B 2146

MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT
Genetikai Intézet

Alkalikus foszfodiészteráz tisztitása és karakterizálása Triticum aestivumból / L. / és Triticum durum x Aegilops squarrosa szintetikus amfiploidból

Doktori disszertáció

Készitette: Reisz M. Zsuzsanna

Szeged
1982

K ö s z ö n e t n y i l v á n i t á s

Az 1981/82-es évben a 9. Nemzetközi Továbbképző Tanfolyam hallgatójaként dolgoztam a Szegedi Biológiai Központban.

Köszönetet mondok prof. Dr. Alföldi Lajos akadémikusnak, hogy lehetővé tette számomra e tanfolyamon való részvételt és a munkalehetőséget a Genetikai Intézetben.

Köszönöm Dr. Belea Adonisznak a munkához szükséges növények biztositását és egyéb anyagok megszerzéséhez nyujtott segitségét.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Borbély Györgynek a munkámhoz nyujtott szakmai irányitásért, valamint a disszertáció összeállitásában nyujtott segitségért.

Dr. Maróy Péterné gyakorlati tanácsai nélkülözhetetlenek voltak a kisérletek során.

Végül köszönetet mondok Dr. Simontsics Andrásnak az izotóp munkához nyujtott segitségéért, valamint a Genetikai Intézet azon dolgozóinak, akik hozzájárultak jelen munkám elvégzéséhez.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtár SZEGED

Röviditések:

A; B; D;	a Triticinae fajok genomjainak szimbólumai
ADH	alkohol-dehidrogenáz
Ae.	Aegilops genus
AMP	adenozin-5'-foszfát
ATP	adenozin-trifoszfát
BSA	szarvasmarha szérum fehérje
CBB	Coomassie Brillant Blue
CMP	citidin-5'-foszfát
D	Dalton
dAMP	dezoxiadenozin-5'-foszfát
dCMP	dezoxicitidin-5'-foszfát
DEAE	dietil-amino-etil
dGMP	dezoxiguanozin-5'-foszfát
DNS	dezoxiribonukleinsav
dUMP	dezoxiuridin-5'-foszfát
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EP	endopeptidáz
GMP	guanozin-5'-foszfát
GOT	aszparaginsav-aminotranszferáz
ICDH	izocitromsav-dehidrogenáz
K_M	Michaelis-állandó
K_i	gátlási állandó
MDH	malát-dehidrogenáz
NAD^+	nikotinamid-adenin-dinukleotid
$NADP^+$	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

OD	optikai denzitás
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PDE-áz	foszfodiészteráz
p-NPP	bis-p-nitrofenil-foszfát
PNP-pT	p-nitrofenil-5'-timidin-monofoszfát
PNP-pU	p-nitrofenil-5'-uridin-monofoszfát
poli-A	poli-adenilsav
poli-C	poli-citidilsav
poli-U	uridilsav
RNS	ribonukleinsav
rpm	percenkénti fordulat
SDS	nátrium-lauril-szulfát
SzTI	szója tripszin inhibitor
T.	Triticum genus
TCA	triklós-ecetsav
TRIS	trisz/hidroximetil/-amino-metán
UMP	uridin-5'-foszfát
UV	ultraibolya
$v_{max.}$	az enzimreakció maximális sebessége

T a r t a l o m j e g y z é k

1.	Bevezetés	1. oldal
2.	Irodalmi áttekintés	3. "
2.1.	A búza evolúciója	3. "
2.1.1.	A hexaploid búza eredete	3. "
2.1.2.	A búza kromoszómák osztályozása	7. "
2.1.3.	Az amfiploidok	8. "
2.2.	A foszfodiészteráz enzim	1o. "
2.3.	A búza PDE-áz izoenzimjei	17. "
2.3.1.	Az izoenzimekről általában	17. "
2.3.2.	A búza PDE-áz izoenzim vizsgálatai	21. "
3.	Anyag és módszer	25. "
3.1.	A kisérletben felhasznált növényanyag	25. "
3.2.	A nyers kivonat készitése	25. "
3.3.	A PDE-áz enzimaktivitás meghatározása	26. "
3.4.	A fehérjetartalom mérése	26. "
3.5.	A foszfodiészteráz enzim tisztitása	27. "
3.6.	A hasitás módjának vizsgálata	28. "
3.6.1.	Poli-A emésztés	28. "
3.6.2.	Radioaktivan jelölt DNS fragmentek emésztése	29. "
3.7.	Az enzim exo- vagy endonukleáz jellegének kimutatása	30. "

3.8. A pH optimum meghatározása 30. oldal
3.9. Az enzim stabilitásának vizsgálata 31. "
3.1o. Az enzim aktiválása és gátlása 31. "
3.11. A nukleinsavak és szintetikus polinukleotidok enzimatikus hidrolizise 31. "
3.12. A végtermékgátlás és a koenzimigény vizsgálata 32. "
3.13. Enzimkinetikai vizsgálatok 33. "
3.14. A poliakrilamid gélelektroforézis 33. "
3.15. Az enzim molekulasúlyának meghatározása 34. "
3.15.1. Oszlopkromatográfiás módszer 34. "
3.15.2. SDS poliakrilamid gélelektroforézis 35. "
4. Eredmények 36. "
4.1. A búza PDE-áz enzim tisztitása 36. "
4.2. A PDE-áz karakterizálása 37. "
5. Eredmények megbeszélése 56. "
6. Összefoglalás 62. "
7. Summary 64. "
8. Irodalomjegyzék 68. "

1. Bevezetés.

Az eltelt 50 esztendőben a búza evolúciójának rekonstruálásában számtalan kimagasló eredmény született, amelyek megmagyarázzák a hexaploid búza genetikai szerkezetét, fejlődésének történetét.
A közönséges búza /Triticum aestivum L./ számos termesztett fajt tartalmazó nagy növénycsoportba tartozik.
A búza evolúciós genetikája, valamint e növénycsoport képviselői napjainkban sem eléggé ismertek. Ezért rendkivül fontos és indokolt megvizsgálni, hogy mely diploid fajok játszottak szerepet a búza kialakulásában és ezen genomok milyen mértékben és hogyan differenciálódtak az evolúció során. Fontos azon speciális genetikai módszerek ismerete és továbbfejlesztése is, amelyekkel megnyugtató módon lehet ezen kérdésekre válaszolni. Egyre nagyobb teret nyer a nemesitői és kutatási gyakorlatban a citogenetikai módszereken túl, az egyes biokémiai módszerek - mint például vizoldható fehérjemintázat, izoenzim spektrum, stb. - alkalmazása. Az utóbbi vizsgálatok alapkutatás jellegüek és elsődleges céljuk a megismerés.

A jelen disszertációban a célkitüzés az, hogy biokémiai módszerekkel adatokat szolgáltassunk a búza rokonsági fokának tisztázásához és az evolúciójában mindeddig tisztázatlan problémákhoz. Választ várunk arra a kérdésre, hogy az előállitott szintetikus búzahibridek, illetve amfiploidok,

enzimológiai karakterük tekintetében milyen mértékben mutatnak hasonlóságot a közönséges búzával és hogy a szülő növények milyen mértékben járulnak hozzá a hibrid enzimek izoenzim képének kialakitásához.

Az utóbbi években bebizonyosodott, hogy az ilyen jellegü vizsgálatokra a nukleinsav-bontó enzimek a legalkalmasabbak /Wolf és Lerch, 1973/. Igy esett a választásunk a foszfodiészterázra, mivel az enzim tulajdonságainak összehasonlitó vizsgálata közelebb vihet a búza evolúciós genetika tisztázatlan problémáinak megoldásához.

2. I r o d a l m i á t t e k i n t é s

2.1. A búza evolúciója

2.1.1. A hexaploid búza eredete

A Triticum L. /búza/ nemzetség a Gramineaea család Triticeae Dumort. / =Hordeae / tribusába tartozó Triticinae subtribus legfontosabb képviselője, melyhez az Aegilops L., Secale L., Agropyron Gaertn. és Haynaldia Schur. nemzetségek is tartoznak.

Már 1918 óta ismert, hogy a Triticum nemzetség kromoszóma alapszáma 7 és hogy három poliploid szintje / 2n = 14 diploid, 2n = 28 tetraploid és 2n = 42 hexaploid / van /Mansfeld, 1951/. A kromoszómák monohaploid szerelvénye felel meg a genomnak. Két genomot akkor nevezünk homológnak, ha egy-egy kromoszómapárban a lineárisan elhelyezkedő locusok azonos sorrendben következnek. Azok a fajok, amelyekben kettőnél több genom szerepel, poliploidok, ha egyszerü genom megtöbbszöröződéséről van szó, autopoliploidok, ha idegen genomok kerülnek össze, allopoliploidok.

A diploid búza haploid kromoszóma szerelvényének két kromoszómáját A betüvel szimbolizálták / 2n = AA /.

Az A genom eredetét a szisztematikusok egyértelmüen a diploid búzából származtatják. Megoszlanak a vélemények, hogy melyik diploid búza volt a szülőpartner. Amig Tumanian 1937-ben meg nem találta a diploid sorozat jelenleg legprimitivebbnek ismert formáját - a T. urartu-t -, addig Balansa által 1854-ben felfedezett T. boeoticum-ot tekin-

tették a búza legősibb fajának / Lelley és Mándy, 1963 /. Kihara / 1935 / és Sax / 1924 /, genom analizissel szoros rokonságot állapitottak meg a Triticum boeoticum kulturváltozata a T. monococcum és a tetraploid búza A genomja között. Feltételezésük szerint ez a faj tekinthető az A genom ősének.

Immuno-kémiai módszerrel megvizsgálva a T. urartu fehérje mintázatát / Johnson, 1975 /, eltéréseket mutattak ki a T. boeoticum fehérje mintázatától, bár kariológiailag nem volt különbség / Giorgi és Bozzini, 1969 /.

A citológiai laboratóriumokban kidolgozott heterokromatikus festési eljárással végzett kromoszóma identifikálás is a két faj közötti különbséget támasztja alá. Az eltérő sávozottság valószinüsiti azt az elképzelést, hogy a T. urartu nem a T. boeoticum-ból, hanem egy közös ősből - azzal párhuzamos úton - származott / Belea, 1971 /.

Mások mindkét diploid búzafajt külön törzsfejlődési forrásnak tekintik / Gubareva és mts, 1975 /. Szerintük a T. timopheevi A genomja a T. boeoticum-ból, a többi tetraploid búza A genomja pedig a T. urartu-ból származik.

Az első poliploidizációs lépcső, a tetraploid szint, melynek A genomja az emlitettek alapján a diploid búzából származott.

Kimutatták a diploid búza A genomját a hexaploid búzákban is. A hexaploid fajokban megtalálható a tetraploidok mindkét genomja és ezenkivül az Ae. squarrosa 14 kromoszómája, a két D genom, aminek a felfedezése Sax nevéhez füződik.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

Kimutatta, hogy a tetraploid Ae. cylindrica / 2 n = 28 / és a hexaploid búza hibridjében 7 bivalens és 21 univalens keletkezik. A D genom tehát benne van az Ae. cylindricaban. Bleier / 1928 / szerint a tetraploid búza-fajok és az Ae. cylindrica között csak jelentéktelen mértékü kromoszóma párosodás van. A további vizsgálatok kimutatták, hogy az Ae. cylindrica két alkotója az Ae. caudata /2n = 14/ és az Ae. squarrosa / 2n = 14 /. Az Ae. caudata és a hexaploid búza között nincsen kromoszóma párosodás.
Sears 1941-ben előállitott egy szintetikus amfiploidot az Ae. squarrosa és a T. dicoccum között, amely morfológiailag nagyon hasonlitott a T. spelta-hoz / 2n = 42 / és azzal keresztezve teljes kromoszóma párosodást talált.
Riley és Chapman / 1960 / előállitottak egy olyan hibridet a T. aestivum és az Ae. squarrosa között, amelyben az Ae. squarrosa hét kromoszómája a hexaploid D genomjának hét kromoszómájával 7 bivalenset képezett, amig az A és B genom 14 kromoszómája mint univalensek jelentkeztek.
A Kyoto egyetem botanikai expediciója megállapitotta, hogy Kisázsiában a tetraploid fajok és az Ae. squarrosa elterjedési területe földrajzilag megegyezik és kiderült, hogy ugyanazokon a területeken, ahol a T. dicoccum-ot termesztik, az Ae. squarrosa a búzaföldek természetes gyomnövénye / Yamashita, Kihara és Tanaka, 1965 /. A fentieket megerősitik azok a heterokromatikus festési vizsgálatok / Hadlaczky és Belea, 1975 /, amelyek szerint az Ae. squarrosa összes kromoszóma párja jellegzetes festődési

mintázata megegyezett a hexaploid búza harmadik genomjának / D / sávozottságával.

A búza B genomjának eredete alig ismert. Napjainkban felmerült az a korábbi elképzelés, hogy a tetraploid búza egyszerüen a diploid faj autotetraploidja / Schrimpf, 1951/. Johnson /1975/ a szemtermés elektrofókuszálásos fehérjemintázata alapján a T. urartu-t tekinti a B genom forrásának. A másik szülőpartnerként a T. boeoticum-ot / A genom/ emliti. A T. boeoticum x T. urartu amfiploid nagyfokú fertilitása és a ssp. dicoccoides-hez való morfológiai hasonlósága miatt Dhaliwal / 1976 / is ezt a felfogást fogadja el. Heterokromatikus festési eljárással kimutatták / Hadlaczky és Belea, 1975 /, hogy a T. urartu A genomja nem azonos sávozottságú a B genomhoz tartozó kromoszómákéval. Eszerint nem lehet e faj a B genom donorja. A B genomból addició útján több olyan tulajdonság is került a búzába, melyekkel a T. urartu nem rendelkezik.

Az autotetraploid származás lehetőségét kizárja az a megfigyelés, mely szerint a mesterségesen előállitott autotetraploidok, a 2n = 28 kromoszómája ellenére, morfológiailag a diploidhoz hasonlitanak.

Sarkar és Stebbins /1955/ feltételezése szerint a B genom donorja az Ae. speltoides. Feltételezésüket az Ae. speltoides és a tetraploid búza B genomjához tartozó satellit kromoszómáknak /1B, 6B / a nagy hasonlóságára és a diploid búzával való közös földrajzi elterjedésre alapozták. E felfogást cáfolja az Ae. speltoides citoplazmás him-

steril jellege / Maan és Lucken, 1971 /, az elektroforézises fehérje-mintázat / Fejér és Belea, 1976 /, az immunokémiai reakciókban megmutatkozó különbség / Aniol, 1973 /. Kizárja ezt a lehetőséget az Ae. speltoides x diploid búza eddigi sikertelen amfiploidizálása, továbbá a laboratóriumokban Giemsavval festett / C-sáv / kromoszóma identifikálás is.

Az utóbbi évek vizsgálatai szerint, az Ae. mutica lehet a B genom donorja / Belea és Fejér, 198o /. Az Ae. mutica két satellit kromoszómája hasonlit a tetraploid búza 1B és 6B kromoszómáihoz. Az előállitott Ae. mutica x T. turgidum ssp. carthlicum hibridek F_1 nemzedékének meiozisában legnagyobb gyakoriságban $7^{II} + 7^{I}$, kisebb mértékben pedig $6^{II} + 9^{I}$ kromoszómakonjugáció fordul elő. Eszerint az Ae. mutica és a tetraploid búza B genomja homeológ egymással / a homeológia magyarázatát lásd "A búza kromoszómák osztályozása" c. fejezetben /.

Az emlitettek ellenére sem tisztázódott megnyugtatóan az emberiség számára legfontosabb fajnak, a közönséges búzának / T. aestivum / a származása.

2.1.2. A búza kromoszómák osztályozása

A búza kormoszómákat római számokkal I-től XXI-ig jelölik, az A genomot I-től VII-ig, a B genomot VIII-tól XIV-ig és a D genomot XV-től XXI-ig.

Sears /1965/ nulliszomokat tetraszomokkal keresztezve megfigyelte, hogy bizonyos esetekben a kettős dózisban

szereplő kromoszómák kiegészitik a hiányzókat. Igy hét olyan csoportot állitott fel, amelyben a bennük szereplő három kromoszóma bármelyike, megkettőzött állapotban, pótolja bármelyik másik hiányzót. Huskins /1941/ nyomán ezeket a külön genomhoz tartozó, egymás kiegészitésére képes kromoszómákat homeológoknak nevezzük /szegmentális homeológok/.

