

DÍSS. B 1155

**Tradescantia albiflora levelekből tisztított  
foszfomonoceszteráz izoenzimek jellemzése**

**Doktori értekezés**

**Sivók Béla**

**biológus**

**József Attila Tudományegyetem Genetikai Csoport**

**és**

**Magyar Tudományos Akadémia Növényélettani Intézete**

**Szeged**

**Szeged**

**1974**

## T A R T A L O M J E G Y Z É K

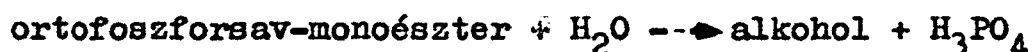
1.	BEVEZETÉS . . . . .	1 oldal
1.1.	A foszfomonoeszterázok általános jellemzése és előfordulásuk . . . . .	1 "
1.2.	Felosztásuk . . . . .	5 "
1.3.	Hatásmechanizmus . . . . .	6 "
1.4.	Élettani szerepük . . . . .	7 "
1.5.	Regulációjuk és lokalizációjuk . . . . .	9 "
1.6.	Foszfomonoeszteráz izoenzimek . . . . .	12 "
2.	ANYAG ÉS MÓDSZER . . . . .	17 "
2.1.	Növényanyag és vegyszerek . . . . .	17 "
2.2.	Nyers kivonat előállítása és az enzimaktivitás meghatározása . . . . .	18 "
2.3.	Az enzimaktivitás egységei . . . . .	20 "
2.4.	Az oldható fehérje meghatározása . . . . .	20 "
2.5.	Enzimmtisztítás . . . . .	21 "
3.	KISÉRLETI RÉSZ . . . . .	27 "
3.1.	Előkísérletek nyers kivonatból . . . . .	27 "
3.2.	Enzimaktivitás megoszlása a részecske frakcióban és az oldható fázisban . . . . .	32 "
3.3.	Az enzimmtisztítás eredményei . . . . .	34 "
3.4.	Az enzimek karakterizálása . . . . .	37 "

3.4.1.	pH optimum . . . . .	37 oldal
3.4.2.	pH stabilitási vizsgálatok . . . . .	38 "
3.4.3.	Hőérzékenység vizsgálata . . . . .	39 "
3.4.4.	Tárolás alatti stabilitás . . . . .	40 "
3.4.5.	Különböző iónok és EDTA hatása . . . . .	41 "
3.4.6.	Egyéb vegyületek hatása . . . . .	44 "
3.4.7.	Az enzimek szubsztrátspecificitása . . . . .	45 "
3.4.8.	Ciklusos mononukleotidok hatása . . . . .	50 "
4.	MEGVITATÁS . . . . .	54 "
5.	ÖSSZEFOGLALÁS . . . . .	58 "
6.	FELHASZNÁLT IRODALOM . . . . .	60 "

## 1. B E V E Z E T É S

### 1.1. A foszfomonoeszterázok általános jellemzése és előfordulása

A számos élő szervezetből izolált savas foszfátázok /ortofoszforsav-monoeszter-foszfahidroláz E.C. 3.1.3.2/ olyan különálló enzimsoportot képeznek, melyek a foszforsavnak különböző vegyületekkel alkotott monoeszter kötéseit hidrolizálják. Cukorfoszfátok mellett zömmel bontják a nukleotid és nukleozidfoszfátokat továbbá az anorganikus pirofoszfát kötéseket is. A nukleotid-3' és 5'-monoeszter kötéseket egyaránt hidrolizálják, tehát a kötéstípust illetően nem specifikusak. Általános reakciósémájuk:



Az első foszfátészter kötést bontó enzimek felfedezése óta mintegy 50 év telt el. Az elmúlt időszak alatt mégis viszonylag kevés összefoglaló értekezés jelent meg erről az enzimsoportról /Schmidt, 1961; Stadtman, 1961; Bernardi, 1966; Torriani, 1966; Hollander, 1971/. Részletesebb kutatásuk az 50-es évek elejétől a nukleinsavak szerkezetének tanulmányozásával kezdődik. Egyéb nukleinsavbontó enzimek /nukleázok/ izolálása és karakterizálása mellett lázas kutatómunka folyt

olyan specifikus foszfatázok felderítésére is, amelyek különbséget tesznek az 5' és 3'-foszfomonoészterek bontásában. Ennek során az élő szervezetekből különböző ortofoszfatészterek hidrolizisét katalizáló számos monoeszterázt irtak le. Nem törekedve teljességre az I. táblázatban néhány nem növényi savas foszfatáz forrását és szerzőjét közöljük.

A növényi foszfomonoeszterázok mélyrehatóbb tanulmányozása az 50-es évek végén indult meg. Az eltelt mintegy másfél évtized alatt számos növényi szövetből izoláltak és tisztítottak foszfatázokat. Néhány jelentősebb adatot a II. táblázat tüntet fel.

A növényi foszfatázok közös jellemzője, hogy jól körülhatárolható savas tartományban /pH 4 - pH 6/ fejtik ki optimális hatásukat. Hőlabilisak és általában nem kívánnak egy és kétértékű ionokat működésükhöz. Nem szubszt-rát specifikusak, a legkülönbözőbb foszfátésztereket csekély különbséggel bontják. Egy-két kivételtől eltekintve /Staples és Stahmann, 1964/ eddig növényi szövetekben lugos pH tartományban működő foszfomonoeszterázt nem irtak le. Megjegyzendő, hogy hasonló a helyzet egyéb növényi nukleázok /foszfodieszteráz, ribonukleáz, deoxiribonukleáz/ esetében is. Ez valószínűleg a növényi szövetnek az állati szövetektől eltérő fiziológiai állapotával /szerves savak nagy mennyisége, fehérjék savas izoelektromos pontja/ magyarázható.

I. táblázat

Savas foszfatázok előfordulása az állati szövetekben és  
mikroszervezetekben

Eredet	Szerző
<u>Mikrobiális</u>	
Neurospora crassa	Kuo és Blumenthal, 1961 Hochberg és Sargent, 1973
Saccharomyces sp.	McLellan és Lampen, 1963
Escherichia coli	Rogers és Reithel, 1960 Hofsten és Porath, 1961
Staphylococcus sp.	Malveaux és San Clemente, 1969
<u>Insecta</u>	
Drosophila sp.	MacIntyre és Dean, 1967
<u>Állati</u>	
tej	Bingham és Zittle, 1963
Vese	Pla et al., 1968
máj	Arsenis és Touster, 1968
fibroblast szövet- kultura	Magnusson, 1971
elektromos szerv	Hargreaves et al., 1964
lép	Chersi et al., 1966
<u>Emberi</u>	
placenta	DiPietro és Zengerle, 1967
erythrocyta	Georgatsos, 1965
prosztata	Ostrowski és Rybarska, 1965

II. táblázat

Savas foszfatázok előfordulása növényi szövetekben

Eredet	Szerző
árpalevél	Wyen et al., 1971
batátagumó	Uehara et al., 1971
borsólevél	Forti et al., 1962
	Pierpoint, 1957/a
csirázó borsó	Pierpoint, 1957/b
burgonyagumó	Bieleski, 1963
buzalevél	Roberts, 1956
csirázó buza	Joyce és Grisolia, 1960
Phaseolus mungo	
csiranövény	Felenbok, 1970
szójaliszt	Mayer et al., 1961
csirázó törpebab	Roussos, 1962
dohánylevél	Shaw, 1966
Enteromorpha sp.	Yamamoto, 1972
földimogyoró sziklelevél	Duda et al., 1966
Lupinus albus	Newmark és Wenger, 1960
éretlen paradicsom	Baker és Takeo, 1973
rizskalász	Ikawa et al., 1964
salátamagvak	Meyer et al., 1971
spenótlevél	Forti, 1961
tealevél	Tirimanna, 1967

## 1.2. Felosztásuk

A különböző foszfomonoésztereket bontó enzimeket a nemzetközi enzimnomenklatura szerint két nagy csoportba tagolják.

1. Specifikus foszfatázok,
2. Nem specifikus foszfatázok

A specifikus foszfatázokat szubsztrátspecificitásuk alapján csoportosítjuk. Eszerint megkülönböztetünk 3'-, és 5'-nukleotidázokat, melyek a nukleotidok végálló foszforsav kötéseit hasítják /Drummond és Yamamoto, 1971; Heppel, 1961/. Működésük a nukleotid "poolok" szintjének kialakításában lehet jelentős. A cukorfoszfatázok a különböző cukorfoszfát észtereket hidrolizálják /Nordlie, 1971; Pontremoli és Horecker, 1971/. Szerepük a légzési anyagcserében fontos. Végezetül az anorganikus pirofoszfatázok, melyek a szervetlen foszforkötések bontására specializáltak /Josse és Wong, 1971; Butler, 1971; Kunitz és Robbins, 1961/.

A nem specifikus foszfatázokhoz az első fejezetben felsorolt legkülönbözőbb szöveti eredetű enzimek tartoznak. Minthogy nem szubsztrátspecifikusak két alcsoportba történő bontásuk az egyik enzimológiai jelleg, a pH optimumuk alapján történhet. Így megkülönböztetünk alkalikus foszfomonoeszterázokat /E.C.3.1.3.1/, melyek 7 és 9 közötti pH tartományban fejtik ki optimális hatásukat /Fernley, 1971; Reid és Wilson, 1971/.



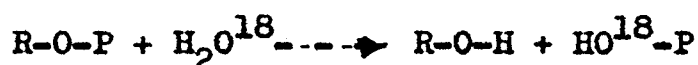
Savas foszfomonoeszterázokat /E.C.3.I.3.2/, melyek savas területen /pH 5 körül/ a leghatékonyabbak. A növényi foszfatázok pH optimuma kizárólag savas. Ez az általánosítás némi megszorítással tovább bővíthető, amennyiben az állati szövetekből nyert enzimek zömmel alkalikus területen működnek. A mikroszervezetekből nyert készítmények viszont pH optimum tekintetében nem mutatnak kizárólagos jelleget. A két alcsoport enzimei olykor sok lényeges tulajdonságban meg is egyezhetnek, mint például hőérzékenység, inhibitorral szembeni viselkedés, stb. Nukleinsavszerkezeti vizsgálatokra a foszfatázok közül zömmel csak néhány jól karakterizált, standard enzimet használnak. Ilyen alkalikus foszfatázokat E. coliból, csirke gyomorból, marha gyomor nyálkahártyából savas foszfatázokat pedig buza csiranövényből, burgonyából állítottak elő. Ezek kereskedelmi úton könnyen beszerezhetők.

### 1.3. Hatásmechanizmus

A foszfomonoeszterázok által katalizált hidrolitikus reakció mechanizmusát számos összefoglaló taglalja /Schmidt, 1961; Stadtman, 1961; Reid és Wilson, 1971; Fernley, 1971; Hollender, 1971/.

Ezek eredményét röviden a következőképpen foglalthatjuk össze. A bontástípus jellegét radioizotópos ki-

sérletekkel bizonyították. Ezekben  $\text{H}_2\text{O}^{18}$  jelenlétében az enzimmel különböző típusu foszfát észtereket hidrolizáltak. Kiderült, hogy mind a lúgos, mind a savas területen működő foszfomonoeszterázok a kérdéses vegyületben az oxigén és a foszfor közötti kötéseket hasítják a következő egyenlet szerint:



Nem enzimatikusan savak jelenlétében is a  $-\text{C}-\overset{|}{\text{O}}\text{P}$  bontástípus megy végbe. A lúg-katalizált hidrolízis viszont a  $-\overset{|}{\text{C}}\text{O}-\text{P}$  bontástípusnak kedvez.

#### 1.4. Élettani szerepük

A nem specifikus foszfomonoeszterázok élettani szerepéről ismereteink elég hiányosak. Ez elsősorban a növényi eredetű enzimekre vonatkozik. Mikrobiális és állati szinten nyert adatok zömét a közvetlen gyakorlat szolgáltatta.

Igy ujabban a klinikai vizsgálatok homlokterébe került a foszfomonoeszterázok szerepe néhány patológias folyamatban. Angolkór ill. csontelváltozások esetében pl. a vérplazma foszfátáz szintjének abnormális emelkedése volt megfigyelhető /Cantarow és Trumper, 1955/. A prosztatara káros megbetegedését is a savas foszfomonoeszteráz aktivitásának növekedése kísérte. Bár a jelenség biológiai értelmezése még vitatott,

emberben és kutyában az epevezeték általános elzáródására is a nem specifikus foszfomonoeszterázok nagy mérvű aktiválódása a jellemző.

A savas foszfatázok kétségtelen szerepét derítették ki a csontképződés során, ahol az enzim a végtermék /Pi/ fokozása által teszi lehetővé a kristálynövekedést /Fleisch et al., 1966/. A megcsontosodási folyamat teljes megértéséhez azonban még más tényezők szerepének ismerete is szükségesnek tűnik. Vannak magas foszfatáz aktivitással rendelkező szövetek /bél, vese, méh/, melyek normális körülmények között nem meszesednek el. Más foszfatáz-hiányos szöveteknél /aorta/ viszont történik elmeszesedés.

A foszfatázoknak a tápanyagtranszportban betöltött szerepére néhány utalás történt az utóbbi időben. Egyes magas foszfatáz szintű szövetekben a kötött állapotú foszfatázok zöme nagy abszorpciós felületekhez lokalizálódik. E jelenség feltehetően bizonyos szereppel bír a tápanyagoknak az epithelium membránján keresztüli transzportjában. Szénhidrátok felvételekor a plazma foszfomonoeszteráz szintjében határozott emelkedés mutatható ki. Zsírok felvétele a béltraktus foszfatáz aktivitásában okoz növekedést, mely később a nyirokvezetékben is kimutatható.

A tárgyalt enzimesoportnak a növényi szövetekben betöltött szerepét illetően csak néhány adat áll rendelkezésre.

kezésre. Az utóbbi évek kísérletei arra utalnak, hogy a növényi foszfatázok fontos szerepet töltenek be a raktározott tápanyagok mobilizálásában /Flinn és Smith, 1967/, a cukrok és más tápanyagok membránokon keresztüli aktiv transzportjában /Figier, 1968/, a plasztiszok differenciálódásában /Mlodianowski, 1972/ és az öregedési folyamatokban /De Leo és Sacher, 1970/. Verjee /1969/ vizsgálatai feltételezik, hogy a piridoxál-5-foszfát hidrolizisében résztvevő foszfatázoknak regulációs szerepe lehet azon enzimek működésének szabályozásában, melyek koenzimként az előbbi vegyületet igénylik.

