

Diss. B 896

NÖVÉNYI ANTRANILSAV-HIDROXILÁLÓ RENDSZER
VIZSGÁLATA

Doktori értekezés

Benyújtja: Dr. I-né, Simon Mária

Készült: a JATE Biokémiai és Genetikai Csoportjánál

Szeged,

1972.

3838



Diss. **B 896**



TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	1
IRODALMI ISMERTETÉS	3
1. Az oxidációs folyamatokban szereplő enzimek rövid áttekintése	3
2. A hidroxilálás típusai	5
3. Aromás hidroxilázok	10
4. A hidroxilálás mechanizmusa	19
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
KISÉRLETI EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS MEGBESZÉLÉSE	32
ÖSSZEFOGLALÁS	46
IRODALOM	48

BEVEZETÉS

A hidroxilázok fontos szerepet töltenek be az anyagcserében. Mind a katabolizmus, mind pedig az anabolizmus során keletkeznek hidroxilált intermedierek. Hosszú ideig csak a citokrom-oxidázt tekintették olyan enzimnek, amely a levegő oxigénjével képes reagálni, napjainkban azonban már enzimek egész sora vált ismertté, amelyek lehetővé teszik az oxigén aktiválását és annak egyik vagy mindkét atomjának szubsztrátba való beépülését. A növényi anyagcserében a hidroxilált termékek, hidroxil-aromás vegyületek nagyon lényegesek, mert ezek az aromás intermedierek anyagcserének egy-egy láncszemét képezhetik, vagy az alkaloid-szintézis intermedierei.

Ugyanakkor a fenolvegyületek sokoldalú szerepet töltenek be a növények betegségeivel szembeni ellenállóképeségének kialakulásában, a herbicidek hatásmódjában. Számos esetben a fenolvegyületek jelenlétével magyarázható a növények bizonyos betegségeivel szembeni rezisztenciája. Pl. parazita szervezetek jelenlétében megváltozik a növény fenol metabolizmusa.

Ismerve a növényi hidroxilázok és a hidroxilált intermedierek sokoldalú szerepét, kísérleteink céljára

ul a növényi aromás hidroxilázok tulajdonságainak vizsgálatát tüztük ki. Először megvizsgáltuk különböző növényi részek hidroxiláló képességét, majd részletesebben az antranilsav in vitro anyagcseréjét tanulmányoztuk babnövényből készült homogenizátumokkal. A hidroxilálás során keletkezett termékeket minőségi és mennyiségi analízisnek vetettük alá. A hidroxilázok hatásmechanizmusának tisztázására gátló és aktiváló anyagokat alkalmaztunk.

Elvégeztük az enzim ammoniumsulfáttal való frakcionálását és Sephadex G 150 gélen a tisztítását, vagy komponenseire bontását.

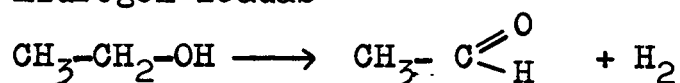
IRODALMI ISMERTETÉS

A biológiai oxidáció folyamatát három különböző úton lehet felírni /1/:

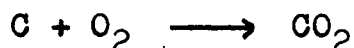
a/ elektron leadás



b/ hidrogén leadás



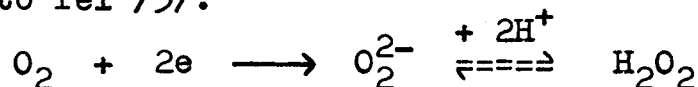
c/ oxigén addíció



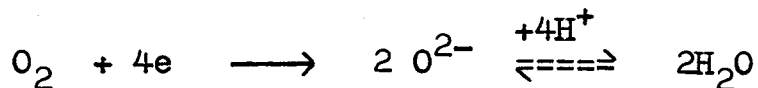
Ezekben a folyamatokban részt vevő enzimek szintén három csoportba sorolhatók /2/:

1. dehidrogenázok,
2. oxidázok,
3. oxigenázok.

Az első csoport enzimei nem lépnek közvetlenül reakcióba az oxigénnel, hanem más hidrogénhordozókon keresztül működnek, amelynek utolsó tagja lehet az oxigén. A második csoportba sorolható enzimekre jellemző, hogy a molekuláris oxigént közvetlenül használják, mint elektronakceptort. Reakciómechanizmusuk a következőképpen írható fel /3/:



vagy



Ezekben a reakciókban a szubsztrát hidrogént veszít, amit az oxigén mint akceptor vesz fel és így vízzé vagy H_2O_2 -vé redukálódik.

Az oxigenázok közös jellemzője, hogy oxigént építnek be a szubsztrátba. Két alcsoportjukat különböztetjük meg aszerint, hogy a molekuláris oxigén egyik, vagy mindkét atomját beépítik-e a szubsztrátba. Így vannak:

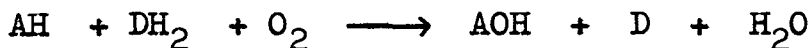
monooxigenázok,

dioxigenázok.

Számos szerző ezt a felosztást követi /Hayaishi 1969, Altman 1972/, de ugyanakkor Karlson könyvében külön önálló csoportként említi az oxigenázokat /dioxigenázok/ és hidroxilázokat /monooxigenázok, kevert funkciójú oxigenázok/. Az oxigenázok által katalizált reakciók az alábbi általános egyenlettel jellemezhetők:



A hidroxilázoké viszont:

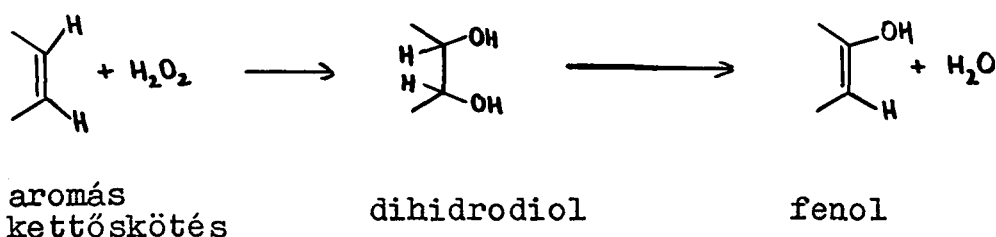


ahol A és AH szubsztrát-molekulát jelent, a DH_2 pedig hidrogén-donort. Hidroxilázok tehát a levegő oxigénjének egyik atomját építik be a szubsztrátba, míg a másik

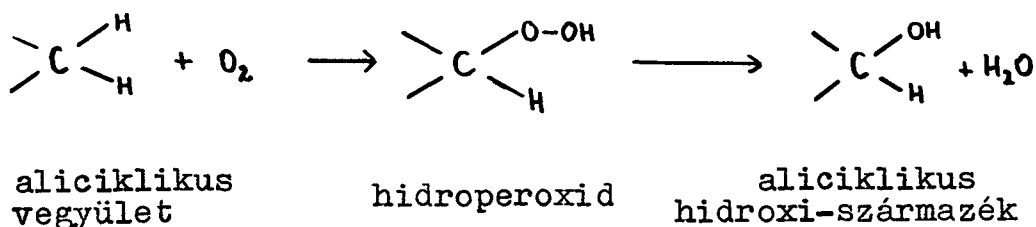
vizé redukálódik. Működésükhöz redukált koenzimre van szükség, ami $\text{NADH} + \text{H}^+$, $\text{NADPH} + \text{H}^+$ vagy pterin-származék lehet. Főleg mikroszómákban található enzimek, nehezen tisztíthatók és nagyon labilisak.

A hidroxilálás többféle mechanizmus szerint mehet végbe. Hunt és munkatársai /4/ a következő lehetőségekről tesznek említést munkájukban az oxigénforrás különbözősége alapján

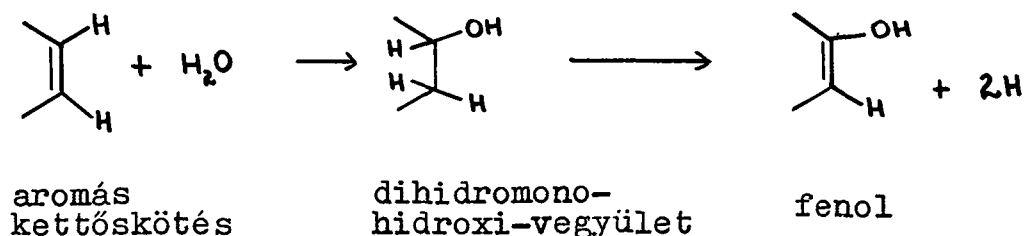
1. Az oxigén hidrogénperoxidból származik:



2. Molekuláris oxigén felhasználása esetén:



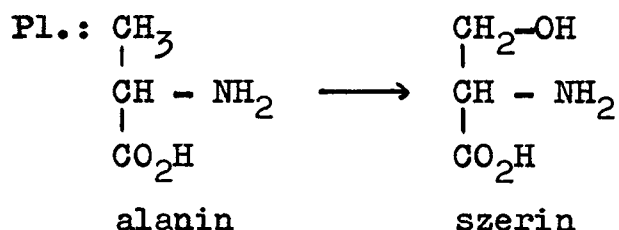
3. Viz az oxigénforrás:



Ez utóbbi esetben egy hidratálás és azt követő dehidrogénezés történik, mint a β -oxidációnál.

A hidroxilálás különböző típusait a hidroxilált anyag természete szerint is csoportosíthatjuk. Ezekre a következő példákat adjuk meg:

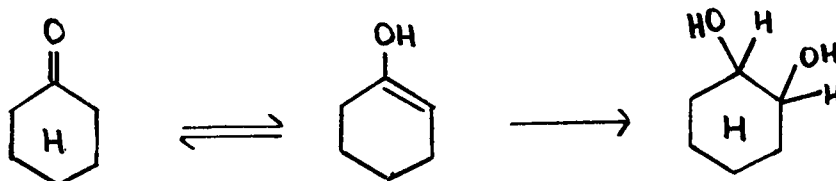
1. Alifás vegyületek hidroxilálása



Ferroaszorbáttal történő hidroxilálás esetén tapasztalták a fenti átalakulást /5,6/. Frommer és Volker /7/ májmikroszómák alifás hidroxiláló képességét vizsgálva megállapította, hogy az alifás szénhidrogének a megfelelő alkohollá alakultak és hogy a hidroxilálás mind a primér, mind pedig a szekundér szénatomon megtörtént, de előnyben részesült a szekundér ill. terciér szénatomon történő hidroxilálás.

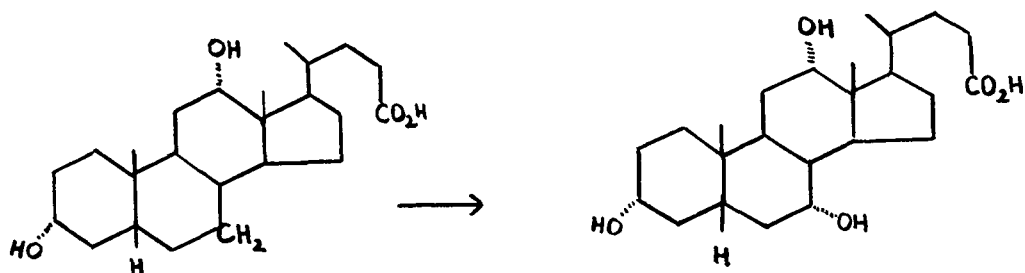
Hasonló átalakulások figyelhetők meg a zsírsavak ω -oxidációjánál is.

2. Oxo-enol tautomér hidroxilálása



Ez a reakció szintén víz-addíció. Itt az öszt-radiol \longrightarrow ösztriol átalakulást említhetjük meg példaként, bár ebben az esetben egy ciklopentanon \longrightarrow ciklopentándiol átalakulás megy végbe. Ez részben emlős állatok májában, részben pedig a placentában történik.

