PATKÁNY MÁJ TIROZIN:tRNS LIGÁZ TISZTITÁSA

ÉS NÉHÁNY TULAJDONSÁGA

Doktori dolgozat

irta:

Deák Ferenc

MTA

Szegedi Biológiai Központ

Biokémiai Intézet

S Z E G E D

1977

B 1466

A dolgozat alapjául szolgáló kisérleteket az MTA, SzBK, Biokémiai Intézetének Anyagcsere szabályozás csoportjában végeztem.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Dénes Gézának, aki végig irányitotta munkámat. Dr. Nagy Juditnak értékes tanácsait és módszertani segitségét köszönöm. Hálás vagyok technikai munkatársam, Komócsin Mihályné lelkiismeretes és szorgalmas munkájáért.

A dolgozat kéziratának átnézéséért és értékes megjegyzéseikért Dr. Straub F. Brunónak és Dr. Kiss Antalnak, valamint munkatársaimnak, Fejes Erzsébetnek, Dr. Dusha Ilonának és Dr. Kuzsel Évának tartozom köszönettel.

A dolgozatban leirt kisérletekben felhasznált E. coli RNS polimerázt és rRNS-t a Biokémiai Intézet Nukleinsav Csoportjának munkatársai bocsátották rendelkezésemre, akiknek ez uton mondok köszönetet.

Rövidítések:

E. coli : Escherichia coli

RN-áz : ribonukleáz

SPF /specific pathogen free/: specifikus kórokozótól mentes

TMEM puffer: 10 mM tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM 2-merkaptoetanol, pH=7,2 25°C-on

E : enzim egység

PP_i : $P_2O_7^{4-}$, pirofoszfát

DEAE-cellulóz : dietil-amino-etil-cellulóz

Tris: trisz/hidroxi-metil/-amino-metán

SDS : nátrium-dodecil-szulfát

EDTA : etilén-diamin-tetraecetsav

TCA : triklór-ecetsav

BSA : marha szérum albumin

AS : aminosav

Tartalomjegyzék

I.	Bevezetés	1. old.
1.	Az aminosav aktiválás mechanizmusa	2. "
2.	Az aminosav aktiváló enzimek általános tulajdonságai	7. "
3.	Célkitüzés	10. "
II.	Anyagok és módszerek	12. "
III.	Eredmények és következtetések	25. "
1.	Az enzim tisztitása	25. "
2.	Az enzim preparátum tisztasága és stabilitása	30. "
3.	Az enzim molekulasulya és alegységszerkezete	35. "
4.	Az ATP:PP_i kicserélődési reakció	38. "
5.	A tirozil-tRNS szintézis	44. "
6.	A reakció mechanizmusra vonatkozó következtetések	50. "
IV.	Összefoglalás	53. "
V.	Irodalom	55. "

I. Bevezetés

Az aminosav aktiváló enzimek - aminosav:tRNS ligázok, E.C.6.1.1. - fontos szerepet játszanak a fehérje bioszintézisben, aktivált aminosavakat, a fehérjeszintézis szubsztrátjait szolgáltatják. Ugyanakkor az aminosavakat specifikus hordozóhoz is kapcsolják, ezáltal biztositva a genetikai információ hibátlan leforditásának feltételét.

Tekintettel kulcsszerepükre és arra, hogy csaknem tévedés mentesen választják ki a természetben előforduló aminosavak és tRNS-ek közül a megfelelőket és kapcsolják azokat össze, érthető az enzimek felfedezése /1-3/ óra irántuk megnyilvánuló nagy érdeklődés. Jelentősek ugy is, mint két makromolekula - nukleinsav és protein - közötti kölcsönhatás vizsgálatának modelljei, és mint három szubsztrátos enzimek, az enzimreakciók mechanizmusát vizsgálók részéről is fokozott figyelemre tartanak számot.

Annak ellenére, hogy az aminosav aktiváló enzimekről és az általuk katalizált reakcióról nagyon sokat tudunk, ezek az ismeretek főként mikroorganizmusok enzimjeinek vizsgálataiból származtak, mig magasabbrendü növények és állatok enzimjei sokkal kevésbé ismertek. Elegendő, ha arra utalunk, hogy a mai napig mindössze egyetlen állati

eredetü aminosav aktiváló enzimet tisztitottak a homogenitásig, a marha pancreas triptofán: tRNS ligázt./4,5/. Az emlős aminosav aktiváló enzimekről alkotott kép hiányos volta inditott bennünket arra, hogy megpróbáljunk egy ilyen enzimet tisztitani és jellemezni. Választásunk a tirozin aktiváló enzimre esett, mert az *Escherichia coli* tirozin:tRNS ligáz volt az első enzim, amelyet kinetikai jellemzők meghatározására alkalmas tisztaságban kinyertek /6/ és azóta tisztitották *Bacillus subtilis*ból /6/, *Bacillus stearothermophylus*ból /7/, pékélesztőből /8,9/ és ennek egy mutánsából /10/, sertés pancreasból /11/ és tovább tisztitották *Escherichia coli* B törzsből is /12/.

Ez a dolgozat a patkány máj citoplazmatikus tirozin: tRNS ligáz /E.C.6.1.1.1./ tisztitásáról és néhány tulajdonságáról szól. Hogy az előzményeket legalább vázlatosan ismerhessük, tekintsük át eddigi ismereteinket az aminosav aktiválás mechanizmusáról és az eddig izolált enzimek főbb tulajdonságairól.

1. Az aminosav aktiválás mechanizmusa

Az aminosav:tRNS ligázok az aminosavak karboxil csoportját a megfelelő tRNS molekulák 3'OH csoportjával ész-

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

teresitik, az 1 egyenlet által összefoglalt reakcióban:

1 $\quad AS + ATP + tRNS \rightleftharpoons AS\sim tRNS + AMP + PP_i$

Az egyenlet egyben az enzimaktivitás mérési lehetőségeit is magában foglalja. Legáltalánosabb a töltött tRNS mennyiségének meghatározása, de mérhetjük az ATP hidrolizisét cagy az AMP keletkezés sebességét is /13/. Ezek mind a teljes reakció sebességmérési lehetőségei. Az enzimek tRNS nélkül is képesek enzim-aminosav-adenilát komplex képzésre, amely ATP:PP_i kicserélődés mérést teszi lehetővé.

Az aminosav és ATP kötődés sorrendjét enzim-szubsztrát komplex izolálás mellett éppen az ATP:PP_i kicserélődés kinetikai vizsgálatával deritették fel. Abban megegyeznek a szerzők, hogy az enzim-aminosav-adenilát komplex képződése szekvenciális mechanizmusu, az aminosav és ATP kötődés megelőzi a PP_i ledisszociálást /18/. Megoszlanak a vélemények abban a tekintetben, hogy az aminosav kötődik-e előbb /19/ vagy az ATP /20-23/, vagy random a kötődés /18, 24/.

A tRNS töltés mechanizmusára vonatkozó hipotézisek alapvetően kétfélék. Az első, klasszikus hipotézis szerint a tRNS töltés két lépésben történik /3/:

2 $E + AS + ATP \rightleftharpoons E \cdot AS \sim AMP + PP_i$

3 $E \cdot AS \sim AMP + tRNS \rightleftharpoons AS \sim tRNS + AMP$

A második hipotézis elismeri az E•AS~AMP komplex létezését, de csak tRNS hiányában, és nem tekinti a tRNS töltés intermedierjének /16/. A hipotézis szerint a tRNS kötődik első szubsztrátként az enzimhez, és az ATP:PP_i kicserélődés E•tRNS•AS~AMP komplex képződésével válik lehetségessé.

A tRNS töltés két részreakcióra bontásának történeti oka van. Előbb fedezték fel ugyanis az aminosavak enzimatikus aktiválódását /14,15/, majd később azt, hogy ugyanezen enzimek az aminosavakat tRNS-hez kötik /1-3, 11/. Az E•AS~AMP komplex intermedier volta mellett szól, hogy kémiailag szintetizált aminosav-adenilátból PP_i hozzáadással ATP-t képez az enzim /25,26/, és izolált komplexhez tRNS-t adva töltött tRNS képződik /21, 27-29/.

Az enzim-aminosav-adenilát komplex intermedier volta ellen szól Loftfield szerint /16, 38/, hogy

a/ van néhány enzim, amely csak tRNS jelenlétében képes ATP:PP_i kicserélődésre /30-35/,

b/ poliaminok vagy divalens kationok helyettesitik a Mg^{++}-t a tRNS töltésben, de az ATP:PP_i kicserélődés nagyon lelassul /36,37/,

c/ egyes esetekben az izolált E•AS ~ AMP komplexből a tRNS töltés lassabb, mint ATP-ből és aminosavból /38/,

d/ SH-gátlószerekkel /39/, poliuridilsavval /28,40/, az enzim alegységekre disszociáltatásával /41/ meg lehet szüntetni a tRNS töltést, az ATP:PP_i kicserélődés változatlanul hagyása mellett,

e/ a bakteriális sejtben becsült tRNS koncentráció és az enzim-tRNS komplex disszociációs állandója ismeretében valamennyi enzim molekulának tRNS-sel alkotott komplex formájában kell jelen lennie a sejtben /42/.

Az e/ pont nem zárja ki, hogy az enzim töltött tRNS-sel alkotott komplex formájában van jelen a sejtben.

A d/ pont megállapitásai nincsenek ellentmondásban azzal, hogy az ATP:PP_i kicserélődést lehetővé tevő E•AS ~ AMP komplex keletkezése a tRNS töltés részreakciója.

A c/ pontban leirt kisérletekről Kim és munkatársai bebizonyitották, hogy tévesek és félrevezető eredményt adtak /43/.

A b/ pontnál figyelembe kell venni, hogy a lecsökkent sebességű ATP:PP_i kicserélődés is gyorsabb, mint a tRNS töltés. A poliaminok képesek helyettesiteni a Mg^{++}-t a tRNS térszerkezetének fenntartásában.

Az a/ pont szolgáltatja a legerősebb érvet, azonban előkisérletek szerint a tRNS-igényes arginin enzim is hasznositja az Arg~AMP-t /45/ és a glutaminsav aktiválás is két lépéses /46/.

Fersht és Jakes elfogadják mind a két reakcióutat. 10-100 msec felbontásu kisérleteik alapján ugy vélik, hogy alacsony tRNS koncentrációnál az *E. coli* tirozil-tRNS szintézis valószinüleg tirozil-adenilát-enzim intermedieren keresztül történik, mig telitési tRNS koncentrációnál a tRNS az ATP hidrolizis előtt kötődik. A sejten belüli tRNS koncentrációtól függ, hogy in vivo melyik reakcióut jut tulsulyba /47/.

A reakciómechanizmussal összfüggő másik vitatott kérdés az, hogy mi a sebességmeghatározó lépés. A probléma vizsgálatánál sokáig döntő volt az a tény, hogy a kutatók a 2 és 3 egyenletek által feltüntetett részreakciókat fogadták el reakció sorrendnek. Amig csak azt tudták, hogy az ATP:PP_i kicserélődés számos esetben sokkal gyorsabb a tRNS töltésnél /16/, a tRNS kötődését az aminosav-adenilát-enzim komplexhez gondolták sebességmeghatározónak. A továbbiak során kiderült, hogy az aminosav-adenilát-enzim komplexről az aminosavátvitel tRNS-re is sokkal gyorsabb, mint a teljes reakció /48/. Ezt figyelembe véve uj hipotézist állitott fel Eldred és Schimmel /48,49/. Szerintük a sebességmeghatározó lépés a töltött tRNS le-

disszociálása az enzimről. Ezt alátámasztotta, hogy sikerült az Ile-tRNS szintézis kétfázisos jellegét kimutatni: a szabad enzim pillanatszerüen köti és tölti a tRNS-t, majd egy lassubb, a töltött tRNS ledisszociálása által meghatározott lineáris szakasz következik. Következtetésük általános érvénye ellen szól, hogy más szerzők nem találtak lényeges különbséget a töltött és töltetlen tRNS enzimhez kötődésének paraméterei között /12/.

Fersht és Jakes /47/ nem tudott kimutatni kezdeti gyors ATP hidrolizist vagy tRNS töltést, Viszont azt kapták, hogy ez enzimet telitő koncentrációju tRNS jelenlétében az ATP hidrolizis sebessége megegyezik a tRNS töltés sebességével és sokkal lassubb, mint az ATP hidrolizise tRNS nélkül. Szerintük a tRNS kötődése az enzimhez lelassitja az aminosav és az ATP kötődését, igy válik valamelyik utóbbi lépés sebességmeghatározóvá.

2. Az aminosav aktiváló enzimek általános tulajdonságai

Az általános tulajdonságok leirását azárt kisérelhetjük meg, mert az enzimek sokféleségük ellenére alapvetően azonos reakciót katalizálnak. Alegység szerkezetüket és aktiv helyeik számát vizsgálva egyaránt elmondhat-

juk, hogy az aminosav aktiváló enzimek szimmetrikus felépitésüek.