A hét homeológ csoport a 3 genom egy-egy kromoszómájából áll, ebből következik, hogy az egyes genomok kromoszómáik hasonlósága alapján szoros rokonságban állanak egymással. A nem homeológ csoportok közötti keresztezések nem mutatnak kiegészitést. A 21 kromoszóma megoszlása a 7 homeológ csoportban a következő / Lelley, 1968 /:

Homeológ csoport	A genom		B genom		D genom	
1.	1A	XIV	1B	I	1D	XVII
2.	2A	II	2B	XIII	2D	XX
3.	3A	XII	3B	III	3D	XVI
4.	4A	IV	4B	VIII	4D	XV
5.	5A	IX	5B	V	5D	XVIII
6.	6A	VI	6B	X	6D	XIX
7.	7A	XI	7B	VII	7D	XXI

2.1.3. Az amfiploidok

Az amfiploidok előállitása Blakeslee és Eigsti munkája nyomán vált lehetségessé, mivel a kolhicin kezelés az orsófonalak képzésére gátló hatást fejt ki, ami poliploidiát

eredményez / Leiser, 1954/ .

A Triticinae nemzetségen belül előállitott amfiploidok közül számos, klasszikus alloploidként viselkedik, mint például az Ae. longissima / 2n = 14 / vagy a Secale cereale / 2n = 14 /, amelyek Triticum fajokban bivalenseket képeznek. Több más esetben azonban multivalenseket kapunk. Ez utóbbi abból eredhet, hogy valamely homeológ genom több, mint kétszer szerepel - mint a diploid és tetraploid búza amfiploidjában az A genom - vagy az V / 5B / kromoszóma aszinaptikus hatását gátolja az új genom valamely génje, mint azt az Ae. speltoides /2n = 14/ illetve Ae. mutica /2n = 14/ hexaploid búzával adott hibridjei mutatják.

Az amfiploidok gyakorlati jelentőségét mutatja, hogy Kiss Árpád /1966/ oktoploid x hexaploid = heptaploid / 7x / F_1 nemzedékét szelektálva ma már a köztermesztésben is felhasználásra került új búzafajt állitott elő.

2.2. A foszfodiészteráz enzim

A növényi anyagcsere folyamatokban a nukleázok szerepe a nukleinsavak bontása. Nagyon kevés ismeretünk van arról, hogy in vivo körülmények között a reakció hatékonysága milyen, valamint arról, hogy milyen kontroll mechanizmusok müködnek az élő sejtben. Csupán annyi biztosat mondhatunk, hogy minden enzim, amely szerepet játszik a nukleinsavak lebontásában, határozott funkcióval rendelkezik és az életciklus egy meghatározott helyén válik aktivvá, egyébként inaktiv / Razzell, 1963 /.
Ez az inaktivitás úgy valósulhat meg, hogy a sejtben a specifikus szubsztrát és az enzim fizikailag elkülönülve helyezkedik el, vagy természetes inhibitorok gátolják az enzimmüködést. Hiányozhatnak az enzimmüködés intracelluláris feltételei, de a jelenség oka lehet az is, hogy a szubsztrát nem megfelelő állapotban van / Laskowski, 1971 /.
A sejtben lejátszódó nukleinsavak bontásáról ma annyit mondhatunk, hogy a nukleázok azt hét reakciólépésben valósitják meg / Wilson, 1975 /:

1. RNS / DNS / $\xrightarrow[\text{exonukleáz}]{\text{nukleáz I.}}$ pN /pdN /

2. RNS $\xrightarrow[\text{RN-áz II.}]{\text{RN-áz I.}}$ N>p / R>p + Y>p /

3. R>p $\xrightarrow[\text{foszfodiészteráz}]{\text{RN-áz I. RN-áz II.}}$ Rp

4. $Y>p \xrightarrow{\text{RN-áz II. foszfodiészteráz}} Yp$

5. $Np \xrightarrow{\text{nukleozid foszfotranszferáz}} pN$

6. $Np \xrightarrow{\text{3'-nukleotidáz nukleáz I.}} N + P_i$

7. $N + ATP \xrightarrow{\text{nukleozid kináz}} pN$

N = ribonukleozid

pN = ribonukleozid-5'-foszfát

pdN = dezoxiribonukleozid-5'-foszfát

N>p = 2'3'-ciklikus nukleotid

R>p = nem specifikus purin bázisú nukleozid-2'3'-ciklikus monofoszfát

Y>p = nem specifikus pirimidin bázisú nukleozid-2'3'-ciklikus monofoszfát

Np = ribonukleozid-3'-foszfát

P_i = anorganikus foszfát

Rp = nem specifikus purin nukleotid

Yp = nem specifikus pirimidin nukleotid

A fenti reakciókban azokat az enzimeket, melyek a nukleinsavakban a nukleotidok közötti kötéseket bontják, PDE-ázoknak nevezzük. Ezeket az enzimeket három fő csoportba soroljuk:

I. Ribonukleázok

II. Dezoxiribonukleázok

III. Ebbe a speciális csoportba azok az enzimek tartoznak, amelyek hidrolizálják a ribo- és dezoxiribonukleotidok láncközi kötéseit. A továbbiakban ezeket az enzimeket egyszerüen PDE-ázoknak nevezzük / Heppel és Rabinowitz, 1958; Khorana, 1961 /.

Pontos információkat az emlitett csoportokba tartozó enzimek hatásmechanizmusáról az utóbbi évek kutatásai adtak. A megadott csoportokba való soroláshoz az enzimek következő tulajdonságait veszik figyelembe / Schmidt és Laskowski, 1961 /:

1. a szubsztrát minősége:	RNS vagy DNS
2. a hasitás módja:	endo- vagy exonukleáz
3. a végtermék kémiai szerkezete:	5'- vagy 3'-mononukleotid
4. egymás melleti vagy speciális helyeken történő hasitás:	3'- vagy 5'-helyzetü szabad hidroxil-csoport

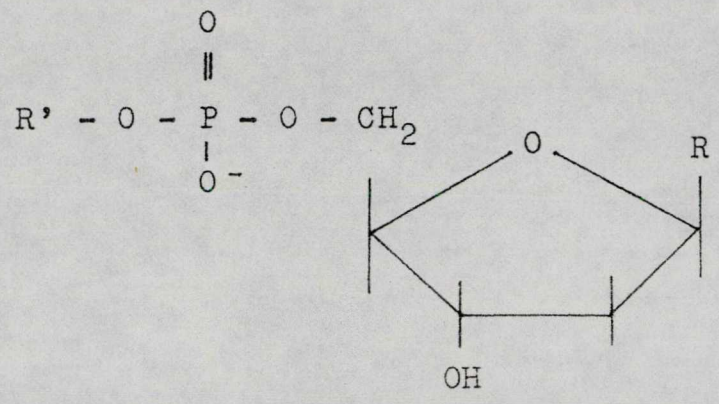
A ribonukleázok és dezoxiribonukleázok / I. és II. csoport enzimjei / jellemzése nem tartozik a disszertáció témájához, igy csak a III. csoportba tartozó foszfodiészterázok tulajdonságaival és eddigi kutatásukkal foglalkozunk. Uzawa /1932/ volt az első kutató, aki kimutatta a PDE-ázt a kigyóméregben és Takahashi / 1932 / tanulmányozta részletesebben azt, ribonukleinsavat használva szubsztrátként. Gulland és Jackson / 1938 / állapitották meg először, hogy a méregben található PDE-áz RNS-el történő reakciója

ribonukleozid-5'-foszfátot eredményez.

Számtalan kutató próbálkozott a PDE-áz tisztitásával mind állati, mind növényi objektumokból. Lerch és Wolf / 1972 / cukorrépából izolálták az eddigi legtisztább növényi PDE-ázt preparativ gélelektroforézist alkalmazva a tisztitás során.

Az első enzimkarakterizálási eredmények Razzel és Khorana / 1959 / nevéhez füződnek. A különböző eredetü szövetekből, sejtekből származó PDE-áz enzim tulajdonságait napjainkig végzett kutatások alapján az alábbiakban foglaljuk össze.

A PDE-áz pH optimuma 8,9 és 9,8 között van. Az enzim müködését a redukáló anyagok, mint például cisztein, aszkorbinsav, gátolják. A kétértékü ionok közül a Mg^{++} jelenléte szükséges az enzimreakcióhoz, mig a többi kétértékü ion magas koncentrációban / 50 mM / gátló hatást fejt ki, hasonlóan a kelátképző anyagokhoz. Az enzimaktivitás részleges elvesztését figyelték meg vizzel szemben történő dializiskor, még abban az esetben is, ha Mg^{++} volt jelen / Razzel, 1959; Boman és Kaletta, 1957 /. A PDE-áz vizsgálatoknál kezdetben a leggyakrabban használt szubsztrát a di-p-nitrofenil-foszfát volt, melyről bebizonyosodott / Razzel, 1959 /, hogy nem specifikus szubsztrátja a PDE-áz enzimnek. A legérzékenyebb és legspecifikusabb szubsztrátoknak az uridin-5'-p-nitrofenil-foszfát és a timidin-5'-p- nitrofenil-foszfát bizonyult.



/ R = timin vagy uracil

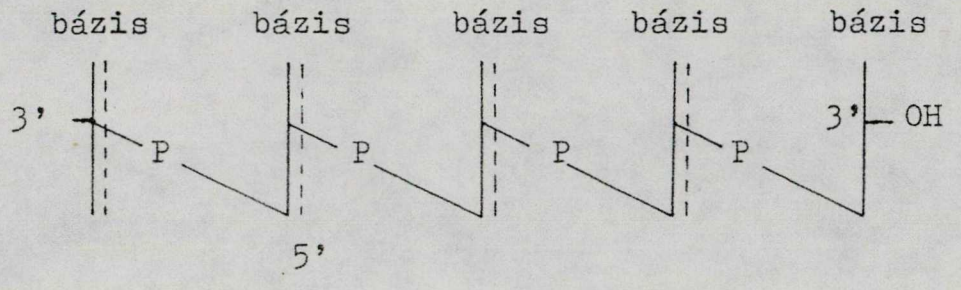
R'= p-nitrofenil /

Az enzim szubsztrátspecifitás vizsgálatai azt az eredményt adták, hogy a dinukleotidok hidrolizisének mértéke akkor a legnagyobb, ha a molekulában 5'-foszfomonoészter csoport van jelen. Ugyanezt tapasztalták oligonukleotidokkal is, más szóval, ha bármely oligonukleotidban 5'-foszfomonoészter csoport van, akkor a hidrolizise sokkal gyorsabb, mint ha az ilyen csoport hiányzik a vizsgált nukleotidból. E tény úgy magyarázható, hogy a hidrolizis az ellenkező láncvégen, nevezetesen a 3'-hidroxilcsoportot tartalmazó végen indul meg, az 5'-foszfomonoészter csoport zárva marad a láncba, mely azt a célt szolgálja, hogy az enzim a "rossz" véghez, vagyis az 5'-hidroxil véghez ne tudjon kötődni. Az 5'-foszfát csoport reakció-gyorsitó hatása fokozódott, ha a monoészter csoportot metilezték / Khorana, 1959 /.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

A reakciómechanizmus sémája a következő:

DNS:



PDE-áz

5'-mononukleotidok

+

nukleozid

Az 5'-p-nitrofenil észterek rendkivül reakcióképes szubsztrátok. A hasonló tipusú, de más észtereket is hidrolizálja az enzim, például a timidilil-/5'→5'/-timidint vagy a nukleozid-5'-foszfát egyszerü alkil-észtereit. A PNP-pT hidrolizisének mértéke sokkal magasabb volt, mint a PNP-pU hidrolizise, ami arra utal, hogy a dezoxiribonukleotid származékok jobb szubsztrátjai a PDE-áz enzimnek, mint a megfelelő ribonukleotidok. Másrészről viszont nincs kimutatható különbség a pirimidin, illetve a purin bázisokat tartalmazó szubsztrátok között, ami azt jelenti, hogy a szubsztrátspecifitásban a heterociklusos bázisoknak nincs szerepük. Az ATP hidrolizise igen lassú reakció, melynek eredményeképpen AMP és anorganikus foszfát keletkezik. A di-/timidin-5'/-pirrofoszfát

hasitása tizszer gyorsabban megy végbe / Boman, 1969 /.
A különböző tipusú oligonukleotidok kompetitiv gátlásának vizsgálatához a legérzékenyebb szubsztrátot, a PNP-pT-t használták /Koerner és Sinsheimer, 1957 /.
Minden tipusú oligonukleotid hatásos gátlónak bizonyult, nagyon alacsony koncentrációban is. A K_i érték a nukleotid lánchosszának növekedésével arányosan csökkent, ami mutatja a nagyobb tagszámú oligonukleotidok szoros felépitését. A leghatásosabb kompetitiv inhibitorok a 3'-foszfát végcsoportú oligonukleotidok voltak.
Az enzimkinetikai vizsgálatok, melyeket olyan szintetikus dezoxioligonukleotidokkal és ribopolinukleotidokkal végeztek, melyek 3'-hidroxil végcsoportot hordoztak, azt mutatták, hogy a hidrolizis a lánc 3'-végén kezdődött és lépésről-lépésre nikleozid-5'-foszfátok váltak szabaddá. Valószinü, hogy a 3'-hidroxil csoport elősegiti az enzim kötődését a polinukleotid lánc ezen végéhez. A reakció ilyen tipusa lehetőséget nyújt a polinukleotid lánc szekvencia analizisére is. A kezdeti vizsgálatok alapján az ilyen tipusú enzimet "exopolinukleotidáz"-nak nevezték el / Laskowski és mts, 1957 /.
Adler és mts./ 1958 / izotóppal jelölt DNS emésztését vizsgálva megerősitették az emlitett reakciómechanizmus helyességét.
Hasonló eredmények születtek a 3'-foszfomonoészter végcsoportot hordozó ribopolinukleotidok és dezoxioligonukleotidok emésztésének vizsgálatából. Ezek minden két-

séget kizáróan igazolták, hogy a 3'-foszfomonoészter csoport ellenálló képességet biztosit a molekulának az enzimmel szemben. Az enzim tehát csak akkor képes kötődni a szubsztrát molekulára, ha a 3'-végen szabad hidroxilcsoport van / Turner és Khorana, 1959; Cresfield és Allen, 1956 /.

A ribopolinukleotidok emésztésével kapcsolatban érdekes megfigyelést tettek. Ha a láncvégen 2'3'-ciklikus foszfo-diészter csoport volt, az enzim megkötődött a molekulán, de nem úgy, mint a 3'-foszfomonoészter csoport jelenlétében /Wilson, 1975/.

Mai tudásunk a PDE-ázokról nem kielégitő ahhoz, hogy az ilyen tipusú enzimek csoportositását véglegesnek tekinthetnénk. Pillanatnyilag ez két okból is korai lenne. Először, mert a szubsztrátspecifitásukról és a reakciómechanizmusukról egyértelmü adatok nem állnak rendelkezésünkre. Másodszor, valószinünek látszik, hogy az elkövetkezendőkben új tipusú foszfodiészterázokat fedezhetnek fel.

2.3. A búza PDE-áz /E.C.3.1.4.1./ izoenzimjei

2.3.1. Az izoenzimekről általában

Az élő szervezetek anyagcsere folyamataiban fontos szerepet játszó enzimek tulajdonságairól és jelentőségéről az utolsó három évtizedben egyre több új adat kerül nyilvánosságra. Ezek közé tartoznak azok is, amelyek egy enzim

"variánsai"-ról, az izoenzimek jelenlétéről tanuskodnak. Különösen nagy lendületet adott az ismeretek gyarapodásának az enzimek komplex molekuláris formáinak szétválasztására használt technikák fejlődése és az izoenzimek különféle festési eljárásokkal történő kimutatásának tökéletesedése.

Az izoenzim fogalmat, vagy ennek analógjaként használt izozim terminus Markert és Moller / 1959 / vezette be. Az eredeti meghatározás szerint az izoenzimek ugyanazon szervezetben, sőt ugyanazon sejtben, hasonló enzimatikus specifitással rendelkező, de eltérő molekuláris alakban megjelenő fehérjék. Azóta sokféle definició született, melyeknek egy része szükitette, más része bővitette az eredeti kritériumok körét, ennek ellenére Markert meghatározása a lényeget illetően ma is helytálló.

Az enzimmolekulák emlitett multiplicitása a biokémiai polimorfizmus egyik megnyilvánulása, amely számos kutató vizsgálatának középpontjában áll. A kutatások célja az izoenzimek morfológiájának, tipusainak, bioszintézisének, kémiai jellegének, fiziológiai jelentőségének, stb. tisztázása.

Ismeretes, hogy a fehérje elsődleges, másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezete, valamint e strukturák által megszabott térbeli konformáció elsőrendüen fontos egy enzim specifikus tulajdonságainak a meghatározásában. Következésképpen minden olyan változás, amely módositja az enzimnek ezt a meghatározott szerkezetét, az

enzim eltérő, de közel rokon formáját eredményezheti / Shannon, 1968 /.