#### 1.5. Regulációjuk és lokalizációjuk

A foszfomonoeszterázok regulációját illetően a mikrobiális és az állati szövetek területén elég nagyszámú adat áll rendelkezésünkre. A genetikai szabályozás jelentősége az emberi vörös vörsejtek savas foszfomonoeszteráz izoenzimeinek / A, BA, B, CA, CB, C, fenotípusok/ regulációjában az utóbbi években vált ismertté /Aebi, 1967/. Az izoenzim spektrumban kimutatott, bizonyos genetikai kombinációkban öröklődő különbségek idézik elő a vörös vörsejtek hypo - ill. hyperphosphatasia néven ismert betegségét. A hormonszabályozás alatt álló glükóz-6-foszfatáz hiánya a májban glükóz-tárolási rendellenességre jellemző patológiás tüneteket vált ki. Szintén hormonhatás játszik szerepet abban, hogy a pubertás korban sokkal ma-

gasabb a prosztata foszfomonoeszteráz szintje.

Mikroorganizmusokban a rendelkezésre álló tápanyagszint befolyásolhatja a foszfatázok mennyiségét. *Escherichia coli* /Torriani, 1960/, *Euglena gracilis* /Blum, 1965; Price, 1962; Summer és Blum, 1965/ és tengeri algák /Kuenzler és Perras, 1965; Kuenzler, 1966/ esetében az ortofoszfát limitáló koncentrációja a savas foszfatázok indukcióját idézte elő. Kilenc algafajnál a foszforhiány által előidézett növekedésgátlás az alkalikus foszfatázok aktivitását fokozta /Fitzgerald és Nelson, 1966/. Hasonló a helyzet néhány élesztőgomba faj esetében is /Schmidt et al., 1956/. Ezek az adatok egyértelműen feltételezik, hogy a mikroorganizmusok foszfatáz szintjének szabályozásában egyik lehetséges faktor a környezetben rendelkezésre álló anorganikus foszfát mennyisége. Ennek hiányában a szövetek foszfatáz szintje megemelkedik.

A magasabbrendű növényi szövetek specifikus foszfatáz szintje általában alacsony, de a nem specifikus savas foszfatáz aktivitásuk számottevő. Valószínűleg azonban az, hogy az utóbbiak normális körülmények között jelentékeny mennyiségű foszfátésztert bontanak el. A foszforhiány *Spirodellában* pl. mintegy 20-szoros foszfatáz aktiválódást idéz elő anélkül, hogy az endogén foszfátészterek mennyiségében vagy a radioaktív jelzéssel követett kinetikájában megfigyelhető változást okozna /Bieleski, 1966/. Így az enzim és a szubsztrát egy-

mástól elkülönülve kell, hogy lokalizálódjanak.

Állati sejtekben ezek a fermentek jól jellemzett sejszervecskében, a lizoszómában helyezkednek el. Növényi sejtekben nagy mennyiségük a vakuólumban található. A merisztematikus sejtekben azonban találunk két lizoszóma-szerű részecskét, a provakuólumot és a lipid-gazdag szferoszómát. A provakuólumok a sejtfejlődés korai szakaszában jelentkeznek. A fiatal sejtekben észlelt nagy membrán-kötött foszfatáz aktivitás vagy a diktioszómákban vagy az endoplazmatikus retikulum betüremkedéseihez lokalizálódott. Ezek a magas foszfatáz tartalmu képletek, végül is fuzionálva az érett sejtek vakuólumát képezik. Az ilyen sejtek foszfatáz aktivitásának zöme a vakuólumban, valószínűleg a membrán belső felén helyezkedik el és csak az öregedés folyamán jut a citoplazmába. Ezt speciális festési technikák mellett közvetlenebb módszerek is bizonyítják. Kukorica gyökerekből protoplasztokat és vakuólumokat izolálva és az enzimaktivitásukat összevetve kiderült, hogy más hidrolitikus enzimekkel együtt majdnem az összes foszfatáz aktivitás a vakuólumban lokalizálódik /Matile, 1966/.

A foszfát-hiányos szervezetekben az enzim a sejt különböző részeiben lokalizálódhat. Az előzőekben elmondtuk, hogy az *E. coli*, *Euglena* és élesztő esetében foszforhiány az enzim 5-50-szeres aktivitását indukálja. Ezt még kiegészíthetjük azzal, hogy a foszfatázszint

növekedése a külső sejtmembránon lokalizálódott új izoenzim megjelenésének volt tulajdonítható.

A foszforhiány magasabbrendű növényekben szintén megnöveli az enzim aktivitását /Hervitt és Tatham, 1960; Ueki és Sato, 1971/. Ebben az esetben az enzim lokalizációja valószínűleg olyan, hogy a sejten kívüli szubsztrát hozzáférhetővé válik számára. Foszfát a külső közegben is szabadulhat, általában azonban a sejt-falhoz vagy a plazmalemma külső feléhez kötődik. Az indukció új foszfát izoenzim megjelenését is jelenti, de még bizonytalan, hogy ez és az ún. külső foszfát azonosak-e?

#### 1.6. Foszfomonoeszteráz izoenzimek

Az izoenzim elnevezés egy fehérje /csoport/ olyan különböző molekuláris formáira utal, melyek közel azonos enzimspecificitással rendelkeznek. Ilyen értelemben ugyanazt az enzimreakciót katalizálják és tulajdonságaikban sok közel azonos vonás található, de a fehérjekémia és enzimológia módszereivel egymástól elkülöníthetők. Fehérje összetételben nagy hasonlóságot mutatnak, ugyanakkor eltérést is az olyan tulajdonságokban, melyeknek aktivitás szabályozás szempontjából van jelentőségük /Shannon, 1968/.

A foszfomonoeszteráz izoenzimek kvalitatív és kvantitatív előfordulása fajonként és szövetenként

változhat. Az első ilyen típusu enzimeket állati szövetekből irták le és izolálták. A III. táblázat 14 különböző emberi egyed sejtkulturában tényésztett szöveteknek izoenzim spektrumát foglalja össze /Hollander, 1971/.

### III. táblázat

#### Savas foszfatáz komponensek megoszlása 14 különböző emberi egyed szöveiben

Az arab számok a sajátos spektrumot képviselő egyedek számára vonatkoznak

Szövet	ABD	BD	AB	B	D
Szív	1	13	0	0	0
Csontváz-izom	3	10	0	0	1
Vese	13	1	0	0	0
Bőr	0	0	2	12	0
Máj	1	13	0	0	0
Hasnyálmirigy	0	1	0	0	13
Bél	1	13	0	0	0

A hét szövetben elektroforetikusan négy /A,B,C és D/ izoenzimet különítették el. Mint kitűnik az A B D spektrum a vesében; B D a májban, bélben, szívben és a csontváz-izomban; B a bőrben és D a hasnyálmirigyben fordul



elő elsősorban. A C komponens egyedül a méhszövetben volt található nagy mennyiségben. Mind a négy izoenzimet a D/+/-borkósav gátolta. Az A komponens sialinsavat tartalmazott, a D alacsonyabb pH optimummal tűnt ki és hőellenállóbb volt, mint az A, B, C. A C és D komponensek elektroforetikus tulajdonságai közel azonosnak mutatkozott.

Emberi vérből elektroforetikusan öt savas foszfatáz izoenzimet izoláltak. Ezek kvalitatív és kvantitatív megoszlását genetikailag meghatározottnak találták és a hat leggyakrabban előforduló fenotípusban ki is mutatták. Az izoenzimek relatív aktivitása azonosnak bizonyult egy sor vizsgált szubsztrát esetében. Jelentős különbség mutatkozott azonban közöttük az elektroforetikus mobilitást, inhibitorrezisztenciát és hőellenállóságot illetően.

A növényi foszfatáz komponensekre fehérjekémiai és enzimológiai tulajdonságaik közötti hasonlóságot és eltérést illetően az állati eredetű enzimeknél elmondottak szintén érvényesek. Szerepüket vizsgálva az élettani folyamatok különböző területeiről kaptak ismereteket. Foszfatázok megváltozása /enzimszint, aktivitás/ volt kimutatható a növekedési és fejlődési jelenségekben, a különböző regulációs mechanizmusokban, valamint a növényi betegségellenállóságban is /Staples és Stahmann, 1964; Staples et al., 1965; Yutaka és Matsunaka, 1965/.

A IV. táblázat a növényekből izolált izoenzimeket foglalja össze.

IV. táblázat

Savas foszfatáz komponensek előfordulása a növényi szövetekben

Növény	Módszer	Izo-enzimek száma	pH optimum	Szerző
batáta	ioncserélő kromatográf.	5	5-6	Asahi et al., 1967
árpa	gél-szűrés	5	5	Wyen et al., 1971
buza	ioncserélő kromatográf. +gél-elektroforézis	4	6	Foster és Weber, 1973
buza	ioncserélő kromatográf.	3	6	Verjee, 1968
mogyoró	ioncserélő kromatográf.	2	5	Duda et al., 1967
paradicsom	ioncserélő kromatográf. +gél-elektroforézis	2	5-6	Baker és Takeo, 1973
tea	ioncserélő kromatográf. + gél-elektroforézis	2	5-6	Baker és Takeo, 1973

Előkísérleteinkben néhány *Tradescantia* faj /*T. fluminensis*, *T. sillamontana*, *T. venezuelensis*, *T. albiflora albo-vitata*, *T. aureo albo-vitata*, *Zebrina pendula* és *Zebrina purpura*/ foszfátészter-bontó enzimeit vizsgáltuk meg. A család nagy földrajzi elterjedtsége és formagazdagsága a foszfomonoeszteráz enzimspektrumban is polimorfizmust sejtetett. Sephadex G-75 és Sephadex G-200 gélszűrők alkalmazása azonban csak egy-két enzim /csoport/ elkülönítését tette lehetővé ezekben a fajokban. Az enzimaktivitások azonban fajról-fajra igen változatos képet mutattak /Horváth és Sivók, 1973/. Az izoenzimek elkülönítését és mennyiségi kimutatásukat a család zömében előforduló polifenoltartalom és a változatos pigmentek igen megnehezítették.

Emiatt további kísérleti anyagként választásunk a zavaró anyagokban legszegényebb faj, a *Tradescantia albiflora albo-vitata*-ra esett. A következőkben a faj foszfátáz izoenzimeinek elkülönítésével és karakterizálásával kapcsolatos kísérletek eredményét vitatjuk meg.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1. Növényanyag és vegyszerek

Kísérleteinket a *Tradescantia albiflora* albivittata /Kunth/ levélszöveveivel végeztük. A leveleket méretre és elhelyezkedésre való tekintet nélkül véletlenszerűen gyűjtöttük. A vizsgálatokhoz desztillált vízzel mosott és  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt anyagot használtuk fel.

Vegyszereket illetően a felhasznált összes nukleotid [ adenzin-3-foszfát /3'-AMP/, adenzin-5-foszfát /5'-AMP/, guanozin-3-foszfát /3'-GMP/, guanozin-5-foszfát /5'-GMP/, citozin-3-foszfát /3'-CMP/, citozin-5-foszfát /5'-CMP/, uridin-3-foszfát /3'-UMP/, uridin-5-foszfát /5'-UMP/ ] a P.L. Laboratories, Milwaukee, Wisc. terméke volt. A p-nitrofenil-foszfát dinátrium sóját /p-NPP/, a bisz-p-nitrofenil-foszfátot /bis-p-NPP/, a ciklusos adenzin 3',-5'-monofoszfátot, a ciklusos adenzin 2',-3'-monofoszfátot /cAMP/, a ciklusos guanozin 2',-3'-monofoszfátot /cGMP/, a ciklusos citozin 2',-3'-monofoszfátot /cCMP/, és a ciklusos uridin 2',-3'-monofoszfátot /cUMP/ a Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. finomvegyzergyár állította elő. A DEAE-celulóz a Calbiochem, Los Angeles, Calif. terméke volt. Sephadex G-200 a Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, a marha szérum albumin /Cohn fr. V/ Serva, Heidelberg készítmény volt. A Folin-Ciocalteus reagenst a Merck

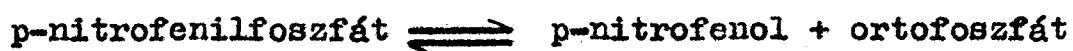
gyár, Darmstadt állította elő. A felhasznált többi REANAL vegyszer analitikai tisztaságu volt.

## 2.2. A nyers kivonat előállítása és az enzimaktivitás meghatározása

A mélyfagyasztott mintát hideg szobában /4 C°/ a szövet súlyának háromszorosát kitevő 0,5 %-os L-aszkorbinsavat tartalmazó 0,05 M pH 7,5-ös Tris-HCl pufferben kvarchomokkal dörzsmozsárban homogenizáltuk. A szuszpenziót négy rétegű gézen szűrtük át. A szűrletet 4 C°-on centrifugáltuk le./40.000xg, 30 perc/. A barnássárga színű tiszta felülusztót használtuk fel a további kísérletekhez. Ezt néhány esetben felhasználásig mélyfagyasztva tároltuk.

Az enzimaktivitás meghatározása a célnak megfelelően szintetikus és természetes szubsztráttal történt.

A szintetikus szubsztrát esetében a p-nitrofenilfoszfátból /p-NPP/ enzimatikusan felszabaduló p-nitrofenolnak /p-NP/ mint egyik végterméknek az abszorpcióját mértük 400 nm-en /Udvardy et al., 1969/. A reakció sémája:



Reakciórendszer: 5 mmol acetát-puffer /pH 5,5/; 2  $\mu$  mol p-NPP és 0,05-0,2 ml enzimtartalmu kivonat. Össztérfogat 2,0 ml. A rendszert 37 C°-on 20 percig inkubáltuk,

majd a reakciót 1 ml 0,3 N NaOH-oldattal állítottuk le. Nyers enzimkivonatokkal történő méréseknél a szuszpenziót centrifugáltuk /8000xg, 10'/. A felüluszó abszorpcióját Beckman DU-2 spektrofotométeren 1 cm-es küvettában 400 nm-nél határoztuk meg. Az összehasonlító oldat az inkubáció ideje alatt csak szubsztrátot tartalmazott. Az enzimkivonatot ehhez lugosítás után adtuk.

A természetes szubsztrát minőségében különböző cukor-, nukleotid- és nukleozidfoszfátokat használtunk. Az inkubációs rendszert Walters és Loring /1966/ eljárása alapján állítottuk össze és az enzimatikusan lehasadt ortofoszfát mennyiségét Chen et al. /1956/ mikromódszerével határoztuk meg.