Az enzimek egy, kettő vagy négy polipeptidből állnak. Egyetlen popipeptid lánc épiti fel például az élesztő tirozin:tRNS ligázt /8,9/. A legtöbb enzim két azonos alegységből áll. Ide tartozik az *E. coli* /6,12/, a *Bacillus stearothermophylus* /7/ és a sertés pancreas /50/ tirozin:tRNS ligáz, a marha pancreas /51/ és human placenta /52/ triptofán valamint a tyuk máj szerin /53/ aktiváló enzimek. Négy azonos alegységből áll a *Saccharomyces cerevisiae* αS288C mutánsból izolált tirozin:tRNS ligáz /10/, és két alegység pár épiti fel az élesztő /54/ és patkány máj/55/ fenilalanin aktiváló enzimeket.

Ha tekintetbe vesszük, hogy az *E. coli* egyetlen polipeptidből álló izoleucin /56/ és leucin /57/ enzimjei is két azonos félre bonthatók, a *Bacillus stearothermophylus* valin enzim két aminosavat és ATP-t köt /58/, és a leucin enzimhez hasonlóan ismétlődő peptideket tartalmaz /59/, nyugodtan állithatjuk, hogy az alegység szerkezet nem zárja ki, hogy az enzimek két azonos félre bonthatók.

Tekintsük át az enzimek szubsztrátkötő helyeinek vizsgálatát a bakteriális tirozin:tRNS ligázokkal végzett kisérleteken keresztül. Egyetlen kötőhelyet találtak egyensulyi dializissel tirozinra /60, 61/, de kinetikai kisérletek és gélszürés egy második, gyenge kötőhely lé-

tezésére is utalt /58,61/ és Sephadex gélszüréssel az enzim két tirozin molekulával alkott komplexét lehetett izolálni /20/. Az enzim-szubsztrát komplex kialakulásakor mért fluoreszcencia változásból két ATP-kötőhelyre következtettek /62/.

Gélszüréssel /60/ és filter kötési kísérletekkel /61/ egyetlen tirozil-adenilát kötőhely mutatkozott, míg ATP hidrolizis mérésén alapuló titrálás /58/ egy második, gyenge kötőhely létére utalt.

Az enzimek egyetlen tRNS-t kötnek /63/ vagy kettőt, és különböző erővel /60/ és disszociációs kísérletekkel el lehetett dönteni, hogy az enzim szimmetrikus, a két tRNS molekula azért kötődik különböző erővel, mert az első kötődés a második molekula kötődését megneheziti /64/, illetve filteren az enzim két tRNS molekulával alkotott komplexe nyerhető ki /2o/.

Összefoglalva a szubsztrátkötő-helyek számának és viszonyának vizsgálatát, láthatjuk, hogy a kisérleti módszerek fejlődésével minden szubsztrátra megtalálták a második kötőhelyet, sőt azt is kideritették, hogy a kötőhelyek azonos értékűek. Ha pedig egy enzim két azonos félre bontható és két azonos szubsztrátkötő hellyel rendelkezik, akkor az enzim szerkezete szimmetrikus.

A direkt bizonyitékot a *Bacillus stearothermophylus* tirozin aktiváló enzim röntgen analizise szolgáltatta. Irwin és munkatársai kimutatták ugyanis, hogy az enzim két teljesen szimmetrikus félből áll /65/.

Ez a szerkezeti szimmetria azonban jól összhangba hozható az enzim müködésbeli aszimmetriájával. Malygin és munkatársai /66/ három különböző enzimmel, *E. coli* egyetlen polipeptidből álló leucin, marha pancreas két alegységes triptofán és élesztő négy alegységes fenilalanin aktiváló enzimmel dolgoztak. Mivel kisérleteikben mintegyik enzim azonosan viselkedett, ugy gondolják, hogy a megszerkesztett enzim modelljük általános érvényü. Szerintük az enzimek két-két tRNS és aminosav-adenilát kötőhellyel rendelkeznek, és az utóbbiak felváltva reagálhatnak a tRNS-sel. Modelljüket affinitás jelölési kisérletekkel is alátámasztották /67/.

3. Célkitüzés

Mint az a bevezetőből kitünik, az állati eredetü aminosav aktiváló enzimekről sokkal kevesebbet tudunk, mint a baktériumok vagy az élesztő enzimjeiről. Ezért jelentős egy eddig még nem vizsgált emlős eredetü enzim tisztitása és jellemzése. Már indokoltuk, hogy miért esett választá-

sunk a tirozin aktiváló enzimre: több baktérium és élesztő törzsből, valamint sertés pancreasból izolálták eddig, és ez lehetőséget nyujt az összehasonlitásra. A patkány máját azért választottuk forrásul, mert rendelkeztünk specifikus kórokozótól mentes beltenyésztett patkány törzsekkel és aktiv fehérjeszintézist végző májukat elfogadható mennyiségben ki tudtuk nyerni.

Célunk volt:

1/ az enzim tisztitása RN-áz mentes, stabil és alegység szerkezet felderitésre is alkalmas állapotig,

2/ molekulasuly és alegység szerkezet meghatározása

3/ látszólagos Michaelis állandók meghatározása ATP:PP_i kicserélődésben és tRNS töltésben,

4/ a reakció mechanizmusra vonatkozó következtetések levonása.

II. Anyagok és módszerek

1. Felhasznált anyagok és vegyszerek

Kromatográfiás célokra Whatman DE 52 microgranular DEAE-cellulózt, Whatman P 11 fibrous foszfocellulózt, Pharmacia 40-120 µm szemcseméretü Sephadex G-200 dextrán gélt és a Chinoin által gyártott Fixion 2x8 anion cserélő vékonyréteget használtunk.

Hordozómentes ^{32}P H_3PO_4-t az Izotóp Intézettől, /Budapest/, ^{14}C/U/ L-tirozint az UVVR-től /Prága/ szereztünk be.

1,5 µm pórusméretü synpor membrán filtert a Chemapoltól /Prága/, UM 10 diaflo membránt az Amicon cégtől kaptunk.

Tris, 2-merkaptoetanol, tirozin, triton X-100, p-nitro-fenil-foszfát, coomassie brilliant blue, dextran blue, marha szérum albumin és mahra máj kataláz Sigma gyártmány volt. Kálium-acetátot és N,N'-metilén-biszakrilamidot a BDH-tól, nátrium-dodecil-szulfátot, N,N,N'N'--tetrametil-etilén-diamint és tyuk tojás albumint a Serva cégtől vásároltunk. Az ATP Reanal, a tRNS preparáláshoz használt szacharóz Merck gyártmány volt.

A felhasznált *E. coli* RNS-polimeráz Burgess és Travers /73/ módszerével tisztitott, homogén preparátum volt, a nyul izom tejsav-dehidrogenázt Kornberg leirása alapján /76/ tisztitottuk 35,2 E/mg tisztaságig, az alkalikus foszfatázt *E. coli* 3747 konstitutiv mutánsból Torriani módszerét követve /77/ tisztitottuk 81 % tisztaságig.

Az összes többi vegyszer analitikai tisztaságu Merck vagy Reanal készitmény volt.

2. A patkány máj kinyerése

Kisérleteinkben SPF körülmények között nevelt beltenyésztett patkány törzsek máját használtuk fel. Az enzim tisztitása PVG/c állatok fagyasztott májából történt, a tRNS-t PVG/c és WA állatok friss májából izoláltuk.

100-300 napos him és nöstény állatokat éteres narkózisban elvéreztettünk. Májukat kivágtuk, 0°C hőmérsékletü, 0.9 %-os NaCl-ban mostuk, és -60°C-on lefagyasztottuk vagy frissen felhasználtuk.

3. A tirozin:tRNS ligáz tisztitása patkány májból

Valamennyi müveletet 0-4°C között végeztük.

3.1. Homogenizálás, ultracentrifugálás, dializis

250 g májat MSE Atomix késes homogenizátorral 10 g-os adagokban, 4 térfogat 0.25 M szacharóz, 3 mM $MgCl_2$ hozzáadása után 1 percig homogenizáltunk. 10 percig 1000 g-vel történő centrifugálással eltávolitottuk a sérült vagy nem homogenizálódott sejteket a sejtmagokkal együtt. Utóbbiakat más enzim preparáláshoz használtuk fel. A csövek tartalmának felső 2/3 részét összeöntöttük és 20 percig 14 000 g-vel centrifugáltuk. A felüluszót 4 réteg gézen átszürtük zsirmentesitás céljából, majd 90 percen át 96 000 g-vel centrifugáltuk /Beckman L3-50 ultracentrifuga, 42 rotor, 35 000 rpm/. A kapott éles határfelületü üledékről a felüluszót leöntöttük és 2 x 5 liter TMEM pufferral szemben dializáltuk 40 órán át. /A TMEM puffer: 10 mM tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 1 mM 2-merkaptoetanol pH=7,2 25°C-on. Az enzim preparálás valamennyi további lépése ebben a pufferban történt./

3.2. DEAE-cellulóz kromatográfia

A dializált felüluszóhoz 100 mg fehérjénként 4 ml nedves, ülepedett térfogatu DEAE-cellulózt adtunk, amelyet előzőleg TMEM pufferban ekvilibráltunk. 30 perces keverés után a cellulózt Büchner tölcséren leszürtük és a cellulóz térfogatával azonos mennyiségü TMEM pufferral

mostuk négyszer egymás után, gyenge szivás mellett. A mosás végén az átfolyt oldat csaknem szintelen volt, E_{280} értéke 0,5 alatt. Ezután a cellulózhoz azonos térfogatu puffert öntöttünk, felszuszpendáltuk, majd 3 cm átmérőjü oszlopba töltöttük. 250 g máj felülusző DEAE-cellulóz oszlopa 3 x 54 cm volt. Az enzimet 0,1 M KCl tartalmu TMEM pufferral eluáltuk az oszloprôl. 10 ml-es frakciókat szedtünk. A fehérjetartalom és enzimaktivitás meghatározása után a legnagyobb specifikus aktivitásu frakciókat összeöntöttük és tovább tisztitottuk.

3.3. Foszfocellulóz kromatográfia

A DEAE-cellulóz kromatográfia összeöntött frakcióit négyszeresre higitottuk TMEM pufferral, majd 1,5x4,5 cm foszfocellulóz oszlopra vittük fel. Az oszlopot addig mostuk TMEM pufferral, amig az átfolyt oldat E_{280} értéke nullára csökkent. Ezután a mosást 0,1 M KCl tartalmu pufferral folytattuk, azonos határig. Az enzimet 0,2 M KCl tartalmu TMEM pufferral eluáltuk. 4 ml-es frakciókat szedtünk. Azokat a frakciókat, amelyek E_{280} értéke a nullát meghaladta összeöntöttük, UM 10 diaflo membránon ultraszüréssel betöményitettük. A igy nyert preparátumot vagy azonnal tovább tisztitottuk vagy azonos térfogat glicerin hozzáadása után -20°C-on tároltuk.

3.4. Foszfocellulóz rekromatográfia

A foszfocellulóz oszlopról 0,2 M KCl-dal eluált, betöményitett enzimet négyszeresre higitottuk TMEM pufferban, majd 1 x 11 cm, TMEM pufferban ekvilibrált foszfocellulóz oszlopra vittük fel. Mostuk az oszlopot 25 ml pufferral, majd eluáltuk a megkötött fehérjéket 200 ml 0-0,3 M KCl tartalmu pufferral. A frakciók térfogata 2,5 ml volt. Az enzimaktivitás és fehérjetartalom meghatározása után a legnagyobb specifikus aktivitásu frakciókat összeöntöttük, UM10 diaflo membránon ultraszüréssel betöményitettük és azonos térfogat glicerinnel tároltuk -20°C-on.

4. Az enzimaktivitás meghatározása ATP:PP_i kicserélődés alapján

4.1. ^{32}P jelölt pirofoszfát készitése

A radioaktiv pirofoszfátot Loftfield és Eigner /68/ módszerével készitettük. 0,178 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O-t és 2 mCi hordozómentes foszforsavat 6 órán át 240°C-on hevitettünk. A foszforsav 99%-ban átalakult pirofoszfáttá, de kerülni kell a magasabb hőmérsékletet, mert az polifoszfátok képződéséhez vezet. A kiindulási és az át nem alakult foszfát koncentrációt radioaktivitást nem tartal-

mazó párhuzamos mintákból határoztuk meg, Eibl és Lands szerint /69/. 4,5 ml vizes foszfát oldathoz 50 µl 1 %-os triton X-100 oldatot adtunk, majd jól összeráztuk. Ezután 0,5 ml 2,5 %-os ammónium-molibdenát 6 N kénsavas oldatát adtuk a meghatározási elegybe, összekevertük, és a kialakuló zavarosságot 20 perc után 660 nm-en lemértük. Az extinkció arányos volt a foszfát koncentrációval a reakcióelegy 10^{-7} mol foszfát tartalmáig. Az ismeretlen oldat foszfát koncentrációját kalibrációs oldatsorozat segitségével határoztuk meg.

A ^{32}P radioaktivitást 10 ml desztillált vizben, Cserenkov sugárzás alapján mértük, Packard Tri-Carb folyadék szcintillációs spektrométerben.

4.2. Az enzimaktivitás mérése

Az enzim aktivitását az enzim által katalizált és tirozin függő ATP:PP_i kicserélődés sebessége alapján mértük. Tirozint tartalmazó és tirozint nem tartalmazó reakcióelegyben mért ATP:PP_i kicserélődés sebességének különbsége adta az enzim aktivitását. Kisérleteinkben a tirozin nélkül mért sebesség nem multa felül a tirozin jelenlétében mért sebesség 10 %-át. Egy enzim egység /1 E/ az a katalitikus aktivitás, amely egy perc alatt

37°C-on 1 nmol radioaktiv ATP keletkezéséhez vezet.