Markert / 1968 / több olyan lehetőséget is felsorolt, amelyek változást okoznak a protein szerkezetében. Például a keletkezett enzim polipeptid láncának megrövidülése a terminális aminósavak deléciója útján; a lánc kis molekulákkal való konjugációja; ugyanazon primer szerkezet eltérő másodlagos, stb. hajtogatódása; az enzim működése szempontjából nem esszenciális régiókban bekövetkező aminósav megváltozás; mind az adott enzim eltérő molekuláris alakjainak keletkezéséhez vezethet.

Brewer és Sing /197o/ az izoenzimek több csoportját különiti el. Egyik alosztálynak tekintik az un. szegregációs izoenzimeket, melyek genetikai determináltságuk következtében a populáció különböző genotipusú egyedeiben más-más megjelenésüek. Ezzel szemben nem szegregációs izoenzimek, vagy konstazimoknak nevezzük azokat az izoenzim mintázatban található sávokat, melyek a populáció minden tagjában közösek. További kategóriát képeznek a heteropolimerek, amelyek két vagy több alegységből állnak, a homopolimerekben viszont valamennyi monomer azonos felépitésü. A konformációs izoenzimek csoportjába egy enzim azon multiplex molekuláris formáit sorolják, melyeknek aminósav szekvenciája azonos, csupán térbeli szerkezetükben különböznek.

Végezetül az izokinetikus izoenzimek kifejezést is használják a szerzők felsorolásukban, a megközelitőleg azo-

nos kvantitativ aktivitást mutató izoenzimek jelölésére. Az izoenzimek bioszintézisének tanulmányozásában az egyik legérdekesebb feladatot jelenti annak a genetikai háttérnek a tisztázása, amely az izoenzimek kialakitásáért felelős. A genetika és biokémia eredményei nyilvánvalóvá tették, hogy az izoenzimek közvetlen gén-termékként foghatók fel. Az allélikus, vagy nem allélikus gének specifikus polipeptideket determinálnak, melyek különböző módon fehérje egységekké hajtogatódnak és közülük egy vagy több aktiv enzimmé formálódik / Lawrence és Shepherd, 1981 /.

Shaw már 1965-ben rámutatott arra, hogy a genetikai alapban bekövetkező, különböző okokra visszavezethető változás az enzimmolekulák eltérő elektroforetikus mobilitását eredményezheti, ami a zimogram technika segitségével detektálható. Ez közvetlen bizonyitékot szolgált az izoenzimek genetikai determináltságáról, de természetesen nem jelenti azt, hogy valamennyi genetikai variáció tanulmányozható az izoenzimek szintjén.

Az izoenzimek kémiai természetüket tekintve több tulajdonságban különböznek egymástól. Eltérhetnek specifikus aktivitásukban, szubsztrát affinitásukban, inhibitorokkal szembeni viselkedésükben, pH optimumuk igényében, különböző hőmérsékleti értékekre adott reagálásukban, stb. A szakirodalomban megjelenő egyre több adat mutatja az egyes izoenzimek kémiai sajátságainak vizsgálatát. Ez kiterjed a szerkezetük, müködésük alaposabb megismerésére

/ Rasmuson és mts, 1966; Vigue és Johnson, 1973; stb./. Ma még az izoenzimek élettani szerepére vonatkozó információink mennyisége és minősége nem teszi lehetővé, hogy egyértelmü magyarázattal szolgáljunk ezek fiziológiai jelentőségéről. Tekintettel arra, hogy egy szervben, szövetben, sőt egyetlen sejtben is több izoenzim mutatható ki, amely ugyanazt a reakciót katalizálja, léteznie kell in vivo olyan regulációnak, amely meghatározza, hogy mindig a körülményeknek legmegfelelőbb enzim müködjék, - bár ennek léte még nem teljesen igazolt -.

2.3.2. A búza PDE-áz izoenzim vizsgálatai

Mivel a búza genom eredetére vonatkozó citológiai és morfológiai vizsgálatok nem adtak megfelelő magyarázatot, igy a 70-es évek elejétől egyre nagyobb jelentőséget kapott a gélelektroforetikus izoenzim technika. A búza rokonsági kapcsolatainak felderitésére 12 különböző specificitású enzim zimogramját hasonlitották össze / Johnson, 1972; Jaaska, 1971; Mitra és Bhatia, 1971 /, eredménytelenül. Értékelhető eredmények akkor születtek, amikor a nukleinsav-bontó enzimeket használták a genetikai vizsgálatokhoz, melyek közé a PDE-áz is tartozik. Az első adat a búza PDE-áz enzimjéről 1973-ban jelent meg / Wolf és Lerch, 1973 /. A szerzők által vizsgált hexaploid búzákban három PDE-áz izoenzimet találtak, egymásnak megfelelő elektroforetikus mobilitással. A tetraploidok csak egy enzimcsikot tartalmaztak, amely azono-

sitható volt a hexaploidok leggyorsabban mozgó izoenzimjével. A vizsgált diploid búza-fajokban szintén egy PDE-áz enzimet mutattak ki, melyet azonban elektroforetikus mozgékonyság alapján nem lehetett pontosan azonositani. Ezen eredményekből azt a következtetést vonták le, hogy:

1. a tetraploidokban található egy enzimcsik jelenléte kétféleképpen magyarázható: vagy úgy, hogy a genomnak azon része, ahol PDE-áz lokalizálódik autoploid, vagy két, nagyon közeli rokonságú diploid búzából származik;
2. azon diploid fajokban, amelyek tartalmazzák az A vagy a B genomot / T. monococcum, T. aegilopoides, Ae. speltoides / olyan enzimcsik mutatható ki, amely nem azonositható a tetraploidok, vagy hexaploidok egyik izoenzimjével sem.

A kapott eredmények tették szükségessé azokat a vizsgálatokat, amelyek a PDE-áz kromoszóma lokalizációjára és ennek génszabályozására vonatkoztak.

A zimogram technika igen eredményes módszer a génhatás szabályozásának tanulmányozására / Scandalios, 1974 /. A nagy specificitású enzim szisztémákban az egyes fehérje molekulák jelentik a strukturgének elsődleges termékét, igy a gének aktivitása külön-külön könnyen figyelhető.

Az allohexaploid búza aneuploid képviselői, amelyekben egyes kromoszómák 0-4-szeres dózisban találhatók, alkalmasak a génhatás vizsgálatára. A búza kromoszómákban

Wolf /1977 / azonositotta és lokalizálta a PDE-áz strukturgéneket és a szabályozó géneket. Bebizonyosodott, hogy a búza 3. homeológ csoportjának kromoszómái kódolják a PDE-ázt / jelölésük: Pde-A3; Pde-B3; Pde-D3 /. Ezért, ha például mindegyik 3D kromoszóma hiányzik egy nulliszóm növényből, akkor a lassúmozgású izoenzim és természetesen a középső hibrid enzim is hiányzik a zimogramról. Ebből az következik, hogy a lassúmozgású izoenzimet a búza 3D kromoszómájának β-karjának génje vagy génjei kódolják. A gyorsmozgású izoenzim relativ aktivitás csökkenése figyelhető meg akkor, ha vagy a 3A vagy a 3B kromoszómák hiányoznak. Ez azt jelenti, hogy az emlitett izoenzimek mind a 3A, mind a 3B kromoszómán van lokalizációja. E vizsgálatokból az is világossá vált, hogy a génhatás a 3A és 3B kromoszómán dózisfüggő /nulliszómás - tetraszómás vizsgálati eredmények/.

Az a tény, hogy a PDE-ázt kódoló gének mindegyike a 3. kromoszóma csoportjában van, alátámasztja a búza genomok kromoszómáinak homeológiáját.

A PDE-áz enzim szabályozó génjeinek lokalizációjáról azt állapitották meg / Wolf, 1977 /, hogy van egy gén az 5B kromoszómán, melynek jelenléte elengedhetetlen a lassúmozgású izoenzim szintéziséhez és a gén hatása dózisfüggő. Az 5B kromoszóma hiányát az 5A vagy 5D kromoszóma génjeinek négyszeres mennyisége kompenzálni képes. Igy, mindhárom kromoszóma az ötödik csoportban olyan géneket hordoz, melyek szerepet játszhatnak a

lassúmozgású izoenzim szintézisében.

A fentiek szerint tehát a PDE-áz három izoenzimje közül a lassúmozgású a 3D kromoszóma génjeinek kontrollja alatt áll / Pde-D3 /, a gyorsmozgású a 3A és 3B kromoszómák génjeinek terméke / Pde-A3 és Pde-B3 /, végül a harmadik izoenzim, közepes elektroforetikus mobilitással, feltehetően egy hibrid enzim.

Rimpau és Wolf / 1978 / Triticale-val végzett munkájuk során egy összetett hatást mutattak ki a strukturgének sejtmag szinten és citoplazmatikus szinten történő szabályozása között. Bebizonyitották, hogy a PDE-áz strukturgénjei citoplazmatikus szabályozás alatt is állnak.

Összefoglalva, a búza PDE-áz izoenzimjeivel kapcsolatban, a génhatás szabályozásának komplex rendszeréről elmondható, hogy:

1. az izoenzimek aktivitása a strukturgének dózisától függ;
2. a strukturgének aktivitása a sejtmagban lokalizált / "separate nuclear" / gének által szabályozott;
3. a szabályozó tényezők hatása szintén dózisfüggő;
4. az allohexaploid búza különböző genomjaiban lokalizáltak / B és D / a szabályozó és a strukturgének és valószinü, hogy a komplex szabályozás a poliploidizáció mértékével egyenes arányban nő;
5. a PDE-áz strukturgénjei citoplazmatikusan is kontrolláltak.

3. Anyag és módszer

3.1. A kisérletben felhasznált növényanyag

A vizsgálatokhoz két különböző hexaploid búza növényfajt használtunk fel. Az egyik a közönséges búza, T. aestivum / L. /, genom formulája AABBDD, a másik az Ae. squarrosa / DD / és a T. durum / AABB / egy szintetikusan előállitott amfiploidja, hasonló genom formulával, mint a közönséges búzáé.

3.2. A nyers kivonat készitése

A növényeket tiz napig vizkulturán nevelük Knopp-féle tápoldaton, 17 ^{o}C-on, sötét és világos periódusok szabályos váltakozásával, Conviron tipusú fitotronban. A világos periódusok alatt a fény erőssége 45 W $\cdot$ m^{-2} volt. A tiznapos leveleket felhasználásig -16 ^{o}C-on tartottuk, majd a friss levél súlyának háromszorosát kitevő 50 mM-os TRIS- HCl puffert /pH:7,5/ adtuk hozzájuk és a leveleket folyékony nitrogén és kvarchomok segitségével elhomogenizáltuk. A szuszpenziót 18000 rpm sebességgel 60 percig, 4 ^{o}C-on centrifugáltuk Sorvall RC5 tipusú centrifugán és az igy nyert felüluszót használtuk a további vizsgálatokhoz.

3.3. A PDE-áz enzimaktivitás meghatározása

A foszfodiészteráz spektrofotometriás meghatározásához használt inkubációs elegy össztérfogata 0,55 ml volt, mely 1,25 µM TRIS-HCl puffert / pH:7,5 /, 0,025 µM p-NPP-t / Sigma / vagy PNP-pT-t / Merck / és 50 µl enzimkivonatot tartalmazott.
Az enzimreakciót 37 °C-on, egy órás inkubálás után 250 µl 0,3 M-os NaOH oldattal állitottuk le. Az elegy fényabszorpcióját 400 nm-en olvastuk le Spektromom 195 / MOM / spektrofotométeren.
Az enzimaktivitás számitásához az enzim által felszabaditott p-nitrofenol mennyiségét mértük. A p-nitrofenol moláris extinktiós koefficiense 18500.
Egy enzimegységnek az enzim azon mennyiségét vettük, amely 1 µM p-nitorfenolt szabadit fel egy óra alatt a fenti kisérleti körülmények mellett. A specifikus enzimaktivitást enzimegység/mg fehérje értékben adtuk meg / Harvey és mts, 1967 /.

3.4. A fehérjetartalom mérése

A fehérje mennyiségét két módszerrel határoztuk meg, melyek közül az egyik a fehérjeoldat 280 nm-en mért fényabszorpciója alapján számitja a proteintartalmat / Kalckar, 1974 /, a másik Bradford / 1976 / módszere volt.

József Attila Tudományegyetem SZEGED

3.5. A foszfodiészteráz enzim tisztitása

A nyers kivonathoz 40 % telitettségig $/NH_4/_2SO_4$-ot adtunk, az oldatot állandó keverés közben egy éjszakán át 3 °C-on tartottuk, majd 30 percig, 8000 rpm sebességgel centrifugáltuk / Centrifuga tipusa: Janetzki K 24 /. A felülúszóhoz 90 %-os telitettségig újra $/NH_4/_2SO_4$-ot adtunk és megismételtük az előző eljárást. A centrifugálás után kapott csapadékot 50 mM-os TRIS-HCl pufferben /pH: 7,5/ oldottuk fel. Az oldatot 3 liter 10 mM-os TRIS-HCl pufferrel / pH: 7,5 / szemben dializáltuk 4 °C-on, háromszor cserélve a puffert 12 órás időközönként. A dializátumot Sephadex G-200-as oszlopon /Pharmacia / kromatografáltuk. Az oszlopot / 2,5 x 95 cm / előzőleg 10 mM-os TRIS-HCl pufferrel / pH: 7,5 / ekvilibráltuk és a folyási sebességet 20 ml/órára állitottuk be.

A kapott 5 ml-es frakciók PDE-áz aktivitását a 3.3. fejezetben leirtak alapján teszteltük mindkét szubsztráttal. A fehérje mennyiségét spektrofotometriásan, 280 nm-en határoztuk meg. Az aktiv frakciókat összegyüjtöttük, 90 %-os $/NH_4/_2SO_4$-os kicsapással töményitettük, újra dializáltuk 5 mM-os TRIS-HCl pufferrel / pH: 7,5 / szemben. Az igy nyert fehérje frakciót DEAE-cellulóz oszlopon / Whatman DE 52 / tovább tisztitottuk. Az oszlopot / 2 x 16 cm / 5 mM-os TRIS-HCl pufferrel / pH: 7,5/ ekvilibráltuk és a felvitt fehérjéket kétszeres oszloptérfogatnyi pufferrel mostuk. A proteineket 0,0-0,4 M-

os NaCl lineáris sógrádienssel eluáltuk / Harvey és mts, 1967 /. Az oszlop folyási sebessége 30 ml/óra volt. A frakciók enzimaktivitását és fehérjetartalmát ugyan úgy határoztuk meg, ahogy azt a Sephadex G-200-as oszlopról lejött frakcióknál tettük. Az aktiv frakciók összegyüjtése után a mintát dializáló hüvelybe öntöttük és Sephadex G-200 superfine poron töményitettük, 4 °C-on.
A koncentrált fehérje oldatot 0,01 M-os KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 pufferrel / pH: 7,0 / szemben dializáltuk és hidroxilapatit / Bio-Rad / oszlopra vittük. Az oszlopot / 2 x 15 cm / ugyanezzel a pufferrel ekvilibráltuk, folyási sebessége 12 ml/óra volt. A minta oszlopba történő bemosása után, 0,01 - 0,35 M-os foszfát-puffer lineáris grádienst / pH: 7,0 / használtunk a fehérjék eluálásához / Lerch és Wolf, 1972 /. Az enzimaktivitás és fehérjetartalom mérésekkel meghatározott aktiv frakciókat összegyüjtve, azt mint tisztitott enzimkivonatot használtuk a következő vizsgálatainkhoz.

3.6. A hasitás módjának vizsgálata

Annak eldöntésére, hogy az enzim a polinukleozidokat hogyan bontja, 3'- vagy 5'-végről hasitja, két módszert alkalmaztunk.

3.6.1. Poli-A emésztés

A tisztitott enzim 0,25 ml-ét 37 °C-on inkubáltuk 1,25 mg

poli-A / Calbiochem / szubsztárttal és 0,12 mM TRIS-HCl pufferrel /pH: 9,5 /, a végtérfogat 1,05 ml volt. Az inkubációs elegyből 1, 2, 4, 8, 16 és 24 órás emésztés után mintákat vettünk, melyeket 5 percig 100 ^{o}C-os vízfürdőn tartottunk az enzim inaktiválása céljából. Minden mintát F_{254} tipusú / DC Plastikfolien, 20 cm x 20 cm x 0,1 mm, Merck / cellulóz vékony-réteg lapon kromatografáltunk. A felszálló technikával végzett futtatáshoz n-propanol : viz : cc.NH_3 = 55 : 35 : 10 arányú elegyét használtuk. Kontrollként 3'-AMP, 5'-AMP és poli-A oldatát vittük fel a rétegre. A kromatográfia eredményét UV fény alatt ellenőriztük.