3. Aliciklusos vegyületek hidroxilálása
pl.

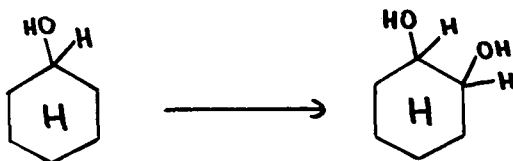


dezoxikolsav
/3 α ,12 α -dihidroxi-
kolánsav/

kolsav
/3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-
kolánsav/

Ferroaszorbátos modellrendszerben irták le ezt az átalakulást, de májban is lejátszódik, sőt ismertek a sugárhatásra bekövetkező C₇-es hidroxilálások is /8/.

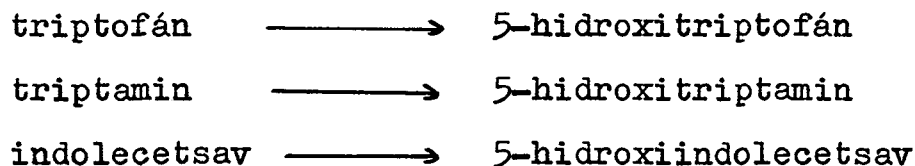
4. Telített ciklikus alkoholok diollá történő átalakulása



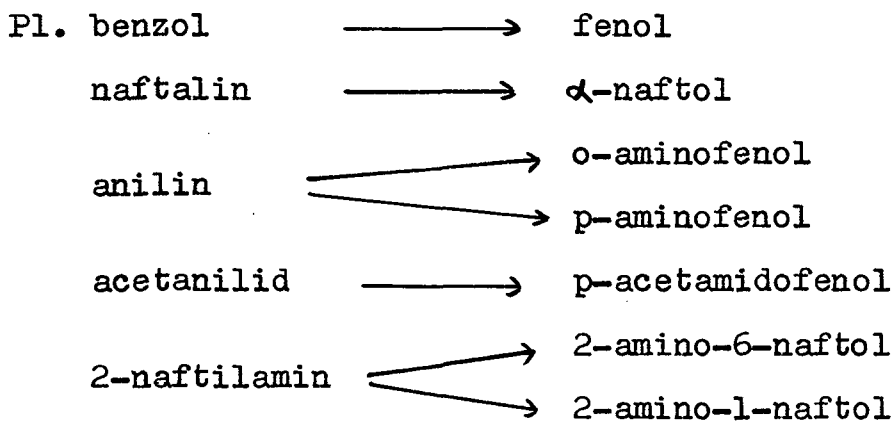
Ilyen típusú átalakulások az epesav-anyagcserében szerepelnek.

5. Aromás vegyületek hidroxilálása

Állati szövetekben, főleg az agyban jól ismert a triptofán-hidroxiláz, az alábbi reakciókat katalizálja /9/

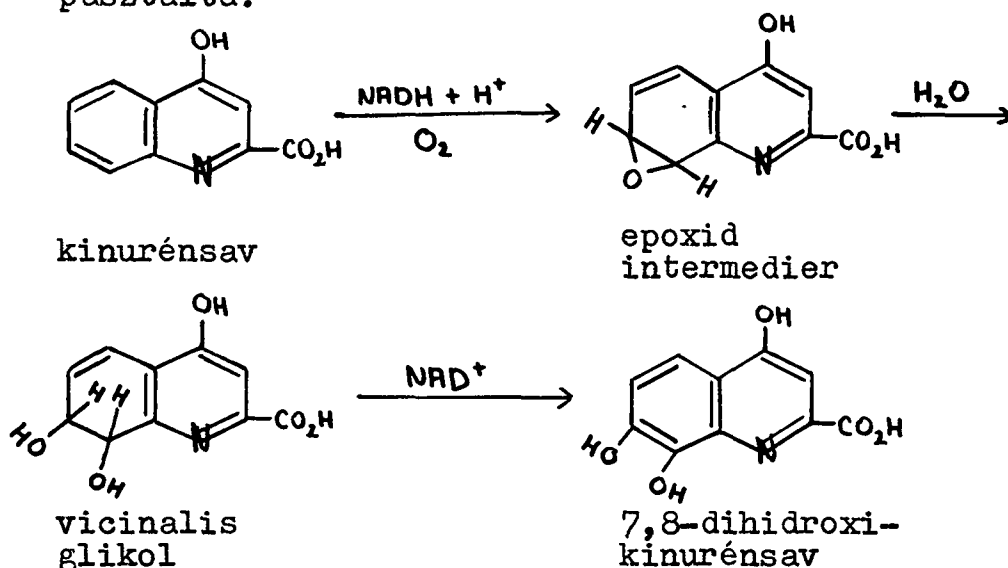


Booth /10/ vizsgálatai arra mutatnak rá, hogy májmikroszómákból izolálható enzimrendszer többféle aromás szubsztrát hidroxilálására képes.



6. Fenolok hidroxilálása

Dagley /11/ Aerococcusokkal vizsgálta a kinurénsav lebomlását és a következő átalakulást tapasztalta:



Ujabban sokat foglalkoznak a bőr karcinogén policiklusos aromások epoxid-képződésével és továbbalakulásával /12/, valamint a szkvalén-epoxid szterán bioszintézisben játszott szerepével /13/.

Az eddigiekből látható, hogy a hidroxilálás mechanizmusa és csoportosítása többféle lehet, és hogy a hidroxilázok közül az intermedier anyagcserében szereplő hidroxilázok nagy csoportot képviselnek. Éppen ezért részletesebben csak az aromás hidroxilázokkal foglalkozunk a továbbiakban. A következőkben főleg ezekről teszünk említést, nem törekedhetve más vonalon, de itt sem a teljességre.

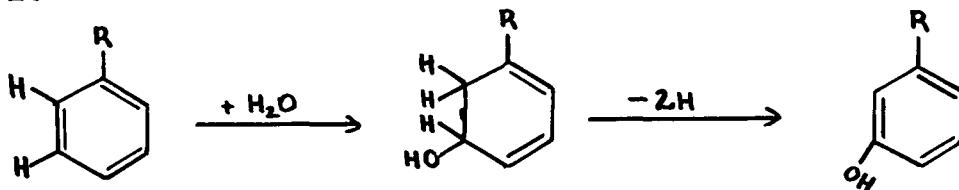
Elsősorban az állati szövetek aromás hidroxilázaival foglalkoztak, részben nagyobb fontosságuk /pl. máj és mellékvese hidroxilázai/, részben pedig jobban és könnyebben elvégezhető tisztíthatóságuk miatt.

Mitoma /14/ és munkatársai máj aromás hidroxiláló képességét vizsgálva arra a megállapításra jutottak, hogy a keletkezett hidroxiaromás vegyületek nem specifikus hidroxilálás eredményei, sőt még azt is megkockáztatják, hogy az egész átalakulás nem enzimátikus, mert pl. a difenil \rightarrow O-hidroxi-difenillé illetve p-hidroxidifenillé történő átalakulása bekövetkezik peroxid és vas vagy aszkorbinsav, vas és oxigén jelenlétében is.

Udenfriend és Brodie /15/ már 1954-ben tanulmányozta az aromás hidroxilálást modellrendszerekben. Kísérleteikkel igazolták, hogy az aromás hidroxilálás szövetek jelenléte nélkül is végbemegy, ha oxigén és aszkorbinsav van jelen. Rámutattak arra is, hogy az aszkorbinsavat a modellrendszerekben helyettesítheti olyan vegyület is, amely endiol-átalakulásra képes vagy diketo-szerkezettel rendelkezik, pl. ninhidrin, dihidromaleinsav, alloxán stb.

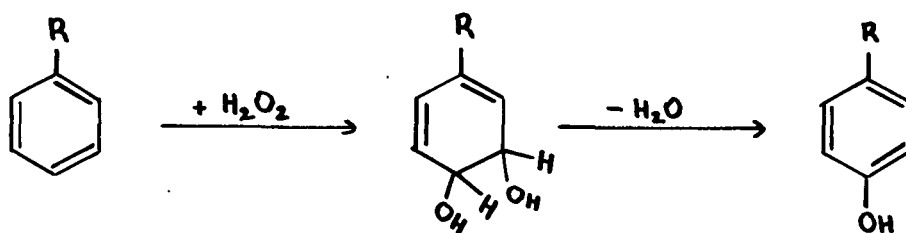
In vivo hidroxitermékek keletkezésére vonatkozóan az alábbi utakat tétéleztek fel:

1.



Tehát itt a reakció mechanizmusa: víz-addíció a kettőskötésre és azt követően az aromás struktúra visszaalakulása dehidrogénezéssel.

2. Hidrogénperoxiddal dihidrodiol keletkezik, majd ezt vízvesztés követi



3. Közvetlen szubsztitúció a hidrogén és a hidroxilcsoport között.

Az aszkorbinsav, oxigén és vas katalizálta hidroxilálások in vivo csak olyan növényekben játszódhatnak le, amelyekben magas az aszkorbinsav koncentrációja.

Hunt és Hughes /4/ *Pseudomonas fluorescens*-nél vizsgálták a nikotinsav hidroxilálását jelzett $^{18}\text{O}_2$ oxigént használva. Megállapították, hogy a nikotinsav \longrightarrow 6-hidroxi-nikotinsav átalakulásban a levegő

O₂-je nem vesz részt, nem épül be a szubsztrátba, hanem a vízmolekula oxigénje az oxigénforrás.

Tanaka és munkatársai /16/ viszont dohánynövényben tanulmányozták a nikotinsav metabolizmusát és azt tapasztalták, hogy a keletkezett 6-hidroxinikotinsav glükózileződik és így raktározódik a növényben. Nikotinsav hiányában a fenti származék újból mobilizálódik és belép az anyagcserébe.

Wilcox és Moreland /17/ fenoxi-alifás savak hidroxilálását vizsgálva kimutatta, hogy míg a mikroorganizmusokban a lebontás során o-hidroxi-származék keletkezik, addig a búzagyökerekkel végzett inkubálási során p-helyzetű hidroxilálódás következett be.

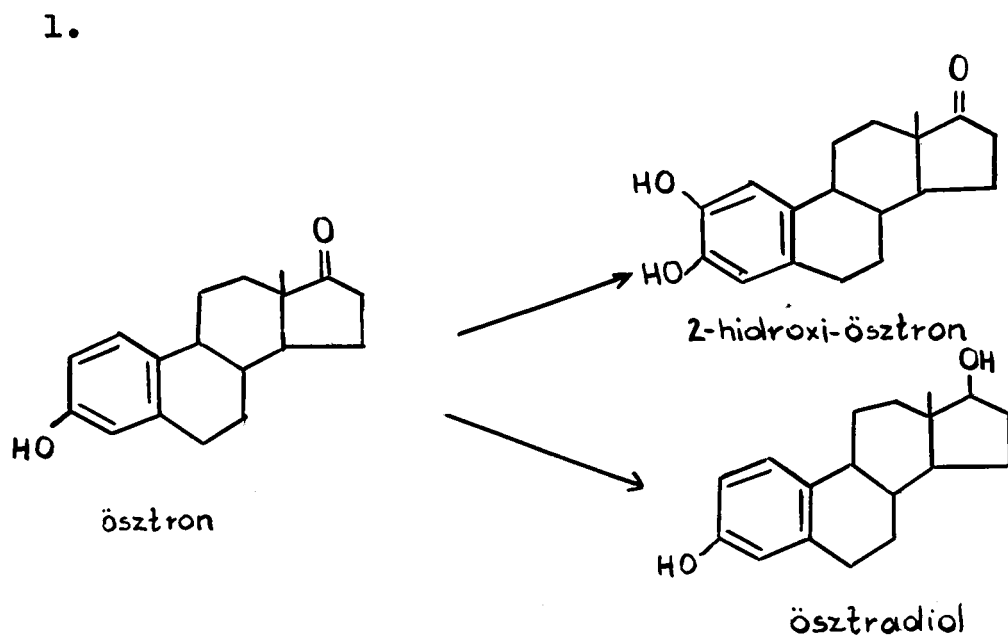
Irodalomból jól ismert, hogy a peroxidázok, melyek széles körben elterjedtek a növényvilágban, - mint nem specifikus hidroxilázok - részt vesznek hidroxí-származékok keletkezésében. /Az említettek az állati szövetek peroxidázaira is vonatkoznak./