A reakcióelegy komponenseinek koncentrációi: 0,1 M tris-HCl, pH=7,65 37°C-on, 0,12 M KCl, 2 mM 2-merkaptoetanol, 10mM ATP, KOH-dal pH=7,4-re baállitott törzsoldatból bemérve, 15 mM $Mg/CH_3COO/_2$, 2,5 mM ^{32}P $Na_4P_2O_7$ /4-7 cpm $pmol^{-1}$/, 1 mM tirozin és annyi enzim, amennyi jól mérhető sebességü reakciót katalizált. A végtérfogat 0,5 ml volt. Az enzim oldatot TMEM pufferban higitottuk, 50 µl-t mértünk a reakcióelegybe, ezzel inditva a reakciót. 3 percenként 50 µl mintát azonos térfogat 0,1 M EDTA pH=7 oldatba pipettáztunk, ezzel állitva le a reakciót.

A radioaktiv pirofoszfátot és ATP-t Fixion 2x8 anion cserélő vékonyrétegen választottuk el Dusha és Dénes szerint /70/. A vékonyréteg 1 x 20 cm-es csikjaira a csik egyik végétől 2,5 cm-re 10 µl rakcióelegyet vittünk fel, majd 0,1 M $Na_4P_2O_7$, pH= 8,0 oldatban kétszer 30 percig futtattuk. A radioaktiv pirofoszfát a futtató oldat ionjaira cserélődik ki és ezáltal a starthelyről kimosódik, mig a lugos pH-n erős anion ATP a helyén marad. A startpont mindkét oldalon 1,5 cm-es környezetét kivágtuk és a radioaktiv ATP-t az előző pont szerint megmértük.

A Fixion 2x8 vékonyrétegeket a felhasználás előtt acetát formából pirofoszfát formába vittük: 0,1 M $Na_4P_2O_7$, pH=8,0 oldatban futtattuk egy napon át Tomasz

/71/ szerint, majd a pirofoszfát felesleget egy éjszaka desztillált vizzel mostuk ki.

5. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

A Shpiro és munkatársai /72/ szerinti SDS-poliakrilamid gélelektroforézist fehérje tisztaság ellenőrzésére és alegység molekulasuly becslésre végeztük el.

Az előbbi esetben használt 0,6 cm átmérőjü és 8 cm hosszu gél henger és az utóbbi meghatározáshoz alkalmazott 17 x 16 x 0,25 cm méretü lemezgél egyaránt 5 % akrilamid tartalmu volt /akrilamid : N,N'-metilén-bisz-akrilamid arány 40:1/, tartalmazott 0,1 M nátrium-foszfát pufferban 0,1 % nátrium-dodecil-szulfátot /SDS/, 0,1 % N,N,N'N' tetrametil-etilén-diamint és 0,05 % ammónium-perszulfátot. A gélt 2 órás polimerizálás után 30 percig előfuttattuk.

A tirozin:tRNS ligáz preparátum fehérjéit és a standard fehérjéket: marha szérum albumint, tyuk tojás albumint, ló szivizom citokróm c-t és *E. coli* RNS-polimerázt 0,01 M nátrium-foszfát, pH=7,3, 0,1 % SDS, 1 % 2-merkaptoetanol, 10 % glicerin pufferban disszociáltattuk alegységeikre, 30 percig, szobahőmérsékleten. Az enzim minták fele töménységü TMEM puffert is tartalmaztak.

Tisztaság ellenőrzésre 100-200 µl-ben 10-30 µg fehérjét vittünk fel, molekulasuly meghatározáskor maxi-

mum 50 µl térfogatban 1-5 µg fehérjetartalmu mintákat futtattunk.

A futtatást 25°C-on, 0,1 M nátrium-foszfát, pH=7,3, 0,1 % SDS pufferban végeztük, tisztaság ellenőrzéskor 40 V, molekulasuly meghatározáskor 25 V feszültségnél, Shandon Southern áramforrással.

A fehérjéket 2 órán át festettük metanol : viz : : jégecet, 5 : 5 : 1 arányu friss elegyében oldott 0,2 % coomassie brilliant blue oldatban. A géleket ecetsav 7,5%-, metanol 5 %-os vizes oldatában differenciáltuk.

6. Enzim molekulasuly meghatározás gélszüréssel

A meghatározást Andrews /74/ szerint végeztük. 1,5 x 90 cm méretü Sephadex G-200 oszlopra, amelyet feltöltés előtt 10 mM tris-HCl pH=7,2, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0,1 M KCl pufferban duzzasztottunk több napon át, majd feltöltés után ugyanezzel a pufferral ekvilibráltunk, 1 ml térfogatban vittük fel a tisztitott tirozin: :tRNS ligázt és a molekulasuly standardként szolgáló enzimeket. Az eluciót a fenti pufferral, 13 ml/h sebességgel végeztük. 2 ml-es frakciókat szedtünk.

A tirozin:tRNS ligáz aktivitását ATP:PP_i kicserélődés alapján mértük.

A marha máj kataláz aktivitását Chance és Maehly /75/ szerint mértük, a hidrogénperoxid bomlás okozta 240 nm-en mért extinkció csökkenés alapján, 0,8 % hidrogénperoxid, 0,02 M kálium-foszfát pH=7,0 reakcióelegyben.

A nyul izom tejsav-dehidrogenáz aktivitását 0,33 mM Na-piruvát, 0,066 mM $NADH+H^+$, 33 mM kálium-foszfát pH=7,4 jelenlétében mértük, 340 nm-en követve a $NADH+H^+$ oxidációját /76/.

Az *E. coli* alkalikus foszfatáz aktivitását Garen és Levinthal /78/ módszerével mértük, 0,16 M tris-HCl pH=8,2 pufferban oldott 0,66 mM p-nitro-fenil-foszfát hidrolizise alapján, a keletkező, sárga p-nitro-fenol mennyiségét 410 nm-en végzett fotometrálással meghatározva.

Mindhárom enzim reakciója 6 percig lineáris volt az alkalmazott enzim koncentrációk mellett.

Ló szivizom citokrom c eluciós profilját E_{412} méréssel határoztuk meg.

A kizárási térfogat meghatározásához használt dextrán blue elucióját a frakciók 625 nm-en mért extinkciója alapján követtük.

7. Patkány máj tRNS izolálás

A keverék tRNS-t PVG/c és WA állatok májából nyertük ki, Rogg és mtsai /79/ leirása alapján. Az izopropanolos frakcionálást kivéve valamennyi müveletet 0 - 4°C között végeztük.

7.1. Fenolos extrakció

250-350 g májhoz g-onként 1,5 ml 0,3 M szacharózt és 0,1 % bentonitot tartalmazó 0,1 M tris-HCl, pH=7,0 puffert és 1,5 ml 0,1 % 8-hidroxi-kinolint tartalmazó fenol: viz, 73:27 arányu elegyét adtuk. Waring Blendorban homogenizáltuk két percig, majd 1 órán át szobahőn rázattuk. Lehütöttük, 12 000 g-vel centrifugáltuk 60 percig. A vizes fázishoz 0,1 térfogat 2 M kálium-acetát pH=5,0 oldatot és 2 térfogat -20°C-os vizmentes etanolt adtunk. Az egy éjszakán át -20°C-on képződött csapadékot lecentrifugáltuk /12 000 g, 30 min/ és mostuk háromszor etanollal, majd háromszor éterrel, végül P_2O_5 felett száritottuk.

7.2. DEAE-cellulóz kromatográfia

A kromatográfia valamennyi lépését 0,1 M kálium-acetát, pH=5,0 pufferban végeztük.

A száritott csapadékot máj g-onként 0,6 ml pufferban oldottuk, és a nem oldódott glikogént centrifugálással eltávolitottuk /12 000 g, 30 min/. A felüluszót ml-enként 0,16 g nedves sulyu, a fenti pufferral ekvilibrált DEAE-cellulózzal kevertük 30 percig. Leszürtük Büchner tölcséren gyenge szivás mellett. A Büchner tölcsérben lévő DEAE-cellulózt mostuk a pufferral addig, amig a szürlet 260 nm-en mért extinkciója 2 alá csökkent. Ezután azonos módon mostuk 0,1 M, 0,2 M illetve 0,3 M NaCl-ot tartalmazó pufferral. A tRNS eluciót 1,0 M NaCl tartalmu acetát puffer kis adagjaival végeztük, a szürlet olyan részleteit, amelyek E_{260} értéke 0,5-nél nagyobb volt, összeöntöttük és 2 térfogat etanollal -20°C-on kicsaptuk. A csapadék centrifugálását, mosását és szárítását a fenolos extrakciónál leirt módon végeztük.

Ez a tisztitási lépés glikogénen kivül DNS-től és a nagy molekulasulyu RNS egy részétől tisztitja meg a tRNS-t. A kapott termék E_{260}/E_{280} értéke 2,0 felett van.

7.3. Frakcionálás izopropanollal

A száritott csapadékot g-onként 50 ml 0,3 M Na-acetát pH=7,0 pufferban oldottuk 25°C-on. Állandó keverés mellett 0,54 térfogat izopropanolt csepegtettünk hozzá, a keletkezett csapadékot szobahőmérsékleten lecentrifugáltuk /2200 g, 20 min/. A felüluszóhoz 0,44 térfogat izo-

propanolt adtunk, majd 0°C-ra hütöttük. A keletkezett csapadékot lecentrifugáltuk /Janetzki K 23 centrifuga, 5200 rpm, 20 min/, mostuk és szárítottuk, mint a fenolozás után.

Az első csapadék elsősorban degradálódott rRNS-t tartalmaz, a tRNS a második csapadékban van. 300 g májból 1600 E_{260} egység tRNS-t nyertünk, 21 E_{260}/mg értékkel, 8-12 pmol/E_{260} tirozin akceptor aktivitással.

8. A tRNS aminoacilálása

A tRNS töltés sebességét a TCA-val kicsapható nukleinsavhoz kötött radioaktiv tirozin mérésével határoztuk meg. 0,5 ml reakcióelegy komponensei: 0,1 M kálium-kakodilát, pH=6,6, 37°C-on, 15 mM $Mg/CH_3COO/_2$, 10 mM ATP, KOH-dal semlegesitett törzsoldatból bemérve, 1 mM 2-merkaptoetanol, 0,1 mM ^{14}C tirozin /10 Ci mol^{-1}/, annyi patkány máj tRNS keverék, amennyi 0,8-1,5 µM tirozin akceptor aktivitást képvisel és limitáló mennyiségü enzim.

A reakciót ATP adással inditottuk, a többi komponenst az enzimmel együtt előmelegitettük 37°C-on. 0,1 ml térfogatu mintákat 1 ml 0°C hőmérsékletü 10 %-os TCA-ba pipettázva állitottuk le a reakciót. A képződött csapadékot 1,5 µm pórusméretü synpor membrán filteren le-

szürtük, 4 x 5 ml 0°C hőmérsékletü 5 %-os TCA-val mostuk. Szárítás után a radioaktivitást 10 ml szcintillátor folyadékban /42 ml Liquid Scintillator NE 592 1000 ml toluolban/ mértük, Packard Tri-Carb folyadék szcintillációs spektrométerben.

A ^{14}C mérés hatásfoka, amelyet ismert radioaktivitásu oldat filterre pipettázása után a mintákkal azonos körülmények között mértünk meg, 80 % volt.

9. Fehérje meghatározás

Az enzim preparálás során a fehérjét Lowry /80/ módszerével mértük, marha szérum albumint használva standardként.

III. Eredmények és következtetések

1. Az enzim tisztitása

A tisztitás lépései ultracentrifugálást és dializist követő DEAE-cellulóz kromatográfia és ismételt foszfocellulóz kromatográfia voltak. Az eredményeket az I. táblázat tünteti fel. Látható, hogy a dializált felüluszóhoz

viszonyítva ATP:PP_i kicserélődés alapján mintegy 1600--szorosra tisztítottuk az enzimet, és a kiindulási aktivitás 6 %-a maradt meg. Az egyes tisztítási lépésekről a következőket mondhatjuk el.

Az alkalmazott késes homogenizálás 0,25 M szacharóz, 3 mM $MgCl_2$-ban intakt sejtmagvak preparálását tette lehetővé, így a patkány máj sejtmagok magas ribonukleáz tartalma nem szennyezte a felülúszót. Továbbá, mivel ilyen körülmények között valószínüleg a mitokondrium membrán sem sérült meg, a tisztított tirozin:tRNS ligáz csaknem kizárólagosan a citoplazmából származik.

Az alkalmazott ultracentrifugálási lépés szükségességét indokolja, hogy 120 perces 36 000 g-vel végzett ülepítés után a riboszómák a felülúszóban maradtak és a riboszóma fehérjék foszfocellulózról együtt eluálódtak az enzimmel. 90 percnél hosszabb idejü centrifugálás, vagy 100 000 g-nél nagyobb ülepitő erő hatására viszont a sejtekben lévő aminosav aktiváló és fehérjeszintetizáló komplex kiülepedhet, az ebből eredő veszteség elérheti az enzimaktivitás 1/3 részét is /81/.