3.6.2. Radioaktivan jelölt DNS fragmentek emésztése

Az inkubációs elegy 10 µl, 5'-adenin végen ^{32}P izotóppal jelölt 12 tagú egyszálú DNS fragmenteket /Dr. Simontsics András - MTA Szegedi Biológiai Központ Genetika Intézet - állitotta elő /, 10 µl enzimoldatot és 10 µM TRIS-HCl puffert / pH: 9,5 / tartalmazott. A 2, 4, 6 és 24 órás inkubálás után kivett mintákat hasonló hőkezelésnek tettük ki, mint az előzőekben és a vékony-réteg kromatográfia körülményei is ugyanazok voltak. A kromatogrammokat autoradiografáltuk és egy éjszakán át történő expozició után hivtuk elő / Medifort RP 15 x 25 cm Forte film /.

3.7. Az enzim exo- vagy endonukleáz jellegének kimutatása

Birnboim / 1966 / által kidolgozott gélfiltrációs módszert alkalmaztuk az enzim exo- vagy endonukleáz jellegének kimutatására. A vizsgálatokhoz használt DNS-t 100 °C-on 10 percig 0,15 M-os TRIS-HCl pufferben /pH:8,8/ denaturáltuk, majd hirtelen lehütöttük. Az inkubációs elegy 1 ml-e 500 µl enzimoldatot, 0,25 mg hőkezelt DNS-t és 15 µM TRIS-HCl puffert /pH: 8,8 / tartalmazott. A Sephadex G-50-es / 2 x 15 cm / oszlopra / Pharmacia / kontrollként először 200 µl hőkezelt DNS és 50 µl 5'-AMP / Serva / elegyét vittük fel, amit a 37 °C-on 45, 90 perc, és 3 és 6 óra inkubáció utáni minták felvitele követett külön-külön. A reakciótermékeket 0,1 M-os TRIS-HCl pufferrel / pH: 8,8 / kromatografáltuk. Az oszlop folyási sebessége 5 ml/óra volt és 2 ml-es frakciókat szedtünk. A frakciók fényabszorpcióját 260 nm-en mértük.

3.8. A pH optimum meghatározása

Az enzimaktivitás pH optimumának meghatározására az eltérő pH tartományokban különböző puffereket alkalmaztunk, igy a pH: 4,5 - 8,0 tartományban 10 mM-os TRIS-acetát, a pH: 7,0 - 9,5 között 10 mM-os TRIS-HCl és a pH: 9,0 - 11,0 között 10 mM-os glicin-NaOH rendszerekkel dolgoztunk.

3.9. Az enzim stabilitásának vizsgálata

Az enzimkivonatot 50, 60, 80 és 90 °C-on 5, 10, 15 és 20 perces inkubációnak tettük ki. A megmaradt aktivitásokat mind p-NPP, mind PNP-pT szubsztrátokkal teszteltük. Az inkubációs elegy összetétele a következő volt:

0,25 ml 50 mM-os TRIS-HCl puffer / pH: 9,5 /
0,25 ml 0,1 mM-os szubsztrát oldat
50 µl enzimoldat.

Hasonló összetételü elegyben vizsgáltuk az enzim stabilitását szobahőmérsékleten és -20 °C-on. A szobahőmérsékleten végzett vizsgálatoknál naponként, a -20 °C-on végzetteknél hetenkénti periódusokban vettünk mintát és meghatároztuk a megmaradt aktivitást. Az utóbbi vizsgálatot öt hónapig folytattuk.

3.10. Az enzim aktiválása és gátlása

A 3.3. fejezetben leirt standard elegyhez 2 mM-os $MgCl_2$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $CoSO_4$, $CaCl_2$, K_2HPO_4, EDTA, Na_2HAsO_4, NaF, NaCN és 3 M-os urea, valamint 10 %-os Triton X-100 oldatok 100 - 100 µl-ét adtuk, a felszabaditott p-nitrofenolt spektrofotometriásan, 400 nm-en mértük.

3.11. A nukleinsavak és szintetikus polinukleotidok enzimatikus hidrolizise

A vizsgálatokhoz denaturált csirkevér DNS, élesztő RNS,

nativ csirkevér DNS, poli-A, poli-U és poli-C / Calbiochem / 0,25 %-os NaCl - Na-citrát pufferrel készitett oldatát használtuk. Az inkubációs elegy összetétele:

0,1 ml az előzőekben leirt nukleinsav, ill. szintetikus polinukleotidok oldata
0,1 ml 50 mM-os TRIS-HCl puffer / pH: 9,5 /
250 µl enzimoldat.

A reakciót 37 °C-os, 30 perces, 1, 2, 4 és 4 órás inkubálás után 0,5 ml 2,5 %-os TCA oldattal állitottuk le, amely 0,3 % $La/NO_3/_3$-ot tartalmazott. A reakcióelegyet 20 percig jégen tartottuk, majd 10 percig 20000 rpm sebességgel centrifugáltuk. A minták fényabszorpcióját 260 nm-en mértük.

3.12. A végtermékgátlás és a koenzimigény vizsgálata

A PDE-áz aktivitását a nukleinsavak hidrolizisekor keletkező 5'-mononukleotidok gátolják. A ribonukleotidok és a megfelelő dezoxiribonukleotidok / AMP, GMP, CMP, UMP, dAMP, dGMP, dCMP, dUMP; Sigma / gátlását vizsgáltuk úgy, hogy a standard inkubációs elegyhez, az abban lévő szubsztráttal megegyező, kétszeres, ötszörös és tizszeres / 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM / koncentrációban adtuk az emlitett nukleotidokat. Szubsztrátként csak PNP-pT-ot használtunk. Harminc perces, 37 °C-on történő inkubálás után 400 nm-en végeztük a méréseket. A különböző koenzimekkel / NAD^+, $NADP^+$ és ATP / végzett kisérleteink során hasonló módon jártunk el.

3.13. Enzimkinetikai vizsgálatok

A PDE-áz Michaelis-állandójának / K_M / és az enzim-szubsztrát reakció maximális sebességének / $v_{max.}$ / meghatározására különböző koncentrációjú PNP-pT szubsztrátoldatot adtunk a standard inkubációs elegyhez. Az inkubálás 37 °C-on, 10 percig tartott. Az eredményeket a Lineweaver - Burk-féle ábrázolással fejeztük ki, melyből K_M és $v_{max.}$ közvetlenül számitható.

3.14. A poliakrilamid gélelektroforézis

Kisérleteink során az egyes tisztitási lépések után "slab" és "disc" gélelektroforézist alkalmaztunk az izoenzimek meghatározására / 7,5 %-os poliakrilamid gélen a Davis-féle rendszerben; Davis, 1964 /. A monomerek /akrilamid, bis-akrilamid/ Serva készitmények voltak. Elektróda pufferként 0,025M TRIS és 0,2 M glicin oldatot / pH: 8,3 / alkalmaztunk.
A lapgél esetén 12 mA/lap, a csövesgél esetén 2 mA/cső áramerősséggel futtattuk a géleket 4 °C-on. Az izoenzimek közül a PDE-áz enzim aktivitását a következő módon mutattuk ki. A géleket

2,5 mg α-naftil-timidin-monofoszfát-Na_2 só / BDH /
25,0 ml 10 mM-os TRIS-HCl puffer /pH: 7,5 /
15,0 mg Fast Red RC só / Sigma /

elegyében áztattuk / Lerch, 1968 /. Az enzimaktivitásnak megfelelő vörösesbarna csikok 20 perces szobahőmér-

sékleten való inkubálás után váltak láthatóvá. A festés után 7 %-os ecetsav oldatban fixáltuk a géleket. Genetikai tesztelés céljából az alábbi enzimek izozim mintázatát vizsgáltuk meg: alkalikus foszfatáz / Macintyre, 1966 /, savanyú foszfatáz / Aurian, 1976 /, nem specifikus észteráz / Kahler és Allard, 1970 /, GOT / Hart, 1975 /, leucin-amino-peptidáz / Scandalios, 1969/, ADH / Hart, 1970 /, MDH / Yamazaki, 1981 /, ICDH / Yamazaki, 1981 /, kataláz / Rudolph és Stahmann, 1966/, amiláz / Nishikawa és Nobuhara, 1971 /, EP / Hart, 1973/. A lapgéleket egy napos fixálás után vákuumban megszáritottuk, a gélcsöveket pedig 7,5 %-os ecetsav oldatban, jól záró csövekben tároltuk.

3.15. Az enzim molekulasúlyának meghatározása

3.15.1. Oszlopkromatográfiás módszer / Andrews, 1965 /

Az enzim tisztitásánál használt Sephadex G-200 oszlopot a látszólagos molekulasúly meghatározására a következő, ismert molekulasúlyú fehérjékkel kalibráltuk:

Blue dextrán / Pharmacia /		
kataláz	"	230.000 D
BSA	"	67.000 D
peroxidáz	"	40.000 D
citokrom-c	"	12.400 D
$K_2Cr_2O_7$	/ Reanal /	294 D

A PDE-áz enzim molekulasúlyának meghatározásakor azonos

körülmények között ugyanazon az oszlopon, a tisztitott enzimet kromatografáltuk.

3.15.2. SDS poliakrilamid gélelektroforézis

A 7,5 %-os Davis-féle gélhez 0,5 % SDS-t adtunk és 15 cm hosszú, 2 mm belső átmérőjü csövekben futtattuk a fehérjemintákat. A mintákat és kontroll fehérjékt "minta" pufferben / Weber és Osborn, 1969 / 5 percig 100 °C-os vizfürdőn tartottuk a futtatás előtt.

Kontrollként az alábbi fehérjéket használtuk:

foszforiláz	94.000 D
BSA	67.000 D
ovalbumin	43.000 D
szénsav-anhidráz	30.000 D
SzTI	20.100 D
α-laktalbumin	14.400 D

A "minta" puffer összetétele a következő volt:

0,0625 M	TRIS-HCl puffer / pH: 6,8 /
2 %-os	SDS oldat
10 %-os	glicerin oldat
5 %-os	merkaptoetanol oldat
0,5 %-os	brómfenolkék oldat.

Az elektroforézis során az áramerősség 2 mA/cső volt. A fehérjéket CBB R-250 / Merck / festékkel festettük Laemmli / 1970 / szerint és két órás festés után a géleket differenciáltuk.

4. Eredmények

4.1. A búza PDE-áz enzim tisztitása

Az enzimtisztitás eredményeit az I. táblázat foglalja össze. Mindkét vizsgált növénynél a tisztitás mértéke magasabb volt, mint 400-szoros, a hozam 10-15 % közötti érték. Minden tisztitási lépésben az enzim aktivitását két szubsztráttal követtük nyomon, egy nem specifikus szubsztráttal, a p-NPP-al és egy specifikussal, a PNP-pT-al.

Az 1. ábrán látható a tisztitás harmadik lépésének eredménye, a Sephadex G-200 oszlopról levált 5 ml-es frakciók aktivitási értékei és fehérje mennyisége. A PDE-áz aktivitás optikai denzitás / OD / értékei mindig 1 ml enzimoldatra vonatkoznak.

A 2. ábra a DEAE-cellulóz oszlopról leválasztott szintén 5 ml-es frakciókkal mért eredményeket tüntetik fel. A T. aestivum PDE-áz enzime 0,16 M-os, a szintetikus amfiploid PDE-áza 0,155 M-os NaCl koncentrációnál eluálódott az oszlopról.

A 3. ábra mutatja a hidroxilapatit oszloppal végzett kromatográfia eredményeit.

Minden enzimtisztitási lépés után az aktiv frakciók összegyüjtésekor összaktivitást mértünk és gélelektroforetikus ellenőrzést is végeztünk. A Triticum aestivum PDE-áz tisztitása során kapott minták enzimaktivitásának vizualizált eredményét PAGE után a 4-A. ábra, a

szintetikus amfiploidét a 4-B. ábra mutatja. Mindkét búza esetében megfigyelhető, hogy a gélen két gyorsabban mozgó izoenzimaktivitása megközelitőleg kétszer akkora, mint a lassú-mozgású enzimé. Ezek az aktivitásbeli különbségek a tisztitás során nem változtak.

A tisztitás különböző lépéseinél a fehérjemeghatározást csak 280 nm-es UV abszorpcióval néztük, a pontos protein tartalom mérés Bradford szerint az utolsó hidroxilapatitos kromatográfia utáni frakcióknál történt. Ennek eredményeként a vizsgált minták kb. 20 µg/ml protein tartalmúnak bizonyultak / I. táblázat és 3. ábra /.

A fehérje mennyiségét és egyben a tisztulás fokát lépésről-lépésre megvizsgáltuk SDS PAGE-sel. Ennek eredményeit az 5-A / Triticum aestivum / és az 5-B / szintetikus amfiploid / ábrák foglalják össze. A hidroxilapatit oszlopon tisztitott minták négy különböző molekulasúlyú fehérjét tartalmaznak, amit a SDS gélek mutatnak.

A továbbiakban a I. táblázatban leirtak alapján végzett tisztitási eljárás eredményeként kapott tisztitott enzimfehérjét használtuk a PDE-áz karakterizálásához.

4.2. A PDE-áz enzim karakterizálása

Az enzimkarakterizálás eredményeit a 6.-9. ábrák és a II., III. és IV. táblázat demonstrálja. A közönséges búza / T. aestivum / és a szintetikus amfiploid

I. táblázat: Az alkalikus PDE-áz tisztitásának lépései

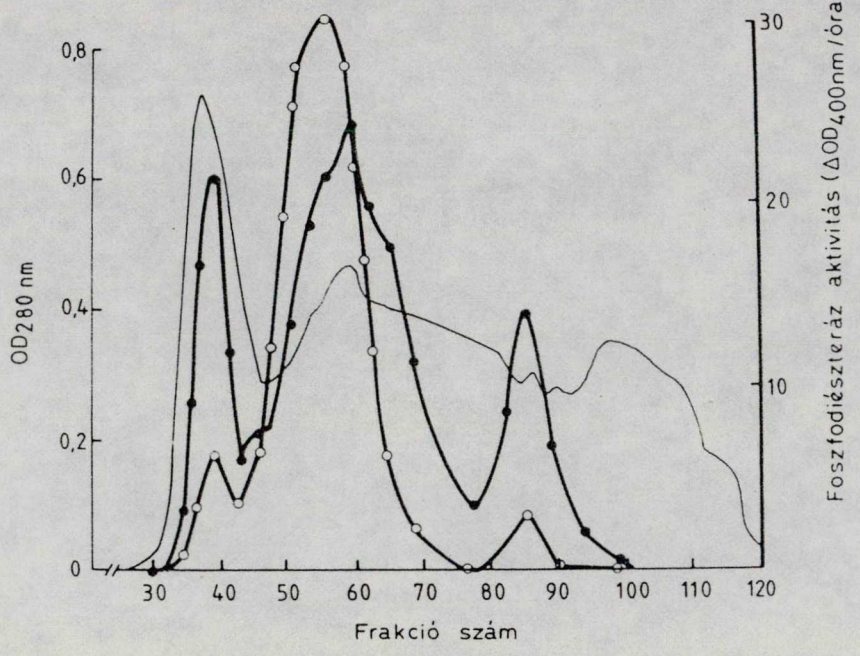
A./ Triticum aestivum

B./ T. durum x Ae. squarrosa

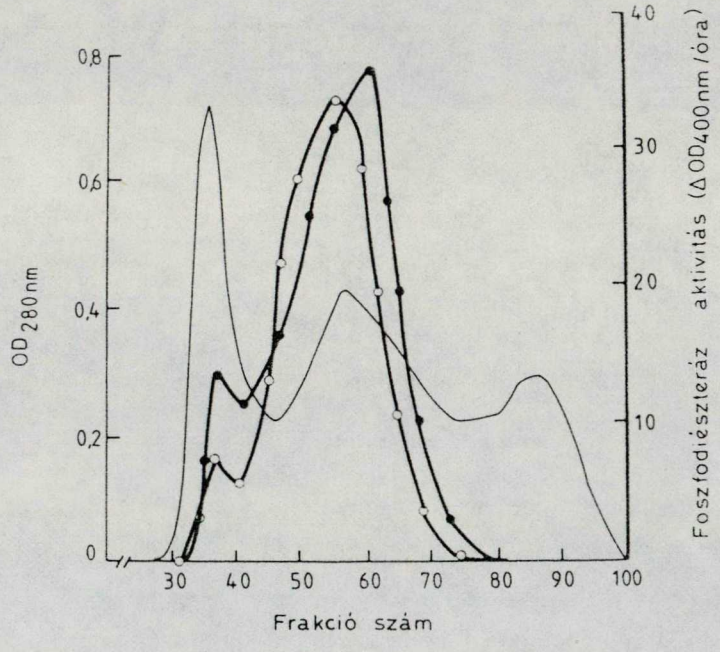
A./ Lépések	Menny. /ml/	Fehérje /mg/ml/	Össz. fehérje /mg/	Össz. aktivitás /egys./	Spec. aktivitás /egys./mg fehérje/	Hozam %	Tisztitás foka
nyers kivonat	190	18,16	3450	51,6	0,015	100,0	1,0
$/NH_4/_2SO_4$ frakc. /40-90 %/	30	8,33	250	38,4	0,153	74,3	10,2
Sephadex G-200 /46-70 fr./	108	0,94	101	71,2	0,700	138,0	46,6
DEAE-cellulóz /44-63 fr./	85	0,23	19	20,4	1,051	39,4	70,0
Hidroxilapatit /55-77 fr./	50	0,02	1	5,5	6,100	10,6	406,6

B./ Lépések	Menny. /ml/	Fehérje /mg/ml/	Össz. fehérje /mg/	Össz. aktivitás /egys./	Spec. aktivitás /egys./mg fehérje/	Hozam %	Tisztitás foka
nyers kivonat	210	16,27	3417,0	54,6	0,016	100,0	1,0
$/NH_4/_2SO_4$ frakc. /40-90 %/	20	15,21	304,2	54,7	0,179	100,2	11,2
Sephadex G-200 /41-70 fr./	140	0,77	109,0	38,1	0,350	69,7	21,8
DEAE-cellulóz /51-66 fr./	98	0,23	23,1	23,7	1,020	43,4	63,7
Hidroxilapatit /48-73 fr./	52	0,02	1,2	8,5	6,440	15,5	402,5

A.

