

**VÍRUSINDUKÁLT NUKLEÁZOK VIZSGÁLATA
ANACYSTIS NIDULANSBAN. HORMONKEZELT
BÚZAGYÖKÉR KALLUSZTENYÉSZET
ENZIMOLÓGIAI VIZSGÁLATA.**

PhD TÉZISEK

Dr. Sivók Béla

Juhász Gyula Tanárképző Főiskola
Biológia Tanszék

SZEGED
1997.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
VÍRUSINDUKÁLT NUKLEÁZOK VIZSGÁLATA	
ANACYSTIS NIDULANSBAN	3
BEVEZETÉS	4
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7
ANACYSTIS NIDULANS SZAPORÍTÁSA	7
AS-1 FÁG SZAPORÍTÁSA	7
AS-1 FÁG TISZTÍTÁSA	7
AS-1 FÁG FERTŐZÉS	7
ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSEK	8
ENZIMTISZTÍTÁS	10
ENZIMKARAKTERIZÁLÁS	11
EREDMÉNYEK	14
ÖSSZEFOGLALÁS	17
HORMONKEZELT BÚZAGYÖKÉR KALLUSZTENYÉSZET	
ENZIMOLÓGIAI VIZSGÁLATA	18
BEVEZETÉS	19
MÓDSZEREK	22
KALLUSZ TENYÉSZETEK KÉSZÍTÉSE	22
ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSEK	22
ENZIMTISZTÍTÁS	23
ENZIMKARAKTERIZÁLÁS	24
EREDMÉNYEK	26
ÖSSZEFOGLALÁS	29
IRODALOM	30
PUBLIKÁCIÓK	32
ELŐADÁSOK, POSZTEREK	33

**VÍRUSINDUKÁLT NUKLEÁZOK
VIZSGÁLATA
ANACYSTIS NIDULANSBAN**

BEVEZETÉS

A legőszibb, legegyszerűbb felépítésű autotróf, prokariota kék-zöld moszatokról az 1970-es években megjelent közlemények kérdésessé tettek számos eddig felhalmozott ismeretet, valamint új megvilágításba helyeztek jónéhány eddig elért eredményt.

Biokémiai tulajdonságaik vizsgálata - amelyek magukba foglalták a fehérje szintézist, nukleinsav anyagcserét és szekvenciákat, fotoszintézist, enzimműködéseket és szabályozási módokat - két fontos területre irányította a figyelmet;

- *Szisztematikai kérdés*, amely az élővilág rendszerezésében a prokariota baktériumok törzsének egyik fontos csoportjába (fotoszintetizáló baktériumok) történő besorolásának lehetőségét jelenti a cianobaktériumoknak.

- *Kloroplaszt evolúció*, ahol ezen obligát fotoautotróf szervezetek prokarióta szerveződési szintjük filogenetikusan kapcsolatban hozható a fotoszintetizáló eukarióták kloroplasztiszainak kialakulásával.

Az úgynevezett kék-zöld algákhoz, vagy az új nomenklatura szerint a cianobaktériumokhoz változatos prokariota típusok tartoznak, amelyek sejtjeik nagyságrendje alapján átmenetet képeznek a baktériumok és az eukariota algák között. Megjelenésük a prekambriumra tehető, ahol széles körben elterjedve különös fontosságra tettek szert és minden jel szerint az oxigéngazdag légkör létrejöttéért is ők a felelősek (Schopf 1978). Mérsékelt égövi talajokban kevésbé jelentős nitrogénkötők, azonban egyes óceáni régiókban, trópusi övezetekben (rizsföldek nitrogénszükségletének utánpótlása) felbecsülhetetlen gazdasági jelentőségűek.

Nincs nukleáris kettős magmembránjuk, sejtjeikben a DNS-hez nem kapcsolódnak az eukarióta rendszerekből jól ismert hisztonfehérjék. Nincs sem kloroplasztiszuk, sem mitokondriumuk. Sejtfaluk strukturális merevségét, miként a baktériumoknál peptidoglikán biztosítja és ezért a penicillinnel szembeni érzékenységük is érthető. A magasabbrendű növényekhez hasonlóan a cianobaktériumok aerob fotoszintetizálók.

A víz náluk is elektron donor, mely közvetve a koenzimeket redukálja. Fotoszintézisükben ugyanazokat a klorofilltípusokat tartalmazzák, mint az eukariota algák, és a víz oxidálása révén termelik a molekuláris oxigént. E tekintetben különböznek a fotoszintetizáló baktériumok többségétől, melyeknek eltérő klorofilljaik vannak és O_2 gázt sohasem termelnek. A cianobaktériumok az általuk termelt oxigént nemcsak tolerálják, hanem aerob respirációjukhoz terminális elektronakceptorként is felhasználják, sőt a szintézisekhez így a klorofill-A előállításához is igénylik.

A szénhidrát disszimiláció, amely többek között a sejtek energiatermelésében is nagyon fontos a kék-zöld algáknál, elsősorban az oxidatív pentóz-foszfát úton zajlik le, melyet a vegetatív sejtekben a fényszakasz anyagcseretermékei inaktiválnak. A glikolízis, a nem teljes Krebs-ciklus és a fermentáció, mint redukciós forrásai nem jelentősek. A megszakított Krebs-ciklus, melynek bizonyos enzimeinél a transzkripció kontroll hiányzik az ammónia asszimilációhoz 2-oxo-glutarátot és a tetra-pirol szintézishez szukcinátot állít elő. A fotoszintézisben a nem ciklikus fotofosforillációval és a ciklikussal együttesen, vagy csak az utóbbival egyedül előállított ATP az optimális szaporodáshoz és a maximális nitrogénáz aktivitás fenntartásához teljesen elegendő. Az oxidatív foszforilláció azonban erre egyedül nem képes (a fermentáció egyenesen jelentéktelen), így az obligát fotoautotróf cianobaktériumok nagy részénél az energiatermelés kizárólagos, egyedüli forrása a fény. A fenti megállapítások igazak a sejtek növekedési és osztódási folyamataira is. Közülük jelentőségével kiemelkedik a proteinszintézis és a fény közötti összefüggés, amelyet sikerült is igazolni. Singer és Doolittle (1975) az *Anacystis nidulans*-ban megfigyelték néhány fehérje sötétben történő szintézisét - glikogén foszforilláz (EC 2.4.1.1) és a glükóz 6-foszfát dehidrogenáz (EC 1.1.1.49) - amelyek alapvetőek a sötét szakaszban lévő anyagcsere folyamatokban azzal, hogy fenntartják az életképességet, de nem teszik lehetővé ezen egysejtűek szaporodását (Doolittle és Singer 1974; Pelroy és mts. 1972).

A sötétben történő fehérjeszintézis jobb megértéséhez AS-1 vírus által megfertőzött cianobaktériumok vizsgálata egy használható modellrendszernek tűnik (Safferman és mts. 1972). Vírusfertőzés alatt a megfertőzött sejtek fokozott mértékben kezdenek olyan

enzimeket szintetizálni, amelyek nem szükségesek (olykor kimondottan károsak) a baktérium sejtekre nézve, pl. ilyen enzimek a nukleinsav anyagcserében résztvevő nukleázok. Ez a megállapítás érvényes a prokariota cianobaktérium szervezetekre ugyanúgy, mint a heterotróf baktériumokra.

A cianobaktériumok növekedését és fejlődését kísérő biokémiai folyamatok részét képező nukleinsav anyagcsere nukleolitikus enzimeinek (RNáz, DNáz, den.DNáz) működésével kapcsolatban szórványos adatok jelentek meg. Erre utal többek között az, hogy az *Anacystis*-ben egy extrém alacsony aktivitási szint volt jellemző a nukleázokra, amely valószínűleg megnehezítette a vizsgálatokat (Norton és Roth 1967/A). A vírushertőzéssel sikerült az *Anacystis* sejtek esetében drasztikus aktivitás emelkedést produkálni az említett enzimeknél, ami arra utalhat az egysejtes cianobaktériumoknál, hogy a nukleázok aktivitásának alacsony szintje nem "obligatory" tulajdonság. Az AS-1 cianofággal fertőzött *Anacystis* esetében az extrém módon megemelkedett nukleolitikus aktivitásnak köszönhetően sikerült kitisztítanunk egy RNáz enzimet (Lehmann és mts. 1979). Az irodalomban ezt megelőzően egy közlemény jelent meg, amely szerint nem fertőzött cianobaktériumból kitisztítottak és karakterizáltak egy nukleáz enzimet "RNáz β " (Norton és Roth 1967/B).

Célkitűzések.

Az obligát fotoautotróf *Anacystis nidulans* sejtek sötétben lejátszódó fehérje szintézis mechanizmusának megértéséhez további kísérleti eredmények prezentálása.

Használható modellrendszer kidolgozása AS-1 fággal fertőzött cianobaktériumokban.

A vírusindukált nukleinsav anyagcserében résztvevő nukleolitikus enzimek (RNáz, DNáz, den.DNáz) működésének vizsgálata folytonos megvilágítás, illetve sötét körülmények között.

Fotoszintézis (DCMU) és protein szintézis (Kloramfenikol) gátlók okozta változások a nukleolitikus enzimek változásában.