Az itt nem közölt kisérleteink eredményei arra mutattak, hogy EDTA inaktiválja az enzimet, tehát az valamilyen kétértékü kationt igényel. A homogenizálás során 3 mM, a dializistől kezdve 5 mM koncentrációju $MgCl_2$ elég volt az enzim aktivitásának megörzéséhez.

I. táblázat

Tirozin:tRNS ligáz tisztitás összefoglalása

Frakció	Térfogat ml	Összes fehérje mg	Összes aktivitás E	Specifikus aktivitás E/mg	Hozam %	Tisztitás mértéke
Dializált 96 000 g felüluszó	680	6400	73 000	11,4	100	1
DEAE-cellulóz	40	428	30 650	71,3	42	6,3
Foszfocellulóz I.	4,0	1,3	11 360	8 740	15,5	767
Foszfocellulóz II.	2,0	0,25	4 550	18 350	6,23	1610

Egy átlagos enzimtisztitás adatai, 250 g májból kiindulva. Egységnyi /1 E/ enzim 1 nmol ATP:PP_i kicserélődést katalizál percenként, az Anyagok és módszerek c. fejezetben ismertetett körülmények között.

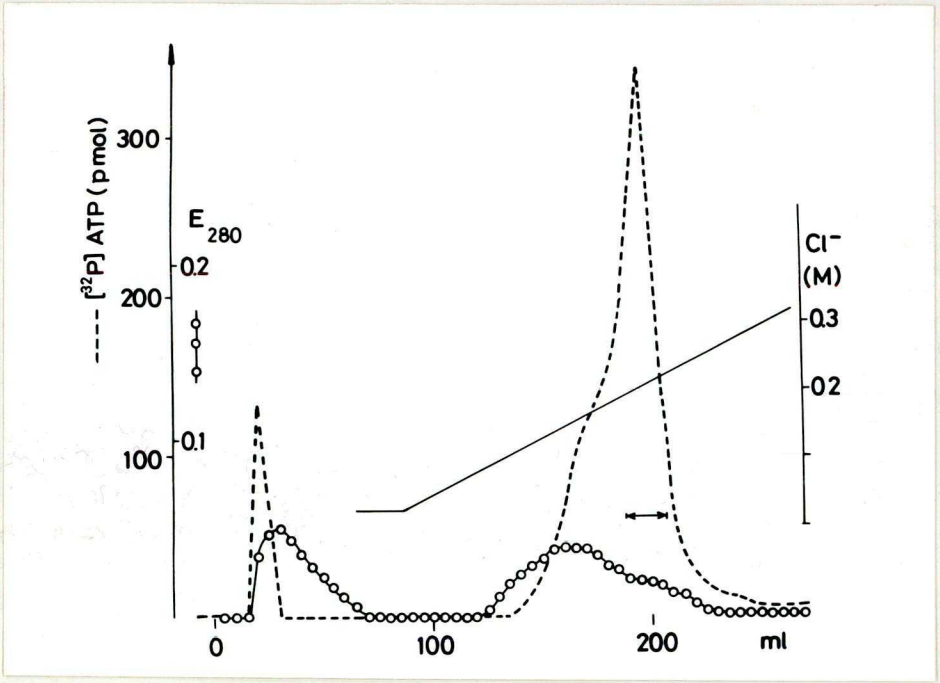
Intenziv dializis szükséges az ultracentrifugált felüluszó pontos aktivitásméréséhez. Tirozin:tRNS ligáz aktivitásnak a tirozin jelenlétében és tirozin hozzáadás nélkül mért ATP:PP_i kicserélődés sebességeinek különbségét tekintettük. Nem kielégitő dializis esetén előfordulhat, hogy az utóbbi értékben a felüluszóban lévő tirozintól függő kicserélődés sebessége is benne van. Ebben az esetben tirozin:tRNS ligáz aktivitásra a valódinál kisebb értéket

kapunk. Általában elfogadtuk, ha a nyers kivonat ATP:PP_i kicserélődést katalizáló aktivitása tirozin nélkül nem haladta meg a tirozinnal mért reakciósebesség 10 %-át. A DEAE-cellulóz kromatográfiát követően a frakciók tirozin nélkül nem katalizáltak ATP:PP_i kicserélődést, ami arra utal, hogy nem tartalmaztak szabad aminosavat.

A DEAE-cellulóz kromatográfia szerepe az enzim elválasztása nukleinsavaktól, főként tRNS-től. Emellett a 0,1 M KCl eluáló sókoncentráció megválasztásával néhányszoros tisztitás is elérhető a lépéssel. Az enzimaktivitás az eluált fehérje csucs első felében található.

A foszfocellulóz kromatográfia a legnagyobb tisztitást eredményező lépés. Az elválasztás alapja, hogy a nukleinsavmentes aminosav aktiváló enzimek a többi fehérjénél erősebben kötődnek a foszfocellulózhoz. A kötődésben a sok negativ töltésü foszfát csoportnak van szerepe, ami nukleinsavhoz hasonlóvá teszi a cellulózt. A lépés tehát affinitás-szerü kromatográfiának tekinthető.

A foszfocellulóz oszlopon átfolyik csaknem az összes, hemoglobin-származéktól szines anyag. 0,1 M KCl tartalmu puffer halvány rózsaszin fehérje oldatot eluál, enzimaktivitás nélkül. A szintelen enzim oldat 0,2 M KCl TMEM pufferral eluálható. 25-30 térfogatszázalék glicerin gyengiti a fehérjék oszlophoz kötődését, az enzimaktivitás zöme már 0,1 M KCl hatására eluálódik. Ezzel a lépéssel



1. ábra: Foszfocellulóz rekromatográfia

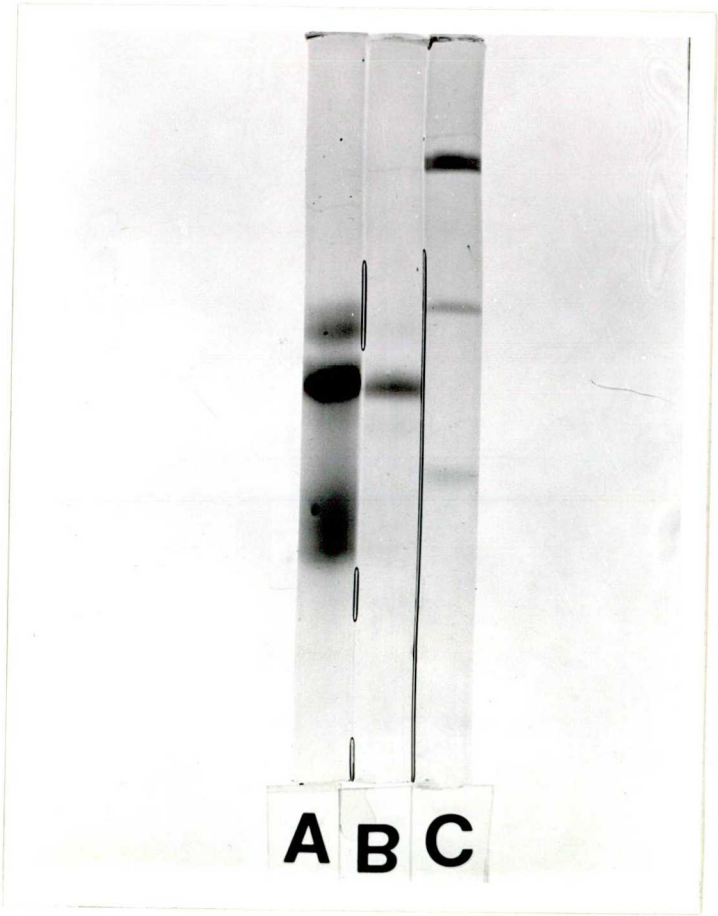
5120 E enzimet /0,8 mg fehérje/ vittünk fel 1x11 cm foszfocellulóz oszlopra, mostuk 3 oszloptérfogat TMEM pufferral, eluáltuk 200 ml 0-0,3 M KCl tartalmu TMEM pufferral. Frakciótérfogat 2,5 ml volt. 0,45 µl frakcióban lévő enzim által 6 perc alatt képzett ^{32}P ATP mennyisége adja a frakciók aktivitását, az E_{280} érték a frakciók fehérje-tartalmával arányos. A Cl^- koncentrációt $AgNO_3$ oldattal végzett titrálással határoztuk meg Mohr szerint. A viszintes nyillal jelölt, összöntött 8 frakcióban 2020 E enzim , és 0,11 mg fehérje van, a kitermelés 40 %-os, a tisztitás 2,8-szeres.

80-100-szoros tisztitást értünk el, 40 % körüli kitermeléssel.

A foszfocellulóz rekromatográfia az ionerősség lineáris emelésével elért nagyobb felbontás miatt az enzim további tisztulásához vezet. Az 1. ábra mutatja, hogy a nem enzim fehérjék eluciója már 0,1 M Cl^- koncentrációnál megkezdődik. Az oszlophoz kötődött fehérjék nagy része lejön az oszlopról, egy kis enzimaktivitás kiséretében. Az enzimaktivitás zöme éles csucsban eluálható az oszlopról, egy kevés fehérjével. Egyszer reaktivált - használat után 1 M KCl tartalmu TMEM pufferral mosott, majd ekvilibrált - foszfocellulóz használata előnyös, mert a teljtesen friss cellulóz-foszfát az enzim egy részét nagyon erősen köti, és bár az enzimaktvitás csucsának helye ekkor is 0,16-0,21 M Cl^- koncentráció közé esik, a kitermelés igen alacsony.

2. Az enzim preparátum tisztasága és stabilitása

Az enzim preparátum tisztaságát a fehérjeszerkezetet felbontó és a fehérjéket denaturáló körülmények között végzett elektroforézissel vizsgáltuk. A foszfocellulóz rekromatográfia után nyert preparátum összes fehérjé-



2. ábra: Az enzim preparátumok SDS-poliakrilamid gél-elektroforézise

Az elektroforézis körülményeit az Anyagok és módszerek c. fejezet 5. pontjában irtuk le.
A: foszfocellulóz I. minta, 16 µg protein,
B: foszfocellulóz II. minta, 10 µg protein,
C: *E. coli* RNS-polimeráz, 5 µg protein

inek több, mint 50 %-a egyetlen csikban található. Mivel a 2. ábra A és B géljeinek összehasonlitásából láthatjuk, hogy az utolsó tisztitási lépésben ez a fehérje dusul fel,

ezt gondoljuk az enzimnek. A szennyező fehérjék néhány halvány csikot adnak.

Elmondhatjuk tehát, hogy a tirozin:tRNS ligázt több, mint 50 %-os tisztaságban sikerült kinyerni. Ez, figyelembe véve az ATP:PP_i kicserélődés alapján mért 1600--szoros tisztulást, azt jelenti, hogy patkány májból csak a fenilalanin aktiváló enzimet tudták eddig megközelitőleg ilyen tisztaságban előállitani. Tscherne és munkatársai számoltak be a fenilalanin:tRNS ligáz 1500--szoros tisztitásáról és arról, hogy szerintük az enzim 50 %-osnál tisztább /55/.

A leucin:tRNS ligázt 350-szeresre tisztitották, más aminosav aktiváló enzimet nem tudtak kimutatni a preparátumból, de fehérjeszintézis elongációs faktorokat találtak nagy mennyiségben /83/.

A treonin aktiváló enzimet 400-szorosra /29/, a szerin:tRNS ligázt 600-szorosra /84/ tisztitották, de százalékos tisztaságot még nem tudtak megadni.

Deutscher, aki glutaminsav aktiváló enzimet tisztitotta 150-szeresre, maga is elismerte, hogy preparátuma a glutaminsavval azonos mértékben aktiválja a lizint is és más szennyező fehérjéket is tartalmaz /82/.

A tisztitás nehézségeire magyarázatul szolgálhatnak Bandyopadhyay és Deutscher eredményei /81/. Ők vizsgál-

ták a legrészletesebben azt, hogy patkány májban - de valószinüleg más emlősök más szerveiben is - az aminosav aktiváló enzimek és a fehérjeszintézis faktorai egyetlen, izolálható, óriási komplexet alkotnak. Ennek a komplexnek lipid komponense is van, ami az egyes enzimek tisztitását még nehezebbé teszi /85/.

Szükséges volt , hogy megnézzük, vajon a szennyező komponensek zavarják-e az enzim által katalizált reakciókat. A II. táblázat adataiból kitünik, hogy olyan mértékü RN-áz szennyezés, amely a tRNS töltés mérését zavarná, már az első foszfocellulóz kromatográfiát követően sincs a preparátumban. Magas specifikus aktivitásu radioaktiv RNS-t a tRNS töltésben használt enzim 15-30-szoros mennyiségével 60 percig inkubálva nem csökkent a kicsapható radioaktivitás mennyisége.