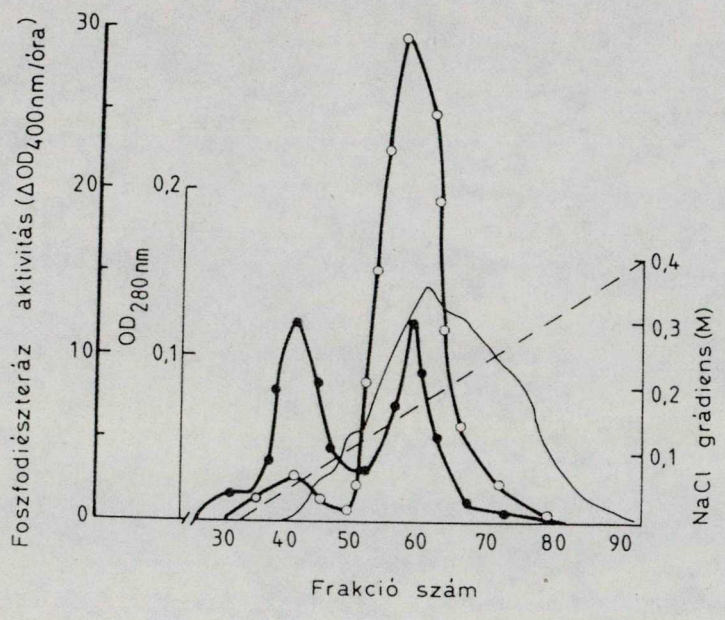


B.

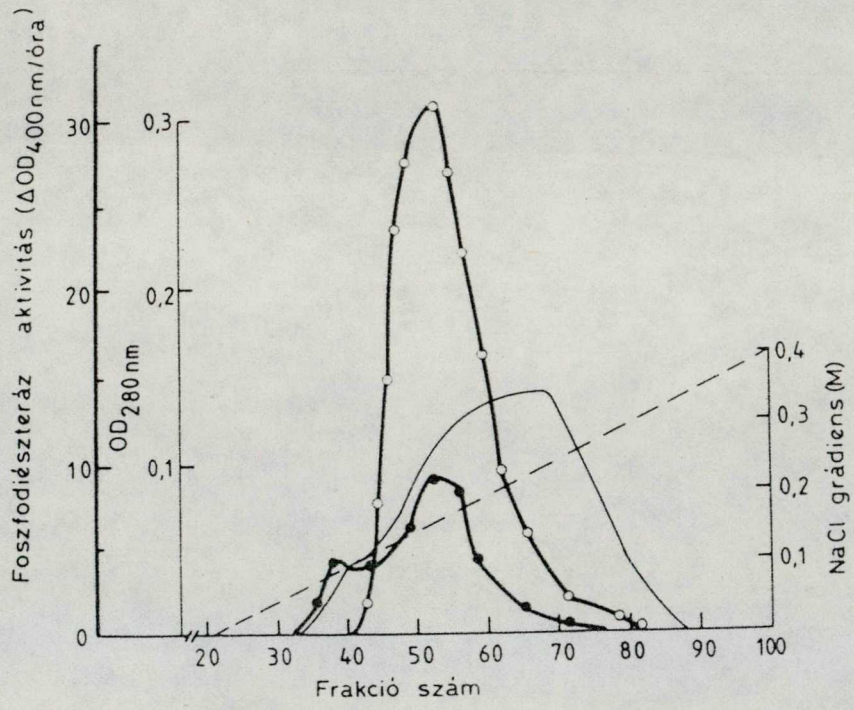


1. ábra. A Sephadex G-200-as oszloppal végzett gélkromatográfiás elválasztás. A./ T. aestivum-ból B./ T. durum x Ae. squarrosa-ból izolált PDE-áz enzim.
——— frakciók fehérjetartalma; —•—•— PDE-áz enzim aktivitása p-NPP szubsztráttal; -o-o-o- PDE-áz enzim aktivitása PNP-pT szubsztráttal.

A.



B.

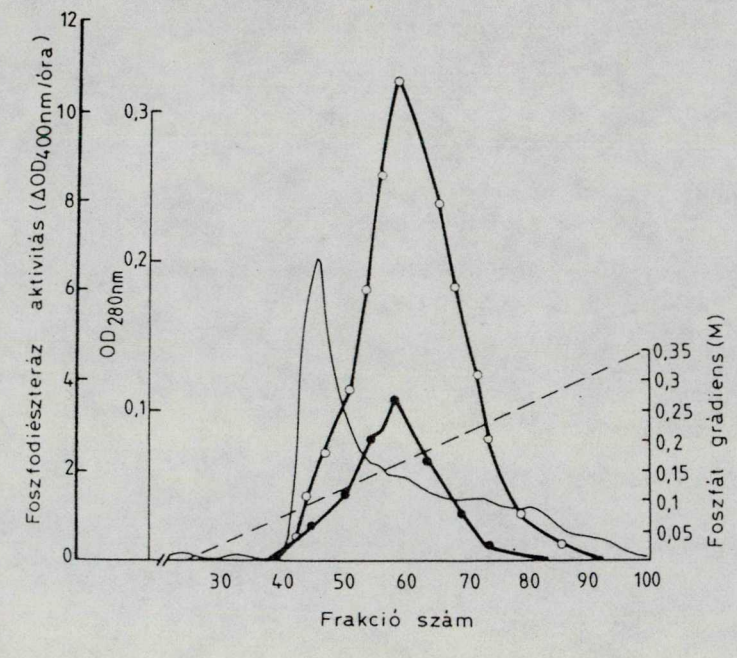


2. ábra. A DEAE-cellulóz oszlopkromatográfia.

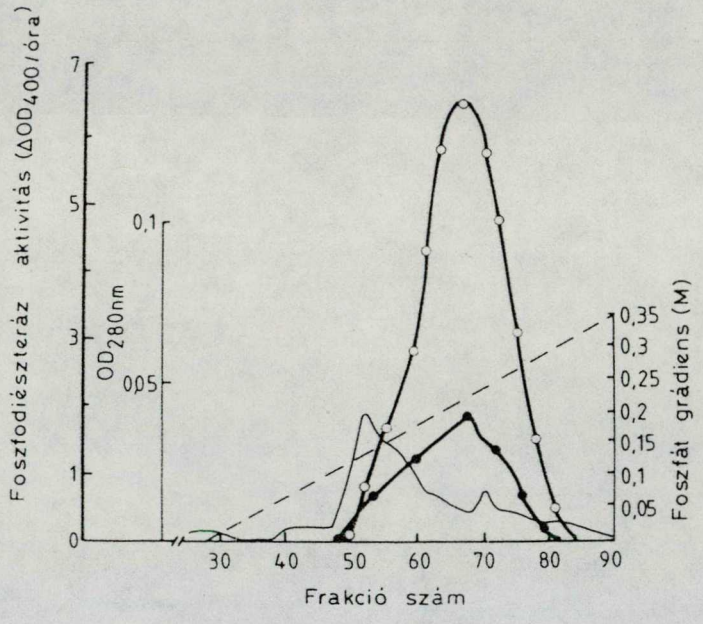
A./ T. aestivum-ból, B./ T. durum x Ae. squarrosa-ból izolált PDE-áz enzim.

——— frakciók fehérje tartalma; —●—●—●— PDE-áz enzim aktivitása p-NPP szubsztráttal; —o—o—o— PDE-áz enzim aktivitása PNP-pT szubsztráttal.

A.



B.

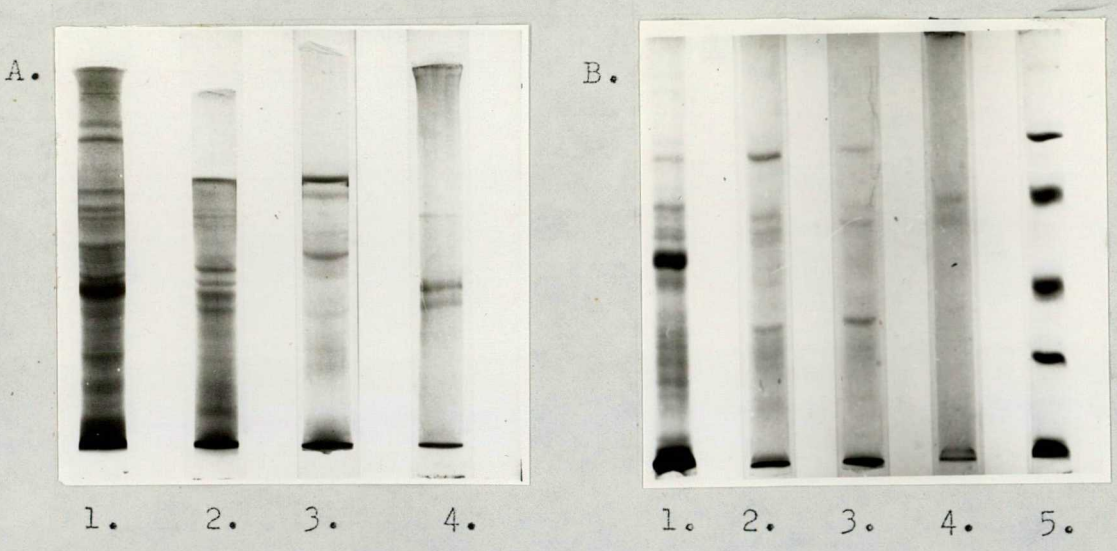


3. ábra. A hidroxilapatit oszlopkromatográfia.

A./ T. aestivum-ból, B./ T. durum x Ae. squarrosa-ból izolált PDE-áz enzim.

——— frakciók fehérjetartalma; —●—●—●— PDE-áz enzim aktivitása p-NPP szubsztráttal; —o—o—o— PDE-áz enzim aktivitása PNP-pT szubsztráttal

4. ábra. A T. aestivum /A/ és a T. durum x Ae. squarrosa /B/ PDE-áz enzim aktivitásának gélelektroforetikus ellenőrzése a tisztitás során nyers kivonatból /A-1; B-1/, $/NH_4/_2SO_4$ frakcióból /A-2/, Sephadex G-200-as frakciókból /A-3; B-2/, DEAE-cellulóz frakciókból /A-4; B-3/ és hidroxilapatit frakciókból /A-5, 6 és B-4/.



5. ábra. A tisztitás során a T. aestivum /A/ és a T. durum x Ae. squarrosa /B/ fehérjéi SDS PAG-en, A-1 és B-1: nyers kivonatból; A-2 és B-2: Sephadex G-200-as frakciókból; A-3 és B-3: DEAE-cellulóz frakciókból; A-4 és B-4: hidroxilapatit frakciókból; B-5: molekulasúly kalibráció.

/ T.durum x Ae. squarrosa / PDE-áz enzimjeinek adatait mindig egymás mellett, párhuzamosan adtuk meg, hogy a célúl kitüzött összehasonlitó elemzés áttekinthető legyen.

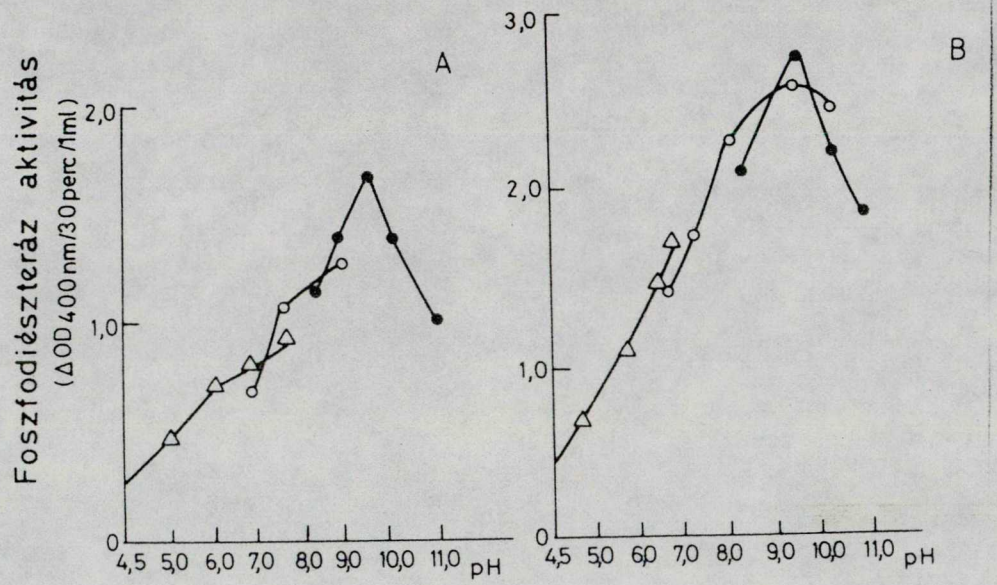
A két enzim pH optimuma a 6. ábrán látható. Mindkét esetben pH: 9,5-nél kaptunk maximum-értéket, igy a további vizsgálatainknál, az enzimaktivitás méréseknél 9,5-ös pH-jú pufferrendszerekkel dolgoztunk.

Ahogy az a II. táblázatból látható, az enzim nagy hőstabilitással rendelkezik. Mind a négy inkubálási idő / 5, 10, 15, 20 perc / eltelte után 50 ^{o}C-on 100 %-os maradt az aktivitás. A magasabb hőmérsékleteken / 60 és 80 ^{o}C-on / már különbség mutatkozott a két növényből izolált enzim között. Amig a közönséges búza PDE-áza 60 ^{o}C-on, 20 perces inkubálás után aktivitásának 40 %-át elvesztette, addig az amfiploidé csak 10 %-át. Hasonló különbség tapasztalható 80 ^{o}C-on is, 20 perces hőkezelés után a T.aestivum eredeti PDE-áz aktivitása negyedére, az amfiploidé csak a felére csökkent.

A 90 ^{o}C-os kezeléssel már 5 perces inkubálási idő után 100 %-os aktivitásvesztés tapasztalható mindkét növényből nyert enzimnél. Szobahőmérsékleten három nap alatt következik be a teljes inaktiválódás a búza esetében, az amfiploidnél ez csak 20 nap múlva tapasztalható. Végül -20 ^{o}C-on az enzim hónapokig eltartható / a mi vizsgálati időnk három ill. öt hónap volt / aktivitáscsökkenés nélkül.

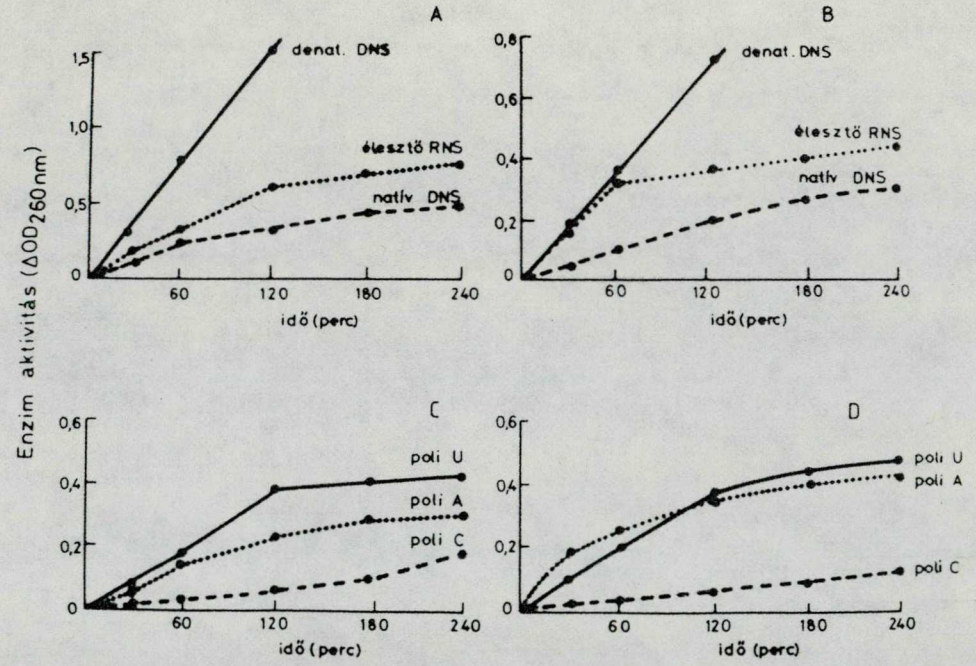
A különböző kationok, anionok, kelát-, és komplex-képző

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED



6. ábra. A T. aestivum /A/. és T. durum x Ae. squarrosa /B./ PDE-áz enzimjeinek pH optimum vizsgálata.