AS-1 fág indukcióra megemelkedő nukleázok közül az RNáz kitisztítása és karakterizálása. Az itt kapott eredményekkel az *Anacystis nidulans* nukleáz enzimeivel kapcsolatos hiányos ismeretek kiegészítése.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

ANACYSTIS NIDULANS SZAPORÍTÁSA

Az egészséges *Anacystis nidulans* sejteket steril körülmények között, Kratz-Myers C. (módosított Chu No.1) típusú tápoldaton, ferde agarcsövekben tartottuk (Kratz - Myers 1955). Az algákat minden kísérlethez a ferde agarcsövekből frissen és sterilen Kratz-Myers C. típusú tápoldatba inokuláltuk. Az inokulált kultúrákat 6 l-es üvegedényekben 10.000 lux megvilágítás mellett 37 °C-on tartottuk, miközben steril 5 % CO₂-ot tartalmazó levegőt buborékolattunk keresztül a rendszeren. A kísérlet céljainak megfelelően a sejteket centrifugálással (7.000xg, 10 perc) gyűjtöttük össze a növekedés késői logfázisából (10⁸sejt/ml).

AS-1 FÁG SZAPORÍTÁSA

Az egészséges kultúrát AS-1 cianofággal fertőztük (3x10⁸ sejt/ml algasejt és tizedrész fág) 0,1-szeres fertőzési multiplicitás mellett. A lízis teljes befejeztével (7-8 óra) a sejt törmelékét Sorvall RC-2 centrifugával Szentgyörgyi és Blum típusú átfolyós rotor segítségével centrifugáltuk. A lizátum fág koncentrátumát Saffermann és mts. (1972) szerint plakkolással határoztuk meg.

AS-1 FÁG TISZTÍTÁSA

A bakteriális szennyeződés eltávolítása érdekében az AS-1 fágokat tartalmazó lizátumot 12 órán át 0 °C-on kloroformmal telített rendszerben tartottuk. A kloroformot 25 °C-on levegő átbuborékolatásával távolítottuk el. Az épségben maradt vírusokat 40.000xg, 30 perc centrifugálással gyűjtöttük össze.

AS-1 FÁG FERTŐZÉS

A 7x10⁷ sejt/ml kései logaritmusos növekedési fázisban lévő egészséges *Anacystis nidulans* kultúrát tisztított AS-1 cianofággal fertőztük 3-szoros multiplicitással. A kultúrát a fertőzés ideje alatt a már ismertetett standard körülmények között tartottuk. A fertőzés minden órájában mintát vettünk az 5. óráig, amikor is lassan elkezdődött a sejtek

lízise. Az enzimaktivitások méréséhez levett minták sejtszámát "Bürker-kamrás" számlálóval határoztuk meg.

ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSEK

A centrifugálással (7.000xg, 10 perc) összegyűjtött *Anacystis nidulans* sejteket (5×10^9 sejt/ml) jéghideg 50 mM, pH 7,5 Tris-HCl pufferben szuszpendáltuk. A sejt-szuszpenziót MSE ultraszonikátorban 10 percig 0 °C-on szonikáltuk. A szonikátumot 10.000xg, 10 percig centrifugáltuk. Az így nyert szupernatant, mint nyers kivonatot használtuk a további vizsgálatokban enzimaktivitások mérésére.

Foszfomonoeszteráz (PMáz)

Az enzimaktivitás meghatározása szintetikus és természetes szubsztráttal történt. Szintetikus szubsztrát esetében a p-nitrofenil foszfátból (p-NPP) enzimatikusan felszabaduló p-nitrofenolnak, mint az egyik végterméknek az abszorpcióját mértük 400 nm-en, lúgos közegben (Sivók és mts. 1981). Reakciórendszer: 5 mM acetát puffer (pH 5,5); 2 μ M p-NPP és 0,05-0,2 ml enzimkivonat. Össztérfogat 2 ml. A rendszert 37 °C-on 20 percig inkubáltuk, majd a reakciót 1 ml 0,3 N NaOH oldattal állítottuk le. Az összehasonlító oldat az inkubáció ideje alatt csak szubsztrátot tartalmazott. Az enzimkivonatot ehhez lúgosítás után adtuk.

Természetes szubsztrátok esetében pl. cukorfoszfátok, nukleozid foszfátok, az inkubációs rendszert Walters és Loring (1966) eljárása alapján állítottuk össze és az enzimatikusan leszakadt ortofoszfát mennyiségét Chen és mts. (1956) mikromódszerével határoztuk meg. Reakciórendszer: 5 mM acetát puffer (pH 5,5); 1 μ M szubsztrát és enzimaliquot. Össztérfogat 2 ml. Az inkubációs idő (37 °C, 40 perc) letelte után a felszabadult foszfor meghatározására a rendszerhez 6 ml molibdén-kénsav-aszkorbinsav elegyet adtunk (2,5 % NH_4 -molibdát: 6 N H_2SO_4 : 10 % aszkorbinsav: H_2O , 1:1:1:2). Az inkubációt további 90 percig folytattuk a kék szín teljes kifejlődéséig. Hűtés után a kék színű komplexet 820 nm-nél mértük. A hidrolizált ortofoszfát mennyiségét 1-5 μ g szervesetlen foszfort tartalmazó standard segítségével számoltuk ki.

Ribonukleáz (RNáz)

RNáz enzim alatt olyan fehérjéket értünk, amelyek csak RNS láncot támadnak meg és a láncon belüli foszfodiészter kötéseknek hasítják. Reakciórendszer: 0,1 M, pH 7,5 Tris-HCl, 1 mg/ml közönséges élesztő RNS és enzimaliquot. A 0,5 ml-es reakciórendszert 37 °C-on 60 percig inkubáltuk, majd 2,5 ml 2,5 % triklór-ecetsavban oldott 0,3 % $\text{La}(\text{NO}_3)_2$ -tal állítottuk le az enzimreakciót. 20 percig állni hagytuk jeges vízben, majd 3.000xg, 10 perc centrifugálással eltávolítottuk a csapadékot, amely hosszabb RNS láncdarabokat valamint fehérjét tartalmazott. A visszamaradt savoldékony nukleotidok, illetve rövid oligonukleotidlánc-darabok abszorpcióját mértük 260 nm-nél (Wyen és mts. 1971).

Dezoxiribonukleáz (DNáz)

A dezoxiribonukleáz aktivitásának mérést hasonlóan végeztük, mint az RNáz esetében azzal az eltéréssel, hogy RNS szubsztrát helyett natív, illetve denaturált DNS-t használtunk. A denaturált DNS preparálása: csirke fehérvérsejtből származó natív DNS-t (10 mg/ml) feloldottunk SSC oldatban (0,015 M NaCl és 0,001 M Na-citrát), majd 15 perces forralás után erős keverés közben jeges vízben lehűtöttük a rendszert, amivel megakadályoztuk a szétvált DNS láncok újra összeállását kettős spirállá. A keletkezett den.DNS-t 260 nm-nél a bekövetkezett hiperkromicitás mérés alapján határoztuk meg (Udvardy és mts. 1976).

Proteinmeghatározás

Az oldható összprotein mennyiségét Lowry és mts. (1951) alapján kombinált Folin-Biuret reakcióval határoztuk meg. A minta fehérjetartalmát azonos térfogatú 10 %-os Triklór-ecetsavval (TCA) csaptuk ki, majd ismételten mostuk (5 % TCA) és a csapadékot lecentrifugáltuk (8.000xg, 10 perc). A precipitátumot 4 ml 0,1 normál NaOH-ban 10 perces melegítéssel oldottuk fel. Reakciórendszer: 0,5 ml fehérje aliquot, 4 ml Biuret reagens, melyet 20 perc szobahőmérsékleten történt állás után kiegészítettünk 0,5 ml vízzel 1:1 arányban hígított Folin-reagenssel. A reakció kialakulása után (30 perc) a kapott kék szín abszorpcióját 680 nm-nél mértük. A minta fehérjetartalmát bovine

szérum albumin (Cohn Fr. V.) egyenértékben fejeztük ki. A tisztítás későbbi fázisában a proteinoldat koncentrációját a 280 nm-nél mért abszorpcióból számoltuk ki.

ENZIMTISZTÍTÁS

A lefagyasztott *Anacystis nidulans* sejteket eldörzsöltük Al_2O_3 -mal (1:2), majd elszuszpendáltuk 3 térfogatnyi 0,05 M, pH 7,5 Tris-HCl pufferben, amely 1 mM EDTA-t és 0,01 % 2-merkaptóetanolt tartalmazott. A kivonatot először 20.000xg/20 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót fázisszeparáció céljából 150.000xg/90 percig ultracentrifugáltuk.

Fázisszeparáció. A 10 ml tiszta, sejtmentes felülúszóhoz 2,5 ml 20 %-os Dextrán T-500, 4,8 ml 30 % PEG-6.000 és 3 M végkoncentrációjú NaCl-ot adtunk. Állás után lecentrifugáltuk a rendszert és csak a felső PEG fázist használtuk a további kísérletekhez.