Johnson és Cunnigham /18/ adatai felhívják a figyelmet arra, hogy fokozódik a növényekben a peroxidázaktivitás patogénekkal történő fertőzéskor, sőt különböző betegségekkel szemben rezisztens növényekben is eltérő a peroxidázaktivitás. Rozsdagomba-fertőzéskor fokozódik a peroxidázaktivitás a növényi részben, aminek magyarázatát abban látják, hogy ennek hatására,

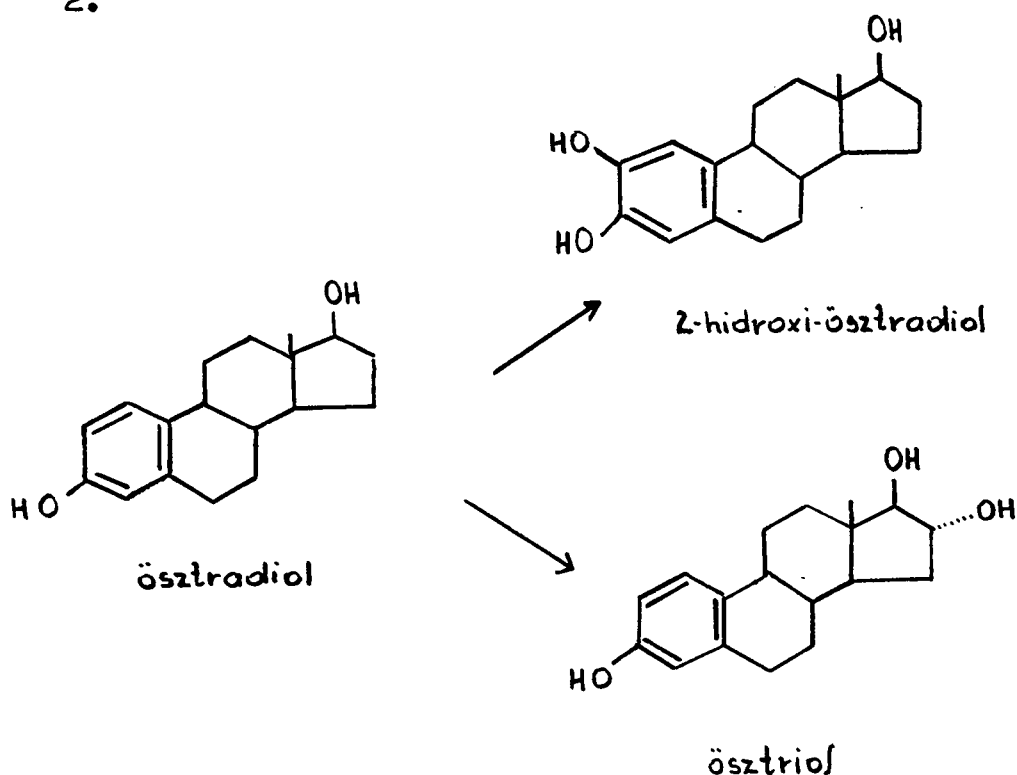
vagy a fokozott peroxidázaktivitás következtében keletkezett fenolok hatására lecsökken a gombamicellák szaporodása.

Ugyancsak érdekes adatokat szolgáltatnak Prochazka /19/ közleményei is. Burgonyaszeletekkel, gombákkal és kalluszon végezte kísérleteit és arra a következtetésre jutott, hogy nemcsak az állati szövetekben történik szteroid hidroxilálás, hanem a növényekben is. Dehidroepiandroszteron 3β -hidroxilálását írta le a fent említett kísérleti objektumokban.

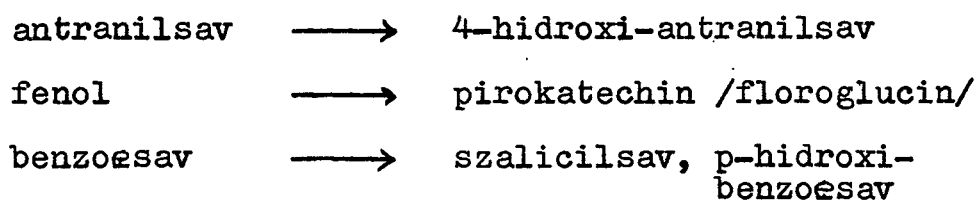
Matkovics és Rajki /20/ torma peroxidáz, xantin-oxidáz, lipoxidáz, aszkorbinsav- és fenoloxidáz, valamint kataláz ösztrogénekre gyakorolt hidroxiláló hatását vizsgálta. Leghatásosabb nem specifikus hidroxiláló enzimnek a peroxidázt, valamint a fenoloxidázt találták. Az említett oxidázok nem specifikus hatásként az alábbi átalakulásokat katalizálták:



2.



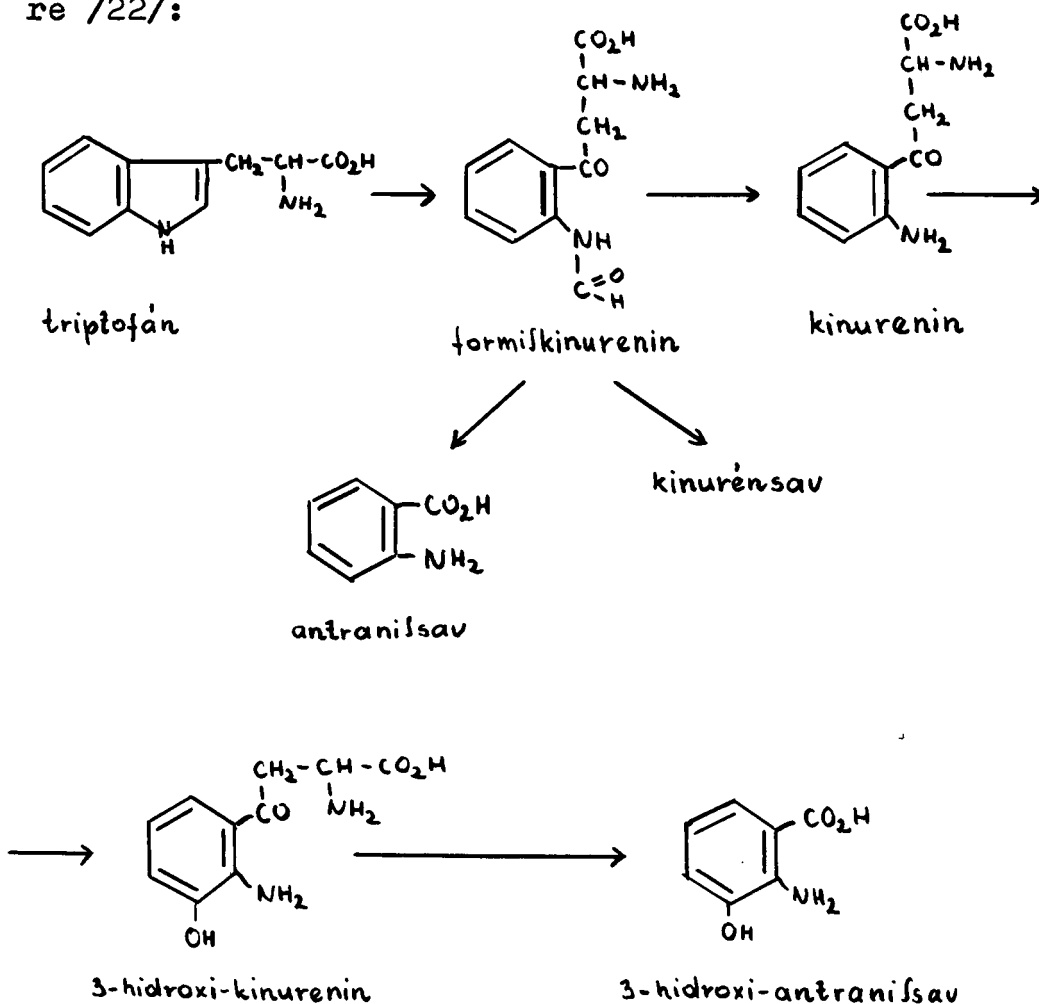
Korábban in vitro vizsgálatokat folytattunk az őszi árpa és dinnyenövények aromás hidroxiláló sajátságainak tanulmányozására /21/. Kísérleti eredményeink az alábbi átalakulásokat támasztották alá:

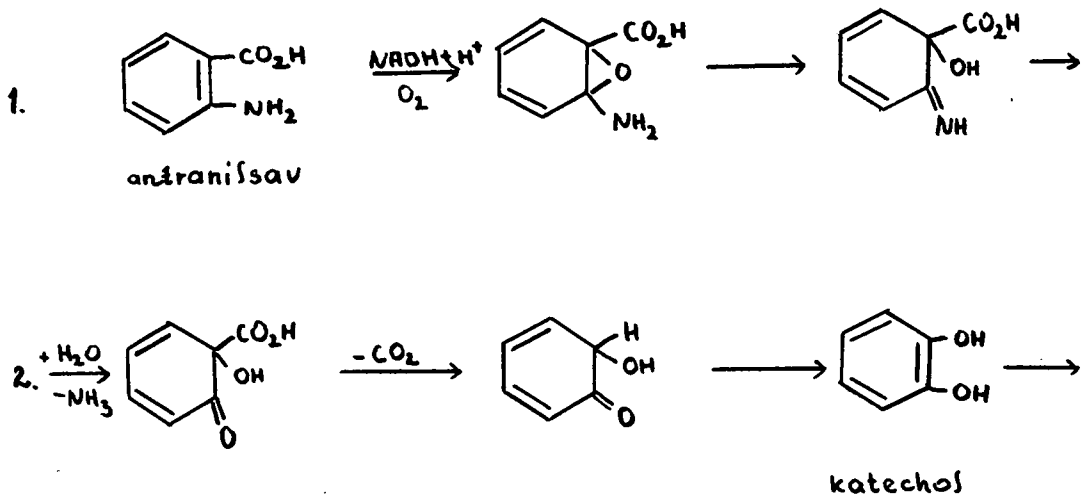


A növényi szövetek sokoldalú hidroxiláló képességének a ténye arra készítetett bennünket, hogy további vizsgálatokat végezzünk. Az antranilsav 4-hidroxi-

antranilsavvá történő átalakulása ezekben a szövetekben azt a gondolatot ébresztette bennünk, hogy talán ebben az esetben egy sajátos enzim-komplexszel állunk szemben, mivel állati és növényi szövetekből addig még csak a 3-hidroxi-antranilsav keletkezését írták le. Ezért részleteiben az antranilsav hidroxilálását tanulmányoztuk.