Reakciórendszer: 5 mmol acetát-puffer /pH 5,5/, 1  $\mu$  mol szubsztrát és enzim. Össztérfogat 2,0 ml. Az inkubációs idő /37 C<sup>0</sup>, 40'/ eltelte után a felszabadult foszfor meghatározására a rendszerhez 6 ml molibdén-kénsav-aszkorbinsav elegyet adtunk /2,5 % NH<sub>4</sub>-molibdát: 6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 10 % aszkorbinsav : H<sub>2</sub>O; 1:1:1:2/. Az inkubációt további 90 percig folytattuk. Hűtés után a kialakult kék színű komplexet 1 cm-es küvettában 820 nm-nél Beckman DU-2 spektrofotométeren mértük. Az összehasonlító oldat az enzimes inkubáció /40'/ ideje alatt csak szubsztrátot tartalmazott. A hidrolizált ortofoszfát mennyiségét 1-5  $\mu$ g szervesetlen foszfort tartalmazó standard segítségével számítottuk ki.

### 2.3. Az enzimaktivitás egységei

A foszfomonoeszteráz aktivitás egysége olyan enzim mennyiséget jelöl, amely 1,0 O.D.<sub>400 nm</sub> abszorpció-növekedést idéz elő a kísérlet körülményei között. A specifikus aktivitás a tisztítás különböző szakaszaiban nyert 1 mg fehérjére számított enzimaktivitás egységet jelenti.

### 2.4. Az oldható-fehérje meghatározása

Az oldható összprotein mennyiségét Lowry et al. /1951/ alapján, kombinált Folin-Biuret reakcióval határoztuk meg. A minta fehérjetartalmát azonos térfogatú 10 %-os triklórecetsavval csaptuk le, majd ismételtelen mostuk /5 % TCA/ és centrifugáltuk /3000xg, 10'/. A csapadékot 4 ml 0,1 N NaOH-ban vízfürdőn történő 10 perces melegítéssel oldottuk fel.

Reakciórendszer: 0,5 ml fehérje-aliquot, 4 ml Biuret-reagens és 20 perc szobahőmérsékleten történő állás után 0,5 ml vízzel 1:1 arányban hígított Folin-reagens. A reakció kialakulása /30'/ után az abszorpciót 1 cm-es küvettában 680 nm-nél Beckman DU-2 spektrofotométeren határoztuk meg. A minta fehérjetartalmát marha szérumban albumin /Cohn fr. V./ egyenértékben fejeztük ki.

## 2.5. Enzimatisztítás

### Ammóniumszulfátos frakcionálás

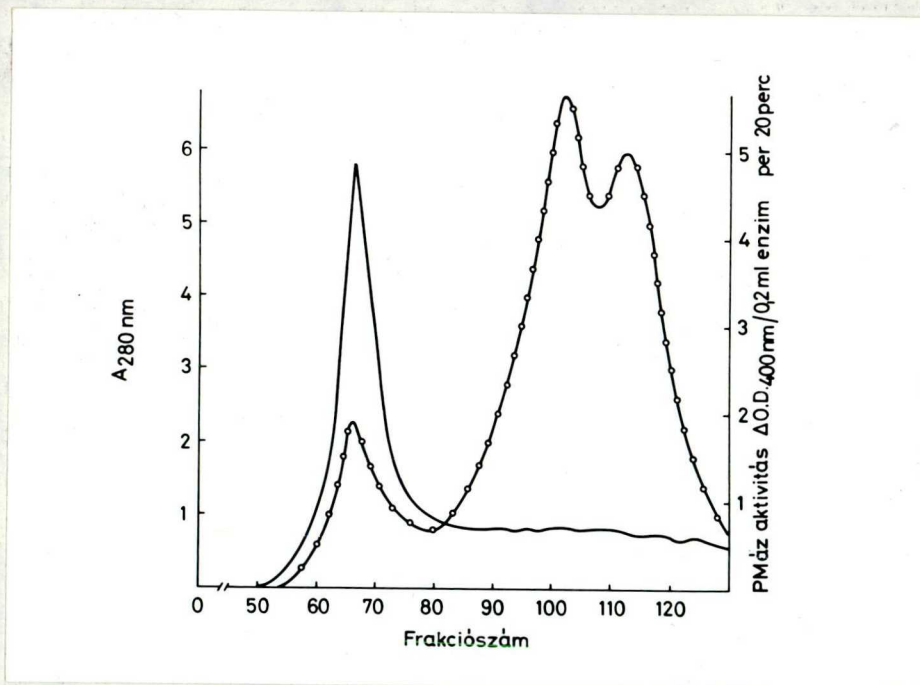
50 gr levélszövetet az előzőekben ismertetett módon homogenizáltunk és centrifugáltunk /40000xg, 30'/. Az enzimaktivitásnak a csapadékban és a felüluszóban történő megoszlásáról külön kísérletekben győződünk meg. Mint kiderült, az aktivitás zömét /85 %/ a felüluszó tartalmazta. Az enzimatisztításnak a következőkben ismertetendő sémája ebből az oldható fehérje frakcióból indult ki. A nyers kivonatot finomra porított ammóniumszulfáttal fokozatosan 35 %-ra telítettük és a rendszert hidegszobában 3 órát állni hagytuk, majd centrifugáltuk /8000xg, 30'/. A kapott csapadék nagy molekulásulju nukleinsavat és partikulumokat tartalmazott. Ezt eldobtuk. A felüluszóhoz 80 %-os telítettségig ismét ammóniumszulfátot adtunk és 12 órán át állni hagytuk. A csapadékot lecentrifugáltuk majd 3 ml 0,05 M pH 7,5-ös Tris-HCl pufferben feloldottuk és egy éjszaka át 5 liter 0,01 M pH 7,5-ös Tris-HCl pufferrel szemben dializáltuk. A dialízis után az oldhatatlan részecskéket centrifugálással távolítottuk el / 20000xg, 10'/.

### Gélszűrés

Az ammóniumszulfátos frakcionáláskor kapott fehérjefrakciót Sephadex G-200-on tisztítottuk tovább.



Ehhez 2,4 cm x 100 cm hosszúságú oszlopot használtunk /Wyen et al., 1971/. A géloszlopot egy éjszakán keresztül 0,01 M pH 7,5-ös Tris-HCl pufferrel equilibráltuk, majd az első tisztítási lépcsőben kapott fehérjeoldatot óvatosan a gél felszínére rétegeztük. Elució az előző pufferrel történt. A folyási sebesség értéke 18 ml/h volt. A 3 ml-es frakciókat LKB Frakciomat típusú készülékkel gyűjtöttük. A művelet során három enzimsucot kaptunk. A frakciók fehérje és enzimaktivitás megoszlását az 1. ábra mutatja.



1. ábra

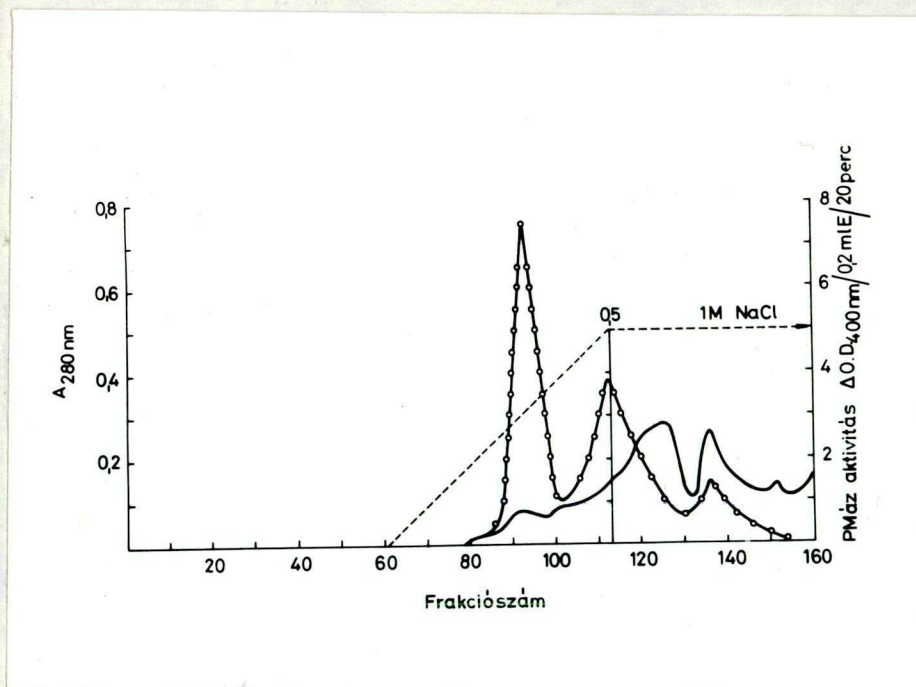
Ammóniumsulfáttal frakcionált *Tradescantia albiflora* nyers kivonatának gélszűrése Sephadex G-200-on

— protein 280 nm

- o-o-o - foszfo monoeszteráz aktivitás 400 nm

### Ioncserés kromatográfia

A gélszűrés után a második és harmadik enzimsucusnak megfelelő frakciókat /fr.: 85-107 és fr.: 108-125/ összeöntöttük és tovább analizáltuk. A DEAE-cellulózzal töltött oszlopra /2 cm x 20 cm/ felvitt enzimet lineáris NaCl gradienssel oldottuk le. Először 0-0,5 M NaCl koncentrációt alkalmaztunk, majd a második lépésben ezt 1 M-ra növeltük. A folyási sebesség 15 ml/h volt és 3 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. A fehérje és enzimprofil a 2. ábra tünteti fel.



2. ábra

A gélszűréssel nyert két foszfomonoeszteráz csucs DEAE-cellulózon történő együttes kromatografálása

— protein 280 nm

-o-o- foszfomonoeszteráz aktivitás 400 nm

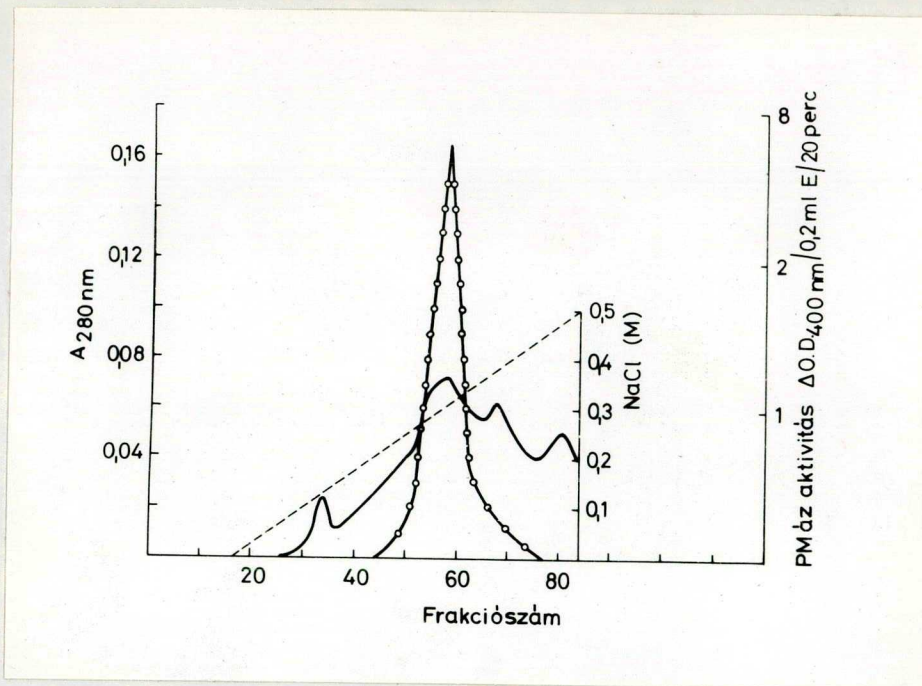
Mint látható három élesen elkülönülő foszfomonoeszteráz enzimcsucst kaptunk. A további tisztításhoz közülük az első és második csucs külön-külön összeöntött frakcióit /fr.: 89-97 és fr.: 105-125/ használtuk fel.

#### Az első enzimcsucs rekromatografálása

Az összeöntött frakciókat /fr.: 89-97/ a NaCl eltávolítása végett 0,01 M pH 7,5-ös Tris-HCl pufferrel szemben egy éjjelen át 4 C<sup>o</sup>-on dializáltuk. A dializátumot az előző lépésben megadott körülmények között DEAE-cellulózon rekromatografáltuk. Mint a 3. ábrán látható az enzim a harmadik tisztítási lépcsőben tapasztalt NaCl koncentrációnál oldódott le és homogénnek bizonyult. A frakcionálás során 174-szeres tisztasági fokot értünk el /VII. táblázat/.

#### A második enzimcsucs rekromatografálása

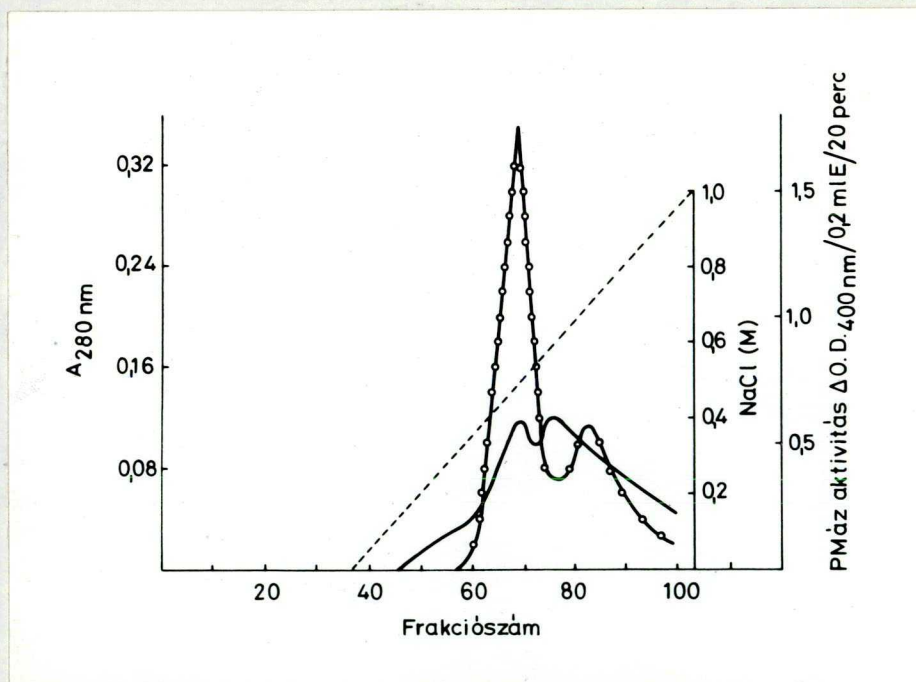
Az összeöntött frakciókat /fr.: 105-125/ az előzőekhez hasonlóan dializáltuk, majd DEAE-cellulóz oszlop-ra vittük. Az eluciót 0-1 M lineáris NaCl gradienssel megismételtük. A kapott fehérje és enzimprofil a 4. ábra tünteti fel. Az ismételt DEAE-cellulóz kromatográfia két enzimcsucst eredményezett, melyek közül a nagyobb aktivitású csucs frakcióit /fr.: 64-74/ gyűjtöttük össze. A tisztítás során 53-szoros tisztasági fokot értünk el /VII. táblázat/.