DEAE batch kezelés. 60 térfogatnyi 0,05 M, pH 7,5 Tris-HCl pufferrel equilibrált DEAE cellulóz és PEG fázis (1:1) alkotta rendszert 2 óra állás után Buchner tölcserén átszűrtük. A színtelen szűrletet eldobtuk, a DEAE cellulózhoz 0,05 M, pH 7,5 Tris-HCl puffert adtunk kiegészítve 0,5 M NaCl-dal, majd 30 perc keverés után leszűrtük. A sóval történt elúció során a fehérjék leoldódtak a DEAE cellulózzal és a szűrlet tartalmazta a további kísérletekhez szükséges enzim fehérjét.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitáció. A fehérje oldatot porított ammónium szulfáttal fokozatosan 80 %-ra telítettünk és 12 órán át hideg szobában állni hagytuk. A fehérje csapadékot (25.000xg, 30 perc) centrifugáltuk. A precipitátumot 0,01 M, pH 6,8 foszfát pufferbe felvettük és egy éjjelen át dializáltuk. A dialízis után visszamaradt kevésnyi csapadékot újra lecentrifugáltuk.

DEAE cellulóz oszlopkromatográfia pH 6,8. A lecentrifugált dializátumot egy 0,01 M, pH 6,8 foszfát pufferrel equilibrált, 2x30 cm-es anioncserélő gyantával töltött DEAE oszlopra vittük fel, amelyben a háromdimenziós, térhálós szerkezetű mátrix funkciós csoportjai (diethyl-aminoetil) éter-hidakon keresztül kötődnek a poliszacharid láncok glükóz egységeihez. A felkötődött fehérjét lineáris foszfát pufferben oldott (0-0,5 M) NaCl grádienssel eluáltuk. A frakciók proteintartalmát 280 nm-nél mértük.

DEAE cellulóz kromatográfia pH 7,5. Az összekombinálás után a frakciókat 0,01 M, pH 7,5 Tris-HCl pufferben dializáltuk, majd felvittük a DEAE cellulózzal töltött oszlopra,

amely a pH 7,5-ös pufferral volt equilibrálva. A fehérjéket 0,15-0,45 M lineáris NaCl sóoldattal mostuk le. Dialízis után amikor a sót eltávolítottuk, a kombinált frakciókkal megismételtük a kromatografálást DEAE oszlopon. A kapott enzim frakciókat dializáltuk, majd 6-8 ml-es térfogatokra szétöntve -20 °C-on tároltuk a kísérletekig.

ENZIMKARAKTERIZÁLÁS

Endo illetve exonukleolitikus bontástípus

Nagy molekulásúlyú élesztő RNS-t (Calbiochem) használtunk szubsztrátként az enzimreakció során. Reakciórendszer: 5 mg RNS, 100 μ M, pH 7,5 arzenát puffer és 0,5 ml tisztított enzimprotein aliquot. Az inkubációt 37 °C-on végeztük és 20 μ l-es mintákat vettünk 0, 48, 96 és 144 órás emésztés után. Az enzimműködés során felszabadult különböző lánchosszúságú oligonukleotid bontástermékeket 1x40 cm Sephadex G-50 oszlopon választottuk el. Markerként gyári 3'-AMP-t használtunk fel a mononukleotidok pozíciójának meghatározására a gélkromatografálásban (Birnboim 1966).

Enzimatikusan emésztett RNS frakcionálása lánchossz alapján

Nagy molekulásúlyú élesztő RNS-t (40 mg) inkubáltuk 4 ml tisztított RNáz-zal 800 μ M, pH 7,5 arzenát pufferben, ahol a reakciórendszer végtérfogata 8 ml volt. 168 órás inkubálás után a reakciót 100 °C-on 10 perces hőkezeléssel állítottuk le. Hűtés után a rendszer pH-ját 8,6-ra állítottuk be, ammónium-hidrogénkarbonáttal. Az enzimatikusan leemésztett különböző hosszúságú RNS láncdarabokat 1,3x30 cm anioncserélő DEAE cellulóz oszlopon választottuk szét konkáv NH_4HCO_3 grádienssel. A gradiens előállításához 4 hengertagú Varigrád rendszert használtunk. A henger 1. tartalma 300 ml 1 M, pH 8,6 NH_4HCO_3 , henger 2, 3, 4. esetében valamennyi 300 ml 0,01 M, pH 8,6 NH_4HCO_3 puffert tartalmazott. A frakciók nukleinsav tartalmát 260 nm-nél mértük (Staehelin 1961). A megfelelő és jól definiálható csúcsokhoz tartozó frakciókat összeöntöttük, sóalanítottuk, liofilizáltuk és ezekkel a mintákkal dolgoztunk a továbbiakban.

Bázis specificitás

Kísérleteinkben két módszert használtunk: (a) alkalikusan hidrolizált rövid lánctagú oligonukleotidok bázisösszetételének összehasonlítása a nem emésztett szubsztrát bázisösszetételével. (b) leemésztett oligonukleotid láncok végcsoport analízise.

Alkalikus hidrolízis 0,3 M KOH jelenlétében (37 °C, 18 óra) történő lúgos hidrolízis eredményeként a rövid lánctagú RNS töredékekből 2',3'-ciklikus nukleotidok szabadulnak fel. Sósav hozzáadásával (pH1) 3 órás szobahőmérsékleten történő állás után a 2',3'-ciklikus kötések felbontódnak. Ezután a mintát KOH-val neutralizáltuk, majd Sephadex G-10 oszlopon sótalanítottuk. A kombinált frakciókat liofilizálás után vízben feloldottuk és kromatografáltuk az összehasonlító standardokkal együtt Wathman 3MM papíron, amely impregnálva volt 0,2 M, pH 7,5 foszfát oldattal. A nukleozid 2',3'-monofoszfátok kromatográfiás szétválasztását isopropanol: ammónium-hidroxid: H₂O (7:1:3) futtató elegyben végeztük (Nestle és Roberts 1968). Az UV-fényben látható szétvált komponenseket kivágtuk és 0,01 N sósavval kioldottuk a papírból. A szétválasztott nukleotidok moláris extinciókoefficiense alapján számoltuk ki a mennyiségüket (Cordis és mts. 1975).

Végcsoport analízis. A liofilizált oligonukleotid minták közül a hosszabb lánccú nukleotid egységeket tartalmazó frakciókat felvettük 0,2 ml glicin-NaOH pufferben (pH 10,4), amely 0,01 M MgCl₂-ot tartalmazott. Alkalikus foszfátázzal (Sigma) kiegészített reakciórendszert (37 °C, 24 óra) inkubáltuk, amely során az enzim a 3'-pozícióban lévő foszfát csoportokat lehasította. A rendszerhez KOH-ot adva a lúgos hidrolízis során (37 °C, 18 óra) 3'-nukleozidok szabadultak fel. A reakcióelegy pH-ját ecetsavval 8,6-ra csökkentettük, majd desztillált vízzel 5 ml-re kiegészítettük. A mintát Dowex 1x2 (acetát forma) oszlopra felvittük, amely vízzel volt egyensúlyozva. A nukleozidok elválasztása "stepwise" elúcióval történt, amikor is H₂O és 0,1 M, pH 6,2 ammónium-acetát puffert használtunk (Georgatsos és Laskowski 1962).

3'- illetve 5'- bontás típus meghatározása

DEAE oszlopon szétválasztott RNS emésztésből származó liofilizált oligonukleotid frakciókat 0,3 M KOH jelenlétében lúgos hidrolízisnek vetettük alá. A lehidrolizált oligonukleotid láncokat tartalmazó elegyet semlegesítettük, majd Sephadex G-10 oszlopon (1x30 cm) sótalanítottuk. A lehidrolizálódott monomereket két módszerrel határoztuk meg:

- (a) A liofilizált száraz mintákat 0,025 M pH 5,0 NH_4 -formiát pufferben feloldottuk és 1x5 cm DEAE oszlopra felvittük, amely ua. pufferrel volt egyensúlyban. Az oszlopról lépcsős gradienssel (0,025, 0,075 és 0,25 M ammónium-formiát) a koncentrációnak megfelelő sorrendben először a nukleozidok, majd a nukleozid-monofoszfátok és végül a nukleozid-difoszfátok eluálódtak le (Lane és mts. 1963).
- (b) A lúgos hidrolizátum komponenseit Whatman 3MM kromatográfiás papíron összehasonlító standardokkal együtt Laskowski (1967) által leírt "futtató elegy I." rendszerben választottuk el.

Oligonukleotid töredékek lánc hossz meghatározása

Alkalikus foszfatázzal emésztett mintákat lúgos hidrolízisnek vetettük alá. Sótalanítás és liofilizálás után a mintákat Whatman 3MM papíron kromatografáltuk (Laskowski 1967). Az UV fényt elnyelő foltokat a papírból kivágtuk, majd 0,01 M HCl-el kioldottuk a nukleozidokat és a nukleotidokat, melyeknek mennyiségét spektrofotometriás méréssel meghatároztuk. Az átlag lánc hosszúságot a nukleotid/nukleozid arányból számoltuk ki.