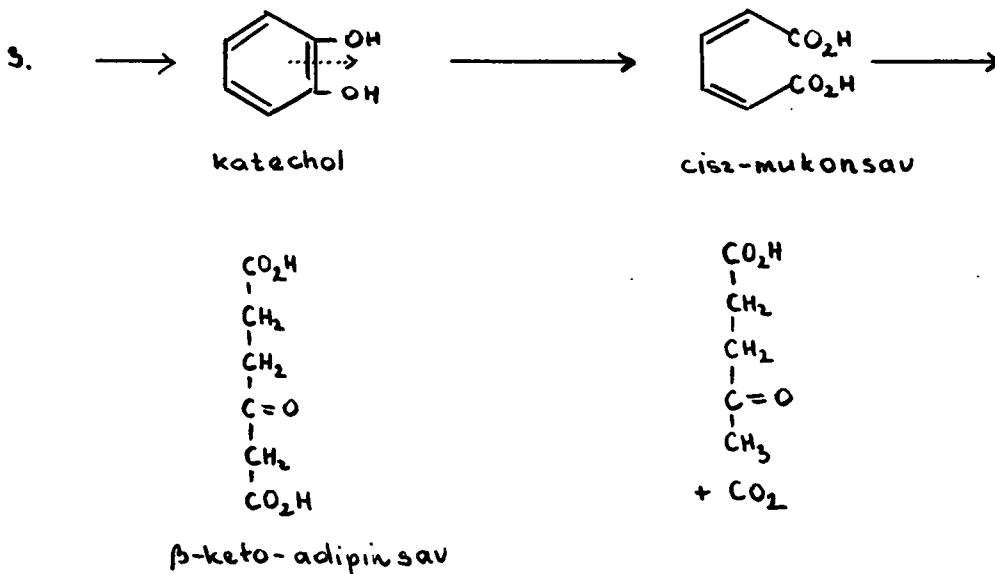
Az antranilsav fontos aminosav-anyagcsere intermedier. Többféle úton keletkezhet az élőszervezetben. Triptofán lebomlása során a következőképpen jön létre /22/:



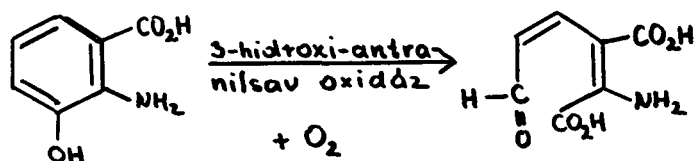


Számos mikroorganizmusból /*Serratia marcescens*,
Escherichia coli, *Salmonella* stb./ Robb és
 Hutchinson /23/ izolálta az antranilsav-szintetázt.
 Ez az enzim a korizmát antranilsavvá történő áta-
 lakulását teszi lehetővé glutamin vagy ammonia,
 mint amino-donor jelenlétében.

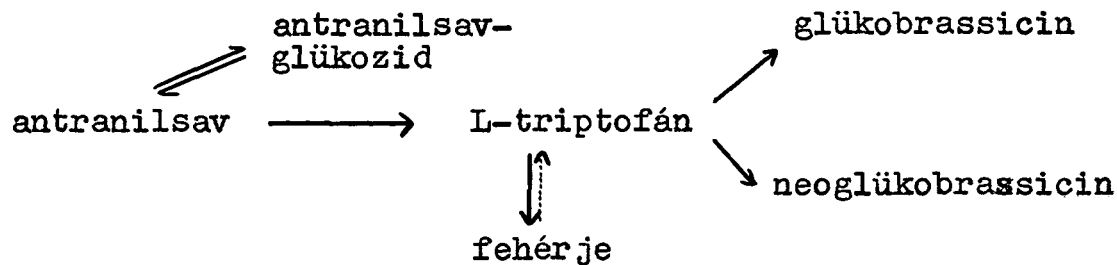
Az antranilsav katabolizmusa a következő séma
 alapján megy végbe *Pseudomonas fluorescens*-nél /24/:



Decker és munkatársai /25/ vese- és májszövetből izolálták azt az enzimet, ami a 3-hidroxi-antranilsav katabolizmusának első lépését végzi az alábbi reakcióegyenlet szerint:



Kutacek és Schraudolf /26/ ^{14}C -vel jelzett antranilsav metabolizmusát a Brassica nemzetségnél a következő táblázatban foglalta össze:



Tehát az antranilsav nemcsak a triptofánnak, hanem a glükobrassicinnek és neobrassicinnek is prekurzora, viszont glükozileződve ki is léphet az anyagcseréből.

3-hidroxi-antranilsav hidroxiláz izolálását mind állati, mind pedig növényi szövetből megkísérelték. Nair és Vaidyanathan /27/ Tecoma stans leve-

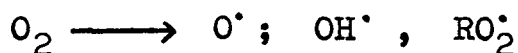
leiből izolálta a fenti enzimet, amelynek a működéséhez Fe^{3+} ionokra, tetrahidrofolsavra és redukált NAD^+ -ra volt szükség. α, α' dipiridillel az enzimgátlás fellépett, de ez Fe^{3+} -al kioltható volt.

Modellrendszerekben is tanulmányozták az antranilsav hidroxilálását /28/ és azt tapasztalták, hogy egyedül a Fenton-Cier rendszer az, ahol az összes monohidroxi származéka keletkezik az antranilsavnak. Összehasonlító anyagnak hidroxi-antranilsavakat mi is a fenti rendszerben állítottuk elő.

Összefoglalva a következőket mondhatjuk: hidroxilált termékek in vivo és in vitro körülmények között keletkezhetnek specifikus és nem specifikus enzimhatásra.

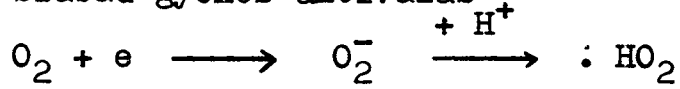
A hidroxiláz enzimek sok esetben fémet tartalmaznak. Redukált koenzimre vagy hidrogén-donorra van szükség az enzimaktivitáshoz, valamint oxigénre, amelynek eredete különböző lehet. Eddigi ismereteink szerint a hidroxilálás útjai a következő /29/ sémák lehetnek:

A. I. oxigénaktiválás



Az aktiválás kétféleképpen történhet:

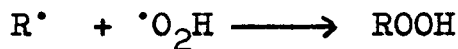
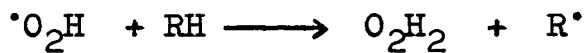
a/ szabad gyökös aktiválás



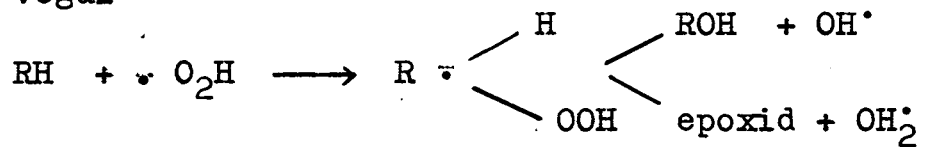
vagy



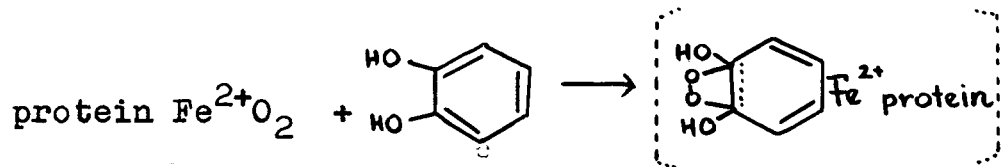
Az aktiválásnak ez az útja feltételezi elektron vagy hidrogén-donor jelenlétét. A keletkezett perhidroxil gyök további átalakulásra képes; láncreakciót indít meg



és végül



b/ oxigén-fémkomplexek keletkezése



majd a gyűrű felhasad és ez mukonsav keletkezéséhez vezet. /Ez a lényege az oxigenázok működésének./

2. A másik lehetőség pedig, hogy oxigénatomok közötti kötés felbontása persavakhoz vezet, vagy persav jellegű vegyülethez, amely epoxidokat vagy N-oxidokat szolgáltatathat. Mason szerint ez az alapja a kevert oxigenázok működésének.

B. Szabad gyökös hidroxilálás

Ez a mechanizmus főleg szabad hidroxilgyökök jelenlétét tételezi fel, amely nem az oxigén aktiválása során keletkezik. Ezeket a gyököket szolgáltatják a víz, H_2O_2 , Fenton-rendszer stb. Ezek az anyagok mikroorganizmusokban többé-kevésbé hasonló módon hidroxilálódnak. Ennek az útnak a létét alátámasztják azok az analógiák is, amelyek a kémiai hidroxilálás és biokémiai rendszerben tanulmányozott in vitro hidroxilálás között fennállnak.

C. Intermedier oxigénezési hipotézis

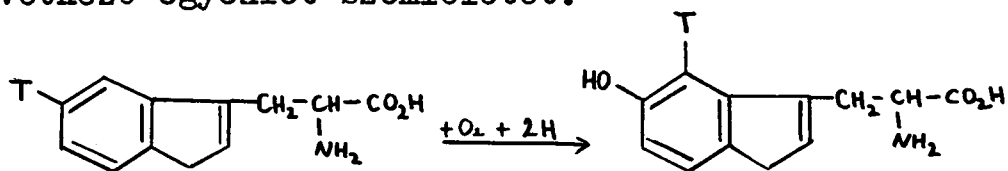
Számos kísérleti tény támasztja alá a molekuláris vagy atomos oxigén szerves molekulákba való közvetlen belépését. Pl. benzoésav hidroxilálódhat a levegő jelenlétében vizes oldatban, ha fémkelát-ionok vannak jelen.

Molds szerint az szteroidok a levegő oxigénjével 11β és 14α helyzetben hidroxilálódhatnak és 9β , 11β ,

és 14 α , 15 α epoxidok keletkeznek.

A hidroxilálás mechanizmusának tárgyalásánál még egy fontos megállapításról kell említést tenni, az un. NIH-shift-ről /Hydroxylation-induced intramolecular migration/. 1955-ben Mason és mtsai közölték, hogy 3,4-dimetilfenol enzimatis oxidációja 4,5-dimetilkatecholhoz vezet. Ez ellentétben áll az aromás szubsztitúció klasszikus koncepciójával, amely szerint közvetlen helyettesítésnek kellene végbemenni. Ebben a közleményben a szerzők megalapozzák az aromás gyűrű szubsztituenseinek hidroxiláláskor bekövetkező intramolekuláris helyváltoztatását, amelyet később számos izotópos vizsgálat is bizonyított és több vonatkozásban is érvényesnek talált.

Guroff, Daly és mtsai /30/ triptofán hidroxiláz hatásmechanizmusának vizsgálatokor is tapasztalták az intramolekuláris átrendeződést, amelyet a következő egyenlet szemléletet:



triptofán

5-hidroxi-triptofán

5. helyzetben a hidrogént tríciummal helyettesítette és ennek az un. triciált triptofánnak a hidroxil-

lálását vizsgálta triptofán-hidroxilázzal és azt tapasztalta, hogy a hidroxilcsoport 5. helyzetbe épült be, míg a trícium 6-os pozícióban volt kimutatható. A későbbiek során még több enzimmél is vizsgálták a "shift" jelenséget és azt is megállapították, hogy ez nemcsak hidrogénre, hanem halogén elemekre is vonatkozik /Cl, F, Br/. Az említett szerzők modellrendszerekre is érvényesnek találták a NIH-shift-et és általánosan megállapították, hogy mind enzimátikus, mind pedig nem enzimátikus átalakulások esetén fennáll /31/.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkben különböző korú /5-20 nap/ bab-növényeket használtunk fel, amelyeket fénytermosztátban, egyenletes fény- és hőviszonyok biztosítása mellett neveltünk fel.

Növények feldolgozása

5-5 g növényi részt /gyökér, szár vagy levél/ kevés kvarchomokkal lefagyasztás után eldörzsöltünk, vagy Potter homogenizátorral elhomogenizáltunk, és az így nyert növényi homogenizátumot 25 ml pH = 7,0 M/15 foszfát pufferben szuszpendáltuk. Ebbe tettük a szubsztrátot /legtöbbször az antranilsavat/ 2 m mol mennyiségben. Ahhoz, hogy a keletkezett származékokat tovább tudjuk analizálni, az ötórás inkubálási idő bizonyult optimálisnak.

Inkubálás után a reakcióelegyhez 5 ml 10 %-os triklórecetsavat adtunk, vagy azonnal elvégeztük az extrakciót.

Extrahálásra 3x10 ml étert használtunk fel. Az éteres extraktumot szárazra pároltuk, majd kromatográfiás vizsgálatnak vetettük alá.