3. ábra

Az első foszfomonoeszteráz csucs /2. ábra/ rekromatografálása DEAE-cellulózon

— protein 280 nm  
-o-o- foszfomonoeszteráz aktivitás 400 nm



4. ábra

A második foszfomonoeszteráz csucs /2. ábra/ rekromatografálása DEAE-cellulózon

— protein 280 nm  
-o-o- foszfomonoeszteráz aktivitás 400 nm

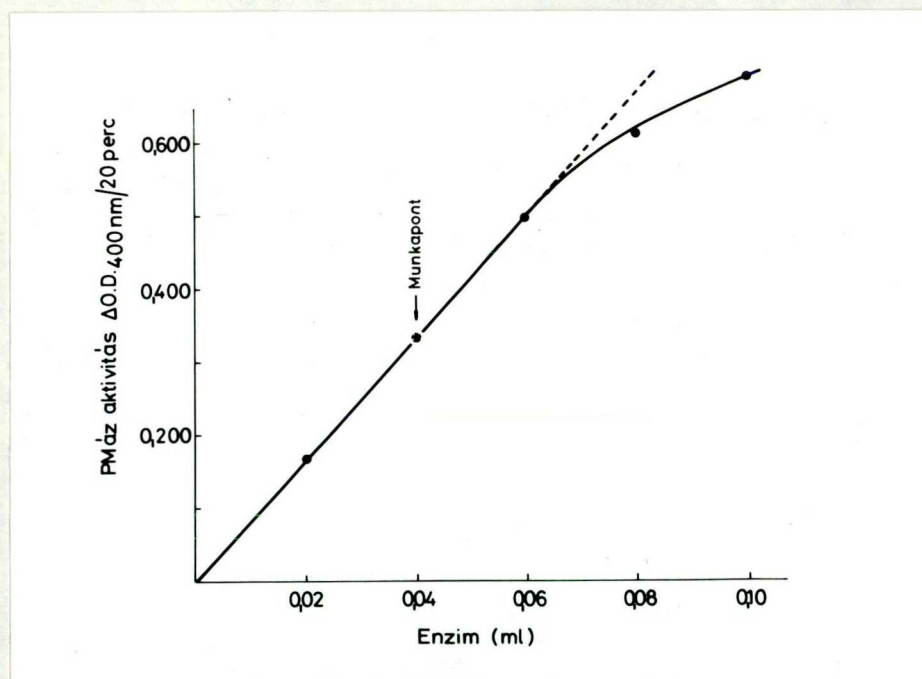
Mindkét enzim összeöntött frakciót /1. csucs fr.: 52-62; 2. csucs fr.: 62-73/ a NaCl eltávolítása végett 0,01 M pH 7,5-ös Tris-HCl pufferben 24 órán át dializáltuk. Ezután az oldatokat 2-3 ml-es részletekre bontva -20 C<sup>o</sup>-on, mélyhűtőben tároltuk. A következőkben ismertetendő összes kísérletet az ily módon tárolt készítménnyel végeztük.

### 3. KISÉRLETI RÉSZ

#### 3.1. Előkísérletek nyers kivonatból

##### Aktivitás az enzinkoncentráció függvényében

Az enzimitisztítás kezdetén a nyers kivonatban előzetes kísérletet végeztünk az enzim néhány tulajdonságát illetően. Minden enzimaktivitás mérésnek egyik alapfeltétele a reakció linearitása az enzim mennyiségének függvényében. Nyers kivonatban az esetek többségében ez a függőség csak szűk határok közt tapasztalható.



5. ábra

Aktivitás függése az enzinkoncentrációtól

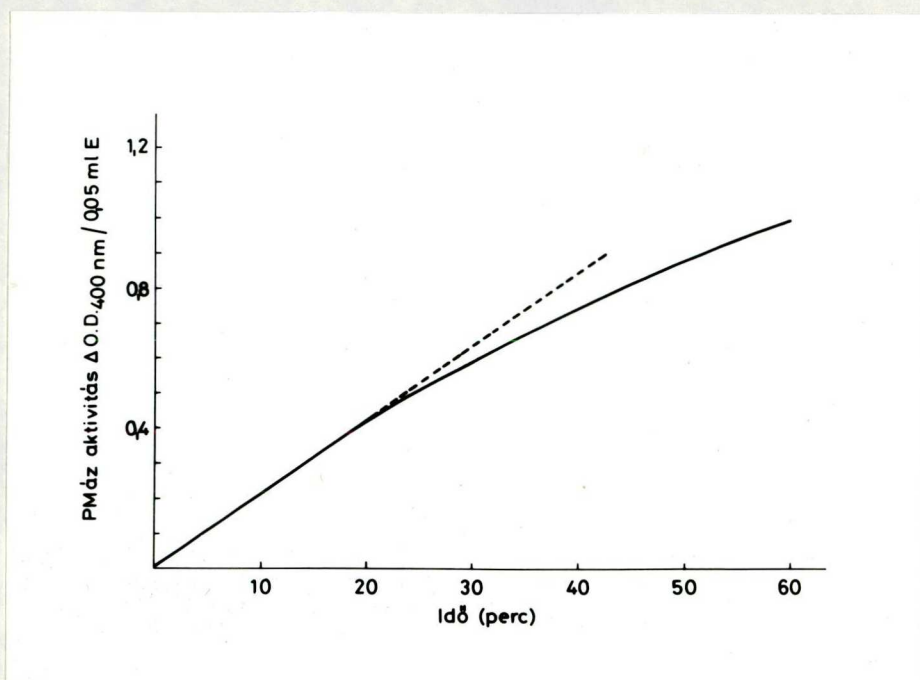
Standard aktivitásmérés, lásd: Anyag és Módszer.  
Enzim: nyers kivonat /18000xg, 10' felüluszó/.

Az 5. ábrán láthatjuk, hogy 0,06 ml enzim aliquotig az aktivitás arányosan változik az enzim koncentrációjával. Emelve az enzimmennyiségét a görbe ellaposodik. "Munkapontunknak" az egyenes közepének megfelelő enzimmennyiséget választottuk a továbbiakban.

#### Aktivitás és az idő összefüggése

Az aktivitás és az idő összefüggésének vizsgálata során arra törekedtünk, hogy a további kísérletekhez optimális időintervallumot használjunk az inkubálásra. Nyilvánvaló, hogy az egyéb reakciófeltételek /pH, ionerősség, aktivátorok, hőmérséklet/ optimumon tartása esetén is az adott rendszerben a reakciósebességet a szubsztrát és az enzim mennyiségi viszonyai döntik el. A 6. ábrán az e célra beállított kísérlet eredményeit tüntetjük fel. Ebben az aktivitásnak megfelelő  $O.D._{400}$  értékeket az idő függvényében ábrázoltuk.

Mint kitűnik 30' után a reakció már nem volt lineáris az idővel. Így a további rutimmunkában ennél kevesebb, 20 perces inkubációs időt és a módszertani részben leírt szubsztrátmennyiséget használtunk.



6. ábra

Az enzimaktivitás és az idő összefüggése

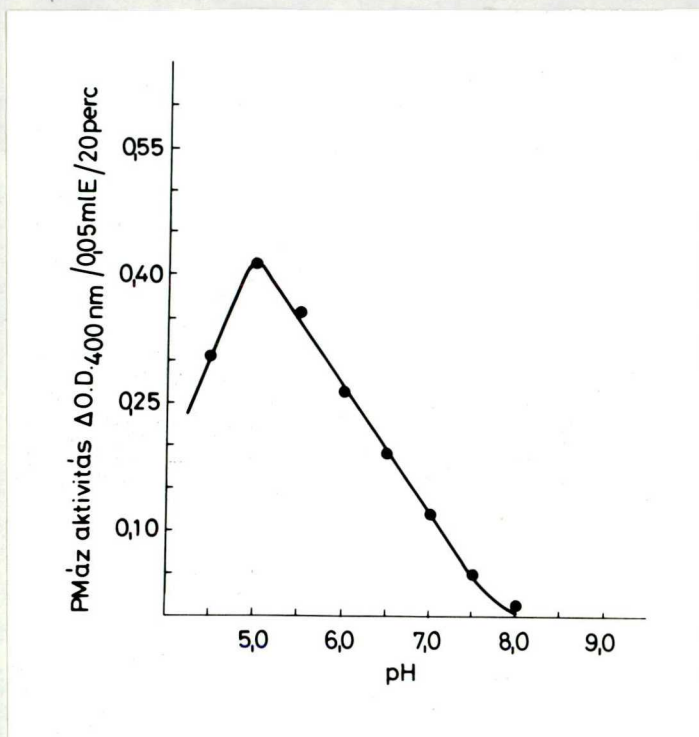
Standard aktivitásmérés. Enzim: 0,05 ml nyers kivonat /18000xg, 10' felüluszó/

#### pH optimum

Az enzimfehérjék katalitikus tulajdonságait a pH nagy mértékben módosítja. Ennek eredményeként az enzimek csak egy meghatározott pH tartományban képesek kifejteni optimális működésüket. Ez a pH igény feltehetően az enzim "aktív centrumában" lévő, a katalízisben résztvevő csoportok disszociációs tulajdonságaival hozható kapcsolatba. Az adott enzim pH optimumának meghatározásakor Tris-acetát puffer sorozatot használtunk



/pH 4,5-9,0/ és a kapott  $\Delta O.D._{400}$  értékeket a pH függvényében ábrázoltuk. A kísérlet eredményeit a 7. ábra tünteti fel.



7. ábra

#### Foszfomonoeszteráz pH optimuma

Standard aktivitásmérés. Enzim: 0,05 ml nyers kivonat /18000xg, 10' felüluszó/.

A pH 5,0-nál észlelt enzimaktivitás csucs egyértelműen savas foszfomonoeszteráz(ok) jelenlétére utal. Lúgos tartományban nem észleltünk enzimaktivitást.

#### Kísérletek az enzim stabilizálására

A nyers kivonatban lévő enzimek zöménél gyors inaktiválódás figyelhető meg. Ez többek között a növényi szövetek magas polifenol tartalmával hozható összefüggésbe. Igen sok növényi szövet eldörzsölésekor a kivonat

színe rövid időn belül megbarnul. A kivonatban jelen levő fenolok a proteinekhez először reverzibilis hidrogénhidkötésekkel kapcsolódnak, majd oxidálódás után irreverzibilis kötés jön létre. Ez a folyamat a fehérje katalitikus tulajdonságainak erős csökkenését idézi elő. Ez a *Tradescantia* szöveteknél is tapasztalható mellékhatás azonban a peptidokkal analóg felépítésű anyagoknak PVP /polivinil-pirrolidin/ és Polyclar AT /oldhatatlan polivinil-pirrolidin/ dörzsöléskor a kivonathoz történő adásával csökkenthető /Loomis, 1966/. Ilyenkor a fenolok, illetve a fehérjék és a fehérje analógok között kompetíció alakul ki a védőanyag javára. A fenolok és proteinek között létrejövő komplexek ill. vegyületek kialakulásában bizonyos gátlást tudunk elérni redukálószer alkalmazásával is. A redukált fenolok nem képesek kovalens kötést létrehozni és az enzimefehérjét károsítani. A *Tradescantiával* végzett ilyen jellegű kísérleteink eredményét az V. táblázat tünteti fel.

A táblázatból kitűnik, hogy a kontrolhoz képest a 0,5 % L-aszkorbinsav és az 0,1 % cisztein emelte az aktivitást. A 2-merkaptoetanol enyhe gátlónak bizonyult. A cisztein és káliummetabiszulfid együttes adagolása pedig mintegy 40 % aktivitás csökkenést okozott. Az eredmények alapján a kivonó pufferhez minden esetben 0,5 % L-aszkorbinsavat tettünk.

V. táblázat

Néhány redukálószer hatása a Tradescantia albiflora  
nyers kivonatának foszfomonoeszteráz aktivitására

A kivonás körülményei az Anyag és Módszertani résznél közöltekkel azonosak. Standard aktivitás mérés.  
Enzim: 0,05 ml nyers kivonat /18000xg, 10' felüluszó/

Vegyületek	O.D. 400 nm/ 0,05 ml E/ 20'	%
Kontrol	1,446	100
0,5 % L-aszkorbinsav	1,920	133,3
2 mM 2-merkaptoetanol	1,215	84,3
0,1 % cisztein	1,545	107,2
0,1 % cisztein + 2 mM k-metabiszulfid	0,840	58,3

3.2. Enzimaktivitás megoszlása a részecske frakcióban  
és az oldható fázisban

A további kísérleteinkben szükség volt olyan támpontra, amely utmutatást ad az enzim megoszlására a sejt részecske komponenseiben és az oldható fázisban. E célból az eldörzsölt levélszuszenziót először 500xg 30 percig centrifugáltuk. A művelet során a kvarchomoktól és nagyobb méretű roncsolt szöveti részekről szabadultunk meg. Az így kapott összes részecske frakciót és oldható fázist tartalmazó felüluszó foszfomonoeszteráz

aktivitását tekintettük 100 %-nak. Ezt 40000 x g-nél 30 percig centrifugáltuk. A kapott üledék sejtkomponensekre nézve sejtmagot, mitokondriumot, kloroplasztiszt és esetleg nagyobb membrán töredéket tartalmazott. A felüluszó a riboszómákat és mikroszómákat tartalmazta. Az enzimaktivitásoknak e két fázisában történő vizsgálatakor kiderült, hogy a riboszómát és mikroszómát tartalmazó oldható fázis /40000xg felüluszó/ az aktivitás túlnyomó részét /85 %/ tartalmazza. 40000 x g-vel ülepitett frakcióban csak elhanyagolható aktivitást tapasztaltunk. Így a sejt alakos elemeihez kötött enzimek kinyerésére használatos módszerek alkalmazására nem volt szükség /VI. táblázat/.

