos resultados, junto con la ausencia de L-alanina deshidrogenasa en embrión de maíz sugieren que este enzima es el responsable de la degradación de alanina que tiene lugar durante la germinación.

Así como la alanina parece afectar los niveles del enzima impidiendo su degradación, los resultados cinéticos que se presentan en este trabajo parecen sugerir, además, que la alanina, aparte de sustrato del enzima, es efector alostérico. Al menos, la curva de saturación sigmoide para alanina sugiere un claro sentido fisiológico en cuanto al control de la degradación de L-alanina por este enzima. Una acusada disminución de L-alanina en el embrión determina junto a una intensa

degradación del enzima una muy pequeña velocidad del mismo.

Las transaminasas varían ampliamente en cuanto a su especificidad de sustrato (7); la L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa estudiada por nosotros parece ser un enzima bastante específico que en todo caso sólo utiliza además de L-alanina y L-glutamato, a la L-cisteína y L-serina, según los resultados de especificidad obtenidos. Estos dos aminoácidos son estructuralmente bastante parecidos a la L-alanina, y desde el punto de vista fisiológico no se plantean grandes problemas porque la L-serina al igual que la L-alanina son aminoácidos cuya cantidad total disminuye durante la germinación del maíz, mientras que la cisteína es un aminoácido prácticamente inexistente en el endospermo y embrión de maíz (8). Las constantes cinéticas encontradas para piruvato, 2-cetoglutarato y L-glutamato no presentan ninguna particularidad especial dentro de la gran variedad de constantes cinéticas de las transaminasas; en cambio, sí son poco comunes las curvas de saturación sigmoides obtenidas para alanina a bajas concentraciones de 2-cetoglutarato y que justifican una ulterior purificación y caracterización más completa del enzima.

### Resumen

Se ha estudiado la actividad L-alanina:2-cetoglutarato aminotransferasa (C.E. 2.6.1.2) presente en embrión de maíz (*Zea mays*). Los extractos crudos se fraccionaron con sulfato amónico para obtener preparaciones con baja actividad de otras aminotransferasas presentes en los extractos crudos.

El enzima muestra curvas de saturación hiperbólicas para los sustratos piruvato ( $K_m$

1 mM), 2-cetoglutarato ( $K_m$  0,4 mM) y L-glutamato ( $K_m$  0,07 mM). Sin embargo, muestra propiedades cinéticas complejas para el sustrato L-alanina, dando curvas de saturación para L-alanina sigmoides, cuando se usan concentraciones fijas bajas de 2-cetoglutarato, e hiperbólicas normales a altas concentraciones fijas de 2-cetoglutarato. Estos últimos resultados se interpretan como indicativos de una regulación de la degradación de L-alanina que tiene lugar durante la germinación del maíz.

Junto a L-glutamato y L-alanina, el enzima parece que sólo utiliza L-serina y L-cisteína y sus correspondientes cetoácidos.

### Bibliografía

1. BERGMAYER, H.-U. y BERNT, E.: En «Methods of Enzymatic Analysis» (H.-U. Bergmeyer, Ed.), Verlag Chemie/Academic Press. Nueva York, 1963, pp. 846-853.
2. DUPUY, J., BOUTIN, J. y DUPAIGNE, G.: *C. R. Acad. Sci.*, **272**, 2548-2551, 1971.
3. FOLKES, B. F. y YEMM, E. W.: *New Phytol.*, **57**, 106-131, 1958.
4. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, M. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
5. SÁNCHEZ-MONJE, E.: Razas de maíz de España. Publicaciones del Ministerio de Agricultura. Madrid, 1962.
6. SANWAL, B. D. y LATA, M.: En «Modern Methods of Plant Analysis». Vol. VII (Linskens, H. F., Sanwal, B. D y Tracey, M. V., Eds.). Springer-Verlag. Berlín, 1964, págs. 294-295.
7. SANWAL, B. D., ZINK, M. W. y DIN, G.: En «Modern Methods of Plant Analysis», Vol. II (Linskens, H. F., Sanwal, B. D. y Tracey, M. V., Eds.). Springer-Verlag. Berlín, 1964, págs. 361-391.
8. SODEK, L. y WILSON, C. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 353-362, 1973.
9. ZRYD, J. P. y PILET, P. E.: *Plant Science Letters*, **1**, 479-482, 1973.