Molekulásúly meghatározás

Sephadex G-100 oszlopon (2,4x100 cm) gélszűrőssel határoztuk meg a tisztított RNáz molekulasúlyát. A marker proteinek közül a Ms. 67.000 bovine-szérum albumint Cohn Fr. V. (Sigma) UV abszorpció, míg a Ms. 12.000 citokróm-C-t (Sigma Type II.) a látható fénytartományban való elnyelés alapján azonosítottuk. A tőrből nyert Ms. 40.000 peroxidáz (Worthington) esetén enzim aktivitást mértünk (Wyen és mts. 1971).

EREDMÉNYEK

Munkáinkat megelőzően a szakirodalomban utalások történtek két enzimnek (Glikogén foszforiláz és Glükóz 6-foszfát dehidrogenáz) sötétben történő szintézisére, amelyek az obligát fotoautotróf szervezetek sötétben lejátszódó endogén energia metabolismusában vesznek részt. Kísérleteinkben a "sötét-indukált" (de novo szintézis) enzimeknek egy másik csoportjára terjesztettük ki vizsgálatainkat a vírusfertőzésre indukálódó *nukleáz(ok)*-ra.

Folytonos fényviszonyok között az AS-1 típusú fág fertőzés esetén az *Anacystis nidulans* kultúrában a vírusok teljes abszorpciója 1 óra alatt befejeződik és a konstans cianobaktérium sejtszám az 5. órára elkezdi csökkenni a lízis beindulásával. A cianofággal fertőzött *Anacystis* sejtekben folyamatos megvilágításban 1 óra múlva a dezoxiribonukleáz (DNáz), működésében növekedés állt be és a 4-5. óra környékén az aktivitás 15-20-szorosra emelkedett. A ribonukleáz aktivitás a fertőzött sejtekben egy konstans értéken stagnált és kb. 5 órával később a fertőzési ciklus utolsó fázisában dramatikusan megemelkedett. A foszomonoeszteráz aktivitása szignifikánsan csökkent a fertőzés utáni első 2 órában és egy nagyon gyors emelkedés kezdődött az 5. óra körül (kb. 1 órával a fertőzött sejtek lízisének megindulása előtt), amely hasonlított az RNáz viselkedéséhez.

Teljes sötétségben tartott cianobaktérium sejtekben a nukleázok aktivitása változatlan maradt, viszont ha a vírusfertőzött sejteket 1-2 óráig megvilágítottuk, majd tartós sötétségbe helyeztük, csak a DNáz aktivitása emelkedett meg (hasonló értéket mutatva, mint a folyamatos megvilágítás esetében) annak ellenére, hogy a vírus teljes szaporodási ciklusa leállt és a sejtek sem estek szét.

Az obligát autotróf sejtek vírusfertőzésre (stressz) megemelkedett nukleáz aktivitás változások egyáltalán nem voltak jellemzők a vírusfertőzött, fotoszintetizáló, magassabbrendű növényi sejtekre (Wyen és mts. 1972). A vírusfertőzés során létrejövő korai és erőteljes DNáz aktivitás emelkedés azonban nagyon hasonlított a heterotróf baktériumokban fágfertőzésre lejátszódó folyamatokhoz (*E. coli* stb.).

A késői fertőzési stádiumban, amikor a sejtek károsodása megfordíthatatlan (rövidesen bekövetkezik a sejtek szétesése) a RNáz és PMáz aktivitások drasztikusan megemelkednek. Az *Anacystis* nukleinsav anyagcseréjében résztvevő nukleázok viselkedése - amikor a fertőzött sejtek szétesése beindul - nagyon hasonlatos a zöld fotoszintetizáló eukariota sejtekben lejátszódó hasonló folyamatokhoz (vírus infekció, mechanikai stressz hatások stb.).

A fénynek a vírusfertőzési mechanizmusokban való szerepére további eredményeket szolgáltatott a fotoszisztém II. reakció centrumot gátló 3-(3,4-diklórfenil)-1,1-dimetil urea (DCMU). Folytonos megvilágításban a 10^{-5} M DCMU kezelés drasztikusan lecsökkenti a DNáz aktivitását, amely alátámasztja, hogy a fotoszintézis által biztosított energia használatra fel a DNáz sötétben történő szintéziséhez.

Teljes megvilágításban a foszfomonoeszteráz aktivitása a fertőzött sejtek korai stádiumában egy átmeneti csökkenés után (amivel ellentétben a DNáz aktivitás emelkedik) a 4-5. órára szignifikánsan megemelkedik. DCMU kezelés hatására a fertőzés korai szakaszára jellemző PMáz aktivitás csökkenés jelentősen lelassul és az RNáz-zal együtt egy konstans szinten marad a 6 órás megvilágítási kísérlet alatt.

3×10^{-4} M kloramfenikol (protein szintézis inhibitor) jelenléte teljesen gátolta a DNáz aktivitás emelkedést ugyanúgy, mint az RNáz és PMáz aktivitás növekedést, amelyek a sejtek szétesési folyamatainak kísérői. A kapott változások alátámasztják, hogy a vírus indukált enzimaktivitás emelkedések új proteinszintézis és nem enzimaktiválódás eredménye.

RNáz tisztításhoz az AS-1 cianofággal fertőzött *A. nidulans* sejteket a fertőzés utáni 5. órában gyűjtöttük be, amikor az RNáz aktivitás ugrásszerűen megemelkedett. Hét lépésben történt tisztítás során a vírusindukált RNáz eseténbe mintegy 300-szoros tisztítási fokot értünk el. A tisztított enzim nem bontott natív és denaturált DNS-t, p-nitrofenil-foszfátot (PMáz aktivitás), bis-p-nitrofenilfoszfátot (foszfodiészteráz aktivitás, PDáz), valamint 3' és 5' nukleotidokat (nukleotidáz aktivitás). Szintetikus homopolimerek

esetében a tisztított enzimmel történt bontás mértéke a következő sorrendet adta $\text{poly U} > \text{poly C} > \text{poly I} > \text{poly A}$. A pH 7,5 optimummal rendelkező, 12.400 molekulasúlyú homogén tisztított enzim nem abszolút fémionfüggő. Fe^{3+} stimulálta ellentétben a Co^{2+} és Ni^{2+} gátolta az enzimműködést. Bontástípus alapján endonukleáznak bizonyult, melyben a legnagyobb mennyiségben felszabadult átlag oligonukleotid lánc darab hosszúság (3), 3' végállású foszforcsoporttal. Az enzim a felszabadult oligonukleotid egységek bázisösszetételének elemzése, valamint a szintetikus poliribonukleotid molekulák bontásának alapján, egy relatív UMP specificitást mutatott.

Az eredményeket összevetve az egyetlen közleményben megjelent kék-zöld algából tisztított nukleáz tulajdonságai alapján - néhány hasonlóság ellenére - egy újonnan szintetizálódott enzimről beszélhetünk. Legalapvetőbb különbség a bontástípusban figyelhető meg. Az irodalomban leírt enzim azokat a foszfodiészter kötéseket hasítja az RNS-ben, ahol a ribóz 2' pozíciójú hidroxil csoportja metilezve van, illetve a felszabadult végtermékek 5' pozíciójú foszforcsoportot tartalmaznak (Norton és Roth 1967/B).

A tisztított vírusindukált RNáz két tulajdonságát érdemes kiemelni: *pH 7,5 RNáz működési optimum* és egy hosszú idejű RNS emésztés során felszabaduló *rövid lánctagú oligonukleotidok* (kb. 3 db nukleotid egység). A két fent említett kiemelt tulajdonság nagyon jól összeegyeztethető azokkal az eredményekkel, amiket magasabbrendű növények kloroplasztisaiból tisztított nukleázokat vizsgálva kaptak. Általában a magasabbrendű növényekből izolál RNázok pH optimuma savas tartományba esik és a szubsztrát elbontása során mononukleotidok szaporodnak fel (Dove 1973, Wilson 1975).

ÖSSZEFOGLALÁS

AS-1. cianofággal fertőzött *Anacystis nidulans* sejtekben fényen 1 óra elteltével a DNáz aktivitás gyorsan emelkedett és az 5. óra végére mintegy 15-20-szoros szintet ért el. Az RNáz és PMáz aktivitások szignifikáns emelkedést az infekció utáni 4-5. órában mutattak 1 órával a sejtek lizálása előtt. Teljes sötétben a nukleázok aktivitási szintje változatlan maradt. Ha a fertőzött sejteket 1-2 órán át fény expozíciónak tettük ki, majd tartós sötétbe helyeztük, a DNáz aktivitás emelkedés közel hasonló eredményt mutatott, mint folytonos megvilágítás esetén, annak ellenére, hogy a vírus teljes szaporodási ciklus rendje felbomlott, leállt és a sejtek lízise is csak folytonos fényben történt. Az *Anacystis nidulans* fotoszisztem II-t gátolva DCMU-val a vírus indukált aktivitásnövekedés gátlódott, a 2 órás megvilágítás, majd ezt követő sötét periódusban. A protein szintézis inhibitoraként használt kloramfenikol kezelés szintén gátolta a DNáz működését.