VI. táblázat

A nyers kivonat enzim megoszlása a részecske frakcióban és az oldható fázisban

A kivonás körülményei az Anyag és Módszertani résznél közöltekkel azonosak. Standard aktivitás mérés.  
Enzim: 0,05 ml nyers kivonat.

Frakció	Össz-aktivitás / O.D. 400nm/ 20 perc/	%
Nyers kivonat /500xg, 30 perc, felüluszó/	3186,54	100
40000xg, 30 perc csapadék	153,12	4,8
40000xg, 30 perc felüluszó	2709,54	85,6

Az eredmények tehát arra utalnak, hogy az általunk vizsgált savas foszfomoeszteráz zöme nem partikulumhoz kötött, hanem oldható enzim.

### 3.3. Enzimmtisztítás eredményei

A módszertani részben ismertetett enzimmtisztítás a nyers kivonat 18000 x g, 30 perces felüluszójából indult ki. Az első tisztítási lépcsőben 0-35 % és 35-80 % ammóniumszulfátos kicsapást alkalmaztunk. Az utóbbi lépés a kiinduló anyaghoz képest 2.2-szeres enzimfehérje feloldulást eredményezett. A nyert fehérjefrakciót Sephadex G-200-as molekulaszűrőre vittük. A gélkromatográfia eredményeként három egymástól jól elkülöníthető enzimfrakciót nyertünk /1. ábra/. Az első csucs feltehetően foszfomoeszteráz is tartalmazó proteínaggregátum. A 2. és 3. csucs elég közel van egymáshoz. Ez a két enzim nem nagy molekulásuly különbségére enged következtetni. A gélszűrés mintegy 20-szoros enzimmtisztulást és 80 % kitermelést eredményezett /1. ábra; VII. táblázat/.

A továbbiakban a 2. és 3. csucs összeöntött frakcióit vittük ioncserélő oszlopra. A 0-0,5 M és 1 M-os lineáris NaCl gradiens a DEAE-cellulóz oszlopról három foszfomoeszteráz aktivitás elucióját idézte elő /2. ábra/. Tisztasági fokok 140, 47, 6-szorosoknak bizo-

nyultak az elució sorrendjében. Az enzimkitermelés ugyanilyen sorrendben 21, 18 és 2 %-nak adódott. Mint a 2. ábrából kitűnik az első foszfomonoeszteráz aktivitás zöme 0,3 M a másodiké 0,55 M NaCl koncentráció-nál oldódott le az oszlopról. E két enzim megfelelő frakcióit dialízis után ismételt DEAE-cellulóz kromatográfiának vetettük alá. A kapott eluciók profilokat a 3. és 4. ábra tünteti fel. Az egész tisztítási eljárásra vonatkozó eredményeket a VII. táblázat foglalja össze.

Mint kitűnik az öt lépcsőben végzett eljárás vég-ső fokon 174 ill. 54-szeres enzimtisztasági fokot eredményezett mintegy 10 %-os kitermeléssel. Az ily módon nyert két enzimet dialízis után részletekre vontva -16 C°-on tároltuk. Megjegyezzük, hogy a további kísérletekben az első foszfomonoeszteráz-csucs frakcióit konzekvensen PMáze-1, a másodikat pedig PMáze-2 elnevezéssel jelöljük.

## VII. táblázat

Savas foszfo monoesteráz tisztítása Tradescantia albiflora levélszövetből

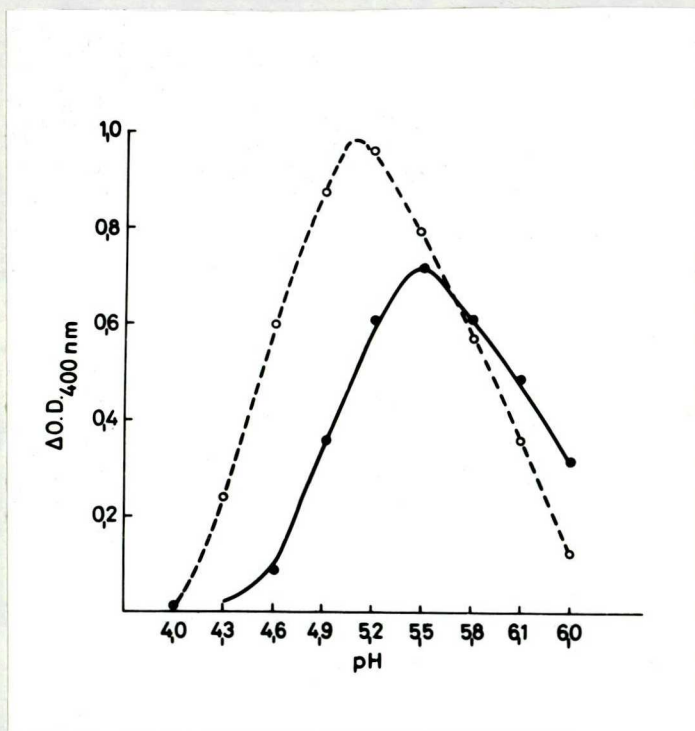
<sup>+</sup>1 enzim-egység: 1  $\Delta$  O.D.<sub>400 nm</sub>/20 perc<sup>++</sup>50 gr Tradescantia albiflora levélszövetéből preparált

Frakció	Térfogat /ml/	PMáze akti- vitas /E-egység/ <sup>+</sup>	Össz fehérje /mg/	Specifikus aktivitas /E-egység/ mg. fe- hérje	Tiszti- tás foka	Kiterme- lési %
Nyers kivonat <sup>++</sup>	134,5	4480	660	6,78	1	100
/NH <sub>4</sub> / <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> frakcionálás 35-80%-os telítés	8,0	4177	276	15,13	2,23	93
Sephadex G-200 fr.: 85-127	126,0	3508	25,1	139,80	20,60	78
Első DEAE-cellulóz						
1. csucs fr.: 89-97	24,0	942	1,0	942,0	140	21
2. csucs fr.: 105-125	60,0	797	2,5	318,8	47	17,8
3. csucs fr.: 133-145	36,0	56	1,5	37,3	5,5	1,2
Második DEAE-cellulóz						
1. csucs fr.: 52-62	30,0	471	0,4	1177,5	174	10,5
2. csucs fr.: 62-73	33,0	400	1,1	363,6	53,6	8,9

### 3.4. Az enzimek karakterizálása

#### 3.4.1. pH\_optimum

Az enzimek jellemzésének első lépéseként a reakció pH függőségét határoztuk meg /8. ábra/. Mint kitűnik p-NPP-al mint szubsztráttal, a PMáze-1 pH-optimuma 5,5-nek, a PMáze-2-é pedig 5,0-nak adódott.



8. ábra

Tradescantia albiflora levélszövetéből tisztított savas foszfomoeszterázok aktivitásának pH függősége

Standard aktivitásmérés. Szubsztrát p-NPP; puffer 0,1 M Tris-acetát

— 1. csucs /Enzim: 0,03 ml/  
- - - 2. csucs /Enzim: 0,15 ml/



### 3.4.2. pH-stabilitási vizsgálatok

Bár az enzimreakció a pH optimumon a leggyorsabb, ebből nem következik szükségszerűen, hogy a kérdéses enzimfehérje stabilitását is az adott közeg pH-ja biztosítja legjobban. Az aktivitás "megőrizhetősége" pedig részint a többlépcsős enzimtisztítás néha hetekre terjedő időigénye, részint a tisztított enzim eltartathatósága szempontjából igen lényeges. Így szükségesnek tűnt, hogy a két enzimnek néhány pH területen megnyilvánuló stabilitásáról fogalmat nyerjünk. E célból az enzimeket különböző pH-ju Tris-acetát pufferben 48-órán át dializáltuk. A kísérlet előtt és után nyert adatokat a VIII. táblázatban közöljük.

#### VIII. táblázat

A Tradescantia albiflórából izolált savas foszfomono-  
eszterázok stabilitása különböző pH-ra

Standard aktivitás mérés. Enzim: 0,2 ml

Enzim	Dializis	pH	Idő /óra/	$\Delta O.D._{400nm}$ 20'	%
Kontrol	-	7,5	0	0,642	100
	+	7,5	48	0,672	104,6
PMáze-1	+	6,0	48	0,660	102,8
	+	5,0	48	0,558	86,9
Kontrol	-	7,5	0	0,897	100
	+	7,5	48	0,927	103,3
PMáze-2	+	6,0	48	0,921	102,7
	+	5,0	48	0,876	97,7

A PMáze-2 enzimaktivitása a két pH-n történt dialízis alatt lényegében nem változott. A PMáze-1 esetében pH 5,0-ön csekély 13 % aktivitás csökkenés mutatkozott.

### 3.4.3. Hőérzékenység vizsgálata

Egyes enzimek szerkezeti felépítésükből adódóan nagyon érzékenyek a magas hőmérsékletre, mások pedig rövid ideig 80-90 C° hőmérsékletet is elviselnek. A tisztított enzimeink hőérzékenységét a IX. táblázat és a 9. ábra tünteti fel.

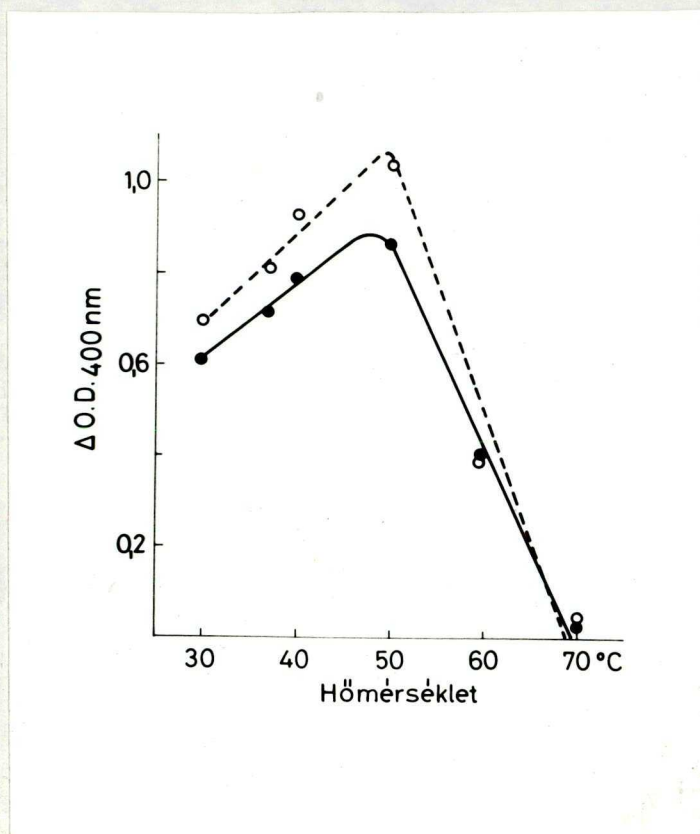
## IX. táblázat

Tradescantia albiflora levélszövetéből izolált savas foszfomonoeszterázok hőstabilitása

Standard aktivitás mérés

Idő /perc/	Hőmérséklet /C°/	PMáze-1		PMáze-2	
		O.D. 400nm/ 0,05ml E/	%	O.D. 400nm/ 0,20 ml E/	%
Kontrol	37	0,726	100	0,936	100
5	60	0,525	72,3	0,642	68,6
10	60	0,297	40,9	0,318	34,0
15	60	0,210	28,9	0,162	17,3

60-70 C° között mindkét esetben az enzimek gyors inaktivációja következett be. Még csekély különbség sem mutatkozott hőstabilitásukban.



9. ábra

*Tradescantia albiflora* levélszövetéből tisztított savas foszfomonoeszterázok hőérzékenysége

Az enzimaliquotokat acetát pufferben /pH 5,5/ 10 percig adott hőmérsékleten inkubáltuk majd gyorsan 0 °C-ra hűtöttük. Az enzimreakciót 37 °C-on szubsztráttal /pNPP/ indítottuk.

— PMáze-1 /0,03 ml enzim/  
- - - PMáze-2 /0,15 ml enzim/

#### 3.4.4. Tárolás alatti stabilitás

Hosszabb ideig történő tárolás alatt a tisztított enzimek aktivitása rendszerint csökken. Mélyhűtött anyagban ez a folyamat lényegesen gátolt. Tájékozódás végett enzimeinket -20 °C-on tároltuk, majd 3 és 10 hónap után felengedtük és meghatároztuk aktivitásukat. Mindkét foszfomonoeszteráz viszonylag instabilnak bizonyult /X. táblázat/.

X. táblázat

A Tradescantia albiflora levélszövetéből izolált savas foszfonoeszterázok aktivitásának stabilitása -20 C°-on történő tárolás alatt

Standard aktivitás mérés

Tárolási idő /hónap/	Enzim	$\Delta$ O.D. 400/ 0,05ml E/ 20'	%	Tárolási idő /hónap/	Enzim	$\Delta$ O.D. 400/ 0,2 ml E/ 20'	%
0	PMáze-1	0,473	100	0	PMáze-2	0,493	100
3	PMáze-1	0,377	79,7	3	PMáze-2	0,427	86,6
10	PMáze-1	0,087	18,4	10	PMáze-2	0,178	36,1

Három hónap alatt csak mintegy 20 % veszteség történt. Tíz hónap elteltével azonban az eredeti aktivitásnak kb. 20 ill. 40 %-a maradt meg. Ez részben az enzimkoncentratok alacsony fehérje tartalmával /lásd: VII. táblázat/ hozható összefüggésbe. Enzimatikusan inaktív védőfehérje /pl. szérumalbumin/ általában hátráltatja a folyamatot.

3.4.5. Különböző ionok és EDTA hatása

Sok enzim intenzív működése valamilyen iont vagy egyéb kofaktort kíván. Az általunk vizsgált kationok közül a  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  1-10 mM koncentrációban nem okozott lényeges változást /XI. táblázat/. A  $Zn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Fe^{++}$  1 mM-os koncentrációban 20-80 %-ban

gátolta az aktivitást. A  $\text{Cu}^{++}$  ionok a PMáze-2-nél erősebb gátlást idéztek elő. Az anorganikus foszfát mint reakcióvégtermék mindkét esetben a legerősebb gátlónak bizonyult. 1 mM EDTA, amely a kétértékű kationokat komplexbe viszi egyik foszfomonoeszteráznál sem fejtett ki gátlást. Ez a megfigyelés azt valószínűsíti, hogy egyik foszfomonoeszteráz sem kíván működéséhez bivalens kationokat.