Az inkubálás során keletkezett hidroxiantranilsavak
szétválasztása, kvalitatív és kvantitatív meghatározása

Az egyes származékokat rétegekromatográfiás úton a következő futtató elegyekben /28/ választottuk el:

kloroform : jégecet /95:5/

kloroform : metanol : jégecet /75:20:5/

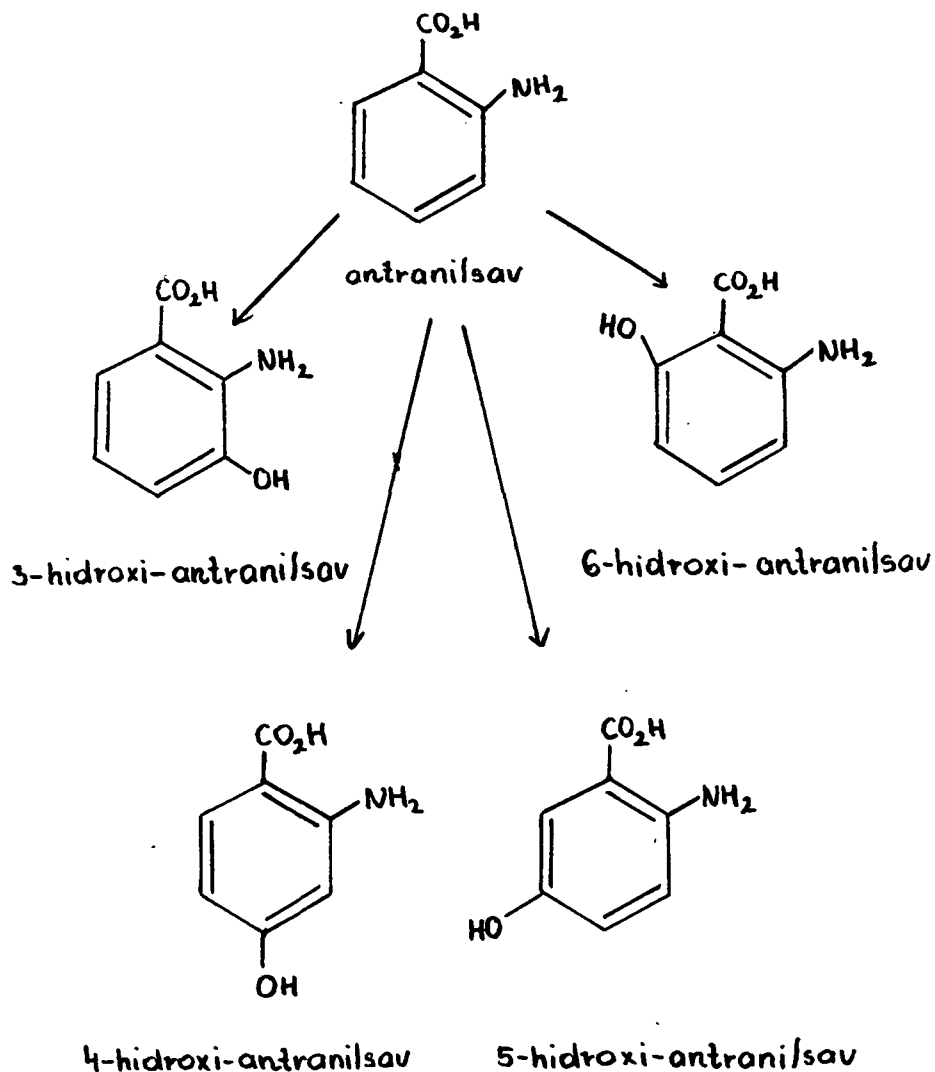
A lapokat Silica gel G /Merck/-ből készítettük 0,25 mm vastagságban. A minták felvitele éteres oldatban történt. Előhívást Van Urk reagenssel végeztük el /32, 33/.

Az inkubálás során keletkezett antranilsav-származékokat Fenton-Cier modellrendszerben előállított hidroxiantranilsavak segítségével azonosítottuk.

A Fenton-Cier rendszer összetétele a következő volt:

FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 m Mol
EDTA-dinátriumsó	1 m Mol
aszkorbinsav	0,5 m Mol
antranilsav	2 m Mol
H ₂ O ₂	2 m Mol

Ezzel a módszerrel - mint már azt korábban is említettük - az összes hidroxiantranilsavak előállíthatók.



Antranilsavból Fenton-Cier modell rendszerben keletkező hidroxi-antranilsavak

Az antranilsav kvantitatív meghatározására és a növényi homogenizátumokban keletkezett hidroxi-antranilsavak mennyiségi visszamérésére az éteres növényi kivonatokat vastagréteg Silica gel lapokon

választottuk el /0,5 mm/, majd UV-abszorpció és fluoreszcencia segítségével bejelöltük azokat a sávokat, ahol ezek a származékok elhelyezkednek és ezeket lekapartuk az üveglapokról. Az extrakciót 10 ml forró vízzel végeztük, majd a Silica gél nyomokat szűrővel eltávolítottuk. A kapott tiszta vizes oldatokból az antranilsavat és a hidroxiszármazékokat Kupfer /34/ módszerével határoztuk meg, amely a szabad aminocsoport-meghatározáson alapszik. A meghatározást a következőképpen végeztük el. 5 ml vizes oldathoz 1 ml p-dimetilaminobenzaldehidet adtunk, majd 20 perces állás után /ami a teljes szinkifejlődéshez volt szükséges/ 420 nm-nél mértük az oldat extinkcióját. A kapott extinkció-értékekből kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg az egyes származékok mennyiségét.

Az antranilsav hidroxilálásában részt vevő enzim hatásmechanizmusának a megközelítésére a következő gátló anyagokat alkalmaztuk:

káliumcianid /Reanal/	10^{-2} M, 10^{-3} M
oxikinolinszulfonsavas kálium /Reanal/	10^{-3} M, 10^{-4} M
rotenon /BDH/	10^{-3} M, 10^{-4} M
SKF-525 /SKFL/	10^{-3} M, 10^{-4} M
p-aminobenzoésav /Reanal/	10^{-4} M

p-oximerkuribenzoát /FLUKA/	10^{-3} M, 10^{-4} M
p-klormerkuribenzoát /FLUKA/	10^{-3} M, 10^{-4} M
hexobarbital /Reanal/	10^{-4} M,
α, α' -dipiridil /Reanal/	10^{-3} M, 10^{-4} M
aminopterin /EGA/	10^{-5} M.

A hidroxilálás előmozdítására viszont az alábbi aktiválókat próbáltuk ki:

aszkorbinsav /Reanal/	10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M
dehidroaszkorbinsav /FLUKA/	10^{-3} M, 10^{-4} M
dihidrofolsav	10^{-3} M, 10^{-4} M
tetrahidrofolsav	10^{-3} M, 10^{-4} M

Az inkubálás minden esetben pH=7,0, M/15 foszfát pufferben történt.

Dihidrofolsav előállítása /35/

20 mg tisztított folsavat 2 ml vízben feloldunk 1 N káliumhidroxid adagolásával. /A folsav előzetes tisztítását Hutchings módszerével végeztük el /36/. 100 mg aszkorbinsavat, majd 200 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -t tettünk hozzá. Ötperces állás után a lombikot jeges-vizes fürdőbe helyeztük és timolkék indikátor színátcsapását követve az oldat pH-ját 2,8-ra állítottuk be ecetsavval. Rövid idő múlva a dihidrofolsav fehéres csapadék formájában kivált az oldatból. A kiszűrt dihidrofolsav tisztasága még tovább fokozható, ha a

fenti műveletet többször megismételjük.

A tetrahidrofolsavat Davis módszerével /37/ állítottuk elő:

350 mg folsavat 90 ml jégcetben szuszpendáltunk, majd pár mililiter merkaptotanolt adtunk hozzá. Rövid idő múlva 2g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -t tettünk hozzá. A szuszpenziót szobahőmérsékleten 30 percig mágneses keverővel kevertük, majd N_2 áramban szűrtük. Vákuum exszikkátorban fénytől védett helyen szárítottuk.

A hidroxiláz enzim ammóniumsulfátos kicsapással történő tisztítása /38/:

1. 50g lefagyasztott gyökeret hűtött körülmények között 1-2 percig Potter homogenizátorral eldörzsöltünk pH = 7,2 M/15-ös foszfát pufferben, majd a kapott pépet többszörös gézrétegen átszűrtük.
2. A szűrletet 35 %-ra telítettük $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -al /209 g/l/ majd ugyancsak jól hűtött körülmények között 30 percig kevergettük, 20 percig /1500 ford/perc/ centrifugáltuk hűthető centrifugában.
3. A centrifugálás után kapott felülúszót 65 %-ra telítettük szilárd $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -al /200 g/l/ majd 30 percig /4500 ford/perc/ centrifugáltuk.
4. A felülúszót újból 30 %-ra, majd ismételt centrifugálás után pedig 65 %-ig telítettük $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -al,

amit a fentiekben leírt centrifugálás követett.

5. Az így kapott "csapadékot" $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -os pH = 7 2,36 M foszfát pufferben szuszpendáltuk /1 liter pH = 7 foszfát pufferben 313 g $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ van oldva/ 30 perces kevergetés után centrifugálás következett, a kapott maradékot pedig 1,75 M $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ oldatban /231 g $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ oldva pH = 7 foszfát puffer 1 literben/ szuszpendáltuk. Újból centrifugáltuk az elegyet, majd a centrifugacső alján maradt anyagot 0,025 M pH = 7,2 foszfát pufferben oldottuk és egy éjszakán át jegesben ugyanazzal a pufferrel szemben dializáltuk. Az enzimaktivitás nyomon követésére minden egyes lépésben antranilsevas inkubálásokat végeztünk.

A hidroxilálásban szerepet játszó enzimkomplex tisztítása Sephadex G 150 gélen /39,40/

Ez a gél 10-40 u átmérőjű részecskéket tartalmaz és 5-400.000 Molsúlyú fehérjék szétválasztására alkalmas.

Az oszlopot 10 g gélből készítettük el, amelyet 3 napig 0,15 M foszfát pufferben előduzzasztottunk. Kétféle méretű oszlopot használtunk.

1. \emptyset 0,6 cm oszlopágy magassága 20 cm
2. \emptyset 1,8 cm oszlopágy magassága 30 cm.

Eluáló folyadéknál ugyanezt a foszfát puffert alkalmaztuk, csak benne a NaCl koncentrációja 1 N volt.

Növényi minta előkészítése oszlophoz

5 g babrészt /gyökér, szár, levél/ lefagyasztottunk, jól elhomogenizáltunk, az így kapott pépet 0,15 M pH = 7 foszfátpufferben szuszpendáltuk. Ezt átszűrtük négyszeres gézrétegen és a szűrletből vittünk fel az oszlopra az első oszlop esetén 0,5 ml-t, a másodikra pedig 1 ml-t. 10 ml frakciókat szedtünk az oszlopról. A kapott frakciókban minden esetben megvizsgáltuk az enzimaktivitást antranilsavval történő inkubálással.

Más szubsztráttal /fenol, nikotinsav stb./ és más növényi anyaggal /dinnye, árpa, spenót/ végzett kísérleteink lefolyása ugyanolyan volt, mint az antranilsavnál leírtak.