Elképzelhető, hogy a tirozin tRNS ligázon kivül még más aminosav aktiváló enzim is eluálódott a foszfocellulóz oszlopról. Az első foszfocellulóz kromatográfia utáni preparátum tirozin kivételével az összes aminosavat 2 mM koncentrációban tartalmazó reakcióelegyben a csak tirozin jelenlétében mérthez képest 12 %-os sebességgel katalizálta az ATP:PP_i kicserélődést. A foszfocellulóz rekromatográfia után ez az érték még mindig 10 % fölött volt. Mivel azonban a mérés a tirozin:tRNS ligáz katali-

II. táblázat

Az enzim hatása a TCA-val kicsapható RNS mennyiségére

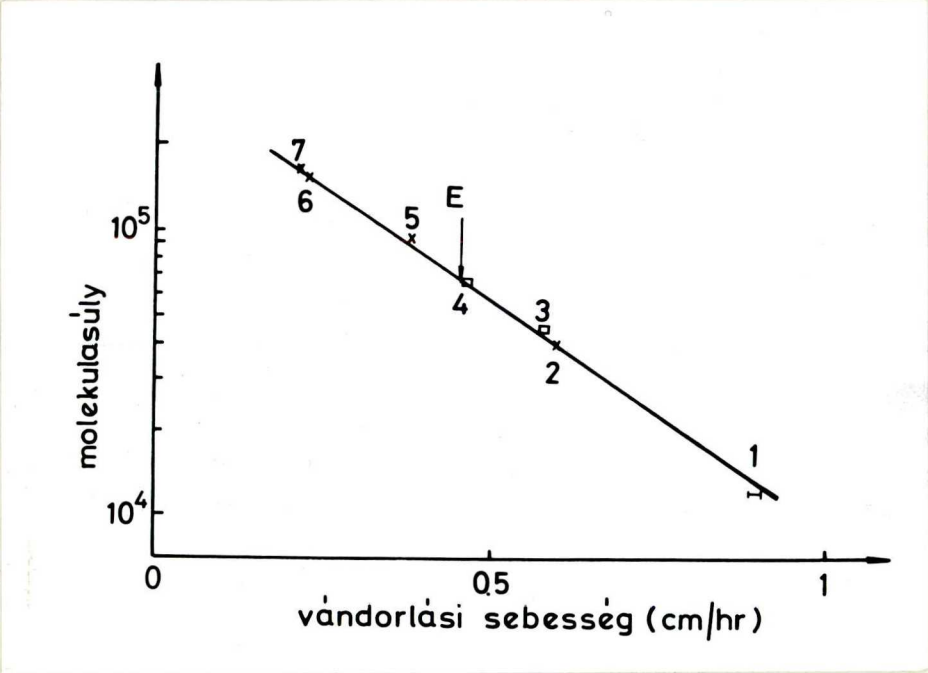
Frakció	Enzim mennyiség µg	RNS csapadék µg
Foszfo-cellulóz I.	0	0,96
	0,625	1,0
	1,25	0,96
Foszfo-cellulóz II.	0	0,96
	0,5	1,11
	1,0	0,96

^{32}P-jelzett rRNS-t /54 000 cpm ug^{-1}/ és változó mennyiségü enzimet inkubáltunk 0,15 ml 0,13 M kálium-kakodilát pH=7,2 pufferban 60 percig 37°C-on. Hozzáadtunk 0,5 mg BSA-t 0,05 ml vizben, és 1 ml 10 %-os TCA oldattal kicsaptuk az RNS-t. A csapadék radioaktivitását szürés és TCA-s mosás után határoztuk meg, a tRNS töltésnél leírtak szerint.

zálta reakció optimális körülményei között történt, a szennyező enzimaktivitás a mértnél valószinüleg magasabb.

Az enzimet 50 % glicerinben -20°C-on tárolva 45 nap után még 0,05 mg/ml fehérjekoncentráció esetén sem volt aktivitás vesztés.

3. Az enzim molekulasulya és alegység szerkezete



3. ábra: Alegység molekulasuly meghatározás SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel

Az elektroforézis körülményeit az Anyagok és módszerek c. fejezet 5. pontja tartalmazza. A 2,5 mm vastag gélre, 3 mm széles mintahelyre a standard fehérjékből csikonként 1 µg-ot, a foszfocellulóz rekromatografált tirozin:tRNS ligázból 2 µg-ot vittünk fel. A fehérjék 14 órán át 25 V feszültség hatására vándoroltak.

Standardok: citokrom c /1/, tyuk tojás albumin /3/, marha szérum albumin /4/, *E. coli* RNS-polimeráz α /2/, β /6/, β'/7/ alegység és ζ faktor /5/. E: tirozin aktiváló enzim.

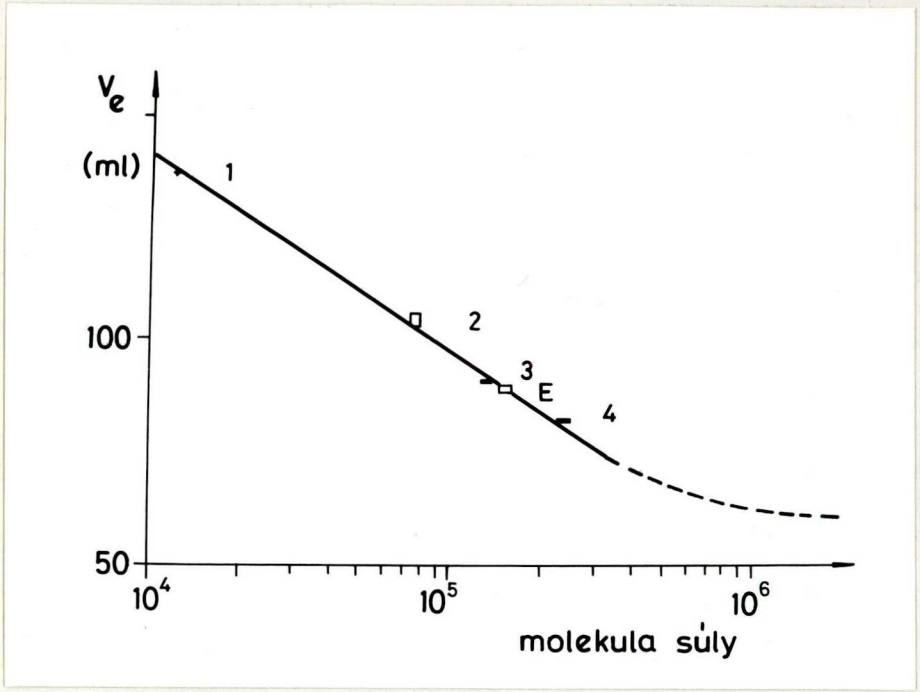
Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist felhasználtuk arra is, hogy megmondjuk az enzim preparátum fő komponensének molekulasulyát. Az SDS ugyanis megszünteti a fehérjék közötti töltés különbségeket és SDS-poliakrilamid gélben az elektromos tér által kiváltott vándorlás sebessége egyenesen arányos a molekulasullyal.

Ismert molekulasulyu fehérjéket futtattunk együtt az enzim preparátumokkal, lemezgélben. Az eredményt a 3. ábra mutatja. Azt kaptuk, hogy az enzim preparátum fő komponense alig nagyobb, mint a marha szérum albumin. Molekulasulya 68 000-nak adódott.

Meg kellett vizsgálni, hogy vajon az enzim aktiv formája milyen molekulasulyu. Ez Sephadex G-200 oszlopon végrehajtott gélszüréssel történt. A gélszürésben, nem denaturáló körülmények között az enzim megörzi aktivitását. A meghatározás alapja, hogy bizonyos határok között lineáris az összefüggés a molekulasuly és az eluciós térfogat között.

3-5°C között 3 alkalommal elvégzett gélszürésben az enzim nagyobbnak adódott, mint a nyul izom tejsav-dehidrogenáz. A harmadik ábra alapján becsült molekulasuly 150 - 160 000.

Természetesen enem zárhatjuk ki a standard fehérjék aggregálódását egymással és az enzimmel, de az ion-



4. ábra: Molekulasuly meghatározás Sephadex G-200 gélszüréssel

1,5 x 92 cm oszlopra 900 E tirozin:tRNS ligázt /800 E/mg/, 15 000 E marha máj katalázt, 20 E nyul izom tejsav-dehidrogenázt, 68 µg *E. coli* alkalikus foszfatázt és 1 mg ló szivizom citokrom c-t vittünk föl 1 ml-ben. Ekvilibrálás és elució 0,1 M KCl tartalmu TMEM pufferral történt. 2 ml-es frakciókat szedtünk.

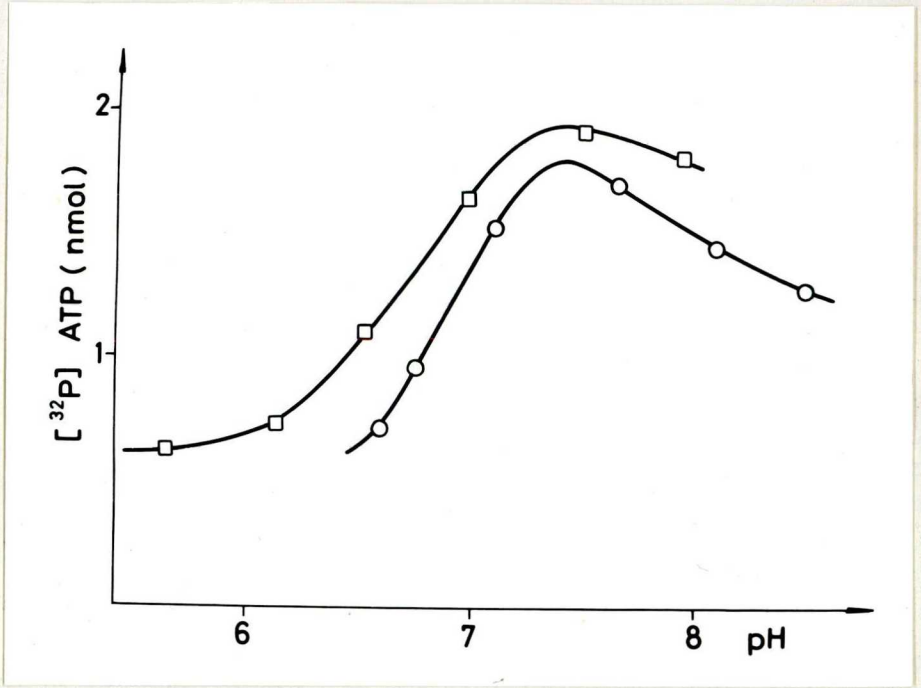
1: citokróm c, 2: alkalikus foszfatáz, 3: tejsav--dehidrogenáz, 4: kataláz, E: tirozin aktiváló enzim.

erősséget ugy választottuk meg, hogy ezt elkerüljük. Elképzelhető az is, hogy az elektroforézisban mutatott kis mennyiségü szennyezések valamelyik kötődik az enzimhez.

Az emlitett megszoritások mellett is jogosnak látszik azt feltételezni, hogy az elektroforézisben kapott 68 000 molekulasulyu polipeptidekből kettő alkotja az aktiv enzimet. Valószinü tehát, hogy az enzim két azonos alegységből áll. Ugyanilyen szerkezetü az *E. coli*, a *Bacillus stearothermophylus* és a sertés pancreas tirozin aktiváló enzim is.

4. Az ATP:PP_i kicserélődési reakció

Az enzim preparátum tRNS nélkül is jól mérhető sebességgel katalizálja a tirozin függő ATP:PP_i kicserélődést. A kicserélődési reakció feltétele, hogy enzim-tirozil-adenilát komplex jöjjön létre, amely dinamikus egyensulyban állandóan kicseréli az AMP komponenst ugy, hogy az a reakcióközeg PP_i molekuláival ATP-t képez, miközben másik molekula ATP hidrolizál AMP-re és pirofoszfátra. A kicserélődési reakció sebessége az enzim-tirozil-adenilát komplex koncentrációjától függ, szubsz-



5. ábra: Az ATP:PP_i kicserélődés pH-függése

A reakcióelegy összetétele a pufferek kivéve azonos az Anyagok és módszerek c. fejezetben leirttal. A K^+ koncentráció mindegyik elegyben 120 mM. Az ordinátán 0,79 E enzim 2 perces aktivitás értékei láthatók.

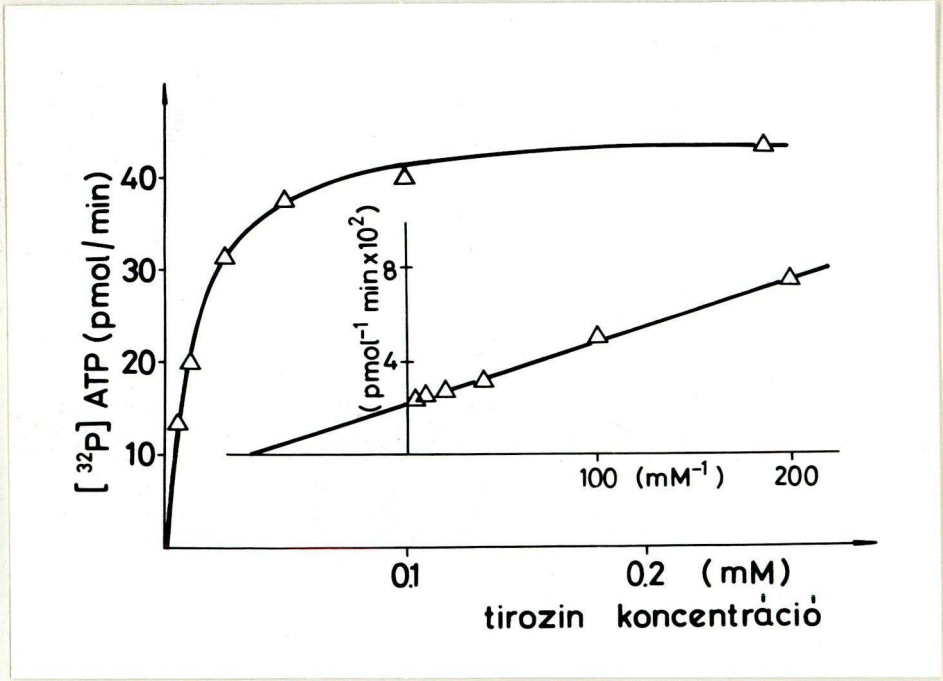
o-o-o-o- tris-HCl, -▫-▫-▫- kálium kakodilát puffer.

trát telitésnél valamennyi enzim molekula komplexet képez, ma mért sebesség az enzim mennyiségével arányos.