A fág fertőzés késői szakaszában aktiválódott RNáz tisztítása során mintegy 300-szoros tisztasági fokot értünk el. A tisztított enzim nem bontja a natív illetve den.DNS-t, inaktív volt a p-NPP és a bis-p-NPP szubsztrátok esetében, valamint nem rendelkezett 3'- és 5'-nukleotidáz aktivitással sem. Hozzávetőlegesen a 12.000 molekulatömegű enzimfehérje optimális aktivitása pH 7,5 volt. Nem kizárólagos ionfüggő, de Fe^{3+} serkentette a Co^{2+} és Ni^{2+} gátolta az enzim aktivitását. Egy relatív uridilsav specifikus endonukleáz, amely hosszú ideig tartó RNS emésztés során átlagban 3 nukleotid egységből álló oligonukleotidokat szabadít fel 3'-pozíciójú foszforcsoporttal.

**HORMONKEZELT BÚZAGYÖKÉR
KALLUSZTENYÉSZET ENZIMOLÓGIAI
VIZSGÁLATA**

BEVEZETÉS

A növényi szövettenyésztés izolált növényi anatómiai részek (embrio, sejtek, szövetek, szervek, ivarsejtek) in vitro körülmények közötti fenntartása, amikor ezen részek anyagcseréje potenciálisan korlátlan ideig fenntartható, fejlődésük tetszés szerint reprodukálható sőt regulálható a fejlődés folyamatát kiváltó faktorok segítségével. Ezen a területen felhalmozott kutatási eredmények vezettek oda, hogy eukarioták egyes sejtjei "elemi organizmusként" működhetnek, ha szervi, szöveti kapcsolataikból elválasztjuk őket. A kultúrákban tartott sejtek anyagcsere- és fejlődési-feltételeinek megismerése tehát elvezetett a sejt differenciálódás és organizálódás folyamatainak irányításához és reverzibilis regulációjához is és egyben bizonyítéka lett az addig csak feltételezett totipotenciának is.

A szövettenyésztésben a vitaminok (piridoxin, tiamin, nikotinsav-amid, stb.), a különböző N-források és mikroelemek mellett a hormonok alkalmazása gyorsította fel a módszer széleskörű elterjedését. A szövettenyésztés mai eredményei a hormonok interakcióira és reguláló hatásukra vezethetők vissza. Először a naftil-ecetsav (NES) és az indol-ecetsav (IES) használata terjedt el, mint a szövetek osztódásának és differenciálódásának általános serkentői. Később ismertté vált, hogy az auxinok egyes folyamatokban speciálisan hatnak. Az osztódásban és szöveti gyarapodásban a NES-nek a gyökér indukcióban az IES-nek és az indol-vajsavnak (IVS), a kallusz szövetgyarapodásban a szintetikusan előállított 2,4-diklór-fenoxi-ecetsavnak (2,4D) van kimagasló szerepe.

A felhalmozódó kutatási eredmények alapján már az is nyilvánvalóvá vált, hogy sem a sejtnövekedést, sem a sejtosztódást, differenciálódást és az organizálódást nem egyes exogén hormonok, hanem ezek interakciói okozzák, amelyek a sejtek endogén hormonszintjét, illetve ezek arányát változtatják meg (Steward 1970). A hormonális interakciók létét a gibberellinek szövettenyészetekben történő szervképzése, valamint az 1955-ben felfedezett DNS-ből származó műtermék kinetin, illetve később felismert természetes citokinin származékok (zeatin és izopentenil-adenozin) felhasználása is megerősítette (Jones 1973). Az auxinok, gibberellinek és citokininek serkentik a sejtek etiléntermelését,

aminek szerepet tulajdonítanak a kalluszosodásban és a szövetek organogenetikus differenciálódásának gátlásában (Steward és Hsu 1977). Az általános növekedést gátlónak tartott abszcizinsav a szövettenyészetekre gátló hatásán kívül a citokininekkel és auxinokkal mutatott szinenergista jellegével hathat (Milborrow 1974).

A sejttől a szervezetig vezető morfogenetikai változásokra jellemző mechanizmusok megismerése nem nélkülözheti az ezeket kísérő anyagcsere folyamatok biokémiai és enzimológiai vizsgálatát. A nukleinsav lebontási anyagcserében résztvevő enzimek közül az RNáz szintje és a *Cichorium* és *Nicotiana* kallusz tenyészet növekedés intenzitása között negatív korreláció figyelhető meg (Gwózdź 1973 és Vetter 1974). A további nukleolitikus enzimek változásainak vizsgálata összefüggéseket tárhat fel a különböző koncentrációban használt növekedési faktorok szerepére a kallusz növekedés indukciójában és fenntartásában.

A növényi sejtek nukleinsav lebontási anyagcseréjében résztvevő enzimek Wilson (1975) összefoglaló munkája alapján a következő csoportokba osztható be.

RNáz I. oldható endoribonukleázok, amelyek 2',3'-ciklikus nukleotidokat szabadítanak fel, preferálva G-re, amely a legnagyobb mennyiségben jelenlévő korai termék. Csak a purin ciklikus nukleotidokat képesek tovább bontani. pH optimumuk 5,0 körül van és 20.000-25.000 molekula tömegű fehérjék.

RNáz II. Mikroszómális endoribonukleázok, melyek szintén G-re preferáltak, pH optimum 6,0 és 17.000-20.000 molekulasúlyú fehérjék.

Exonukleáz. Polinukleotid láncokat hasít a lánc 3'-végéről, 5'-mononukleotidok felszabadítása közben. pH optimum 7-9 között van. Az izolált enzimek molekulasúlya 100.000 vagy e fölötti. A növényekből izolált exonukleázok sok tulajdonságukban hasonlítanak a vipera méregből izolált foszfodieszterázhoz.

Nukleáz I. A magasabbrendű növények nukleinsav anyagcserében résztvevő nem cukor-specifikus endonukleázok relatíve egy adenin (A) specifikus enzimek. Működésük során egyformán hasítják a den.DNS-t és az RNS-t 5'-nukleotidok felszabadítása közben, ugyanakkor alig bontják a natív DNS-t. Rendszerint az RNS és den.DNS bontás mellett 3'-nukleotidáz enzimaktivitással is bírnak. pH optimumuk 6,0 vagy ennél magasabb.

A 33.000 molekulatömegű fehérjék működését rendszerint az EDTA gátolja, illetve gyakran kétértékű kationokat igényelnek optimális működésükhöz, stabilitásukhoz.

Különböző növényekben vizsgálva a nukleáz I. szerepét, sikerült egy jól kimutatható összefüggést megállapítani az enzim akkumulációja és az öregedés között (Wyen és mts. 1971). Más esetben kimutatható volt a nukleáz I. szintjének változása a hormonkezelt növényi levelekben, ahol abszcizinsavval (ABA) kezelt fiatal levélszövetekben látványosan megemelkedett az "ageing specific" (korspecifikus) nukleáz aktivitás (Udvardy és Farkas 1972). A búza csíranövény különböző szerveiben egyformán megtalálható a nukleáz I., beleértve a gyökeret is. Ugyanakkor előzetes kísérletek arra utalnak, hogy ABA kezelt levélszövetekben megemelkedett nukleáz szint nem volt kimutatható az ugyanúgy kezelt gyökérszövetekben (Sivók és mts. 1977).

Célkitűzések.

Kísérleteinkben jól karakterizálható búzagyökér kallusz tenyészetek fenntartása és szaporítása különböző növekedési faktorok jelenlétében.

Az α -naftil-ecetsav, 2,4,5-triklórfenoxi-ecetsav és 3,6-diklór-o-ánizssav növekedési faktorok optimális koncentrációjának beállítása a kallusz tenyészet súlygyarapodásában.

A különböző koncentrációban használt növekedési faktorok által okozott nukleolitikus enzimváltozások (RNáz, den.DNáz, PMáz, PDáz) vizsgálata.

A súlygyarapodás és azzal összefüggő nukleolitikus enzimek változásának pozitív, negatív korrelációs vizsgálata.

Abszcizinsav hormonkezelt gyökércsúcsokban történő nukleolitikus enzimaktivitás változások vizsgálata. Nukleáz I kitisztítása és karakterizálása gyökércsúcsból, valamint az eredmények összehasonlítása a levelekből kitisztított ABA hormonindukált Nukleáz I-gyel.

MÓDSZEREK

KALLUSZ-TENYÉSZETEK KÉSZÍTÉSE

Triticum aestivum gyökércsúcsokat használtunk fel kallusz képzésre. Dudits és mts. (1975) által leírt médium T-t használtunk a szövettenyésztésre, amelyet kiegészítettünk 20 g/l szacharóz és 6 g/l oxoid agar hozzáadásával. A kísérletekhez különböző koncentrációjú növekedési faktorokat használtunk: α -naftilecetsav (NAA), 2,4,5-triklórfenoxi-ecetsav (2,4,5-T) és 3,6-diklór-o-ánizssav (Dicamba). Iniciáció után 6 héttel gyűjtöttük össze a primér kallusz szöveteket és -25 °C-on tároltuk a kísérletekig.

ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSEK

A lefagyasztott primer kallusz szöveteket hideg, 0,1 %-os aszkorbinsavat tartalmazó 10-szeres mennyiségű 0,05 M pH 7,5 Tris-HCl pufferrel extraháltuk az enzimaktivitások meghatározásához.

Ribonukleáz (RNáz)

Élesztő RNS-t használtunk szubsztrátként az enzimreakcióban. Az aktivitást a savoldható felszabadult bontástermékek abszorpciója alapján 260 nm-nél mértük (Wyen és mts. 1972).