KISÉRLETI EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS MEGBESZÉLÉSE

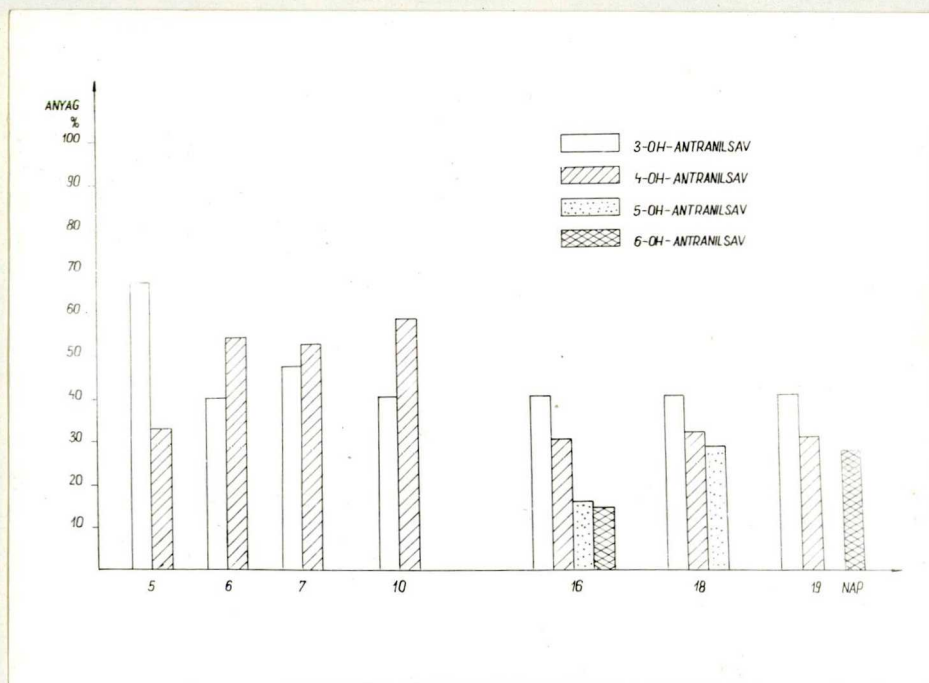
Babnövény homogenizátumokkal végzett inkubálások során azt tapasztaltuk, hogy az antranilsav valamennyi lehetséges hidroxi-származéka keletkezett. Ha különböző korú növényeknél vizsgáltuk a hidroxi-antranilsavakat, akkor jól megfigyelhető volt, hogy ezek mennyisége a növény korával változik. Az 1. táblázatban foglaltuk össze az erre vonatkozó eredményeinket /41/.

A NÖVÉNYI KOR (NAP)	NÖVÉNYI RÉSZ	3-HIDROXI ANTRANILSÁV	4-HIDROXI ANTRANILSÁV	5-HIDROXI ANTRANILSÁV	6-HIDROXI ANTRANILSÁV
5	GYÖKÉR	67	32	+	+
	HAJTÁS	30	65	+	+
6	GYÖKÉR	40	54	+	+
	HAJTÁS	42	50	+	+
7	GYÖKÉR	47	52	+	+
	HAJTÁS	51	46	+	+
10	GYÖKÉR	40	58	+	+
	SZÁR	29	67	+	+
	LEVÉL	21	68	2	9
16	GYÖKÉR	40	30	16	14
	SZÁR	23	30	21	26
	LEVÉL	28	32	15	25
18	GYÖKÉR	40	31	28	+
	SZÁR	40	17	10	33
	LEVÉL	68	13	14	5
19	GYÖKÉR	40	30	+	27
	SZÁR	33	40	12	15
	LEVÉL	30	34	14	22

1. táblázat

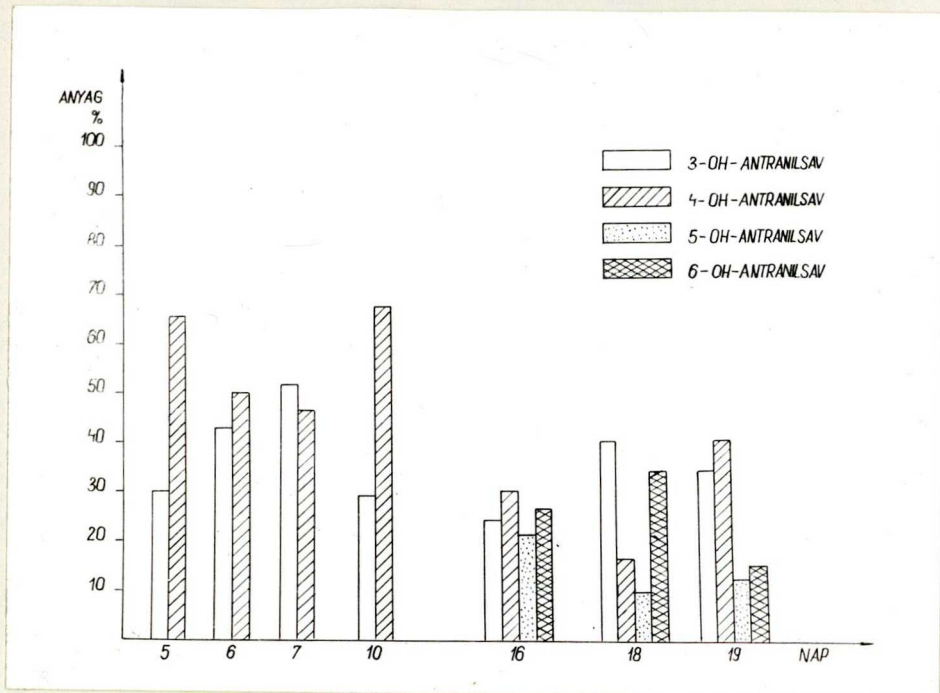
Különböző korú babnövényi részekkel történő inkubálás során keletkezett hidroxi-antranilsavak százalékos megoszlása

A táblázat adatai jól szemléltetik, hogy már öt-napos babnövénynél is keletkezik az összes hidroxiantranilsav, azonban az 5- és 6-hidroxi-antranilsav csak nyomnyi mennyiségben van jelen, kimutatható, de mennyiségileg nem mérhető. Meglepő, hogy a 3-hidroxi-antranilsav mellett végig szinte azonos mennyiségben keletkezik a 4-hidroxi-antranilsav. 10 napnál idősebb babnövényekben már jól mérhető az 5- és 6-hidroxi-antranilsav mennyisége is, tehát a növény korával nő ezeknek a mennyisége. Az 1., 2., 3. ábra oszlopgrafikonjai még szemléletesebben mutatják be ezeket a változásokat /42/.



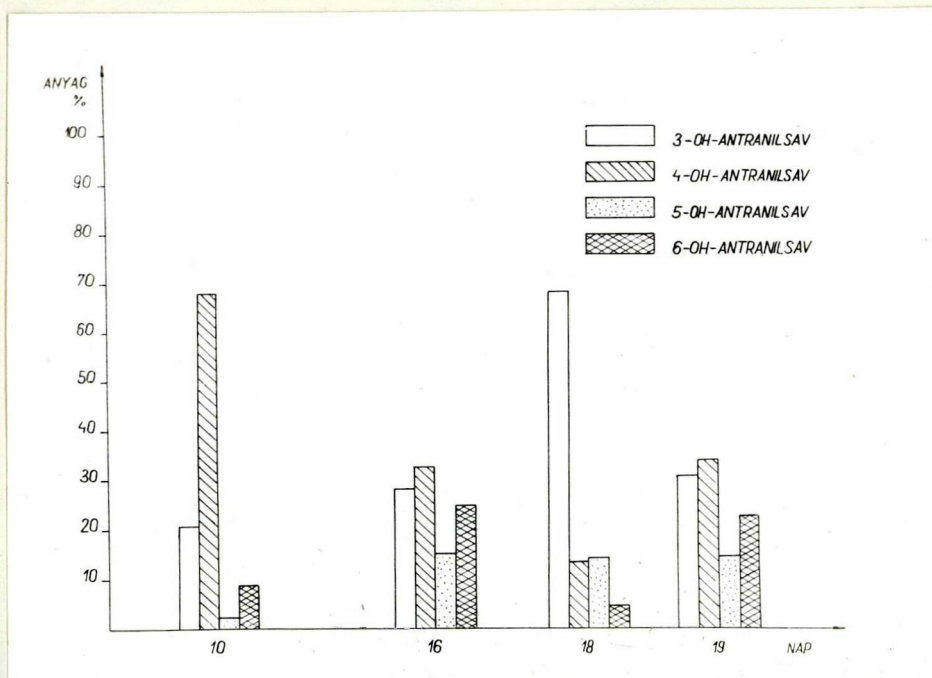
1. ábra

Gyökér-homogenizátumban keletkező hidroxiantranil-savak %-os megoszlása a növény kora függvényében



2. ábra

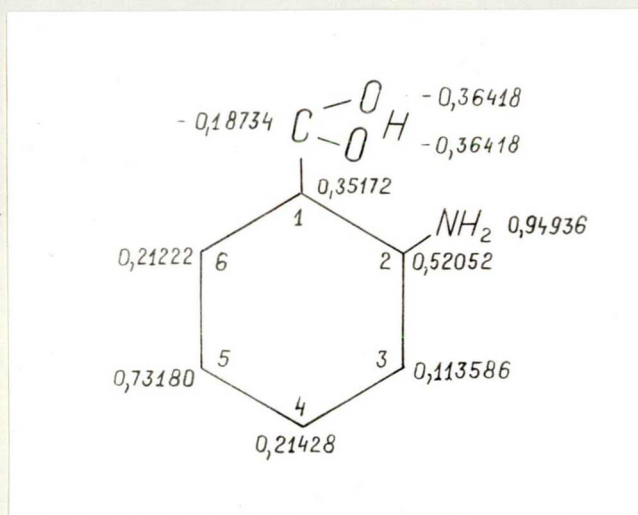
Hidroxi-antranilsavak megoszlása szárban a babnövény kora függvényében



3. ábra

Az antranilsav-hidroxi izomerek aránya különböző korú babnövények levél-homogenizátumaiban

Annak eldöntésére, hogy a keletkezett antranil-sav-származékok specifikus vagy nem specifikus hidroxiláz hatására jöttek-e létre, kvantumkémiai számításokkal meghatároztuk, hogy az aromás szubsztitúció szempontjából az antranilsav-molekula, mely szénatomjai vannak kedvezményezett helyzetben /43, 44/. Számításaink során a 4. ábrán látható eredményeket kaptuk.



4. ábra

Parciális töltésértékek az antranilsav-molekulában

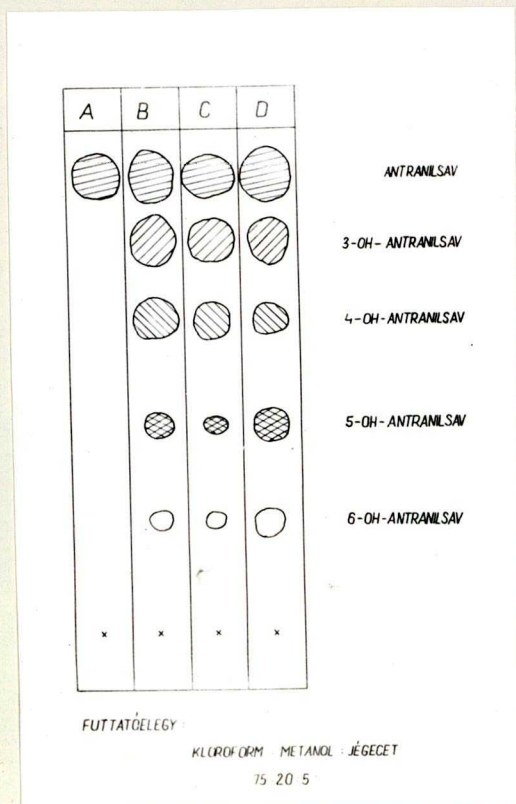
Jól megfigyelhető az ábrán, hogy a viszonylag kis töltéssel rendelkező szénatomok /energetikailag a hidroxilálásra kedvezményezett helyek/ a 3, 4 és 6. Az 5. szénatomon magas a töltéssűrűség, ezért feltételezhető, hogy erre a szénatomra a hidroxil-csoport

belépése csak specifikus enzimhatásra következhet be, és egyébként ellenáll a gyökös hidroxilálásnak, míg a többi helyzetben specifikus és nem specifikus hidroxilázok egyaránt szerepelhetnek a hidroxilálásban.