Valamennyi kisérletet foszfocellulóz oszlopon kromatografált enzimmel végeztük.

Az 5. ábra mutatja a kicserélődési reakció pH függését. Bár kakodilát pufferban egy kicsit magasabb a reakciósebesség, kisérleteinkben pH=7,65 értékü tris-HCl puffert használtunk, mert annak nagyobb a pufferkapacitása az optimális pH környezetében.

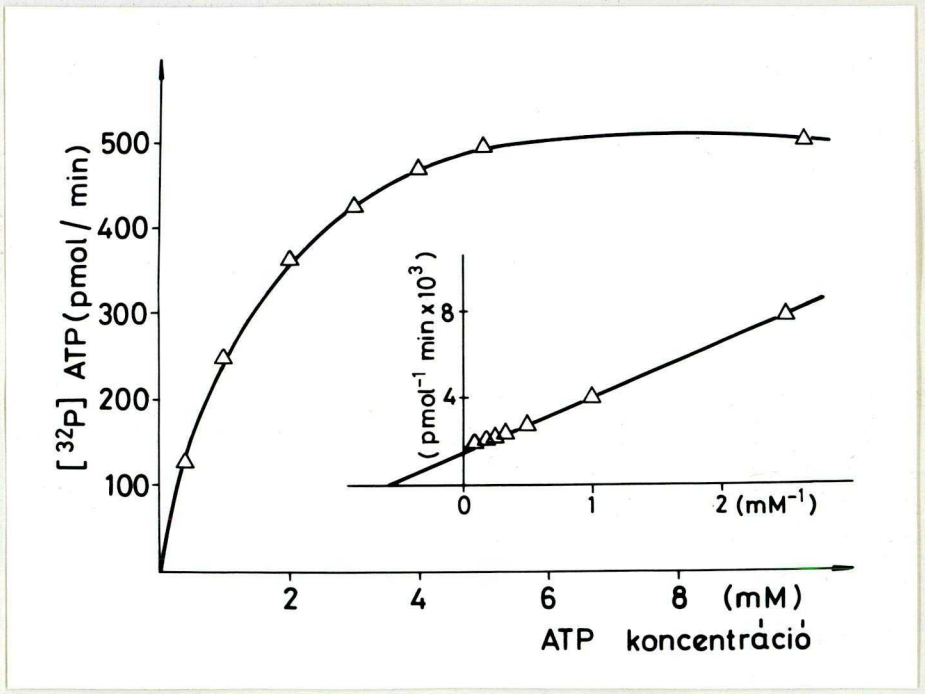
Mint az a 6. ábrából látszik, az enzimaktivitás



6. ábra: A tirozin koncentráció hatása az ATP:PP_i kicserélődésre

A kezdeti sebességeket az Anyagok és módszerek c. fejezetben leirt reakcióelegyben mértük meg, 2,2 mM pirofoszfát koncentrációnál, a tirozin mennyiségét növelve. Az ordinátán 0,05 E enzim aktivitás értékei láthatók.

méréskor alkalmazott 1 mM tirozin koncentráció az enzimet telitő koncentráció többszöröse. A tirozin függés mérését frissen kromatografált enzimmel végeztük, amely nem tartalmazott proteolizisből származó endogén tirozint. A látszólagos Michaelis állandó 0,0125 mM-nak adódott.



7. ábra: Az ATP koncentráció hatása az ATP:PP_i kicserélődésre

A kezdeti sebességeket az Anyagok és módszerek c. fejezetben leirt reakcióelegyben mértük meg, kivéve, hogy 5 mM PP_i és 5,5 mM Mg^{++} koncentrációk mellett változtattuk a hozzáadott 1:1 arányu ATP: Mg oldat mennyiségét. Az ordinátán 0,5 E enzim aktivitás értékei láthatók.

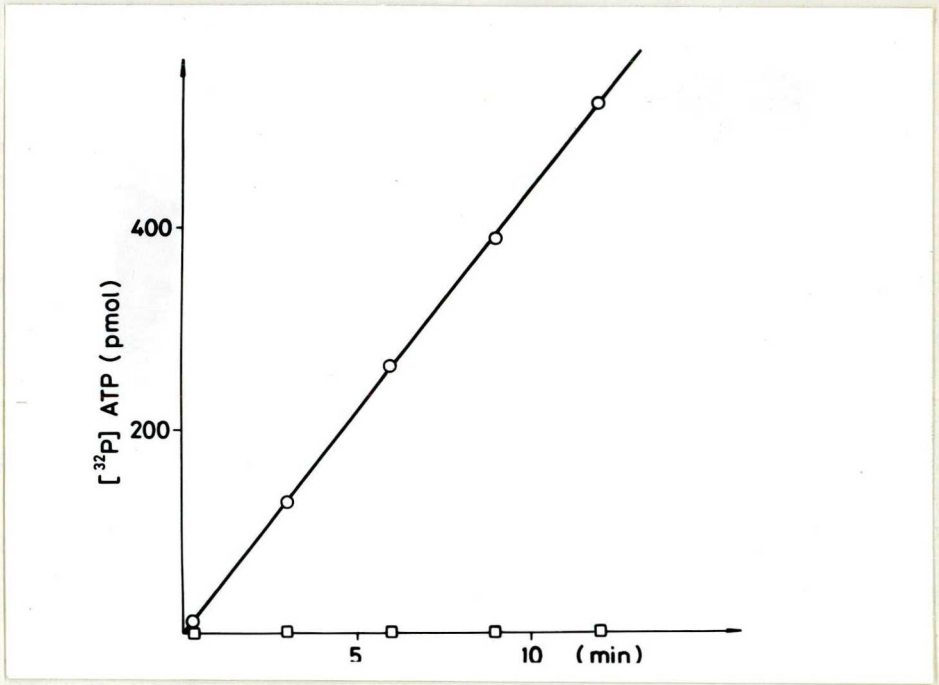
SZEGED

A 7. ábra alapján az enzimaktivitás méréskor alkalmazott 10 mM ATP teliti az enzimet az ATP:PP_i kicserélődésben. A látszólagos Michaelis állandó 1,7 mM.

A Mg^{++} koncentrációt ugy választottuk meg, hogy mindenkor egy kissé /0,5 - 2,5 mM-lal/ felülmulja az ATP és PP_i együttes koncentrációját. Éppen ezért az ATP-függés vizsgálatánál a Mg^{++} koncentrációt együtt növeltük az ATP koncentrációval. Tul magas Mg^{++} koncentráció esetén ugyanis a reakcióelegy pH értékén a PP_i Mg^{++} komplex formájában kicsapódik, és ez csökkenti a mérhető sebességet.

A reakcióelegy többi komponensét vizsgálva a reakció 30-200 mM K^+ koncentrációk közötti széles optimumot mutat. A merkaptoetanol nem növeli a reakciósebességet, de jelenlétében kisebb a mért értékek szórása, különösen a tisztitás első két lépése után.

Az alkalmazott 1 mM tirozin, 10 mM ATP, 2,5-4,5 mM PP_i és 15 mM Mg^{++} koncentrációknál a reakció legalább 12 percig lineáris /8. ábra/. Az enzim tehát ennyi idő alatt a reakcióelegyben nem inaktiválódott. Mivel kicserélődési reakcióban szubsztrát fogyás nincs, a linearitás fennállt 12 percen belül magas enzim koncentráció esetén is addig, amig a bevitt PP_i 10 %-a ki nem cserélődik. Ekkor ugyanis a keletkezett radioaktiv ATP visszaalakulása is számottevő lesz /16/. A 8. ábrán lát-



8. ábra: Az ATP:PP_i kicserélődés időfüggése

A reakcióelegy azonos volt az Anyagok és módszerek c. fejezetben leirttal. Az ábrán 0,0055 µg foszfocellulóz I. enzim aktivitás értékei láthatók, tirozin jelenlétében /o-o-o-/ és tirozin nélkül /-□-□-□/

ható az is, hogy tirozin nélkül nincs kimutatható ATP:PP_i kicserélődés.

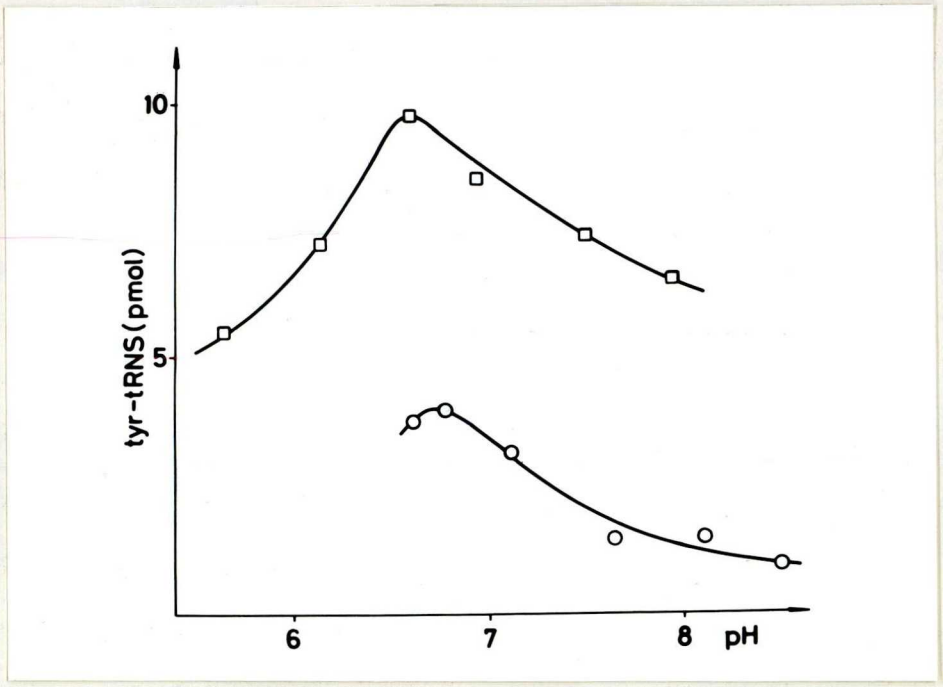
Ha a legjobban tisztitott enzim specifikus aktivitása 18 000 nmol/min/mg, az enzim molekulasulya 150 000 és a preparátumot 100 % tisztaságunak tekintjük, akkor egy molekula enzim egy perc alatt 2700 kicserélődést katalizál. Mivel az enzim nem 100 % tisztaságu, a tény-

leges érték ennál magasabb és mindenképpen felülmulja a sertés pancreas tirozin enzim 1500 értékét /11/, alatta marad viszont a marha pancreas triptofán enzim 10 000 értékének /4/.

5. A tirozil-tRNS szintézise

Miután az enzimet tisztitottuk az egyszerüen kivitelezhető ATP:PP_i kicserélődési reakciót használva a tisztitás követésére, és igazoltuk, hogy zavaró mennyiségü RN-áz szennyezés nincs a preparátumba, megmértük a tRNS töltés optimális körülményeit. A 9. ábra a tRNS töltés pH-függését mutatja. Tris-HCl pufferban, valószinüleg a tris észterkötés hidrolizist katalizáló hatása miatt az értékek sokkal alacsonyabbak, mint kakodilát pufferban. A pH optimum értéke 6,6, szemben az ATP:PP_i kicserélődés pH=7,4 optimum értékével. További kisérleteinket pH=6,6 kakodilát pufferban végeztük.