A bizonyág kedvéért mindkét enzimet százszoros törfogatu 0,001 M-os EDTA-val /pH 7,5/ dializáltuk 24 órán át. A kísérlet előtti és utáni adatokat a XII. táblázat tartalmazza.

Mint kitűnik a PMáze-1. aktivitására a dialízis nem hatott lényegében. A PMáze-2 esetében azonban 60-90 %-os aktiválódást észleltünk.

XI. táblázat

A különböző ionok hatása a Tradescantia albiflora  
levélszövetéből izolált savas foszfonoeszterázok  
aktiválására

Standard ektivitás mérés

Ionok	Vég- koncent- ráció /mM/	PMáze-1		PMáze-2	
		$\Delta O.D._{400} /$ 0,03 ml E/ 20'	%	$\Delta O.D._{400} /$ 0,2 ml E/ 20'	%
Kontrol		0,200	100	0,271	100
MgCl <sub>2</sub>	10,0	0,126	63	0,277	102
	1,0	0,220	110	0,283	104
CaCl <sub>2</sub>	10,0	0,176	88	0,285	104,5
	1,0	0,183	91	0,283	104
CoCl <sub>2</sub>	10,0	0,180	90	0,294	108
	1,0	0,176	88	0,302	113
KCl	10,0	0,167	83	0,277	102
	1,0	0,171	85	0,253	93
NaCl	10,0	0,180	90	0,283	104
	1,0	0,186	93	0,250	92
ZnSo <sub>4</sub>	1,0	0,159	79	0,221	81,2
CuSO <sub>4</sub>	1,0	0,134	67	0,075	27,5
FeCl <sub>2</sub>	10,0	0,007	3,5	0,014	5,5
	1,0	0,036	18	0,067	24,6
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10,0	0,036	11,5	0,022	8
EDTA	10,0	0,219	109	0,275	101
	1,0	0,239	119	0,337	124

XII. táblázat

EDTA-val szembeni dialízis hatása a Tradescantia albi-  
florából izolált savas foszfomonoeszterázok aktivitására

Az enzim mintákat 0,001 M EDTA-t tartalmazó 0,01 M Tris-HCl pufferrel szemben dializáltuk /pH 7,5/ 24 órán át. A dialízis előtt és után az aliquotokból standard aktivitás mérést végeztünk

Enzim	Enzim /ml/	Dialízis előtt		Dialízis után	
		$\Delta O.D._{400}/$ 20 perc	%	$\Delta O.D._{400}/$ 20 perc	%
PMáze-1	0,03	0,852	100	0,801	94
	0,06	1,662	100	1,620	97,5
PMáze-2	0,05	0,444	100	0,711	160,1
	0,10	0,690	100	1,300	188,4

3.4.6. Egyéb vegyületek hatása

A monojódecetsav / $JCH_2COOH$ /, nátriumazid / $NaN_3$ /, 2-merkaptoetanol és az L-askorbinsav 1 mM-os koncentrációban enyhe, nem szignifikáns aktivitáscsökkenést idézett elő /XIII. táblázat/.

Ugyanezek a vegyületek lényegében a PMáze-2-re sem hatottak. A nátriumfluorid / $NaF$ / 1 mM, az urea 3 M-os koncentrációban 70-80 % gátlást okozott mindkét enzimnél.

XIII. táblázat

Különböző vegyületek hatása a Tradescantia albiflora szövetéből izolált foszfomonoeszterázok aktivitására  
Standard aktivitás mérés

Vegyületek	Végkoncentráció /mM/	PMáze-1		PMáze-2	
		$\Delta$ O.D. 400/ 0,03 ml E/ 20'	%	$\Delta$ O.D. 400/ 0,2 ml E/ 20'	%
Kontrol	-	0,200	100	0,272	100
NaF	1,0	0,059	29,5	0,083	30,5
NaN <sub>3</sub>	1,0	0,169	84,5	0,244	89,7
JCH <sub>2</sub> COOH	1,0	0,160	80	0,273	100,3
2-Mercaptoetanol	10,0	0,169	84,5	0,292	107,2
L-askorbinsav	10,0	0,163	81,5	0,280	103
Urea	3000,0	0,076	38,0	0,087	31,9

3.4.7. Az enzimek szubsztrátspecifitása

Különböző foszfátészterek hidrolizise: Mint ismert, a foszfomonoeszterázok a különböző típusu vegyületekhez kapcsolódó terminális foszfátgyökök hidrolizisét katalizálhatják. A bakteriális enzimekkel ellentétben, a növényi eredetű foszfomonoeszterázok egyike sem mutat szigorú specificitást az egyik vagy másik foszfátkötés típus bontása tekintetében. Ezért célszerűnek látszott tisztított készítményeink ilyen irányú vizsgálata is. Mint a XIV. táblázat feltünteti az ATP-t, ADP-t és az



anorganikus pirofoszfátot a PMáze-1 a p-NPP-al közel azonos mértékben hidrolizálta. Ugyanezeket a vegyületeket a PMáze-2 lényegesen kevésbé /50-70 %/ bontotta, mint a p-NPP-ot.

Figyelemreméltó, hogy a glükóz-1-foszfát /gl-1-P/, glükóz-6-P /gl-6-P/, fruktóz-1,6-difoszfát /fr-1,6-PP/, 2-glicerín-foszforsav, tiamin-pirofoszfát és a trifoszfó-piridin-nukleotid /TPN vagy NADP/ mindkét enzimnél igen kis mértékben hasznosult mint szubsztrát.

A 3'- ill. 5'-foszfomonoészter kötés bontása:

Nukleinsav szerkezeti vizsgálatokban egyik eszköz a 3'- ill. 5'-foszfoészter kötések specifikusan hasító enzimek szisztematikus alkalmazása. Ezért a tisztított enzim készítményeinket ilyen szempontból is megvizsgáltuk. A PMáze-2 a p-NPP-hoz viszonyítva mind a 3'-, mind az 5'-purin és pirimidin nukleozid monofoszfát kötések közel azonos mértékben /40-55 %/ bontotta /XV. táblázat/. A PMáze-1 pedig az 5'-orto-foszfát kötések alig /5-10 %/ a 3'-végálló foszfor kötések pedig nagy mértékben /60-80 %/ hidrolizálta.

XIV. táblázat

A Tradescantia albiflora levélszövetéből izolált foszfomoeszterázok  
specificitása néhány foszfátészterre

Standard aktivitás mérés az enzimatikusan lehasadó Pi meghatározása alapján.  
A reakciórendszer 0,03 ml ill. 0,20 ml enzimet tartalmazott

Szubsztrát	Felszabadult $\mu$ M <sub>Pi</sub> /20 perc				%			
	PMáze-1		PMáze-2		PMáze-1		PMáze-2	
	K i s é r l e t		K i s é r l e t		K i s é r l e t		K i s é r l e t	
	1	2	1	2	1	2	1	2
p-NPP	0,555	0,529	0,896	0,723	100	100	100	100
bisz-p-NPP	-	0,0005	-	0,025	-	0,0009	-	0,03
TPN	0,309	-	0,431	-	55,6	-	50,3	-
ATP	0,658	0,555	0,464	0,335	118,5	104,8	51,7	46,30
ADP	0,632	0,516	0,348	0,413	113,8	97,5	38,8	57,10
Gl.-1-P	0,155	0,116	0,180	0,232	27,7	21,9	20,0	32,0
Gl.-6-P	0,206	-	0,451	-	37,1	-	50,3	-
Fr.-1,6-P-P	0,219	-	0,503	-	39,4	-	56,1	-
2-glicerín- foszforsav	0,322	-	0,432	-	58,0	-	60,4	-
Thiamin- pirofoszfát	0,180	0,170	0,150	0,180	32,4	32,1	16,7	24,8
Anorganikus- pirofoszfát	-	0,464	-	0,232	-	87,7	-	32,0

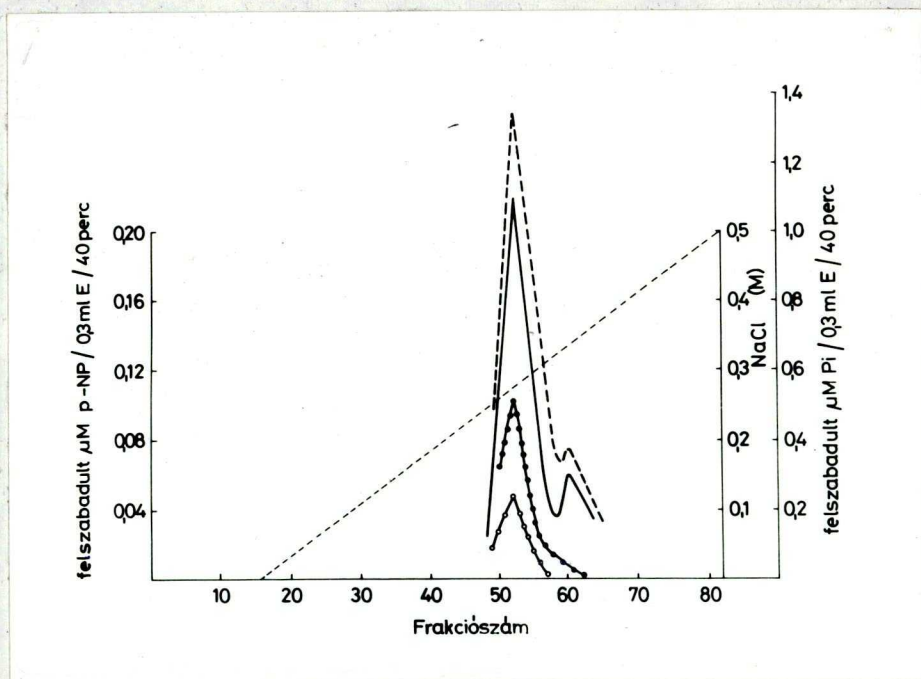
XV. táblázat

A különböző mononukleotidok hidrolizise Tradescantia albiflora levélszövetéből izolált foszfomonoeszterázok által

Standard aktivitás mérés Pi alapján. A reakciórendszer PMáze-1 esetében 0,03 ml, PMáze-2 esetében, 0,10 ml enzimet tartalmazott

Szubsztrát	Felszabadult $\mu$ M <sub>Pi</sub> /20 perc		%	
	PMáze-1	PMáze-2	PMáze-1	PMáze-2
5'-NPP	0,387	0,671	100	100
5'-AMP	0,039	0,284	10,1	42,3
3'-AMP	0,245	0,361	63,3	53,8
5'-CMP	0,026	0,258	6,7	33,4
3'-CMP	0,310	0,400	80,1	59,6
5'-GMP	0,026	0,297	6,7	44,3
3'-GMP	0,200	0,374	51,7	55,7
5'-UMP	0,021	0,258	5,4	38,4
3'-UMP	0,245	0,313	63,3	46,6

A kísérlet időpontjában ilyen szubsztrát specificitású PMáze létére nem állt irodalmi adat rendelkezésre. Így a kérdés sulya más oldalról történő bizonyítást is kívánt. E célból a PMáze-l-el ismét DEAE-cellulóz rekromatográfiát végeztünk. Ezután minden frakcióban megvizsgáltuk az aktivitást a standard szubsztrátokra /p-NPP/, két cukorfoszfátra /gl-6-P és 2-PGS/, továbbá egy nukleozid 3'-, ill. 5'-monofoszfátra nézve /3'-CMP és 5'-CMP/. A kísérlet eredményét a 10. ábra mutatja.



10. ábra

DEAE-cellulózon másodszor rekromatografált PMáze-l szubsztrátspecificitása

- o-o- gl-6-P,
- .-.- 2-PGS,
- p-NPP
- - - 3'-CMP

Standard aktivitás mérés Pi alapján



A négy különböző szubsztrátot bontó aktivitás profilja /p-NPP, Gl-6-P, 2-PGS, 3'-CPM/ teljesen egybeesett. Az 5'-CPM-t bontó aktivitás az újabb tisztítás során pedig eliminálódott.

Igy további bizonyítást nyert, hogy a *Tradescantia* levelekből izolált két foszfomonoészteráz egyike /PMáze-1/ az egyéb foszfátészterek bontása mellett a nukleozid monofoszfátokon belül csak a 3'-ortofoszfát kötéseket hidrolizálja. A másik enzim /PMáze-2/ pedig egy teljesen aspecifikus ortofoszfomonoészter-foszfohidroláznak bizonyult.

#### 3.4.8. Ciklusos mononukleotidok hatása

A ciklusos -adenozin-3'-5'-monofoszfát /cAMP/ hormonszerű szabályozó szerepét intracelluláris szinten egyre több irodalmi adat bizonyítja /Robinson et al., 1971/. E vegyületeknek egyes nukleolitikus enzimekre gyakorolt in vivo és in vitro hatását is megerősítik. A növényi foszfomonoészterázokra vonatkozó egyetlen közlemény /Polya and Ashton, 1973/ tanúsítja, hogy a cAMP in vitro gátolja az enzim aktivitását. Célszerűnek tűnt tehát megvizsgálni e vegyület hatását a *Tradescantia albiflora* leveléből izolált foszforsavésztereket bontó enzimekre is. Különböző koncentrációju /0,1-1,0 mM/ cAMP azonban nem hatott egyik PMáze aktivitására sem az alkalmazott három szubsztrát /3'-AMP, 5'-AMP és p-NPP/ jelenlétében /XVI. és XVII. táblázat/.