Dezoxiribonukleáz (DNáz)

Natív és denaturált DNS-t használtunk szubsztrátként a reakcióban. Az eredményeket a savoldékony nukleinsav bontástermékeknek 260 nm-nél az abszorpcióban okozott változás alapján mértük (Wyen és mts. 1971).

Foszfomonoeszteráz (PMáz)

Szubsztrátként szintetikus p-nitrofenil foszfátot használtunk. A lehasított foszfor-sav maradék után felszabadult p-nitrofenol elnyelését mértük lúgos közegben 400 nm-nél (Udvardy és mts. 1970).

Foszfodiészteráz (PDáz)

Az enzimaktivitás mérése szintetikus bis-p-nitrofenil foszfáttal történt (bis-p-NPP). A reakció során az enzim elhasítja a foszfodiészter kötést és a szubsztrát elbomlik p-nitrofenil foszfátra (p-NPP) és p-nitrofenolra (p-NP). A felszabadult p-NP-t mérjük lúgos közegben 400 nm-nél. Reakciórendszer: 5 mM acetát puffer, pH 5,3, 3 μ M bis-p-NPP, 0,1-0,2 ml enzimkivonat. Össztérfogat 2 ml. A reakcióelegyet 40 percig inkubáltuk 37 °C-on, majd 0,3 N NaOH (1 ml) leállítottuk a reakciót. A reakciórendszer abszorpcióját 1 cm-es küvettában 400 nm-nél mértük.

3'- illetve 5'-nukleotidáz

Az enzimek a nukleotid monofoszfátok 3'-5' pozíciójú foszfátészter kötéseit hidrolizálják el. Reakciórendszer: 100 μ M Tris-HCl pH 7,5, 500 μ M 3'-AMP, illetve 5'-AMP, 20-100 μ l enzimtartalmú kivonat. Az össztérfogat 1 ml. 37 °C-on 40-60 percig inkubáltuk a rendszert, majd 1 ml 10 %-os TCA oldattal állítottuk le a reakciót. A felszabaduló foszfort Chen és mts. (1956) módszere alapján határoztuk meg. 10 perces szobahőmérsékleten való állás után 820 nm-nél mértük a kialakult kék színű komplex fényelnyelését.

Proteinmeghatározás

A protein koncentráció meghatározását a crude extraktból Lowry és mts-i (1951) által leírt módszer alapján végeztük. A tisztítás utolsó fázisaiban a fehérjeoldat koncentrációját A_{280} nm-nél mért abszorpció alapján számoltuk ki.

ENZIMTISZTÍTÁS

Sötétben, petricsészében csíráztatott búzanövényke 1 cm-es levágott gyökércsúcs darabjait használtuk fel a kísérletekhez.. Hormonkezelés során a gyökércsúcs darabokat vizes közegbe helyeztük (kontrol minták), valamint 10^{-5} M abszcizinsav (ABA) oldatba, erős levegőztetés jelenlétében 24 órán keresztül. Az így összegyűjtött mintegy 22 g gyökércsövet elhomogenizáltuk 0,05 M pH 7,5 Tris-HCl pufferrel, amely 0,1 % aszkorbin-savat tartalmazott. A homogenizátumot 40.000xg centrifugáltuk és a szupernatansból

80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ telítéssel kicsaptuk a proteint. 24 órás állás után a csapadékot lecentrifugáltuk, majd dializáltuk Tris-HCl pufferrel szemben.

DEAE oszlopkromatográfia

2x20 cm DEAE cellulózzal töltött 0,01 M pH 7,5 Tris-HCl pufferrel equilibrált oszlopra vittük fel a protein oldatot. Az eluálás 0-0,4 M lineáris NaCl oldattal történt. Az RNS és denaturált DNS bontó aktivitási csúchoz tartozó frakciókat összekombináltuk és dializáltuk.

Hidroxyapatit kromatográfia

A DEAE után összekombinált frakciókat 0,01 M pH 6,8 foszfát puffer jelenlétében dializáltuk, majd egy 2,5x10 cm hidroxyapatittal töltött oszlopra vittük a fehérjeoldatot. A felkötődött enzimfehérjéket egy pH 6,8 lineáris foszfátgrádienssel oldottuk le (0,01-0,3 M). Az enzimaktivitást tartalmazó frakciókat dializáltuk (foszforeltávolítás), majd lefagyaszttva tároltuk az enzim karakterizálásáig.

ENZIM KARAKTERIZÁLÁS

Endonukleolitikus bontás meghatározása

Az RNS-ből valamint a den.DNS-ből az enzimemésztés során felszabadult bontási végtermékeket Sephadex G-50 oszlopon választottuk el a molekulásúly megoszlás alapján. Az elválasztásra felhasznált aliquotokat különböző ideig történt hídolízis után vettük. Standardként gyári 3'-AMP-t használtunk.

Végtermékek frakcionálása lánchossz alapján

Szubsztrátként használt nagy molekulásúlyú RNS, valamint den.DNS hosszú idejű emésztéséből kapott különböző hosszúságú leemésztett oligonukleotid és dezoxi oligonukleotid láncokat anioncserélő DEAE oszlopon választottuk szét konkáv 0,01-1 M, pH 8,6 ammónium-hidrogén-karbonát grádiens segítségével (Staehelin 1961). A DEAE oszlopról első frakciók közé tartozó nukleozidokat és nukleotidokat két dimenziós papírkromatográfiával választottuk szét és azonosítottuk (Laskowski 1967).

3' és 5'-bontástípus

A tisztított nukleáz I. enzimmel leemésztett RNS és den.DNS-ből felszabadult és elválasztott oligonukleotid lánctöredékekből kiválasztottunk néhány jól definiált frakciót. Ezeket lúgos hidrolízisnek vetettük alá, majd a hidrolizátumban felszabadult mononukleotidokat prpírkromatográfiás módszerrel elválasztottuk és meghatároztuk.

Bázis specificitás végcsoport analízissel

A DEAE cellulózon konkáv grádienssel elválasztott és jól definiált oligonukleotid lánctöredéket lúggal hidrolizáltuk. A hidrolízis során felszabadult nukleozidokat Dowex 1x2 oszlopon választottuk szét "stepwise" elucióval (Georgatsos és Laskowski 1962).

Molekulasúly meghatározás

A tisztított enzim molekulasúlyát Sephadex G-100-on történő gélzúréssel határoztuk meg ismert molekulasúlyú fehérjék jelenlétében (Wyen és mts. 1971).

EREDMÉNYEK

A búza gyökércsúcsból előállított kallusz szövet gyarapodását az iniciálástól kezdve 6 hétig vizsgáltuk. A táptalajhoz különböző koncentrációba adtuk kiegészítőként a növekedési faktorokat. Az optimális hormonkoncentráció a kallusz szövetek súlygyarapodásában a 3,6-diklór-o-ánizsav (Dicamba) esetében 5×10^{-3} mM; 2,4,5-triklórfenoxi-ecetsav (2,4,5-T) esetében $2,5 \times 10^{-3}$ mM, valamint az α -naftil-ecetsav (NAA) esetében 4×10^{-2} mM volt. Abszolút értékben kifejezve a legnagyobb súlygyarapodást a kezelt kallusz szövetkultúrában az α -naftil-ecetsavval (NAA) kaptunk.

A különböző hormonkezelt kallusz szövetkultúrákban megvizsgáltuk a súlygyarapodás és a nukleinsav anyagcserében résztvevő enzimek (RNáz, DNáz, den.DNáz, PMáz és PDáz) specifikus enzimaktivitás változásainak összefüggéseit. Különböző koncentrációjú Dicamba kezeléssel (3×10^{-4} - 1×10^{-2} mM) kapott növekedési görbéhez hozzárendelt enzimaktivitás változások az RNáz, DNáz és den.DNáz esetében antiparallelek (ellentétes lefutásúak). Kevésbé hangsúlyozott, de alapvetően antiparalell tendenciát találtunk a foszfomonoeszteráz (PMáz), valamint a foszfodieszteráz (PDáz) specifikus aktivitás esetében is (Udvardy és mts. 1976).

Nem mutatható ki antiparalell kapcsolat a növekedés és az enzimszint között, amikor a kallusz szövettenyészethez 2,4,5-T (3×10^{-4} - 1×10^{-2} mM) illetve NAA (2×10^{-2} - 1×10^{-1} mM) növekedési faktort adtunk. Az RNáz és a DNáz specifikus aktivitása egyenesen csökken az egyre növekvő koncentrációban alkalmazott fent említett két hormon jelenlétében annak ellenére, hogy a különböző koncentrációban adott hormonok hatására a szöveti súlygyarapodás egy tipikus maximum görbét ad. A PMáz és PDáz aktivitások görbéi, valamint a különböző koncentrációban adott NAA és 2,4,5-T hormonok által okozott szöveti súlygyarapodást leíró maximum görbe közel megegyező, parallel lefutású. A kapott eredményekből levonható következtetések megerősítik azt a feltevést, hogy in vitro körülmények között intenzív primer szövetgyarapodás és egy csökkenő nukleáz enzim aktivitási szint között nem szükségszerű valamilyen korreláció.