A 3-hidroxi-antranilsav az állati szervezetben jól ismert anyagcsere-intermedier, több mikroorganizmusból is sikerült izolálni azt az enzimet, amely részt vesz a hidroxilálásban. Érdekes azonban, hogy a 3-hidroxi-antranilsav mellett a 4-hidroxi-antranilsav is nagy mennyiségben keletkezik. Specifikus enzimet pedig nem ismerünk még, ami ebben az átalakulásban szerepelhetne és ugyanez vonatkozik a 6-hidroxi-antranilsavra is.

Feltételeztük és több adatunk volt arra, hogy a növényi peroxidázok azok az enzimek, amelyek fontos szerepet játszanak az antranilsav hidroxilálásában /valószínűleg az állati szervezetekben is hasonló anyagcserehatásokról van szó sokszor/, ezért tormaperoxidázzal is elvégeztük az antranilsav hidroxilálását. Az 5. ábrán szemléltetjük a Fenton-Cier rendszerben és 10 napos babnövény levelében, valamint $2,5 \times 10^{-7}M$ tormaperoxidáz hatására keletkezett hidroxiantranilsavak rétegekromatogramját. A kristályos tormaperoxidáz jelenlétében is bekövetkezett a hidroxilálás.

A tormaperoxidázzal történő antranilsav-hidroxilálás termékeinek százalékos megoszlását tüntet-



5. ábra

A = antranilsav; B = Fenton-Cier rendszerrel előállított antranilsav-hidroxi izomérek; C = levélhomogenizátumban keletkezett hidroxi-származékok; D = tormaperoxidáz hatására

tük fel a 2. táblázatban.

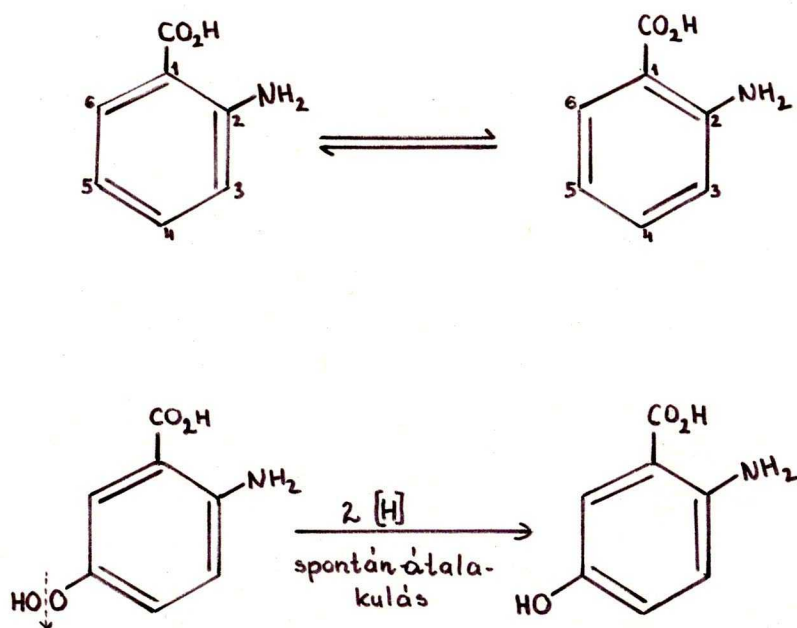
Az adatok szerint a tormaperoxidáz legnagyobb mértékben a 3- és 5-hidroxi-antranilsav keletkezésében vesz részt, de kismértékben szerepel más helyzetben történő hidroxilálásban is. Az 5-hidroxi-antranilsav aránya az átalakulásban ugyancsak magas, ami a fent

3-hidroxi-antranilsav	4-hidroxi-antranilsav	5-hidroxi-antranilsav	6-hidroxi-antranilsav
53,2	6,0	40,8	+

2. táblázat

Tormaperoxidáz hatására létrejött antranilsav-hidroxi-izomérek százalékos megoszlása

említett energetikai szempontok miatt meglepő. Ha hidrogénperoxid is van jelen, akkor a H_2O_2 bontásnál keletkező gyökök energetikája is más, a $\cdot OOH$ /hidroperoxid-gyök/ hatásról pl. keveset tudunk. Bármelyik rezgési formánál lejátszódhat a következő reakció és ezzel magyarázható a nagyobb mennyiségű 5-hidroxi-antranilsav keletkezése.



A hidroxilálási mechanizmus megközelítésére az irodalomból jól ismert gátló vegyületek egész sorát próbáltuk ki /45-49/. Gátlási kísérleteink eredményeit a 3. táblázat foglalja össze. A táblázatban + jellel tüntettük fel az adott származék keletkezését, tehát ahol gátlás nincs a kontrollhoz viszonyítva, és - jellel pedig, ahol a gátlás érvényesül és hidroxitermék nem keletkezik.

GÁTLÓANYAG CC. MÓDOSÍTÁS	NÖVÉNYI RÉSZ	KCN		d-d' DIPRIDIL		8-OXIKINO- LINSZULFON- SAVASKÁLIUM		P-Cl-MERKUR- RI-BENZOÁT		P-OXIMERKUR- RI-BENZOÁT		AMINOPTERIN	ROTENON		HEXO- BARBITÁL		SKF-525		P-AMMO- BENZOSAV	KONTROLL
		10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴		10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴		
3-OH- ANTRANILSÁV	GYÖKÉR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	SZÁR	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	LEVÉL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
4-OH- ANTRANILSÁV	GYÖKÉR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	SZÁR	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	LEVÉL	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
5-OH- ANTRANILSÁV	GYÖKÉR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SZÁR	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
	LEVÉL	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
6-OH- ANTRANILSÁV	GYÖKÉR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	SZÁR	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
	LEVÉL	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+

3. táblázat

Gátló anyagok hatása 12 napos babnövényben történő hidroxilálásra

10^{-2} M KCN jelenlétében a hidroxilálás teljes mértékben megszűnt. 10^{-3} M-nál viszont csak az 5- és 6-hidroxi-antranilsav keletkezése volt gátolva.

α, α' -dipiridil az alkalmazott koncentrációkban csupán a 4-hidroxi-antranilsav létrejöttét akadályozta meg a növény szárában.

8-oxi-kinolinszulfonsavas-kálium 10^{-3} M koncentrációban szárban teljesen leállította a hidroxilálást, viszont gyökérben nem gátolt, levélben pedig egyedül a 4-hidroxi-antranilsav keletkezését akadályozta meg.

p-klórmerkuribenzoáttal és p-oximerkuribenzoáttal végzett kísérleteink során gátlás nem volt kimutatható. Igaz, hogy a gátláskiesésnél azt is figyelembe kell vennünk, hogy ezek az anyagok vízben kevésbé oldódnak, ugyanígy foszfátpufferben is, viszont glicil-glicin-pufferben már jól oldódnak, azonban ebben a pufferben /pH = 7,8, a legalacsonyabb pH-jú puffer/ nincs hidroxilálás gátlószer távollétében sem. Így tehát ezek az enzim SH-csoportjait gátló vegyületek ebben az esetben nem adnak egyértelmű képet.

Az aminopterin levélben és szárban a 6-os helyzetű hidroxilálást gátolta.

Rotenonnal végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy 10^{-3} M koncentrációval gyökérben egyedül az 5-, 6-os helyzetű hidroxilálás marad meg, szárban

viszont fordítva van, az 5- és 6-os hidroxilálás szűnik meg. 10^{-4} M koncentrációval sem a gyökérben, sem a szárban és levélben nincs kimutatható gátlás.

Hexobarbital 10^{-3} M koncentrációnál szárban és levélben az 5- és 6-hidroxi-antranilsav keletkezését gátolta, míg a gyökérben gátlás nem volt kimutatható. Érdekes viszont, hogy 10^{-4} M koncentrációnál a levélben a 3-, 4- és 6-hidroxi-antranilsav nem keletkezett.

SKF-525 viszont csak levélben gátolta a hidroxilálást 3-, 4- illetve 5-, 6-os helyzetekben 10^{-3} illetve 10^{-4} M koncentrációban.

p-aminobenzoésavval történő inkubálás során azt a kérdést akartuk tisztázni, hogy létezik-e kompetitív gátlás az antranilsav / θ -aminobenzoésav/ és a p-aminobenzoésav között. Kvantitatív méréseket itt nem végeztünk sem az antranilsav-hidroxi-származékokra vonatkozóan, sem pedig a p-aminobenzoésavnál, azonban az biztos, hogy p-aminobenzoésavat is hidroxilál a növényi rendszer, de ez nem jelenti egyik hidroxiantranilsav kiesését sem.

/Az SKF-525, a hexobarbital és rotenon a vizes pufferben rosszul oldódtak, főleg a magasabb koncentrációban / 10^{-3} /. Oldékonyságuk fokozására ezeket az anyagokat először 0,5 ml absz. etanolban feloldottuk és így adtuk a pufferhez a már feloldott gátlószert. Az oldékonyság nagyobb lett, de teljes mértékű felol-

dódás így sem következett be./

A keletkezett hidroxil-antranilsavak mennyiségének a növelésére, a hidroxilálás fokozására aktiváló anyagokat is felhasználtunk. Az aktiválás során keletkezett hidroxil-antranilsavakat mennyiségileg is meghatároztuk. Eredményeinket a 4. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatban feltüntetett adatok többszöri ismétlés során kapott eredmények átlagát jelentik.

ANTRANILSÁV HIDROXISÁRMÁNYZATOK	NÖVÉNYRÉSZ	KONTROL	ASZKORBINSÁV			DEHIDRO- ASZKORBINSÁV		DIAHIDROFOLSÁV		TETRAHIDRO- FOLSÁV	
			10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻² M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
3-OH- ANTRANILSÁV	GYÖKÉR	400	40,0	210	411	33,6	35,2	40,2	41,8	38,8	33,07
	SZÁR	42,7	61,7	32,4	4025	52,1	38,5	400	410	52,3	40,09
	LEVÉL	300	44,5	241	274	402	280	293	292	283	30,5
4-OH- ANTRANILSÁV	GYÖKÉR	300	27,3	295	300	31,3	34,0	27,6	34,0	33,4	28,03
	SZÁR	33,3	35,8	28,5	31,9	25,2	35,5	28,0	28,2	20,3	22,7
	LEVÉL	34,0	9,5	34,8	32,1	2629	32,5	31,6	33,5	29,3	23,9
5-OH- ANTRANILSÁV	GYÖKÉR	16,0	20,0	29,5	22,1	16,5	14,8	17,4	13,6	21,1	26,4
	SZÁR	13,1	—	15,8	1308	14,6	15,0	17,2	18,9	1802	28,1
	LEVÉL	14,0	72,6	32,6	182	8,3	15,2	16,0	16,7	28,7	23,4
6-OH- ANTRANILSÁV	GYÖKÉR	14,0	12,3	13,8	6,7	17,8	16,0	14,8	10,5	6,5	12,5
	SZÁR	107	2,3	23,1	14,7	8,0	11,0	14,6	11,9	9,3	9,1
	LEVÉL	22,0	3,7	8,3	22,3	25,2	24,3	2307	200	13,1	22,02

4. táblázat

Aktiváló anyagok jelenlétében keletkezett hidroxil-antranilsavak százalékos megoszlása 12 napos babnövénynél

Az adatok jól demonstrálják, hogy mind aszkorbinsav, dehidroaskorbinsav, mind pedig di- és tetrahidro-folsav hatására fokozódik egyértelműen az 5-hidroxi-antranilsav mennyisége. Ez vonatkozik a szárra, gyökérre, levélre egyformán. A 3- és 4-hidroxi-antranilsav mennyisége kicsit lecsökken, a 6-hidroxi-antranilsavé pedig majdnem változatlan. 10^{-2} M koncentrációban alkalmazva az aszkorbinsavat azt is figyelembe kell venni, hogy az oldat pH-ja 5-re esett le, ezért a kapott - néha egészen extrémnek tűnő - eredmények /pl. 3-OH-antranilsav a szárban 61,7 % vagy 5-hidroxi-antranilsav a levélben 72,6 %/ a bekövetkezett pH-változásnak is betudhatók.