XVI. táblázat

A különböző ciklusos monomukleotidok hatása a Tradescantia albiflora levélszövetéből izolált PMáze-1 aktivitására

Standard aktivitás mérés a felszabadult Pi alapján.  
A reakciórendszer 0,03 ml enzimet tartalmazott

Vegyület	Koncentráció /M/	Szubsztrát	Koncentráció /M/	Aktivitás %
Kontrol	-	3'-AMP	0,0025	100
2',-3'-cAMP	0,0001	3'-AMP	0,0025	102
	0,0005	3'-AMP	0,0025	84,8
	0,001	3'-AMP	0,0025	96,5
2',-3'-cAMP	0,001	p -NPP	0,00025	105
2',-3'-cCMP	0,001	p -NPP	0,00025	102
2',3' -cGMP	0,001	p -NPP	0,00025	98,5
2',3' -cUMP	0,001	p -NPP	0,00025	91,2
3',5'- cAMP	0,0001	3'-AMP	0,0025	100,3
	0,0005	3'-AMP	0,0025	121,8
	0,001	3'-AMP	0,0025	117,9
3',5' -cAMP	0,001	p -NPP	0,00025	106,8

XVII. táblázat

A cAMP hatása a Tradescantia albiflora levélszövetéből tisztított PMáze-2 aktivitására különböző szubsztrátok esetében

Standard aktivitás mérés enzimatikusan felszabadult Pi alapján. A reakciórendszer 0,20 ml enzimet tartalmazott

Vegyület	Koncentráció /M/	Szubsztrát	Koncentráció /M/	Aktivitás %
Kontrol	-	3'-AMP	0,0025	100
	0,0001	3'-AMP	0,0025	97,7
2',3'-cAMP	0,0005	3'-AMP	0,0025	108,1
	0,001	3'-AMP	0,0025	108,6
	0,0001	5'-AMP	0,0025	93,8
2',3'-cAMP	0,0005	5'-AMP	0,0025	91,7
	0,001	5'-AMP	0,0025	86,7
2',3'-cAMP	0,001	p -NPP	0,00025	80,5
	0,0001	3'-AMP	0,0025	98,9
3',5'-cAMP	0,0005	3'-AMP	0,0025	103
	0,001	3'-AMP	0,0025	83,5
	0,0001	5'-AMP	0,0025	98,8
3',5'-cAMP	0,0005	5'-AMP	0,0025	96,6
	0,001	5'-AMP	0,0025	96,6
3',5'-cAMP	0,001	p NPP	0,00025	83,7

Hasonlóképpen a purin /2',3'-cikl.-AMP; 2',3'-cikl.-GMP/ és a pirimidin /2',3'-cikl.-CMP; 2',3'-cikl.-UMP/ ciklusos nukleozid monofoszfátok szintén hatástalannak bizonyultak mindkét reakciórendszerben /XVI. és XVII. táblázat/.



#### 4. M E G V I T A T Á S

Tradescantia levelek nyers kivonatának előállításakor az enzimműködésben nagyfokú inaktiválódást tapasztaltunk. Ez a jelenség a növényi szövetek eldörzsölésekor legtöbbször problémát jelent /Loomis, 1966/. Az alkalmazott redukálószernek közül esetünkben az L-aszkorbinsav bizonyult a legalkalmasabbnak az aktivitás stabilizálására /V. táblázat/.

A savas foszfatázok sejten belüli lokalizációjára vonatkozóan számos adat áll rendelkezésre. Nakano és Asahi /1972/ csirázó borsó sziklelevelében az aktivitásnak csak mintegy 50 %-át találta a sejt oldható fázisában. A differenciális centrifugálás módszere bebizonyította, hogy esetünkben a kötött aktivitás kisebb része a mitokondrium frakcióban, zöme pedig a mikroszómákban lokalizálódott. Buza gyökércsucsok /Matile, 1968/ és burgonyalevelek /Pitt, 1973/ foszfomoeszterázainál is hasonló megállapításra jutottak. Tradescantia albiflora esetében ilyen típusú kísérleteket nem végeztünk. Az aszkorbinsavat tartalmazó hipotóniás puffer alkalmazása gyakorlatilag az összes aktivitást feltárta /VI. táblázat/.

Differenciális centrifugálás módszerét használva dohánylevelekben is gyakorlatilag a 10000 x g felüluszóban találták az összaktivitást /Shaw, 1966/.

A foszfomonoeszterázok sejtenbelüli lokalizációja és szubsztrátjaik sokfélesége /cukor-, nukleotid-, nukleozid-foszfátok, anorganikus pirofoszfátok/ eleve felveti ezek működésbeli polimorfizmusát az élő szervezetben. A különböző állati szövetekben a foszfátészter-bontó izoenzimek megléte és jelentősége jól bizonyított /Hollander, 1971/ Gél-elektroforézis alkalmazása a növényi foszfomonoeszteráz izoenzimek meglétére is fényt derített. *Oenothera organensis* pollenjében hat /Mäkinen és MacDonald, 1968/, hagymában három /Mäkinen, 1968/ fiatal buza növényekben három /Jaaska Jaaska, 1968/a/ kukorica csiranövényekben kilenc /Jaaska és Jaaska, 1968/b/ burgonya gumóban három /Jaaska, 1969/ szőlőhibridek levelében négy /Schaefer, 1971/ jól elkülönült izoenzimet sikerült kimutatni. A legutóbbi időben az izoenzimek közötti minőségi és mennyiségi jellegek számbavételére a gél- és az ioncserélő-kromatográfia, továbbá az elektrofokuszáló technika alkalmazása is tért nyert. Ily módon tealevélből kettő /Baker és Takeo, 1973/ buzacsirából három /Verjee, 1968/ illetve négy /Foster és Weber, 1973/ izoenzimet sikerült elkülöníteni, megtisztítani és enzimátikus sajátságait egybevetni.

Elővizsgálatainkban a hét *Tradescantia* faj /*T. fluminensis*, *T. sillamontana*, *T. venezuelensis*, *T. albiflora* albo vitata, *T. aureo albo-vitata*, *Zebrina pendula* és *Zebrina purpura*/ feltételezett foszfátáz izoenzimeinek szétválasztása csak részben sikerült /Horváth és Sivók, 1973/.

Az enzimfehérjék inaktiválódását és meghatározását zavaró tényezőktől /nagy mennyiségű polifenol, festékanyagok/ mentes faj, a *Tradescantia albiflora albo-vitata* kiválasztása, továbbá védőanyag /aszcorbinsav/ alkalmazása a nyers kivonat előállításakor a tisztítás egymásutáni lépcsőiben néhány foszfomoeszteráz-izoenzim elválasztására és jellegének részletesebb analizisére adott lehetőséget.

Az ammónium-szulfát frakcionálással nyert fehérje, Sephadex G-200-on történő molekulaszűrése három foszfatáz enzimcsucs elkülönülését eredményezte /1. ábra/. A második és harmadik PMáze enzimnek DEAE-cellulóz oszlopon történt együttes kromatografálása még egy további enzim elválasztását idézte elő /2. ábra/. Így az alkalmazott módszerek segítségével négy foszfomoeszteráz enzimet sikerült elkülöníteni. Közülük az ioncserélő kromatográfiával kapott első és második /PMáze-1 és PMáze-2/ enzimcsucs kombinált frakcióit vizsgáltuk tovább. Ezeket az ismételt kromatográfia és rekromatográfia homogéneknek mutatta /3. 4. ábra/. A tisztítás során 174. ill. 54-szeres tisztasági fokot és 10 %-os ill. 9 %-os enzimkitermelést értünk el /VII. táblázat/.

A PMáze 1 és PMáze 2 izoenzim jellegét pH optimumuk /8. ábra/, EDTA-val szembeni érzékenységük /XII. táblázat/ és szubsztrátspecificitásuk /XIV. XV. táblázat/ különbözősége bizonyítja. Számos tulajdonságuk a többi növényi eredetű savas foszfomoeszterázokéival bizonyult azonosnak /Schmidt, 1961; Hollander, 1971/.

Valójában a két enzim nem tipikus ortofoszfor mono-észter foszfohidroláz /E.C.3.2.3.2/ mivel különböző mértékben a szervetlen és nukleotidpirofoszfát kötéseket szintén bontja /XIV. XV. tábkázat/.

A különböző szubsztrátokkal szembeni specificitásuk nagyon hasonló azokhoz a nem specifikus növényi foszfatázokéihoz, amelyek a cukorfoszfát észterek zömét kb. egyforma mértékben, de az általánosan használt szintetikus szubsztrátnál /pNPP/ kevésbé hasítják /Loring et al., 1966; Shaw, 1966; Walters és Loring, 1966; Asahi et al., 1967; Verjee, 1968; Felenbok, 1970; Wyen et al., 1971; Nomura et. al., 1971/.

A PMáze-1 és PMáze-2 között a 3'-, és 5'-nukleozid monofoszfátok hidrolizisében talált különbség az ujszerű és lényeges. A PMáze-2 általánosan előforduló, nem specifikus foszfatáz /Duda et al., 1967; Yamamoto, 1972/.

A PMáze-1 azonban szinte kizárólagos specificitást mutat a 3'-nukleozid monofoszfátok bontására /XV. táblázat/. Ilyen típusu enzimet eddig egyetlen esetben, buza csiranövényből izoláltak /Polya és Ashton, 1973/ és 3'-ribonukleotid foszfohidroláz néven nevezték el.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

*Tradescantia albiflora* albo-vitata levélszövetek nyers kivonatában a savas foszfomonoeszteráz aktivitás zöme /85 %/ a sejt oldható fázisában található. Az enzimfehérje a szövet nagy polifenoltartalma következtében gyorsan inaktiválódik. A folyamat aszkorbinsavnak a kivonó-pufferbe adásával részben kivédhető.

A nyers kivonat oldható-fehérje frakcióját ammónium-szulfátos frakcionálással, Sephadex G-200-on történő gélszűréssel és ismételt DEAE-cellulóze kromatográfiával tisztítottuk meg. A fehérje-frakcionálás utolsó fázisában három foszfomonoeszteráz izoenzimet sikerült elkülöníteni. Közülük két foszfatáz /PMáze-1 és PMáze-2/enzimátikus jellemzőit vizsgáltuk meg részletesen.

Az enzimek pH optimuma /pH 5,0 és 5,5/ és EDTA-val szembeni érzékenysége különbözőnek bizonyult. Egy és kétértékű kationokat egyik enzim sem kívánt működéséhez. 50 °C-on felül mindkét foszfatáz gyorsan inaktiválódott. Tíz hónapos, mélyhűtött állapotban történő tárolás folyamán az eredeti aktivitásuk 20-40 %-a maradt meg.

Részletes kísérletek történtek az enzimek szubsztrát-specifitásának jellemzésére. A vizsgált cukorfoszfát, nukleotid pirofoszfát és inorganikus foszfát kötéseket mindkét enzim nem nagy különbséggel bontotta.

Lényeges különbség mutatkozott közöttük a 3'- ill. 5'-végálló foszfomonoészter kötés hidrolizisét illetően. Az egyik enzim /PMáze-2/ mind a 3'-, mind az 5'-purin és pirimidin nukleozid monofoszfát kötéseket közel azonos mértékben hasította. A PMáze-1 azonban kizárólagos preferenciát mutatott a 3'-nukleozid foszfomonoészter kötések hidrolizisére. Eddig csak buza csiranövényből izoláltak hasonló tulajdonságu foszfatázt.

A két enzim aktivitására különböző koncentrációju adenzin 3',5'-ciklusos monofoszfát, továbbá purin és pirimidin 2',3'-ciklusos monofoszfátok nem hatottak.

I R O D A L O M

- AEBI, H.E. 1967: Inborn errors of metabolism.  
Ann.Rev.Biochem., 36, 271-306.
- ARSENIS, C. and O. TOUSTER, 1968: Purification and properties of an acid nucleotidase from rat liver lysosomes.  
J.Biol.Chem., 243, 5702-5708.
- ASAHI, T., SAKANO, K., NOMURA, T., OGAWA, H. and I. URITANI, 1967: Isolation and properties of acid phosphatases of sweet potato roots.  
Agr.Biol.Chem., 31, 1394-1400.
- BAKER, J.E. and T. TAKEO, 1973: Acid phosphatase in plant tissues. I. Changes in activity and multiple forms in tea leaves and tomato fruit during maturation and senescence.  
Plant and Cell Physiol., 14, 459-471.
- BERNARDI, G. 1966: Spleen acid phosphomonoesterase.  
In: Proc. in Nucleic Acid Res., Edit. by Cantoni, G.L. and D.R. Davis, Harper Row Publ., New York - London, 236-244.
- BIELESKI, R.L. 1963: Phosphatase reactions during tissue extractions.  
Biochim.Biophys.Acta, 74, 135-137.
- BIELESKI, R.L. 1966: Accumulation of phosphate, sulphate and sucrose by excised phloem tissues.  
Plant Physiol., 41, 447-454.

- BINGHAM, E.W. and C.A. ZITTLE, 1963: Purification and properties of acid phosphatase in bovine milk. Arch.Biochem.Biophys., 101, 471-477.
- BLUM, J.J. 1965: Observation on the acid phosphatases of *Euglena gracilis*. J.Cell Biol., 24, 223-234.
- BUTLER, L.G. 1971: Yeast and other inorganic pyrophosphatases. The Enzymes, Edit. by Boyer, P.D., Academic Press, New York and London, Vol. IV., 529-539, Third Edition.
- CANTAROW, A. and M. TRUMPER, 1955: Clinical Biochemistry Saunders, Philadelphia.
- CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y. and H. WARNER, 1956: Micro-determination of phosphorus. Anal.Chem., 28, 1756-1758.
- CHERSI, A., BERNARDI, A. and G. BERNARDI, 1966: Studies on acid hydrolases. II. Isolation and properties of spleen acid phosphomonoesterase. Biochim.Biophys.Acta, 129, 12-22.
- DIPINETRO, D.L. and F.S. ZENGERLE, 1967: Separation and properties of three acid phosphatases from human placenta. J.Biol.Chem., 242, 3391-3396.
- DeLEO, P. and J.A. SACHER, 1970: Senescence. Association of synthesis of acid phosphatase with banana ripening. Plant Physiol., 46, 208-211.



- DRUMMOND, G.I. and M. YAMAMOTO, 1971: Nucleotide phosphomonoesterases.  
The Enzymes, Edit. by Boyer, P.D., Academic Press,  
New York and London, Vol. IV., 337-352, Third Edition.
- DUDA, C.T., RICHMOND, A.E. and J.H. CHERRY, 1967:  
Phosphoric monoester hydrolases in cotyledons of  
germinating peanut seeds /*Arachis hypogaea* L./.  
Phytochemistry, 6, 171-179.
- FELENBOK, B. 1970: Acid phosphomonoesterases from  
*Phaseolus mungo*.  
Eur. J. Biochem., 17, 165-170.
- FERNLEY, H.N. 1971: Mammalian alkaline phosphatases.  
The Enzymes, Edit. by Boyer, P.D., Academic Press,  
New York and London, Vol. IV., 417-443, Third Edition.
- Figier, J. 1968: Localisation infrastructurale de la  
phosphomonoestérase acide dans la stipule de  
*Vicia faba* L. au niveau du nectaire.  
Planta, 83, 60-79.
- FITZGERALD, G.P. and T.C. NELSON, 1966: Extractive and  
enzymatic analyses for limiting or surplus phos-  
phorus in algae.  
J. Phycol., 2, 32-37.
- FLEISCH, H., RUSSEL, R.G.G. and F. STRAUMANN, 1966:  
Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and  
its implications in calcium homeostasis.  
Nature, 212, 901-903.