Az eredmények összecsengenek korábbi megfigyelésekkel, ahol indolecetsavval serkenteni lehetett a kezelt növényi szervek növekedését (búza koleoptil, borsó szár), ugyanakkor az RNáz aktivitás szintje csökkenő tendenciát mutatott (Truelsen 1967). A 2,4,5-T és NAA-val kapcsolatos megfigyeléseink eredményei a fent említett összefüggések tükrében nem követik az általánosan levonható szabályszerűségeket. Ha csak a Dicamba kezelés eredményeit vesszük figyelembe, akkor könnyen ahhoz a hibás megállapításhoz juthatunk, amely alapján megerősíthető a korábbi közleményekben leírt RNáz szint és a kallusz növekedés közti antiparallel kapcsolat. A jelen eredmények még annak ellenére is érdekesnek tűnnek, hogy bizonyos kezelések hatására nem mutatható ki korreláció a kallusz növekedés és a szembetűnő nukleáz aktivitás változások között, míg más hormonok alkalmazása során negatív vagy pozitív összefüggés van a szövetgyarapodás és néhány enzim szintjének megváltozása között (Dicamba: RNáz és DNáz; 2,4,5-T: fosz-fomonoeszteráz, és foszfodieszteráz).

Összehasonlítva mindhárom növekedési faktoral végzett kísérlet eredményeit, nagy valószínűséggel úgy tűnik, hogy a szövetgyarapodás (kallusz és más szöveti kultúrák) összefügg számos másodlagos anyagcsere-folyamattal, amely paralell a növekedés trendjével. Amikor nincs közvetlen interferencia a fent említett másodlagos anyagcsere-folyamatok és a növekedési ütem között, a kapott eredmények egy pozitív korrelációt mutatnak. Ha egy növekedési faktor megváltoztatja az enzimnek a szintjét többé-kevésbé specifikus módon (pl. csökkenti), ilyen esetben a szövetnövekedés és az enzimszint közti nyilvánvaló korreláció eltűnik. Valószínűsíthető magyarázata az osztódó szöveti sejtek normál módon válaszolnak az eltérő koncentrációjú növekedési faktorok okozta hatások-ra még akkor is, ha az enzimek aktivitási szintje egyenletesen csökken a növekvő hormonkoncentráció függvényében. A fent említett összefüggések okozhatják az RNáz és DNáz specifikus aktivitás szintjének változásait a 2',4',5-T-vel kezelt kallusz szövetek növekedésében.

Búza gyökércsúcsból kitisztított nukleáz I. esetében 123-szoros tisztítási fokot értünk el. Az enzim elsősorban a den.DNS-t bontotta nagy intenzitással és csak kevésbé az RNS-t, illetve a natív DNS-t praktikusán nem bontotta. A tisztított enzim tartalmazott

3'-nukleotidázt, ugyanakkor 5'-nukleotidáz, foszfomonoeszteráz és foszfodieszteráz aktivitás nem volt kimutatható. Az enzim egy endonukleáznak bizonyult, amely 5'-nukleotidokat szabadít fel mind az RNS-ből, mind a den.DNS-ből. A szubsztrátok elnyújtott inkubálása során felszabadult oligo- illetve dezoxi oligonukleotid láncok végcsoport analízisének eredménye alapján az enzim egy relatíve adenin specifikus endonukleáznak bizonyult. Az enzimnek gélszűrőssel Sephadex G-100-on meghatározott molekulásúlya kb. 36.000.

A gyökérből kitisztított és karakterizált nukleáz Wilson (1975) osztályozása alapján "növényi nukleáz I.". Hasonló típusú "öregedés specifikus" nukleázt találtak a levelekben. Jellemző módon ez az enzim a szenescencia alatt a levelek szöveteiben nagy mennyiségben halmozódott fel. Az abszcizin savval öregített fiatal levél szövetekben a nukleáz I. enzim aktivitás szintje többszörösére emelkedett.

Kísérleteinkben 24 órás 10^{-5} M ABA kezelt gyökércsúcsokból mért nukleáz I. aktivitásában nem történt változás. Hasonló feltételek között ABA kezelt levélszövetekben az enzim aktivitása mintegy 5-10-szeresére megemelkedett 24 óra alatt, ugyanakkor más nukleolitikus enzimek aktivitásában nem történt számottevő változás (Udvardy és Farkas 1972). A különböző ABA koncentrációnál (10^{-4} - 10^{-7} M) mért nukleáz aktivitás úgyszintén nem változott a gyökérszövetekben, de ez igaz volt az összes RNS-t bontó aktivitással bíró enzimekre is, amelyek működését nyers kivonatból mértük.

Kísérleteink előtt néhány utalás létezett a szakirodalomban a növényi hormonoknak (magában foglalva az ABA-t) a nukleinsav lebontási anyagcserében résztvevő enzimek aktivitásszintjére gyakorolt hatásáról és csak egy esetben történt utalás az ABA kezelt gyökérszövetben az RNáz aktivitásának egy enyhe emelkedéséről (Pilet 1970).

A levelek vizsgálata során kapott számos eredmény, valamint a gyökérből származó néhány irodalmi adat alapján valószínűsíthető, hogy az abszcizinsavnak a hatása a nukleázok aktivitásának megváltozásában nem közvetlenül az enzimfehérjékre gyakorolt hatáson alapszik, hanem ezek a történések szervspecifikusak.

ÖSSZEFOGLALÁS

Búza gyökércsúcsokból készített kallusz kultúrákat szaporítottunk α -naftil-ecetsav (NAA), 2,4,5-triklorfenoxi-ecetsav (2,4,5-T), valamint 3,6-diklor-o-ánizssav (Dicamba) növekedési faktorok jelenlétében. A különböző növekedési faktorok optimális koncentrációja a kallusz szövet gyarapodásában NAA (4×10^{-2} mM), 2,4,5-T ($2,5 \times 10^{-3}$ mM), Dicamba (5×10^{-3} mM). A nukleolitikus enzimek közül az RNáz és DNáz aktivitás negatív korrelációt mutatott a Dicambával kezelt kallusz növekedéssel. NAA és 2,4,5-T kezelt gyökérkallusz tenyészetben ilyen összefüggést nem kaptunk az RNáz és DNáz esetében. Pozitív korreláció volt megfigyelhető a szövetgyarapodás és két enzim aktivitása között (foszfomonoeszteráz és foszfodieszteráz). Bizonyos enzimek esetében azok a változások, amikor az aktivitásuk csökken az emelkedő hormonkoncentráció függvényében, függetlenek a kallusz növekedés mértékétől.

A gyökércsúcsi szövetből tisztított RNáz esetében mintegy 123-szoros tisztasági fokot értünk el. A den.DNS-t és RNS-t egyaránt bontó enzim emellett 3'-nukleotidáz aktivitással is bírt. DNáz, PMáz, PDáz és 5'-nukleotidáz aktivitást nem tartalmazott. Egy adenilsav specifikus endonukleáz pH 5.0 optimummal, amely a bontás során 5'-nukleotidokat szabadít fel mind az RNS-ből, mind a den.DNS-ből. Az eredmények alapján a gyökérből tisztított enzim Wilson osztályozása alapján növényi nukleáz I. A növényi levelekből izolált abszcizinsav indukált nukleáz I-el szemben a gyökérszövetből tisztított nukleáz I. nem ABA függő.

IRODALOM

- Birnboim, J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 119: 198-200.
- Chen, P.S., T.Y. Toribara and H. Warner (1956) *Anal. Chem.* 28: 1756-1758.
- Cordis, G.A., P.J. Goldblatt and M.P. Dautscher (1975) *Biochemistry (Wash.)* 14: 2596-2698.
- Doolittle, F.W. and R.A. Singer (1974) *J. Bacteriol.* 119:677-683.
- Dove, L.D. (1973) *Phytochemistry* 12: 2561-2563.
- Dudits, D., G. Németh and Z. Haydu (1975) *Canad. J. Bot.* 53: 957-963.
- Georgatsos, J.G. and M. Sr, Laskowski (1962) *Biochemistry (Wash)* 1: 288-295.
- Gwózdź, E. (1973) *Acta Soc. Bot. Poloniae* 42: 493-506.
- Jones, R.L. (1973) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 571-594.
- Kratz, W.A. and J. Myers (1955) *Amer. J. Bot.* 42: 282-287.
- Lane, B.G., J. Diemer and C.A. Blashko (1963) *Can. J. Biochem. Physiol.* 41: 1927-1931.
- Laskowski, M. Sr. (1967) in *Methods in Enzymology* (Colovick, S.P. and N.O. Kaplan, eds.) 12/A: 281-304.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrongh, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Milborrow, B.V. (1974) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:259-283
- Nestle, M. and W.K. Roberts (1968) *Analyt. Biochem.* 22: 349-352.
- Norton, J. and J.S. Roth (1967/A) *Comp. Biochem. Physiol.* 23: 361-371.
- Norton, J. and J.S. Roth (1967/B) *J. Biol. Chem.* 242: 2029-2033.
- Pelroy, R.A., R. Rippka and R.Y. Stainer (1972) *Arch. Mikrobiol.* 87: 303-322.
- Pilet, P.E. (1970) *J. Exp. Bot.* 21: 446-451.