Az eddigiekben tehát megvizsgáltuk különböző gátló és aktiváló anyagok l. hidroxilálásra gyakorolt hatását.

Megkíséreltük szétválasztani ezt az enzimkomplexet egyrészt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os kicsapással, másrészt pedig Sephadex G 150 gél oszlopon. A célunk egyrészt az volt, hogy megpróbáljuk "megközelíteni" a hidroxiláló enzimet, másrészt pedig, ha ezekért az átalakulásokért több enzim, enzimkomplex a felelős, azt részeire bontani.

Ammóniumsulfátos frakcionálás során azt a meglepő dolgot tapasztaltuk, hogy az enzim a legjobban elhomogenizált növényi részben is, gézen való szűrés után részben a növényi maradékhoz kötődik és az aktivi-

tás ott is fennmarad /az összes hidroxil-antranilsav keletkezik/. A szűrlettel tovább elvégezve az Anyag és Módszer fejezetben leírt utat azt kaptuk, hogy a végső enzim is képes az összes hidroxil-antranilsav létrehozására, tehát ezt az enzimkomplexet nem sikerült felbontani.

Hasonló eredményre jutottunk Sephadexen történő szétválasztáskor is. Az oszlopról lejött 3-5. frakcióban megjelent a hidroxiláz enzim, amely képes volt az összes hidroxil-izomér létrehozására.

Ezekből a kísérletekből tehát azt a következtetést vonhatjuk le, hogy egy enzimkomplex az, ami felelős az átalakulásokért és ennek a molekulásúlya nagyobb 400.000-nél.

Még itt szeretnénk említést tenni más növényekkel végzett hidroxilálási kísérleteinkről. Korábban megvizsgáltuk az árpa és dinnye hidroxiláló képességét is, és azt tapasztaltuk, hogy árpa esetében csak 4-hidroxil-antranilsav keletkezik, míg dinnyénél 3- és 4-hidroxil-antranilsav mutatható ki.

Érdekes, hogy pl. székfűgombánál már a kontroll növényben is viszonylag nagy mennyiségben található 3-hidroxil-antranilsav. Antranilsavval történő inkubálás viszont nem hidroxiláláshoz vezet, hanem triptofánszintézisre használódik fel. Kromatográfiásan

kimutatható a Try-szint emelkedése antranilsav jelenlétében, ami érthető is, hiszen az antranilsav a triptofán prekursora.

Spenótlevelekben szintén kimutatható antranilsav-hidroxiláló aktivitás. Az összes hidroxi-antranilsav keletkezik, amelyek százalékos megoszlása ötórás inkubálás után a következő:

3-hidroxi-antranilsav	4-hidroxi-antranilsav	5-hidroxi-antranilsav	6-hidroxi-antranilsav
50,0 %	16,6 %	16,6 %	16,8 %

Ebben az esetben is 3-hidroxi-antranilsav keletkezése dominál, míg a 4-, 5-, 6-hidroxi-antranilsavak azonos mennyiségben keletkeznek.

Paprika termésfalában is megvizsgáltuk az antranilsav hidroxilálását és azt tapasztaltuk, hogy szintén keletkezik minden egyes hidroxi-antranilsav, azonban itt is legnagyobb mennyiségben a 3-hidroxi-antranilsav keletkezett.

ÖSSZEFOGLALÁS

Már több éve foglalkozunk a hidroxilálással, a növényi szövetek in vitro hidroxilálásával. Többféle növényi anyaggal próbálkoztunk és megvizsgáltuk számos szubsztrát /benzol, benzoesav, piridin-karbonsavak stb./ növényi szövetekben történő hidroxilálását is, amelyekről az előzőkben már beszámoltunk. Az antranilsav hidroxilálásáról összefoglalóan a következőket mondhatjuk.

1. Babnövény vegetatív szerveivel végzett inkubálásaink során 3-, 4-, 5- és 6-hidroxi-antranilsav keletkezett. Paprika termésében és a spenót leveleiben szintén hasonló átalakulást figyeltünk meg. Dinnyénél és árpánál 3-, 4- illetve csak 4-hidroxi-antranilsav keletkezett. Szekfűgombánál nem tapasztaltunk hidroxilálást.
2. Babnövénynél a hidroxi-származékok megoszlása és mennyisége korrelációba hozható a növény korával.
3. Gátlási kísérleteink alapján feltételezhető, hogy a hidroxiláz-komplex ferro-ion tartalmú.
4. Az aktiváló anyagok 5-hidroxi-antranilsav keletkezésére gyakorolt fokozó hatása azzal magyaráz-

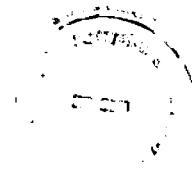
ható, hogy hidrogén-donorként vesznek részt a hidroxilálásban.

5. Az ammoniumsulfátos frakcionálásból és Sephadex G-150 gélen való tisztításból pedig látható, hogy az enzimkomplex kötött a sejtalkotórészekhez és 400.000-nél nagyobb molekulásúlyú enzimkomplexről van szó, amely az összes hidroxiláz-sajátság hordozója.
6. Más növényi anyaggal végzett kísérleteink azt igazolták, hogy az antranilsav-hidroxilálás végbemehet ott is, de maga a mechanizmus nem egységes a növényeknél, nem általános az összes hidroxiantranilsav keletkezés.
7. A peroxidázok, mint nem specifikus hidroxilázok részt vesznek a hidroxilálásban, azonban nemcsak ezek tehetők felelőssé az antranilsav-hidroxizomerek keletkezéséért.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Hayaishi, O.: Annual review of Biochemistry. 38,
/1969/ 21-43.
2. Altman, F.P.: An introduction to the use of tetra-
razolium salts in quantitative enzyme cyto-
chemistry. /1972/ Colnbrook, Brucks, England.
13-18.
3. Karlson, P.: Biochemie für Mediziner und Natur-
wissenschaftler 7. Neubearbeitete Auflage,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 178 /1970/
218-220.
4. Hunt, A.L. and Hughes, D.E.: The Biochem. Journal,
69, 170-173, /1958/.
5. Matkovics, B. és Göndös, Gy.: Biol. Közlemények,
XV. /1967/, 23-31.
6. Péntzes Pál: Doktori értekezés, 1964.
7. Frommer, U.-Volker, U. and Hansjürgen, S.: Z. phy-
siol. Chem. 351, 903-912, /1970/.
8. Matkovics, B.: Steroidologia /in press/.
9. Green, H. and John, L. Sawyer: Anal. Biochem. 15,
53-64 /1966/.
10. Booth, J. and Boyland, E.: Biochem. J. 66, 73-78,
/1957/
11. Dagley, S.: Biochim. et Biophys. Acta, 78, 577-87.
/1963/

12. Sims, P.: Biochem. J. 130/1, 27. /1972/
13. Anding, C.-Brandt, R.D.-Ourisson, G.-Pryce, R.J.:
Proc. R. Soc. Lond. B 180, 115-124 /1972/
14. Mitoma, Ch.,-Posner, S.H.-Reitz, C.H. and Udenfriend;
S.: Arch of Biochem. Biophys. 61, 431-441 /1956/
15. Udenfriend, S.-Clark, C.T.-Axelrod, J. and Brodie,
B.B.: J. Biol. Chem. 731-739 /1954/ 208
16. Mizusaki, S.-Tanabe, Y.-Kisaki, T. and Tamaki, E.:
Phytochem. 9, 549-554 /1970/
17. Wilcox, M.-Moreland, D.E. and Klingman, G.C.:
Physiol. Plant. 16, 565-571 /1963/
18. Johnson, L.B.-Cunnigham, B.A.: Phytochem. 11, 547-
551 /1972/
19. Prochazka, Z.: Collection Czechoslov. Chem. Commun.
33, 4039-4046 /1968/
20. S. Rajki, E. és Matkovics, B.: XII. Biokémiai Ván-
dorgyűlés előadásai, MKE Biokémiai Szakosztálya
Kiadványa, 1971, 1145.
21. Simon, M.-Matkovics, B. és H-né Mészáros, M.: XI.
Biokémiai Vándorgyűlés kiadványa /1970/, Sop-
ron, 36. előadás.
22. Doby, G.: Növényi biokémia. Akadémiai Kiadó, Bp.,
484-495, 442-449 /1959/
23. Robb, F.-Hutchinson, M.A.: The Journal of Biologi-
cal Chem. 246, 6908-6912 /1971/



24. Taniuchi, H.-Hatanaka, M.-Kuno, S.-Hayaishi, O.-
Nakajima, M. and Kurihara, N.: J. Biol. Chem.
239, /1964/, 2204-2211.
25. Decker, R.H.-Kang, H.H.-Leach, F.R. and Henderson,
L.M.: J. Biol. Chem. 236, 3076-3082 /1961/
26. Kutacek, M.H.-Schraudolf,: Proceedings of the 2nd
International Symposium on Isothiocyanates /1969/
27. Nair, P.M. and Veidyanathan, C.S.: Biochim. Bio-
phys. Acta, 110, 521-531 /1965/
28. Marián, M.: Doktori értekezés /1970/
29. Pulmann, B.: Electronic aspects of biochemistry,
Acad. Press. New York, /1964/ 237-281.
30. Guroff, G.-Daly, J.W.-Jerina, D.M.-Rendson, J.-
Witkop, B.-Udenfriend, S.: Science, 157, 1526
/1967/
31. Jerina, D.-Daly, J.-Landis, W.-Witkop, B.-Udenfriend,
S.: J. Am. Chem. Soc. 89, 3347-49 /1967/
32. Stahl, E.: Dünnschicht Chromatographie. Springer
Verlag, Berlin, /1962/
33. Tyihák, E.: A rétegekromatográfia új eredményei. /A
biokémia modern módszerei I. II./ MKE, Bioké-
miai Szakosztálya, Budapest, /1966/
34. Kupfer, D. and Atkinson, D.E.: Anal. Biochem. 8,
82-94 /1964/
35. Futterman, S.: J. Biol. Chem. 228, 1031 /1957/

36. Hutchings, B.L.: J. Am. Chem. Soc. LXX, 22. /1948/
37. Davis, L.: Anal. Biochem. 26, 459-460 /1968/
38. Rutner, H.C.: Biochemistry, 9, 178-184 /1969/
39. Whitaker, J.R.: Anal. Chem. 35, 1950-1953 /1963/
40. Leach, A.A. and O'Shea, P.C.: J. Chromatog. 17,
245-251 /1965/
41. Matkovics, B.-Simon, M.-Szőnyi, G.D. and Mészáros,
M.H.: Biochem. Physiol. Pflanzen /B.P.P./, 163,
324-327 /1972/
42. Simon, M.-Matkovics, B. és H-né, Mészáros, M.:
XII. Biokémiai Vándorgyűlés kiadványa /1971/
/Pécs/, 145-150
43. Simon, M.-Matkovics, B. és H-né Mészáros, M.:
XIII. Biokémiai Vándorgyűlés kiadványa /1972/
/Szombathely/, 41. előadás
44. Lajkó, K.-Simon, M. és Matkovics, B.: /Közlés alatt/
45. Nakanishi, S.-Shiohara, E.: Japan J. Pharmacol.
22, 221-225 /1972/
46. Margolis, R.L. and Lukens, N.L. Archives of Biochem.
and Biophys., 147, 612-618 /1971/
47. Linskens, H.F.-Sanwal, B.D. and Tracey, M.V.: Modern
methods of plant analysis 7, 260-285.
48. Pridham, J.B.: Annual Review of Plant Physiol. 16,
13-36 /1965/
49. Pridham, J.B.-Swain, T.: Biosynthetic pathways in
higher plants. Acad. Press. London-New York /1965/.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani

dr. Matkovics Béla egyetemi docens úrnak a témavezetésért, munkámhoz nyújtott hasznos útmutatásáért és tanácsaiért, valamint

dr. Horváth Imréné egyetemi docensnek kísérleti munkám végzésében nyújtott segítségéért.