—△—△— TRIS-glicin puffer; —o—o— TRIS-HCl puffer;
—●—●— TRIS-NaOH puffer



7.ábra. A nukleinsavak és szintetikus polinukleotidok hidrolizise PDE-áz enzimmel / A és C T. aestivum; B és D szintetikus amfiploid /.

II. táblázat: Magas és alacsony hőmérséklet hatása a PDE-áz enzim stabilitására.

Hőmérséklet / °C /	Idő	Megmaradt aktivitás / % /	
		Triticum aestivum	T. durum x Ae. squarrosa
60	5 perc	87,6	91,0
	10 "	62,0	94,0
	15 "	59,8	91,0
	20 "	59,8	90,0
80	5 perc	73,0	97,0
	10 "	54,7	93,0
	15 "	43,8	79,0
	20 "	25,5	50,0
90	5 perc	-	4,0
	10 "	-	-
	15 "	-	-
	20 "	-	-
25	3 nap	-	70,0
	10 "	-	42,5
	20 "	-	-
-20	3 hónap	100,0	100,0
	5 "	100,0	nem mért

anyagok aktiváló ill. gátló hatását foglalja össze a III. táblázat. Az enzim müködését jelentősen gátolja a CN^--ion és az EDTA. A Ca^{++}-ion megemeli az enzimaktivitást, mig a Triton X-100 hatástalannak bizonyult. Az enzim müködését a Cu^{++}, a Zn^{++}, Co^{++}, PO_4^{---} és F^--ionok gátolták, de a két növény PDE-ázára gyakorolt hatásuk különbözött egymástól. A Cu^{++} és Co^{++}-ionok szinte teljesen inaktiválták a közönséges búza PDE-ázát, mig az amfiploidét alig befolyásolták. A F^--ionok aktivitás vesztést okoztak T.aestivumnál és jelentéktelen hatást idéztek elő az amfiploid enzimaktivitásában. A két különböző eredetü enzimre nézve ellenkező hatást tapasztaltunk a Mg^{++}, az AsO_4^{---}-ionok és az urea esetén, vagyis amig a T. aestivumból izolált enzim müködését nevezett ionok serkentették és az urea gátolta, addig az amfiploid PDE-ázának enzimaktivitása Mg^{++} és AsO_4^{---} -ionok hatására csökkent, urea jelenlétében emelkedett.

A különböző nukleinsavak és szintetikus poliribonukleotidok hidrolizisének eredményeit mutatja a 7. ábra. A tisztitott enzim a hőkezelt, denaturált DNS-t igen gyorsan bontja, a reakciótermékek mennyisége az idővel lineárisan nő. Ezzel szemben a nativ DNS hozzáférhetetlen az enzim számára. A hidrolizis sebességét alacsonynak találtuk nagy molekulasúlyú RNS-t használva szubsztrátként.

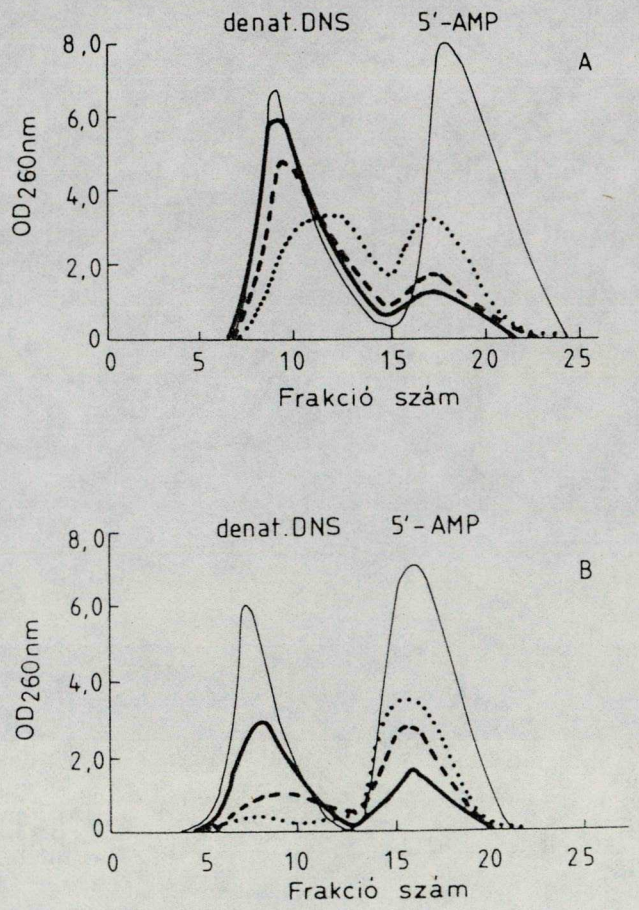
III. táblázat: Különböző ionok, kelát- és komplex képző anyagok hatása a PDE-áz enzim aktivitására.

	Koncentr. / mM /	Aktivitás a kontroll %-ban	
		Triticum aestivum	T.durum x Ae. squarrosa
-	0	100,0	100,0
$MgCl_2$	2	126,0	99,2
$CuSO_4$	2	11,2	99,2
$ZnSO_4$	2	70,5	91,4
$CaCl_2$	2	109,0	118,3
KH_2PO_4	2	70,0	99,6
EDTA	2	5,0	12,3
NaF	2	50,0	99,6
Na_2HAsO_4	2	112,4	97,3
NaCN	2	8,0	14,6
$CoSO_4$	2	28,0	75,0
Urea	3000	60,0	105,2
Triton X-100	10 %	90,0	100,0

A szintetikus polinukleotid szubsztátumok közül az RNS-ekben található nukleotidok homopolimerjeit vizsgáltuk meg. Az enzimhatás következtében a hidrolizis mértéke poli-U > poli-A > poli-C sorrendben csökkent.

Ha szubsztrátként denaturált DNS-t alkalmaztunk, Sephadex G-50-es oszlopon történő gélfiltráció után megállapitható, hogy az izolált PDE-ázok exonukleázként müködnek, mert az inkubációk után két csúcs jelent meg a diagramon, melyek közül az egyik a polinukleotidnak, a másik a mononukleotidnak megfelelő csúcs / 8. ábra /.

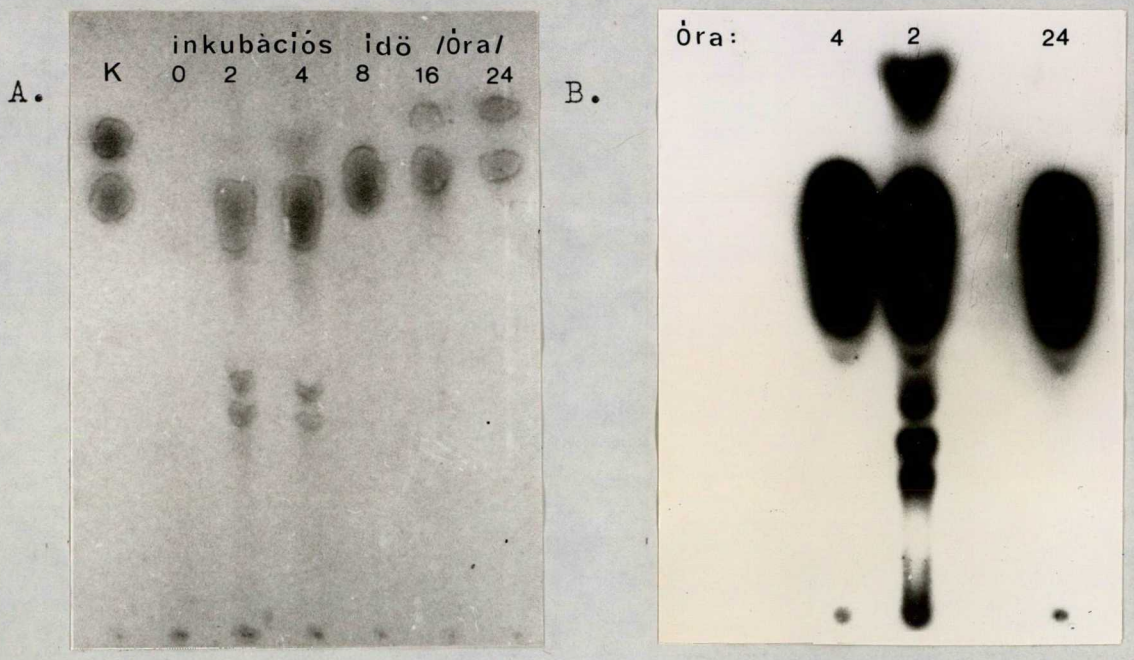
A poli-A-t, mint szubsztrátot 2, 4, 6 és 24 órán át a tisztitott enzimmel emésztettük, majd az enzim inaktivációja után a reakciótermékeket cellulóz vékonyrétegen kromatografáltuk. Kontrollként 3'-AMP-t, 5'-AMP-t, a két mononukleotid elegyét és poli-A-t futtattunk ugyanazon vékonyrétegen. Minden esetben csak az 5'-AMP-nek megfelelő foltokat tudtunk azonositani UV fényben / 9-A és 10-A ábra /. A kapott eredményeket egy igen érzékeny módszerrel, a radioautográfia vizsgálattal erősitettük meg. Simontsics András olyan 12 bázis hosszúságú DNS darabokat állitott elő kémiai szintézissel, melyek 5'-végén adenint tartalmaztak és a foszforsav része ^{32}P-izotóppal jelölt volt. A DNS fragmentek emésztési körülményei és a kromatográfiás módszer ugyanaz volt, mint az előzőekben. A kétórás emésztés után még megjelentek az oligonukleotidoknak megfelelő foltok, de hosszabb inkubációs idők esetén csak az 5'-AMP-nek megfelelő, jelölt



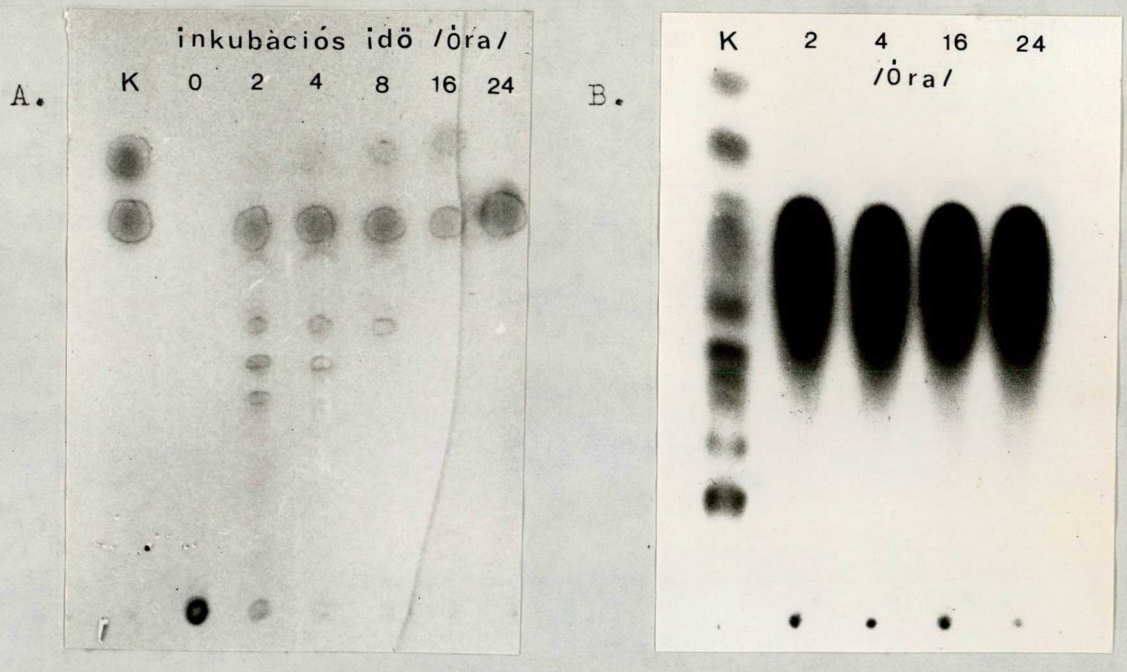
8. ábra. A denaturált DNS hidrolizisének termékei a Sephadex G-50 gélfiltráció után / A:T. aestivum; B:T. durum x Ae. squarrosa /.

——— kontroll; ▬▬▬ 45 perces hidrolizis;

- - - - 3 órás hidrolizis; ..... 6 órás hidrolizis



9. ábra. T. aestivum-ból izolált PDE-ázzal emésztett poli-A / A / és jelölt DNS fragmentek / B / reakciótermékeinek analizise cellulóz vékonyrétegen, 0, 2, 4, 16 és 24 óra inkubáció után.



10. ábra. T. durum x Ae. squarrosa-ból izolált PDE-ázzal emésztett poli-A /A/ és jelölt DNS fragmentek /B/ reakciótermékeinek analizise cellulóz vékonyrétegen 0, 2, 4, 16 és 24 óra inkubáció után.

5'-adenilsav azonositható / 9-B és 10-B ábra /.
Az enzimkinetikai vizsgálatok során meghatároztuk a K_M-t, a $v_{max.}$-t és az enzimgátlás tipusát.
Ez utóbbi vizsgálata során a szubsztrátum mellé különböző koncentrációkban az RNS hidrolizisèből származó mononukleotidokat és az ezeknek megfelelő dezoxi származékokat adtuk. A IV. táblázat adataiból kitünik, hogy a végtermék molekulák kompetitiv gátlást fejtenek ki, vagyis ha nagyobb koncentrációban vannak jelen, mint a szubsztrát molekulák, gátolják az enzim-szubsztrát reakciót. Mivel a kompetitiv gátlás reverzibilis, a kapott eredmények ellenőrzésére elvégeztük azt a kisérletet, melyben a mononukleotidok koncentrációja volt állandó / 0,1 µM/ml / és a szubsztrát koncentrációt növeltük a nukleotidkoncentráció kétszeresére, öszörösére és tizszeresére. Ebben az esetben az enzim aktivitása a szubsztrát koncentrációval arányosan nőtt.
Koenzimek közül az ATP, NAD^+ és $NADP^+$ hatását vizsgáltuk. Az ATP és NAD^+ - hasonlóan a mononukleotidokhoz -, kompetitiv gátlónak bizonyultak, mig a $NADP^+$ nincs hatással az enzim aktivitására.
Az enzim Michaelis-állandójának meghatározása a 3.13. fejezetben leirtak szerint történt. A T. aestivum-ból izolált PDE-áz Michaelis-állandója / K_M / 0,24 mM, a szintetikus amfiploidból izolálté 0,25 mM, ami azt mutatja, hogy az enzim szubsztrátaffinitása nagy. Amennyiben a szubsztrátkoncentráció és reakciósebbesség közötti

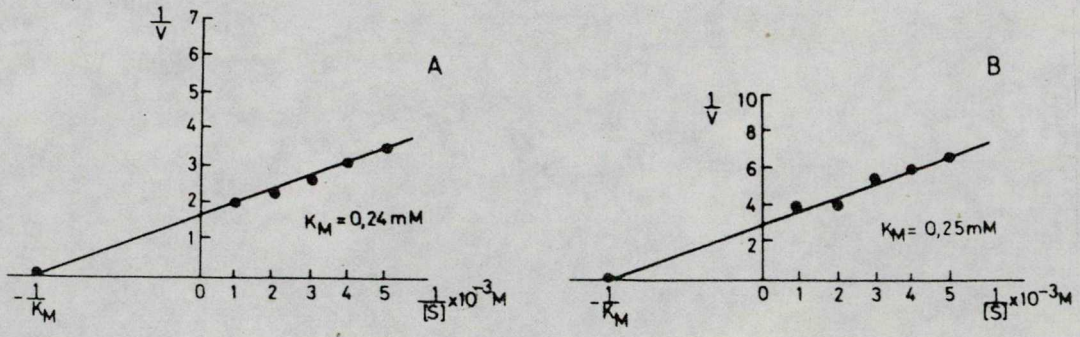
IV. táblázat: A különböző nukleotidok hatása a PDE-áz enzim aktivitására.