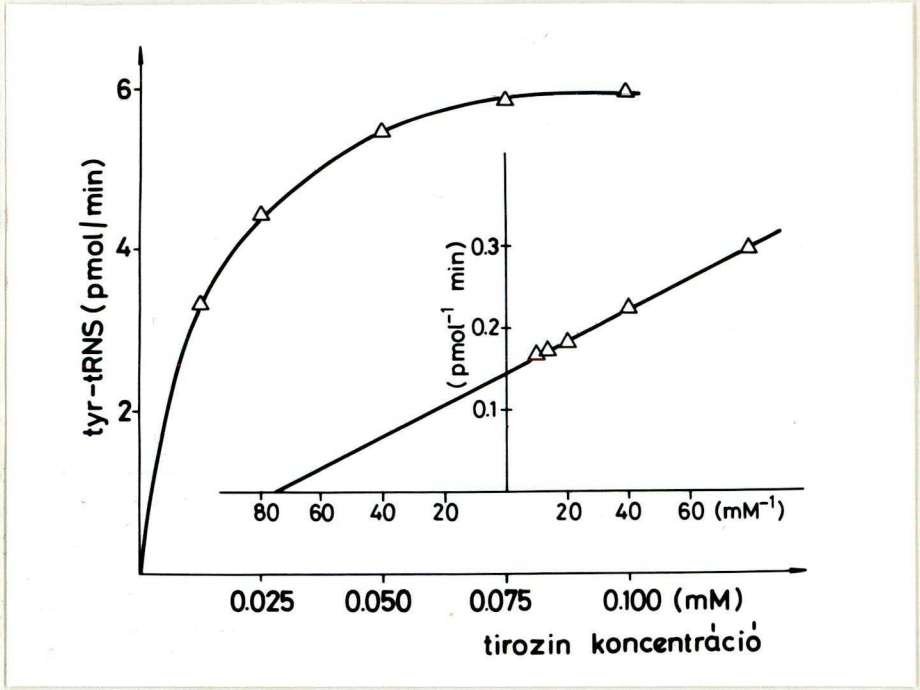
A következő kisérletekben foszfocellulóz oszlopon frissen kromatografált enzimet használtunk. A tirozin koncentráció befolyását a tRNS töltésre a 10. ábra mutatja. A látszólagos Michaelis konstans 0,0132 mM, csaknem azonos a kicserélődési reakcióban mért-tel. Jelentősen különböznek viszont az ATP-re mért



9. ábra: A tirozil-tRNS szintézis pH-függése

A reakcióelegy összetétele a pufferok kivételével azonos az Anyagok és módszerek c. fejezetben leirttal. Az ordinátán 0,14 E enzim 4 perces aktivitás értékei láthatók tris-HCl pufferban /-o-o-o-/ és kálium-kakodilát pufferban /-□-□-□- /.

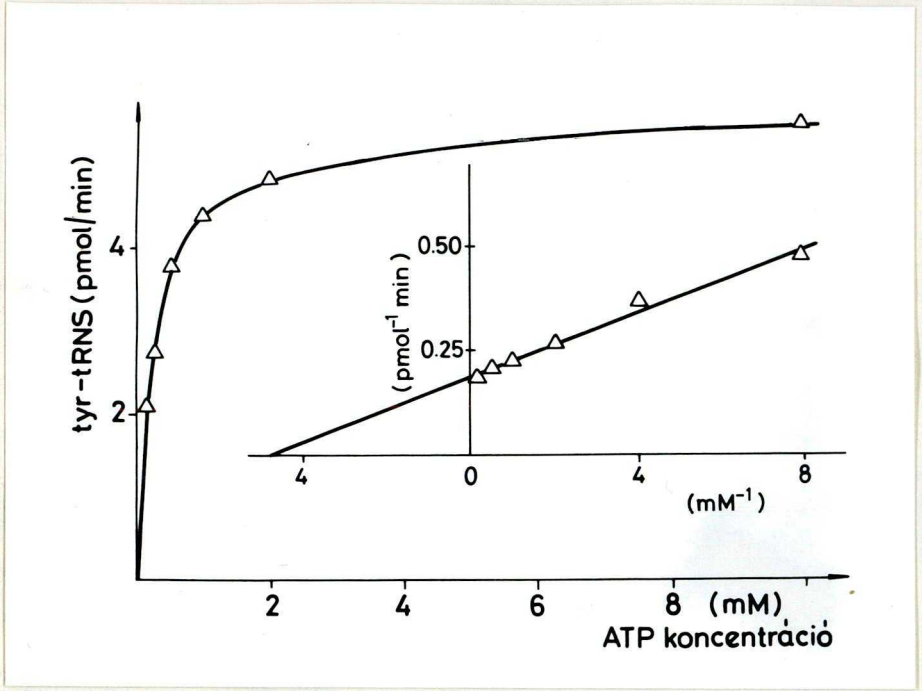
Michaelis konstansok. A 11. ábra adataiból tRNS töltésre 0,208 mM adódik, szemben a kicserélődési reakcióban mért 1,7 mM értékkel.



10. ábra: A tirozin koncentráció hatása a tRNS töltésre

A kezdeti sebességeket az Anyagok és módszerek c. fejezetben leirt reakcióelegyben mértük meg. A PVG/c patkány máj keverék tRNS-sel bevitt $tRNS^{tyr}$ koncentrációja 1,4 µM volt, a ^{14}C tirozin specifikus aktivitása 100 Ci/mol. Az ordinátán 0,3 E enzim aktivitás értékei láthatók.

A tRNS befolyását a tirozil-tRNS szintézis sebességére a 12. ábra mutatja. A látszólagos Michaelis állandó $1{,}36 \times 10^{-7}$ M. Ez az érték jól egyezik más enzimek keverék tRNS-sel kapott Michaelis állandóival. Tiszti-

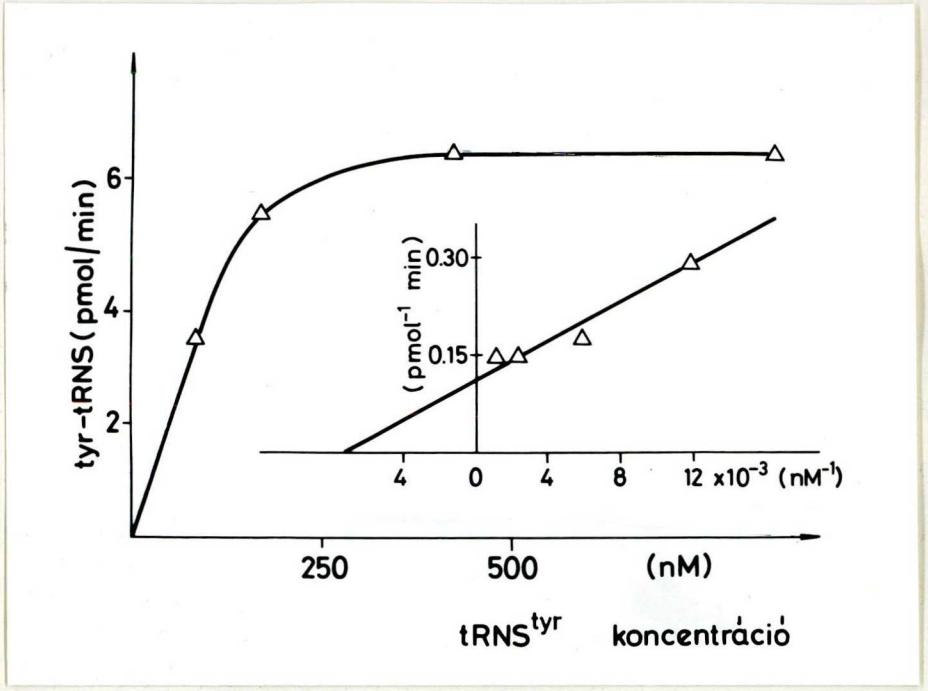


11. ábra: Az ATP koncentráció hatása a tRNS töltésre

A kezdeti sebességeket az Anyagok és módszerek c. fejezetben leirt reakcióelegyben mértük meg. A reakcióelegy 0,1 mM 50 Ci/mol specifikus aktivitásu ^{14}C tirozint és 0,9 µM tirozin akceptor aktivitásu WA patkány máj kuverék tRNS-t tartalmazott. Az ordinátán 0,22 E enzim aktivitás értékei vannak feltüntetve.

tott tRNS-sel végzett kisérletekből adódik ennél alacsonyabb, 10^{-8} M nagyságrendü érték /55/.

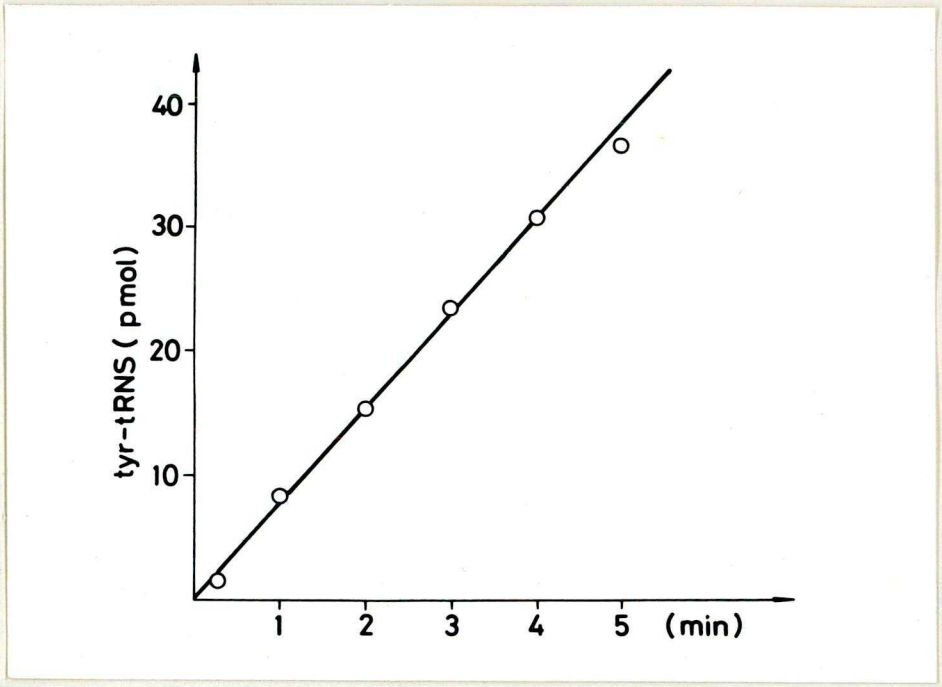
Az enzim által katalizált tRNS töltés sebességét



12. ábra: A tRNS koncentráció hatása a tRNS töltésre

A kezdeti sebességet az Anyagok és módszerek c. fejezetben leirt módon mértük meg. 50 Ci/mol specifikus aktivitásu ^{14}C tirozin koncentrációja 0,1 mM volt. A reakcióelegy PVG/c patkány máj keverék tRNS koncentrációját növeltük. 1 E_{260} tRNS tirozin akceptor aktivitása 8,45 pmol volt. Az ordináta 0,38 E enzim aktivitás értékeit tünteti fel.

10 mM ATP, 0,2 mM tirozin és 0,83 µM $tRNS^{tyr}$ koncentrációknál mértük. A reakció 5 percig lineáris volt /13. ábra/. Mivel ez alatt az idő alatt az enzim a tRNS 40 %-át észteresitette, arra kell gondolnunk, hogy a linearitásnak elsősorban a $tRNS^{tyr}$ alacsony koncentrációja szab határt.



13. ábra: A tirozil-tRNS szintézis időfüggése

A reakcióelegyben 0,2 mM tirozin /10 Ci mol^{-1}/, 10 mM ATP és 830 nM tirozin akceptor aktivitású WA patkány máj keverék tRNS volt jelen. A többi komponens koncentrációi megegyeztek az Anyagok és módszerek c. fejezetben leirttakkal. Az ábrán 0,35 E enzim aktivitása látható.

0,35 E enzim által katalizált tRNS töltés sebessége 7,6 pmol/min. Ez a kicserélődési reakció sebességének 2,17 %-a. Általában több enzimpreparátum átlagosan 2 %-os sebességgel katalizálja a tRNS töltést az ATP:PP_i kicserélődéshez képest. Ez enzim molekulánként percenként 54 molekula tRNS észteresitésének felel meg.

6. A reakció mechanizmusra vonatkozó következtetések

Bár más szerzők az ATP:PP_i kicserélődés és a tRNS töltés optimális körülményeinek összehasonlitásából gyakran következtetnek a reakció mechanizmusára /36, 37/, szerintünk a következtetés nem indokolt. Ilyen tipusu kisérletek eredményei ugyanis rendszerint összhangba hozhatók a bevezetőben ismertetett két lehetséges reakcióut bármelyikével. A mi kisérleteinket tekintve az, hogy a kicserélődési reakció és a tRNS töltés pH optimumai különböznek egymástól, és a kicserélődési reakció 50-szer gyorsabb, összhangban lehet azzal, hogy a tirozil-adenilát-enzim komplex intermedierje a tRNS töltésnek, de azzal is, hogy tRNS jelenlétében a tRNS kötődik elsőként az enzimhez és az aminosav aktiválásnak nem intermedierje a tirozil-adenilát-enzim komplex.

Nem lényegtelen, hogy mig a tirozinra mért látszólagos Michaelis állandók megegyeznek az ATP:PP_i kicserélődésben és a tRNS töltésben, az ATP K_M értékek különböznek. Véleményünk szerint az 1,7 mM és 0,21 mM közötti különbség nem magyarázható csupán a két reakcióelegy pH értékének eltérésével. Elképzelhető, hogy a töltött vagy töltetlen tRNS kötődése az enzimhez megváltoztatja annak katalitikus tulajdonságait.