- FLINN, A.M. and D.L. SMITH, 1967: The localization of enzymes in cotyledons of *Pisum arvense* L. during germination. *Planta*, 75, 10-22.
- FORTI, G. 1961: Partial purification of a pyrophosphatase from spinach leaves. *Biochim.Biophys.Acta*, 48, 200-202.
- FORTI, G., TOGNOLI, C. and B. PARISI, 1962: Purification from pea leaves of a phosphatase that attacks nucleotides. *Biochim.Biophys.Acta*, 62, 251-260.
- FOSTER, D.M. and D.J. WEBER, 1973: Separation and characteristics of isoenzymes of wheat germ acid phosphatase. *Plant Sci.Letters*, 1, 169-177.
- GEORGATSOS, J.G. 1965: Acid phosphatases of human erythrocytes. *Arch.Biochem.Biophys.*, 110, 354-356.
- HARGEAVES, A.B., WANDERLEY, A.G. and H.S. CONCALVES, 1964: Acid phosphatase isolated from the electric organ of the *Electrophorus electricus*. *Biochim.Biophys.Acta*, 85, 420-426.
- HEPPEL, L.A. 1961: 5'-nucleotidase. *The Enzymes*, Edit. by Boyer, P.D., Lardy, H. and K. Myrbäck, Academic Press, New York and London, Vol. V., 49-53, Second Edition.
- HERVITT, E.J. and P. TATHAM, 1960: Interaction of mineral deficiency and nitrogen source on acid phosphatase activity in leaf extracts. *J.Exptl.Bot.*, 11, 367-376.

- HOCHBERG, M.L. and M.L. SARGENT, 1973: Separation and identification of *Neurospora* phosphatases by polyacrilamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 51, 516-522.
- HOFSTEN, B. And J. PORATH, 1961: Acid phosphatases in *Escherichia coli*. *Acta Chem. Scand.*, 15, 17 91-1796.
- HOLLANDER, V.P. 1971: Acid phosphatases. *The Enzymes*, Edit. by Boyer, P.D., Academic Press, New York and London, Vol. IV., 450-496, Third Edition.
- HORVÁTH, M. and B. SIVÓK, 1973: Közöletlen adatok.
- IKAWA, T., NISIZAWA, K. and T. MIWA, 1964: Specificities of several acid phosphatases from plant sources. *Nature*, 203, 939-940.
- JAASKA, V. and V. JAASKA, 1968/a: Phosphohydrolase and peroxidase isoenzymes in wheat seedlings. *ENSV TA Toimet. Biol.*, 17, 164-171.
- JAASKA, V. and V. JAASKA, 1968/b: Soluble phosphohydrolases and esterases in maize seedlings. *ENSV TA Toimet. Biol.*, 17, 274-283.
- JAASKA, V. 1969: Electrophoretic study of potato tuber phosphohydrolases. *ENSV TA Toimet. Biol.*, 18, 55-61.
- JOSSE, J. and S.C.K. WONG, 1971: Inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. *The Enzymes*, Edit. by Boyer, P.D., Academic Press, New York and London, Vol. IV., 499-526, Third Edition.

- JOYCE, B.K. and S. GRISOLIA, 1960: Purification and properties of a non-specific acid phosphatase from wheat germ.  
J.Biol.Chem., 235, 2278-2281.
- KUENZLER, E.J. and J.P. PERRAS, 1965: Phosphatases in marine algae.  
Biol.Bull., 128, 271-284.
- KUENZLER, E.J. 1966: Glucose-6-phosphate utilization by marine algae.  
J.Phycol., 1, 156-164.
- KUNITZ, M. and P.W. ROBBINS, 1961: Inorganic pyrophosphatases. The Enzymes, Edot. by Boyer, P.D., Lardy, M. and K. Myrbäck, Academic Press, New York and London, Vol. V., 169-178.
- KUO, M.H. and H.J. BLUMENTHAL, 1961: Purification and properties of an acid phosphomonoesterase from *Neurospora crassa*.  
Biochim.Biophys. Acta, 52, 13-29.
- LOOMIS, W.D. and J. BATAILLE, 1966: Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes.  
Phytochemistry, 5, 423-438.
- LORING, H.S., McLENNAN, J.E. and T.L. WALTERS, 1966: Enzymes of nucleic acid metabolism from mung bean sprouts. II. The specificity of 3'-nucleotidase activity and general properties of the 3'-nucleotidase-ribonuclease M<sub>2</sub> fraction.  
J.Biol.Chem., 241, 2876-2880.

- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. and R.J. RANDALL, 1951: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J.Biol.Chem., 193, 265-275.
- MacINTYRE, R.J. and M.R. DEAN, 1967: Sub-units of acid phosphatase-I in *Drosophila melanogaster*: Reversible dissociation in vitro. Nature, 214, 274-275.
- MAGNUSSON, G. 1971: Deoxyribonucleotide phosphatase from rat liver and cultured mouse fibroblasts. Eur.J.Biochem., 20, 225-230.
- MALVEAUX, F.J. and C.L. SAN CLEMENTE, 1969: Staphylococcal acid phosphatase: extensive purification and characterization of the loosely bound enzyme. J.Bacteriol., 97, 1209-1214.
- MATILE, Ph. 1968: Vacuoles as lysosomes of plant cells. Biochem.J., 111, 26-27.
- MATILE, Ph. 1966: Enzyme der Vakuolen aus Wurzelzellen von Maiskeimlingen. Ein Beitrag zur funktionellen Bedeutung der Vakuole bei der intrazellulären Verdauung. Zeitschr.Naturforsch., 21B, 871-878.
- MAYER, F.C., CAMPBELL, R.E., SMITH, A.K. and L.L. MCKINNEY, 1961: Soybean phosphatase. Purification and properties. Arch.Biochem.Biophys., 94, 301-307.

- MAKINEN, Y. 1968: Isoenzyme polymorphism in flowering plants VI. Variation of isoenzyme patterns in onion seedlings.  
Physiol.Plantarum, 21, 858-465.
- MAKINEN, Y. and T. MACDONALD, 1968: Isoenzyme polymorphism in flowering plants II. Pollen enzymes and isoenzymes.  
Physiol.Plantarum, 21, 477-486.
- McLELLAN, W.L., Jr. and J.O. LANGSEN, 1963: The phosphatase of yeast, localization and secretion by protoplast.  
Biochim.Biophys. Acta, 67, 324-326.
- MEYER, H., MAYER, A.M. and E. HAREL, 1971: Acid phosphatases in germinating lettuce-Evidence for partial activation.  
Physiol.Plantarum, 24, 95-101.
- MLODIANOWSKI, F. 1972: The occurrence of acid phosphatase in thylakoids of developing plastids in lupin cotyledons.  
Z. Pflanzenphysiol., 66, 362-365.
- NAKANO, M. and T. ASAHI, 1972: Subcellular distribution of hydrolase in germinating pea cotyledons.  
Plant and Cell Physiol., 13, 101-110.
- NEWMARK, M.Z. and B.S. WENGER, 1960: Preparation and some properties of an acid phosphatase from white lupine seedlings.  
Arch.Biochem.Biophys., 89, 110-117.

- NOMURA, A., SUNO, M. and Y. MIZUNO, 1971: Studies on 3'-nucleotidase-nuclease from potato tubers I. Purification and some properties of the enzymes. *J. Biochem.*, /Tokyo/, 70, 993-1001.
- NORDLIE, R.C. 1971: Glucose-6-phosphatase, hydrolytic and synthetic activities. *The Enzyme*, Edit. by Boyer, P.D., Academic Press, New York and London, Vol. IV., 553-600, Third Edition.
- OSTROWSKI, W. and J. RYBARSKA, 1965: Studies on human prostatic acid phosphomonoesterase. Further purification and molecular weight of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 105, 196-198.
- PIERPOINT, W.S., 1957/a: The phosphatase and metaphosphatase activities of pea extracts. *Biochem. J.*, 65, 67-76.
- PIERPOINT, W.S., 1957/b: The phosphoesterase of pea plants /*Pisum sativum* L./. *Biochem. J.*, 67, 466-472.
- PITT, D. 1973: Solubilization of molecular forms of lysosomal acid phosphatase of *Solanum tuberosum* L. leaves during infection by *Phytophthora infestans* /Mont./ de Bary. *J. General Microbiol.*, 77, 117-125.
- PLA, G.W., PAPADOPOULOS, N.M. and S. ROSEN, 1968: Renal acid phosphatase isoenzymes. *Enzymologia*, 34, 40-44.

- POLYA, G.M. and A.R. ASHTON, 1973: Inhibition of wheat seedling 5'/3'/-ribonucleotide phosphohydrolase by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Plant Sci. Letters*, 1, 349-357.
- PONTREMOLI, S. and B.L. HORECKER, 1971: Fructose-1,6-di-phosphatases. *The Enzymes*, Edit. by Boyer, P.D., Academic Press, New York and London, Vol. IV. 612-644, Third Edition.
- PRICE, C.A. 1962: Repression of acid phosphatase synthesis in *Euglena gracilis*. *Science*, 135, 46.
- REID, T.W. and I.B. WILSON, 1971: *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *The Enzymes*, Edit. by Boyer, P.D., Academic Press, Vol. IV. 373-409.
- ROBERTS, W.A. 1956: The wheat leaf phosphatases. II. Pathways of hydrolysis of some nucleotides at pH 5.5. *J. Biol. Chem.*, 222, 259-270.
- ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W. and E.W. SUTHERLAND, 1971: Cyclic AMP. Academic Press, New York
- ROGERS, D. and F.J. REITHEL, 1960: Acid phosphatases of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 89, 97-104.



- ROUSSOS, G.G. 1962: Studies on a non-specific acid phosphatase from dwarf bean seedlings. *Biochem. Biophys. Acta*, 64, 187-189.
- SCHAEFER, H. 1971: Enzym polymorphismus in Rebenblättern. *Phytochemistry*, 10, 2601-2607.
- SCHMIDT, G., SERAIDARIAN, K., GREENBAUM, L.M., HICKEY, M.D. and S.J. THANHAUSER, 1956: The effects of certain nutritional conditions on the formation of purines and of ribonucleic acid in baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 20, 135-149.
- SCHMIDT, G. 1961: Nonspecific acid phosphomonoesterases. *The Enzymes*, Edit. by Boyer, P.D., Lardy, M. and K. Myrbäck, Academic Press, Vol. V., 37-47. II. Edition.
- SHANNON, L.M. 1968: Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 19, 187-204.
- SHAW, J.G. 1966: Acid phosphatase from tobacco leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, 117, 1-9.
- STADTMAN, T.C. 1961: Alkaline phosphatases. *The Enzymes*, Edit. by Boyer, Lardy, M. and K. Myrbäck, Academic Press, Vol. V. 55-71. II. Edition.
- STAPLES, R.C. and M.A. STAHMANN, 1964: Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. *Phytopathology*, 54, 760-764.

- STAPLES, R.C., McCARTHY, W.J. and M.A. STAHMANN, 1965:  
Heat stabilities of acid phosphatases from pinto  
bean leaves.  
Science., 149, 248-249.
- SUMNER, J.R. and J.J. BLUM, 1965: Cytochemical localiza-  
tion of acid phosphatases in *Euglena gracilis*.  
J.Cell Biol., 24, 235-251.
- TIRIMANNA, A.S.L. 1967: Acid phosphatases of the tea leaf.  
The Tea Quarterly., 38, 331-334.
- TORRIANI, A. 1960: Influence of inorganic phosphate in  
the formation of phosphatases by *Escherichia coli*.  
Biochim.Biophys., Acta, 38, 460-469.
- TORRIANI, A. 1966: Alkaline phosphatase from *Escherichia*  
*coli*.  
In: Proc. in Nucleic Acid Research, Ed. by G.L.  
Cantoni and D.R. Davies, Harper Row Publ., New  
York - London, 224-235.
- UDVARDY, J., FARKAS, G.L. and E. MARRE, 1969: On RNase  
and hydrolytic enzymes in excised *Avena* leaf  
tissues.  
Plant Cell Physiol., 10, 375-386.
- UEHARA, K., FUJIMOTO, S. and T. TANIGUCHI, 1971: Isolation  
of violet-colored acid phosphatase from sweet  
potato.  
J.Biochem., /Tokyo/, 70, 183-185.
- UEKI, K. and S. SATO, 1971: Effect of inorganic phosphate  
on the extracellular acid phosphatase activity  
of tobacco cells cultured in vitro.  
Physiol.Plant., 24, 506-511.

- VERJEE, Z.H.M. 1969: Isolation of three acid phosphatases from wheat germ.  
Eur.J.Biochem., 9, 439-444.
- WALTERS, T.L. and H.S. LORING, 1966: Enzymes of nucleic acid metabolism from mung bean sprouts. I. Fraction and concentration of phosphomonoesterase, ribonuclease  $M_1$  and  $M_2$ , 3'-nucleotidase, and deoxyribonuclease.  
J.Biol.Chem., 241, 2870-2875.
- WYEN, N.V., UDWARDY, J. and G.L. FARKAS, 1971: Changes in the level of acid phosphatases in Avena leaves in response to cellular injury.  
Phytochemistry, 10, 765-770.
- YAMAMOTO, M. 1972: Acid phosphatases in Enteromorpha.  
Phytochemistry, 11, 2451-2453.
- YUTAKA, M. and S. MATSUNAKA, 1965: The effect of gibberelin on components of phosphatase and peroxidase in rice plants.  
Plant Physiol., 38, 43.

Hálás köszönetet mondok Dr. Horváth Imréné egyetemi docensnőnek és Dr. Udvardy János tudományos főmunkatársnak a téma kijelöléséért, munkám közvetlen irányításáért és igen értékes elméleti és gyakorlati utmutatásaikért.

Köszönettel tartozom Dr. Farkas Gábor akadémikusnak, hogy a vezetése alatt álló intézetben lehetővé tette dolgozatom kísérletes részének elvégzését, valamint köszönöm annak átolvasásakor nyújtott hasznos kritikai megjegyzéseit.