Koncentr.	Enzim aktivitás a kontroll %-ban							
	0,1 μM/ml		0,2 μM/ml		0,5 μM/ml		1,0 μM/ml	
	T. aest.	T.d. xAe.squ.	T. aest.	T.d. xAe.s.	T. aest.	T.d. xAe.squ.	T. aest.	T.d. xAe.squ.
AMP	67,5	47,1	55,0	36,7	37,5	15,7	27,5	5,8
GMP	96,2	77,4	87,5	58,3	77,5	39,0	52,5	24,0
CMP	97,5	85,7	93,7	67,6	73,7	46,0	57,5	29,4
UMP	100,0	89,2	92,5	74,5	86,2	56,8	67,5	38,7
d AMP	78,7	60,3	57,5	37,2	38,7	19,1	23,7	7,3
d GMP	95,0	81,3	86,2	63,7	70,0	40,1	57,5	27,0
d CMP	92,5	78,9	80,0	55,8	70,0	37,2	50,0	24,0
d UMP	100,0	80,4	95,0	72,0	75,0	53,9	62,5	32,3
ATP	100,0	70,6	88,7	58,3	85,0	34,3	70,0	21,0
NAD^+	85,0	70,0	65,0	50,0	46,2	26,4	33,7	15,2
$NADP^+$	100,0	80,0	100,0	80,0	100,0	80,0	100,0	80,0

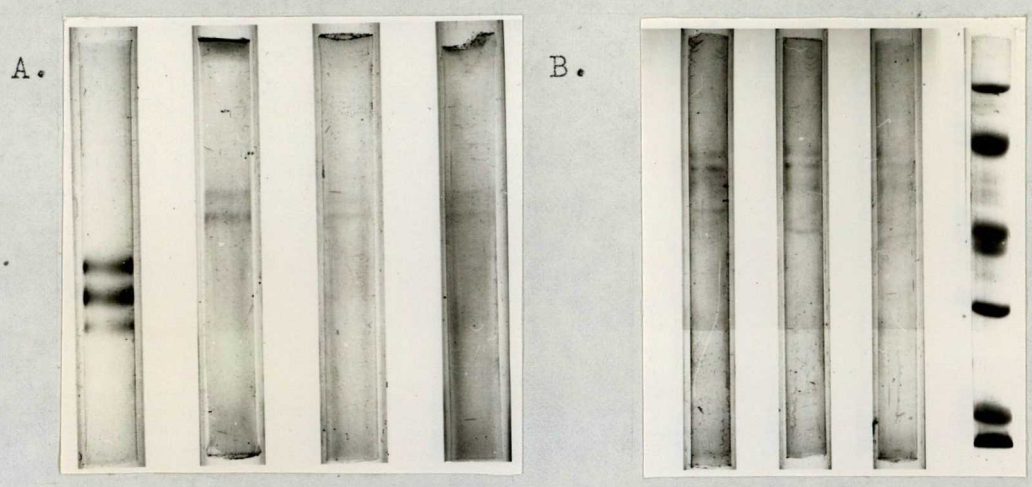
összefüggést Lineweaver-Burk szerint ábrázoljuk / 11. ábra /, úgy a görbe meredekségéből a $v_{max.}$ közvetlenül számolható. Ez az érték T.aestivum-nál 0,62 $\mu M.h^{-1}$, T. durum x Ae. squarrosa-nál pedig 0,32 $\mu M.h^{-1}$.

Az enzim szerkezetének vizsgálatát SDS tartalmú "disc"-gélelektroforézissel végeztük úgy, hogy a tisztitott enzimpreparátum 100-100 μl-ét 7,5 %-os nativ poliakril-amid gélen futtattuk. A gélen az izoenzimek aktivitását Wolf /1968 / módszerével határoztuk meg. A nativ gélből külön-külön kivágtuk az egyes izoenzimeknek megfelelő festett csikokat és egy éjszakán át "minta" pufferben inkubáltuk, majd 7,5 %-os SDS gélen ujrafuttattuk. Az eredményeket a 12. ábra mutatja. Mindhárom izoenzim két alegységből áll, melyek molekulasúlya megegyezik. Nevezetesen a T. aestivum esetén $5,6 \cdot 10^4$ D és $6,4 \cdot 10^4$D, a szintetikus amfiploid esetén $6,6 \cdot 10^4$ D és $7,2 \cdot 10^4$ D / 13. ábra /. Ezek alapján a búza PDE-áz molekulasúlya $1,2.10^5$ D, mig az amfiploidé $1,38 \cdot 10^5$ D-nak adódik.

A kapott adatokat összehasonlitva a Sephadex G-200-as oszlopkromatográfiás meghatározással, azt tapasztaljuk, hogy a megengedett hibahatárokon belül a molekulasúlyok megegyeznek, azaz a T. aestivum-nál gélen $1,2 \cdot 10^5$ D, oszlopon szintén $1,2 \cdot 10^5$ D-t kaptunk, a szintetikus amfiploidnél / T. durum x Ae. squarrosa / gélen $1,38 \cdot 10^5$ D, oszlopon $1,4 \cdot 10^5$ D.

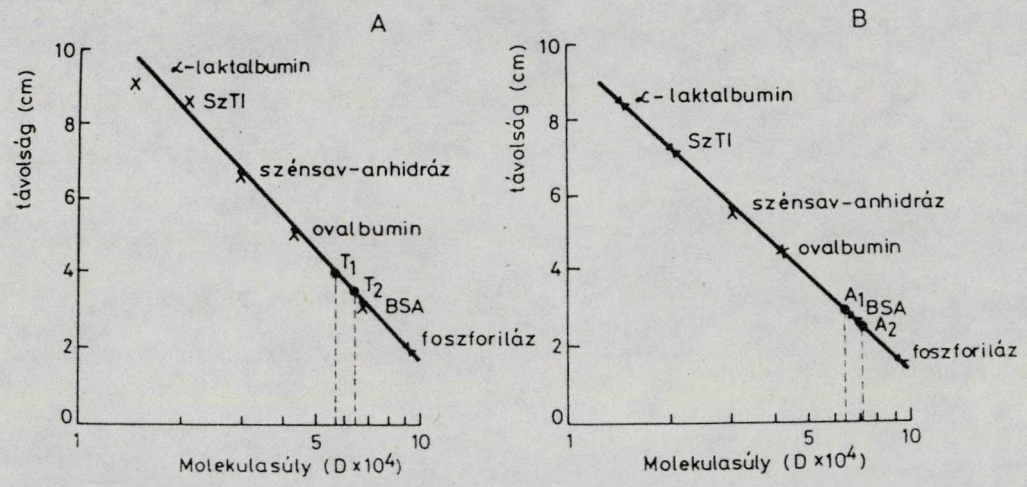


11. ábra. A Michaelis-állandó / K_M / és az enzimreakció maximális sebességének / $v_{max.}$ / meghatározása Lineweaver - Burk-féle ábrázolásban / A: T. aestivum; B: T. durum x Ae. sguarrosa /.

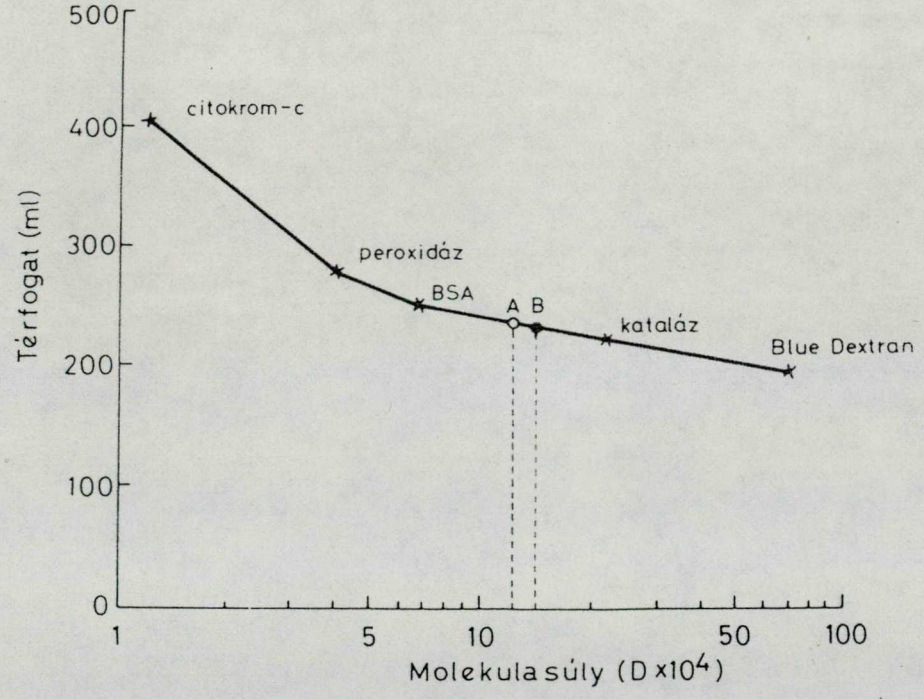


12. ábra. A PDE-áz enzimszerkezetének vizsgálata PAGE-sel /A: T.aestivum; B: T. durum x Ae. squarrosa / A-1: enzimaktivitás nativ gélen; A-2 és B-1: a leggyorsabban mozgó izoenzim A-3 és B-2: a középső izoenzim, A-4 és B-3: a leglassúbb izoenzim zimogramja; B-4: molekulasúly kalibráció SDS poliakrilamid gélen.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED



13. ábra. A molekulasúly kalibrációja SDS gélelektroforézissel végzett meghatározásnál.
A: T. aestivumból izolált PDE-áz két alegységének / T_1 és T_2 / molekulasúlya;
B: T. durum x Ae. squarrosa-ból izolált PDE-áz két alegységének / A_1 és A_2 / molekulasúlya.



14. ábra. A Sephadex G-200 oszlopkromatográfiás molekulasúly meghatározás kalibrációja / A: T. aestivum;
B: T. durum x Ae. squarrosa PDE-ázainak esetén /.

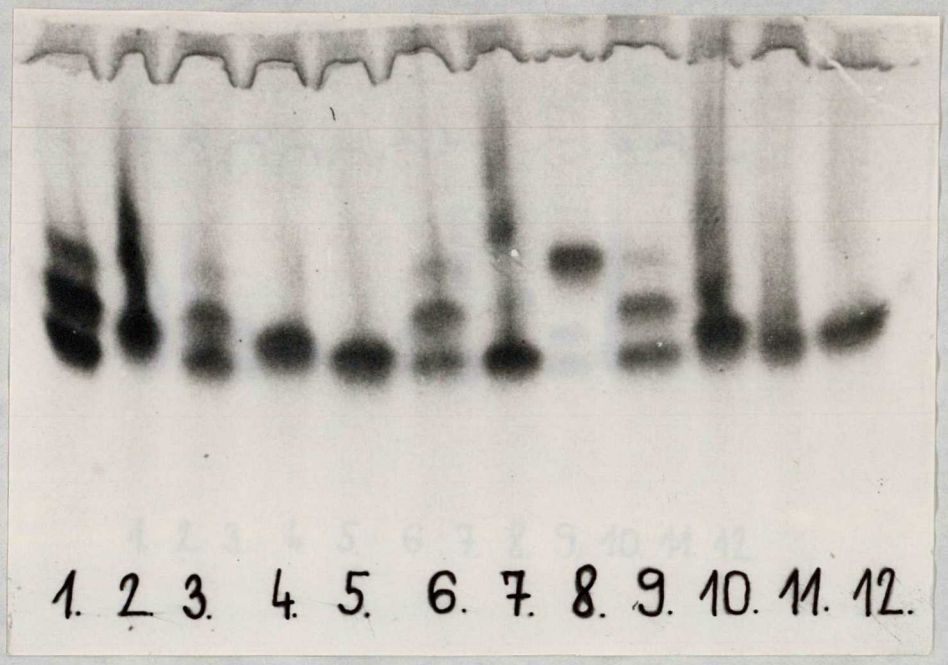
5. Eredmények megbeszélése

A közönséges búza / T. aestivum L. / három genomjának eredete ma sem pontosan ismert. A probléma megoldására, a genetikai vizsgálatokhoz a szemtermés fehérjéket használva számtalan kérdés megválaszolatlan maradt a fehérjék nagy száma miatt.

A kisérleti munka kezdetén tizenegy különböző enzim zimogramját készitettük el. Azt tapasztaltuk, hogy az alkalikus és savanyú foszfatázok, észterázok, a GOT, valamint az EP szubsztrátspecifitása nem jól definiált. Más enzimek, mint például ADH, MDH, ICDH, kataláz, amiláz és aminopeptidáz, az enzimmolekulák polimorf jellege miatt, genetikai vizsgálatokhoz akalmatlan zimogramot mutatott. A nukleinsav-bontó enzimek közül a PDE-áz bizonyúlt a legalkalmasabbnak arra, hogy adatokat kapjunk a búza evolúciójához / Wolf, 1977 /.

A 15. ábra mutatja a Triticinae-hez tartozó különböző fajok PDE-áz enzim patternjét lapgélen. A kapott eredményekből az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A hexaploidok leglassabban mozgó izoenzimje ugyanolyan pozicióban van, mint az Ae. squarrosa enzimcsikja, ami azt jelenti / az irodalommal összhangban /, hogy az Ae. squarrosa a D genom donorja.
2. A tetraploidokban található egyetlen izoenzim elektroforetikus mobilitása a hexaploidok leg-



15. ábra. A Triticinae subtribusba tartozó különböző fajok PDE-áz izoenzim patternjei.

1. T. aestivum
2. T. tymopheevi
3. T. aestivum x T. tymopheevi amfiploid
4. T. tymopheevi
5. T. monococcum
6. T. timonovum
7. T. durum
8. Ae. squarrosa
9. T. durum x Ae. squarrosa szintetikus amfiploid
10. Secale cereale
11. T. turgidum
12. T. turgidum x S. cereale amfiploid

gyorsabban mozgó izoenzimjével egyezik meg és ez azt sugallja, hogy a hexaploidok valamely tetraploidtól származhattak.

3. A hexaploidokban található, közepes mozgékonyságú izoenzimnek nincs megfelelője sem a diploid, sem a tetraploid fajokban. Mivel a szülői / di- és tetraploid / fajokban csak 1 - 1 enzimcsik található, úgy gondoltuk, hogy a hexaploidok középső izoenzimje egy hibridenzim lehet.

Amennyiben ez igaz, akkor a különböző búzafajokból izoláld PDE-ázok enzimatikus karakterében és molekulaszerkezetében hasonlóságoknak kell lenni. Fentiek miatt tisztitottuk és karakterizáltuk a PDE-áz enzimet a közönséges búzából és a hasonló genom felépitésü szintetikus amfiploidból.

A PDE-áz enzimet néhány növényből már tisztitották, igy zabból / Udvardy és mts, 1970 /, sárgarépából / Harvey és mts, 1970 /, cukorrépából / Lerch és Wolf, 1972 /, Tradescantia-ból / Sivók és mts, 1981 /, de egyik módszer sem eredményezett megfelelő mértékü tisztulást. A különböző eljárásokat kipróbálva és módositva mi az I. táblázatban látható módon tisztitottuk az enzimet. A tisztaság fokának ellenőrzésére SDS PAGE-t alkalmaztunk. Mint ahogy az az 5. ábrán látható, négy különböző molekulasúlyú fehérje mutatható ki CBB festési eljárással. A négy protein közül kettő erősen, kettő

gyengébben festődött. A két erősen festődő csik azonositható volt az enzim molekulaszerkezetének megállapitására végzett kisérletek során kapott két fehérjével / 12. ábra /. Ezek után a PDE-áz három izoenzimjéről annyit elmondhatunk, hogy mindegyik dimer szerkezetü, ahogy ez a citogenetikai vizsgálatok ismeretében várható volt. A két gyengén festődő csikról, ill. az annak megfelelő fehérjékről biztosat nem tudunk. Mivel a poliakrilamid gélen ezek a molekulák a szerkezet-vizsgálatoknál is láthatók, feltételezzük, hogy az enzim alegységeit összekapcsoló fehérjemolekulákról van szó. Az előbbiek alapján felvetődött, hogy a hexaploid búzákban található, közepes mozgékonyságú izoenzim, a különböző genomok által determinált hibrid enzim. Azt vártuk tehát, hogy az eltérő mobilitású izoenzimek alegységeinek molekulasúlya az SDS géleken különböző. Eredményeink - a feltételezésünkkel szemben - azt mutatják, hogy a három izoenzim alegységszerkezete azonos és ezek molekulasúlya megegyezik.