A tRNS hatása az ATP:PP_i kicserélődés sebességére viszont többet elárul. Ha a tirozil-adenilát-enzim komplex egy részét a tRNS töltés elvonja, az ATP:PP_i kicserélődés sebessége csökken, de a csökkenés nem lehet nagyobb, mint a tRNS töltés maximális sebessége, azaz esetünkben 2 %. Mig ha a tRNS az első szubsztrát és az ATP:PP_i kicserélődést az enzim-tirozil-adenilát--tRNS komplex végzi, valamint a szubsztrátok kötődése a sebességlimitáló, akkor az ATP:PP_i kicserélődés nem lehet lényegesen gyorsabb a tRNS töltésnél.

A III. táblázat adataiból látható, hogy az enzimet telitő, 1 x 10^{-6} M koncentrációju $tRNS^{tyr}$ a kicserélődési reakció sebességének néhány %-os csökkenését okozta, az 5 % és 2 % közötti különbség a módszer hibájának tudható be. Ez az eredmény a második lehetőség ellen szól, és az első reakcióutat valószinüsiti. Indirekt bizonyiték tehát arra, hogy a tRNS töltésnek intermedierje a tirozil-adenilát-enzim komplex.

III. táblázat

A tRNS koncentráció hatása az ATP:PP_i kicserélődés sebességére

tRNS koncentráció M	ATP:PP_i kicserélődés sebessége pmol/min	%
0	42	100
1×10^{-8}	42	100
1×10^{-7}	42	100
1×10^{-6}	40	95

A kezdeti sebességeket az Anyagok és módszerek c. fejezetben leírt módon mértük meg. A táblázat WA patkány máj frakcionálatlan tRNS tirozin akceptor aktivitását és 0,042 E enzim aktivitás értékeit adja meg.

IV. Összefoglalás

Patkány máj citoplazmatikus tirozin:tRNS ligázt tisztitottunk ultracentrifugálást és dializist követő DEAE-cellulóz kromatográfiával és ismételt foszfocellulóz kromatográfiával. Bár az enzim nem homogén, az ATP:PP_i kicserélődés alapján mért több, mint 1000-szeres tisztulás, RN-áz mentesség és a tárolás körülményei közötti stabilitás lehetővé tették az enzim néhány kinetikai jellemzőjének meghatározását.

Az ATP:PP_i kicserélődés pH optimuma 7,4, a tRNS töltésé 6,6. A látszólagos Michaelis állandók a többi szubsztrát telitési koncentrációinál tirozinra 0,0125 mM és ATP-re 1,7 mM az ATP:PP_i kicserélődésben, mig tRNS töltésben tirozinra 0,0132 mM, ATP-re 0,208 mM és $tRNS^{tyr}$--re $1,36 \times 10^{-7}$ M.

Sephadex G-200 gélszürésből az enzim molekulasulya 150-160 000-nek adódott, SDS-poliakrilamid gélelektroforézis alapján az enzim két 68 000 molekulasulyu alegységből áll.

Egyetlen enzim molekula becslés szerint 54 molekula tRNS-t tölt 1 perc alatt, az ATP:PP_i kicserélődés 50-szer gyorsabb. A hozzáadott tRNS az ATP:PP_i kicserélődést

nem lassitja lényegesen, ami összhangban van azzal, hogy a tirozil-adenilát-enzim komplex a tRNS töltés intermedierje és a tRNS töltés sebesség-limitáló lépése a komplex kialakulását követő lépések valamelyike.

V. Irodalom

1. M.B. Hoagland, P.C. Zamecnik és M.L. Stephenson
Biochim. Biophys. Acta 24 /1957/215.

2. K. Ogata, H. Nohara és T. Morita
Biochim. Biophys. Acta 26 /1957/ 656.

3. J. Preiss, P. Berg, E.J. Ofengand, F.H. Bergman és M. Dieckmann
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 45 /1959/ 319.

4. G. Lemaire, M. Dorizzi, G. Spotorno és B. Labouesse
Bull. Soc. Chim. Biol. 51 /1969/ 495.

5. O. Favorova, L. Kochkina, M. Sajgo, A. Parin, S. Khilko, V. Prasolov éssL. Kisselev
Mol. Biol. 8 /1974/ 729.

6. R. Calendar és P. Berg
Biochemistry 5 /1966/ 1681.

7. G.L.E. Koch
Biochemistry 13 /1974/ 2307.

8. H. Beikirch, F. von der Haar és F. Cramer
Eur. J. Biochem. 26 /1972/ 182.

9. H.G. Faulhammer és F. Cramer
Eur. J. Biochem. 75 /1977/ 561.

10. Z. Kucan és R.W. Chambers
J. Biochem. 73 /1973/ 811.

11. J.M. Clark és J.P. Eyzaguirre
J. Biol. Chem. 237 /1962/ 3698.

12. S. Chousterman és F. Chapeville
Eur. J. Biochem. 35 /1973/ 51.

13. E.A. Eigner és R.B. Loftfield
Methods in Enzymology XXIX /1974/ szerk. L. Grosmann és K. Moldave 601.

14. M.B. Hoagland
Biochim. Biophys. Acta 16 /1955/ 288.

15. P. Berg
J. Biol. Chem. 222 /1956/ 1025.

16. R.B. Loftfield
Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 12 /1972/ szerk. J.N. Davidson és W.E. Cohn 87.

17. L.L. Kisselev és O.O. Favorova
Advances in Enzymology 40 /1974/ szerk. A. Meister 141.

18. D.V. Santi és V.A. Pena
FEBS Letters 13 /1971/ 157.

19. G. Myers, H.U. Blank és D. Söll.
J. Biol. Chem. 246 /1971/ 4955.

20. V.V. Zinovjev, L.L. Kisselev, D.G. Knorre, L.L. Kochkina, E.G. Malygin és O.O. Favorova
Biokhimiya 37 /1972/ 443.

21. P. Rouget és F. Chapeville
Eur. J. Biochem. 4 /1968/ 305.

22. C.C. Allende, H. Chaimovich, M. Catica és J.E. Allende
J. Biol. Chem. 245 /1970/ 93.

23. A.V. Parin, E.P. Savelyev és L.L. Kisselev
FEBS Letters 9 /1970/ 163.

24. D.V. Santi, P.V. Danenberg és P. Satterly
Biochemistry 10 /1971/ 4804.

25. J.A. De Moss, S.M. Genuth és G.D. Novelli
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 42 /1956/ 325.

26. P. Castelfranco, K. Moldave és A. Meister
J.Am. Chem. Soc. 80 /1958/ 2335.

27. A.T. Norris és P. Berg
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52 /1964/ 330.

28. S.A. Berry és M. Grunberg-Manago
Biochem. Biophys. Res. Comm. 39 /1970/ 691.

29. C.C. Allende, J.E. Allende, M. Gatica, J. Celis, G. Mora és M. Matamala
J. Biol. Chem. 241 /1966/ 2245.

30. S. Mitra, és C. Smith
Biochim. Biophys. Acta 190 /1969/ 222.

31. S. Mitra és A.H. Mehler
J. Biol. Chem. 242 /1967/ 5490.

32. R. Parfait és H. Grosjean
Eur. J. Biochem. 30 /1972/ 242.

33. W.R. Folk
Biochemistry 10 /1971/ 1728.

34. J. LaPointe és D. Söll
J. Biol. Chem. 247 /1972/ 4966.

35. M.P. Deutscher
J. Biol. Chem. 242 /1967/ 1132.

36. K. Igarashi, K. Matsuzaki és Y. Takeda
Biochim. Biophys. Acta 254 /1971/ 91.

37. Y. Takeda, T. Onishi és Y. Ogiso
J. Biochem. 80 /1976/ 471.

38. T.N.E. Lövgren, J. Heinonen és R.B. Loftfield
J. Biol. Chem. 250 /1975/ 3854.

39. D. Cassio
Eur. J. Biochem. 4 /1968/ 222.

40. S.A. Berry és M. Grunberg-Manago
Biochim. Biophys. Acta 217 /1970/ 83.

41. T.S. Papas és A.H. Mehler
J. Biol. Chem. 243 /1968/ 3767.

42. K.B. Jacobson
J.Cell Comp. Physiol. 74 /suppl./ /1969/ 99.

43. J.-J.P. Kim, K. Chakraburtty és A.H. Mehler
J. Biol. Chem. 252 /1977/ 2698.

44. R. Thiebe
FEBS Letters 79 /1977/ 212.

45. J.-J. P. Kim. M. Lui, K. Chakreburtty és A.H. Mehler
Fed. Proc. 35 /1976/ 1735.

46. D. Kern és J. LaPointe
10th Int. Congr. Biochem., Hamburg
/1976/ Abstract Book, 105.

47. A.R. Fersht és R. Jakes
Biochemistry 14 /1975/ 3350.

48. E.W. Eldred és P.R. Schimmel
Biochemistry 11 /1972/ 17.

49. D. Söll és P.R. Schimmel
The Enzymes /szerk. P.D. Boyer/ 3. kiadás
/1974/ X. kötet 489.

50. J.M. Lazar és J.M. Clark Jr.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 77 /1977/ 1384.

51. C. Gros, G. Lemaire, R. van Rapenbusch és B. Labouesse
J. Biol. Chem. 247 /1972/ 2931.

52. K.M. Muench, M. Lipscomb, G.V. Kuehl és N.S. Penneys
9th Int. Congr. Biochem., Stockholm
/1973/ Abstract Book 3h 12, 160.

53. M.A. LeMeur, P. Gerlinger, J. Clavert és J.P.Ebel
Biochimie 54 /1972/ 1391.

54. J. Schmidt, R. Wang, S. Stanfield és B. Reid
Biochemistry 10 /1971/ 3264.

55. J.S. Tscherne, K.W. Lanks, P.D. Salim, D. Grunberger, C.R. Cantor és I.B. Weinstein
J. Biol. Chem. 248 /1973/ 4052.

56. M.R. Kula
FEBS Letters 35 /1973/ 299.

57. R.M.Waterson és W.H.Königsberg
Proc. Nat.Acad. Sci. U.S. 71 /1974/ 376.

58. A.R. Fersht
Biochemistry 14 /1975/ 5.

59. G.L.E. Koch, Y. Boulanger és B.S. Hartley
Nature 249 /1974/ 316.

60. H.R. Bosshard, G.L.E. Koch és B.S. Hartley
Eur. J. Biochem. 53 /1975/ 493.

61.K. Krajewska-Grynkiewicz, V. Buonocore és S. Schlesinger
Biochim. Biophys. Acta 312 /1973/ 518.

62. A.R. Fersht, R.S. Mulvey és G.L. E. Koch
Biochemistry 14 /1975/ 13.

63. R. Jakes és A.R. Fersht
Biochemistry 14 /1975/ 3344.

64. A. Pingoud, D. Boehme, D. Riesner, R. Kownatzki és G. Maass
Eur. J. Biochem. 56 /1975/ 617.

65. M. J. Irwin, J. Nyborg, B.R. Reid és D.M. Blow
J. Mol. Biol. 105 /1976/ 577.

66. E.G. Malygin, V.V. Zinoviev, F.Fasiolo, L.L. Kisselev, L.L. Kochkina és V.Z. Akhverdyan Mol. Biol. Rep. 2 /1976/ 445.

67. V.Z. Akhverdyan, L.L. Kisselev, D.G. Knorre, O.I. Lavrik és G.A. Nevinsky J. Mol. Biol. 113 /1977/ 475.

68. R.B. Loftfield és E.A. Eigner Biochim. Biophys. Acta 130 /1966/ 426.

69. H. Eibl és W.E. M. Lands Anal. Biochem. 30 /1969/ 51.

70. I. Dusha és G. Dénes Anal. Biochem. 81 /1977/ 247.

71. J. Tomasz Anal. Biochem. 68 /1975/ 226.

72. A.L. Shapiro, E. Vinuela és J.V. Maizel, Jr. Biochem. Biophys. Res.Comm. 28 /1967/ 815.

73. R. Burgess és A.A. Travers Procedures In Nucleic Acid Res. 11 /1971/ szerk. G.L. Cantoni és D.R. Davies, 851.

74. P. Andrews Biochem. J. 96 /1965/ 595.

75. B. Chance és A.C. Maehly Methods in Enzymology II /1955/ szerk: S.P. Colowick és N.O. Kaplan 764.

76. A. Kornberg Methods in Enzymology I /1955/ szerk. S.P. Colowick és N.O. Kaplan, 441.

77. A. Torriani
Procedures in Nucleic Acid Res. I. /1966/ szerk. G.L. Cantoni és D.R. Davies 224.

78. A. Garen és C. Levinthal
Biochim. Biophys. Acta 38 /1960/ 470.

79. H. Rogg, W. Wehrli és M. Staehelin
Biochim. Biophys. Acta 195 /1969/ 13.

80. O.H. Lowry, M.J. Rosenbrough, A.L. Farr és R.J. Randall
J. Biol. Chem. 193 /1951/ 265.

81. A.K. Bandyopadhyay és M.P. Deutscher
J. Mol. Biol. 60 /1971/ 113.

82. M. P. Deutscher
J. Biol. Chem. 242 /1967/ 1123.

83. M. Smulson, C.S. Lin és J.G. Chirikjian
Arch. Biochem. Biophys. 167 /1975/ 458.

84. M. Rouge
Biochim. Biophys. Acta 171 /1969/ 342.

85. J. Moon, B. Redfield, S. Millard, J. Vane és H. Weissbach
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70 /1973/ 3282.

SZOTE