- Safferman, R.S., T.O. Dinner, P.R. Desjardins and M.E. Morris (1972) *Virology* 47: 105-113.
- Schopf, J.W. (1978) *Sci. Amer.* 239: 85-89.
- Singer, R.A. and W.F. Doolittle (1975) *Nature (London)* 253: 650-651.
- Staehelin, M. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 49: 11-19.
- Steward, F.C. (1970) *Roy. Soc. Proc. B.* 175: 1-5
- Steward, J. McD and C.L. Hsu (1977) *Physiol. Plant.* 37: 79-82
- Truelsen, T.A. (1967) *Physiol. Plant.* 20: 1112-1119.
- Udvardy, J. and G.L. Farkas (1972) *J. Exp. Bot.* 23: 914-920.
- Udvardy, J., E.Marre and G.L. Farkas (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 206: 392-403.
- Vetter, J. (1974): *Biochem. Physiol. Pflanzen* 165:114-118.
- Walters, T.L. and H.S. Loring (1966) *J. Biol. Chem.* 241: 2870-2875.
- Wilson, C.M. (1975) *Rev. Plant Physiol.* 26: 187-208.
- Wyen, N.V., J. Udvardy, S. Erdei and G.L. Farkas (1972) *Virology* 48: 337-339.
- Wyen, N.V., S.Erdei and G.L. Farkas (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 232: 472-483.

PUBLIKÁCIÓK

- Udvardy, J., B. Sivók and G. Német (1976) in Ribosomes and RNA Metabolism 2.
(Zelinka, J. and J. Balan eds.) pp. 409-418.
- Udvardy, J., B. Sivók, G. Borbély and G.L. Farkas (1976) J. Bacteriol. 126: 630-633.
- Udvardy, J., B. Sivók and G. Német (1976) Z. Pflanzenphysiol. 78: 33-40.
- Sivók, B., J. Udvardy, A. Balogh and G.L. Farkas (1977) Z. Pflanzenphysiol.
83: 327-333.
- Lehmann, J., W. Völkl, J. Udvardy, G. Borbély, B. Sivók and G.L. Farkas (1979)
Phytochemistry 18: 541-544.
- Sivók, B., M. Horváth and J. Udvardy (1981) Phytochemistry 20: 1223-1227.
- Sivók, B., G. Homor and M. Tóth (1982) in. Hazai természetes zeolitok kutatása és
felhasználása (Jánossy A. szerk.) pp. 257-267.
- Wong, L., B. Sivók, E. Kurucz, C.H. Sloop, P.S. Roeheim and B. Asztalos (1995)
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15: 1875-1881.

ELŐADÁSOK, POSZTEREK

- Udvardy, J., B. Sivók and G. Német (1976) Effect of Naphtylacetic Acid, 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid and 3,6-Dichloro-o-Anisic Acid on Nucleolytic Enzymes in Callus Cultures from Wheat Root.
Proceedings of the Second International Symposium on Ribosomes and Ribonucleic Acid Metabolism Organized by the Biological Institute Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Czechoslovakia.
- Farkas, G.L., J. Udvardy and B. Sivók (1976) Virus Induced DNase Activity Triggered in Light, Developed in Dark in *Anacystis nidulans*, an Obligate Photoautotroph. Meeting Organized in the Framework of the Multilateral Research Project of the Socialist Academies. Szeged, Hungary
- Sivók, B., J. Marton, M. Tóth, J. Rózsa and C.P. Keszthelyi (1980) Natural Zeolites as Feed Supplements: A Bacteriological, Enzymological and Histological Study. Second Chemical Congress of the North American Continent. 180th National Meeting of the American Chemical Society. San Francisco, USA
- Csonti, F., Á. Nagy, B. Sivók, J. Soós and M. Such (1981) Adatok a természetes zeolit-ásványkeverékekkel etetett broiler pecsenyecsirkék táplálkozás-biológiájához. Hazai természetes zeolitok kutatása és felhasználása szimpózium, Veszprém, Hungary
- Sivók, B., G. Homor and M. Tóth (1981) Természetes zeolitok, mint takarmánykiegészítők felhasználása: enzimológiai, szövettani és gazdaságossági vizsgálatok. Hazai természetes zeolitok kutatása és felhasználása szimpózium, Veszprém, Hungary

- Sivók, B., G. Homor and K. Soós (1990) Dephosphorylation of flavin mononucleotide (FMN) by 5'-nucleotidase from *Agaricus bisporus*.
7th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Umea, Sweden
- Sivók, B., K. Soós and G. Homor (1990) Comparison of activities of two ribonucleases isolated from basidiocarp of *Agaricus bisporus*
Fourth International Mycological Congress Regensburg, Germany
- Homor, G., K. Soós and B. Sivók (1990) Changes in enzymes activities in developmental stages and during post-harvest storage in *Agaricus bisporus*.
Fourth International Mycological Congress Regensburg, Germany
- Szalma, E., O. Zsíros, K. Soós and B. Sivók (1993) Germination of *Utricularia vulgaris* L. turions.
XV. International Botanical Congress Yokohama, Japan
- Sivók, B., T. Mészáros, K. Soós and G. Homor (1993) Ribonuclease activity in fruit bodies of *Pleurotus ostreatus* Fr. G-24 strain
XV. International Botanical Congress Yokohama, Japan

HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Borbély György hozzájárulok ahhoz, hogy Dr. Sivók Béla közös cikkeink eredményeit felhasználja a tudományos előmenetele során. Dr. Sivók Béla önálló, alkotó munkát végzett a publikált eredmények létrehozása során, eredményesen használta a Szegedi Biológiai Központ nyújtotta lehetőségeket.

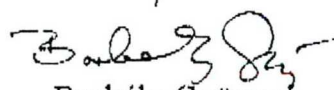
Közös munkáink a következők voltak:

Udvardy, J., Sivók, B., Borbély, G., Farkas, G.I. (1976) The formation in the dark of virus-induced deoxyribonuclease activity in *Anacystis nidulans*, an obligate photoautotroph. J. Bacteriol. 126. 630-633.

Lehmann, J., Völkl, W., Udvardy, J., Borbély, G., Sivók, B., Farkas, G.I. (1979) Characterization of a ribonuclease from *Anacystis nidulans* infected with cyanophage AS-1. 18. Phytochemistry, 541-544.

Dr. Sivók Béla, Dr. Udvardy János kolléga (jelenleg nyugdíjas) laboratóriumában dolgozott, aki a Szegedi Biológiai Központ Alga-vírus kutatócsoportjának tagja volt. Dr. Udvardy kollégával, az előbbieken felsorolt dolgozatokon kívül, más eltérő munkákban is alkotó módon tevékenykedett. A fentiekben említettek miatt nem látok sem elvi, sem gyakorlati akadályokat az eredmények felhasználásában.

Debrecen, 1997. márc. 10.

1

Borbély György

biol. tud. kandidátusa, csoportvezető

GYÖRGY BESSENYEI COLLEGE

City- Nyíregyháza,
Street- Sóstói 31/b
P.O.Box.166
HUNGARY 4401



Telephone:
Hu Code (42) International Code 36 (+36 42)
Switchboard: 402-488
Fax: 402-605
E-MAIL: balogha@ny1.bgytf.hu

FAX

TO: Dr. Sivók Béla
X NO: 62-310-953
FROM: Dr. Balogh Árpád
DATE: 97.02.27.
NUMBER OF PAGES: 1.
REMARKS:

Nyilatkozat

Alulírott Balogh Árpád kijelentem, hogy a Sivók Béla első szerzőjeként megjelent cikk -
Nuclease I. in wheat címmel Zeitschrift für Pflanzenphysiologie című folyóiratban - a szerző
saját eredménye és mint társszerző hozzájárulok ahhoz, hogy nevezett pályázati anyagaihoz
felhasználja.

Üdvözlettel:

Balogh Árpád

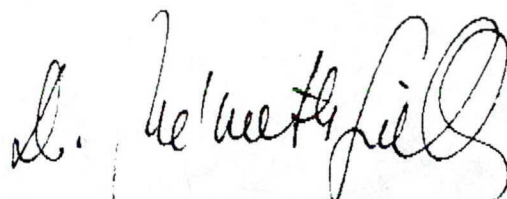
Nyíregyháza, 1997. február 27.

N Y I L A T K O Z A T

Alulírott, Dr. Németh Gizella (6723 Szeged, Debreceni u. 3/b.)
kijelentem, hogy az Udvardy, J., Sivók, B; and Németh, G.:
Effect of naphtylacetic acid, 2,4,5 - trichlorophenoxyacetic
acid and 3,6 - dichloro-ortho-anisic acid on nucleolytic
enzymes in callus cultures from wheat root. Z. Pflanzenphysiol.
1976, 78(1), pp.33-40

megjelentetett cikk a szerző saját eredménye, és mint társszer-
ző, hozzájárulok ahhoz, hogy Dr. Sivók Béla pályázati anyagához
e publikációt felhasználja. E cikkre kandidátusi tézisemben hi-
vatkoztam.

Szeged, 1997. április 21.



Dr. Németh Gizella
mg. tud. kand., tud. főmunkatárs,
osztályvezető