Ez azt jelenti, hogy a nativ gélen kimutatható középső csik vagy a gyors és lassúmozgású izoenzimek töltés szerinti hibridje, vagy az alegységeknek egy közbülső, multimer formája. A búza 21 kromoszómája hét homeológ csoportba sorolható, a csoportok mindegyike három-három kromoszómát tartalmaz. A búza diploid őseinek strukturgénjeit vizsgálva világossá vált, hogy nem minden gén funkcionál egyformán, igy a hexaploid búzából sokkal

több izoenzim mutatható ki, mint az a diploidok alapján várható volna. Magyarázata az, hogy a poliploidokban a meiozis során az allélek nem válnak szét, hanem együtt maradnak, igy létrejönnek olyan polipeptid alegységek, amelyek egyik diploidban sem fordulnak elő. Az izoenzimek számának ilyen módon való növekedése a poliploid származás magyarázata lehet / Gottlieb, 1982 /. A kérdés még nem eldöntött, tisztázásához további kisérletekre van szükség.

A két búzafajból izolált PDE-áz karakterizálása során különbség mutatkozott az enzimek stabilitásában, ionigényében és a szintetikus poliribonukleotidok hidrolizisének mértékében. Felvetődött tehát a gondolat, hogy a két PDE-áz enzim hasonló genetikai eredtü-e? Ezért megvizsgáltuk, hogy a tisztitott enzim exo- vagy endonukleáz tipus szerint emészti-e a denaturált DNS-t. Azon enzimek között, amelyek a nukleinsavakat hidrolizálják, két csoportot különböztetünk meg a foszfodiészter kötések hasitásának helye alapján. Egyik csoportba az olyan enzimek tartoznak, amelyek a foszfodiészter kötésen belül hasitanak, igy oligonukleotidok jönnek létre. Ezeket endonukleázoknak nevezzük. A másik csoport az exonukleázok, melyek a láncvégi kötéseket hasitják és a reakció végtermékei a mononukleotidok. Birnboim / 1966 / dolgozott ki egy egyszerü gélfiltrációs módszert a két tipusú enzim közti különbség megállapitására. A módszer lényege, hogy ha exonukleáz

József Attila Tudományegyetem SZEGED Könyvtár

denaturált DNS-t emészt, akkor az inkubációs elegyben csak az emésztett DNS és mononukleotidok találhatók. A poli- és mononukleotidok oszlopkromatográfiás eljárással szétválaszthatók és az elúciós profilban csak két csúcs van. Az endonukleáz esetén egy úgy módosúl, hogy az elúciós profilban több csúcs jelentkezik, amelyek az oligonukleotidoknak felelnek meg. Kisérleteink a búza PDE-ázokkal azt mutatták, hogy mindkét enzim exonukleáz / 8. ábra / tipusú.

Ha egy enzim exonukleázként müködik, akkor a polinukleotid lánc hasitását vagy 3'-, vagy 5'-végről kezdi és a keletkezett termékek vagy 5'-, vagy 3'-mononukleotidok. Autoradiográfiás cellulóz vékonyréteg kromatográfiával bizonyitottuk, hogy a búzákból kivon PDE-áz a polinukleotid láncokat a 3'-végről hasitja, igy a reakció végterméke 5'-mononukleotid / 9. és 10. ábra /.

Az enzimkinetikai vizsgálataink / Michaelis-állandó, maximális reakciósebesség és az enzimgátlás tipusának meghatározása / eredménye a két különböző növényből izolált PDE-ázok esetében annyira hasonló, hogy a két faj nagyon közeli rokonságának, esetleg azonosságának biokémiai igazolását jelenthetik.

6. Összefoglalás

A közönséges búzából / Triticum aestivum / és egy szintetikusan előállitott amfiploidból / Triticum durum X Aegilops squarrosa / alkalikus foszfodiészteráz enzimet tisztitottunk és karakterizáltunk, hogy adatokat szerezzünk az emberiség számára gazdaságilag egyik legfontosabb növény, a búza származásához, genomjainak azonositásához.

Kisérleti eredményeink elemzéséből a következőket állapithatjuk meg:

1. A PDE-áznak a hexaploid búzákban három izoenzimje van, melyek mindegyike dimer szerkezetü és az izoenzimek egymás multimer molekula formái.

2. A PDE-áz aktivitása pH függő, pH optimuma 9,5-nél van.

3. A PDE-áz egy exonukleáz, mely a polinukleotid lánc 3'-végéről 5'-mononukleozid-foszfátokat hasit.

4. Az enzim nagy hőstabilitással rendelkezik és a kétértékü kationok nem befolyásolják jelentősen az enzimaktivitást.

5. Az enzimnek nagy a szubsztrátspecifitása és a mononukleotidok kompetitiven gátolják a müködését.

6. Kisérleteink megerősitik azokat a vizsgálati eredményeket, melyek szerint a közönséges búza D genomjának donorja az evolúció során a diploid Aegilops squarrosa volt.

7. A PDE-áz alegységszerkezeti vizsgálatai és speciális tulajdonságai alátámasztják azt a felfogást, hogy a búza A és B genomja közvetlenül egy AABB genom felépitésü, tetraploid búzából származik.

7. Summary

Due to increasing interest in Triticale as an important crop of commersial value its evolutionary genetics has been widely studied. Common wheat, Triticum aestivum is an allohexaploid plant with genom formula AABBDD, the origin of which has not yet been completely identified.

Electrophoretical investigations of the different enzymes of the wheat have been used to elucidate the relationships in the Triticinae, but it was found, that only nucleic-acid-degrading enzymes fit for this work.
Having studied more than ten enzymes of various specificities PDE-ase one of most suitable giving informations about the donors of the three genoms of the common wheat.
Therefore, we've purified and characterized the PDE-ase isolated from two wheats: namely a hexaploid common wheat and from a synthetic amphiploid deriving from cross of the diploid Ae. squarrosa and the tetraploid T. durum.

After studying the PDE-ase isoenzyme patterns of the different species of wheat, we found that all hexaploids contain the same three PDE-ase isoenzymes. Both of the fast bands are twice active as the slow one. Tetraploids contain a single band, migrating to the same position as the fastest one of the hexaploids. Similarly to the tetraploids a single band was found in every diploid tested. Their electrophoretical mobility, however, corresponded either to the fastest or slowest band of the hexaploids, respectively.

From these results the following conclusions can be drawn:

1. The band found in Ae. squarrosa was identical to the slowest moving one of the hexaploids, what confirms that the former is the donor of the D genom.
2. The band of tetraploids was identical to the fastest migrating one of the hexaploids, what proves that hexaploids derive from tetraploid species.
3. The band corresponding to the middle band of hexaploids was not found either in diploids or in hexaploids. At the same time, three isoenzymes were revealed in the synthetic amphiploid. Since both parents have a single enzyme band, the band in the middle probably is a hybrid enzyme.

If so, there must be some similarities in the enzymatic and subunit properties of PDE-ase of different origin. To check this idea we have purified and characterized of the PDE-ase enzymes of Ae. squarrosa x T. durum synthetic amphiploid and that of common wheat T. aestivum.

PDE-ases are - difined as - enzymes, splitting the bonds of diesterified phosphate. They usually hydrolyze substrates like α-naphtyl-pT and DNPP, but not neccesserily nucleic acids. Although, when it does hydrolyze nucleic acids, it is acting as an exonuclease.

PDE-ase has been purified from several plants, but non of procedures could be applied for the wheat. Thus we used a modified way of purification. To follow the degree of purification, the enzyme activity was monitored by useing two different substrates: p-NPP and PNP-pT.

A 400 fold purification was achieved at the end. On SDS gel, however, two additional bands were revealed by Commassie blue staining. The significance of these two proteins is not yet known.

The pH optimum of alkaline PDE-ase from both the common wheat and synthetic amphiploid is at 9,5.

The PDE-ase preparation showed a considerable heat stability. A loss of only 10% in the enzyme activity was observed after 20 mins at 60°C and half of the activity was recovered even after 30 mins at 80°C. Inactivation became complete only at 90°C for both enzymes.

We found some differences concerning the enzyme's requirements for bivalent ions, chelating and complexing agents. PDE-ase activity of common wheat is inhibited by Cu^{++}, Co^{++}, F^{-}, AsO_4^{---}.

However, these chemicals activate the amphiploid' enzyme. 3M urea shows a vice versa effect on PDE-ase activities. The enzyme of amphiploid origin is inhibited by urea, the common one is activated. No significant differences were found useing other agents, like Mg^{++}, Zn^{++}, Hg^{++}, Ca^{++}, EDTA or CN^{-}.

The rates of hydrolyzis of various nucleic acids and polynucleotides were also studied. Denatured DNA and polyU were split rapidly, while native DNA and poliC were digested to a much lesser extent. The mode of action of the enzymes was tested by useing heat-denatured DNA. The elution profile is clearly consistent with an exonucleotic type of action.

To estabilish whether the enzyme produces 3'- or 5'-mononucleotides, aliquots of polyA and DNA fragments, end-labelled with ^{32}P 5'-AMP, were digested. Only spots corresponding to the 5'-AMP were detected after 8 and 24 hours of digestion. Data, coming from the analysis of the end product inhibition and coenzyme requirement, clearly indicate a fully competitive type of inhibition. The K_M values for PNP-pT as substrate were found to be 0.24 mM and 0.25 mM, respectively.

Finally we determined the MW of enzymes on Sephadex column and SDS poliacrilamide gelelectrophoresis. MWs of PDEases estimated, by both methods, were about 1.2×10^5 and 1.4×10^5 Daltons, respectively.

The data corresponding to the native and SDS PAGE properties of PDE-ases of hexaploid species support the idea, that the so called "middle enzyme" is rather an intermediate multimeric form of proteins, existing in parental species, since all of the native isoenzymes produce the same subunit structure on SDS gel.

To solve this problem it requires some more investigations in biochemical and genetical properties of different parental and hexaploid species.

Summarizing the result presented here, these show, that none of the enzymatic characteristics of PDE-ases examined differ significantly in the two wheats, suggesting that T. durum can be one of the parents of the common wheat.

8. I r o d a l o m j e g y z é k

Adler, J. és mts. / 1958 / Proc. Natl. Acad. Sci. 44:641

Andrews, P. / 1965 / Biochem. J. 96:595

Aniol, A. / 1973 / Proc. 4th. Intern. Wheat Genet. Symp. Columbia, Agr. Exp. Univ. Missouri, 59

Aurian, P. és mts. / 1976 / Ann. Amélior Plantes 26:51

Belea, A. és Fejér, O. / 1980 / Acta Agronomica 29:306

Belea, A. / 1971 / Acta Agronomica 20:1-2:227

Birnboim, H. / 1966 / B.B.A. 119:198

Bleier, H. /1928 / Z. f. ind. Abst. u. Vererbgse., Suppl. 1:447

Boman, H.G. / 1969 / Ann. N.Y. Acad. Sci. 81:800

Boman, H.G. és Kaletta, U. / 1957 / B.B.A. 34:503

Bradford, M.M. / 1976 / Anal. Biochem. 72:248

Brewer, G.J. és Sing, Ch.F. / 1970 / Acad. Press. N.Y. and London

Crestfield, A.M. és Allen, F.W. / 1956 / J. Biol. Chem. 219:103

Davis, B.J. / 1964 / Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:404

Dhaliwal, H.S. / 1976 / Cer. Res. Com. 4:411

Fejér, O. és Belea, A. / 1976 / KGST kiadvány /kézirat/

Giorgi, B. és Bozzini, A. / 1969 / Caryologia 22:279

Gottlieb, L.D. / 1982 / Science 216:373

Gubareva, N.K. és mts. / 1975 / All-Union N.J. Vavilov Inst. Pl. Industry, Leningrad

Gulland, J.M. és Jackson, E.M. / 1938 / Biochem.J. 32:590

Hadlaczky, Gy. és Belea, A. / 1975 / Plant Sci. Letters 4:85

Hart, G.E. / 1970 / Proc. Natl. Acad. Sci. 66:1136

Hart, G.E. / 1973 / Proc. 4th. Intern. Wheat Genet. Symp.:805

Hart, G.E. / 1975 / Isoenzymes III.:637

Harvey, C. és mts. / 1967 / Biochemistry 6:3689

Harvey, C. és mts. / 1970 / Biochemistry 9:921

Heppel, L.A. és Rabinowitz, J.C. / 1958 / Ann. Rev. Biochem. 27:613

Huskins, C.L. / 1941 / Amr. Nat. 75:329

Jaaska, V. / 1971 / Eesti NSV Ta Toimet., Biol. 20:202

Johnson, B.L. / 1972 / Amer. J. Botany 59:952

Johnson, B.L. / 1975 / Canad. J. Genet. Cytol.17:21

Kahler, A.L. és Allard, R.W. / 1970 / Crop Sci. 10:444

Kalckar, H.M. / 1947 / J. Biol.Chem. 167:461

Khorana, HG. / 1959 / J.A.C.S. 81:4657

Khorana, H.G. / 1961 / Enzymes 5B:79

Kihara, H. / 1935 / Cytologia 14:195

Kiss, Á. / 1966 / Der Züchter 6:249

Koerner, J.F. és Sinsheimer, R.L. / 1957 / J. Biol. Chem. 228:1039

Laemmli, U.K. / 1970 / Nature 227:680

Laskowski, M. / 1971 / Enzymes IV:313

Laskowski, M. és mts. / 1957 / Nature 180:1181

Lawrence, S.J. és Shepherd, K.W. / 1981 / Theor. Appl. Genet. 59:25

Leiser, M. / 1954 / Z. f. Pflanzenzüchtg 33:59

Lelley, T. / 1968 / Növénytermelés 17:379

Lelley, T. és Mándy, Gy. / 1963 / A búza. Akad. Kiadó, Budapest

Lerch, B. / 1968 / Experientia 24:889

Lerch, B. és Wolf, G. / 1972 / B.B.A. 258:2o6

Maan, S.S. és Lucken, K.A. / 1971 / J.Hered. 62:149

Macintyre, R.J. / 1966 / Genetics 5:461

Mansfeld, R. / 1951 / Der Züchter 21:41

Markert, C.L. / 1959 / Proc. Natl. Acad. Sci. 45:753

Markert, C.L. / 1968 / Ann. N.Y. Acad. Sci. 151:14

Mitra, R. és Bhatia, C.R. / 1971 / Genet. Res. Camb. 18:57

Nishikawa, K. és Nobuhara, M. / 1971 / Japan J. Genet 46:345

O'Farrell, P.H. / 1975 / J. Biol. Chem. 250:4007

Rasmuson, B. és mts. / 1966 / Hereditas 53:313

Razzell, W.E. / 1963 / Methods in Enzymology 6:236

Razzell, W.E. /1966/ Biochem. Biophys. Res. Commun. 22:243

Razzell, W.E. és Khorana, H.G. / 1959 / J. Biol. Chem. 243:2105

Riley, R. és Chapman, V. / 1960 / Nature 182:713

Rimpau, J. és Wolf, G. / 1978 / Proc. 5th. Intern. Wheat Genet. Symp.:720

Rudolph, K. és Stahmann, M.A. / 1966 / Plant Physiol. 41:389

Sarkar, P. és Stebbins, G.L. / 1955 / Amer. J. Botany 43:297

Sax, K. / 1924 / Genetics 9:454

Scandalios, J.G. / 1969 / Biochem. Genet. 3:37

Scandalios, J.G. / 1974 / Ann. Rev. Plant Physiol. 25:225

Schmidt, H. és Laskowski, M. /1961/ Enzymes 5:26

Schrimpf, J. / 1951/ Z. Pflanzenz. 31:42

Sears, E.R. / 1965 / In Chromosome Manipulation and Plant Genet. Edit. Riley, R. and Levis, K.R. 29-46

Shannon, L.M. / 1968 / Ann. Rev. Plant Physiol. 19:187

Shaw, C.R. / 1965 / Science 149:936

Sivók, B. és mts. / 1981 / Phytochemistry 20:1223

Takahashi, H. / 1932 / J. Biochem. 16:463

Turner, A.F. és Khorana, H.G. / 1959 / J.A.C.S. 81:4651

Udvardy, J. és mts. / 1970 / B.B.A. 206:392

Uzawa, T. / 1932 / J. Biochem. 15:19

Yamashita, K., Kihara, A. és Tanaka, M. / 1965 / Kyoto University, Japan

Yamazaki, T. / 1981 / Japan J. Genet. 56:373

Vigue, C.L. és Johnson, F.M. / 1973 / Biochem, Genet. 9:213

Weber, K. és Osborn, M. / 1969 / J. Biol. Chem. 244:4406

Wilson, C.M. / 1975 / Ann. Rev. Plant Physiol. 26:187

Wolf, G. / 1968 / Experientia 24:890

Wolf, G. / 1977 / Genetics 86:597

Wolf, G. és Lerch, B. / 1973 / Proc. 4th. Intern. Wheat Genet. Symp.:885

József Attila Tudományegyetem Növénytani Könyvtára SZEGED