

B 1955

D O K T O R I É R T E K E Z É S

A LIGAND-RECEPTOR KÖLCSÖNHATÁS VIZSGÁLATA
A GASZTRIN ÉS A DIAZEPÁM ESETÉN

Irta:

Szücs Mária

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet

1 9 8 1 .



TARTALOMJEGYZÉK

I.	BEVEZETÉS	1.
II.	IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	4.
	1. A receptor fogalma és általános jellemzése	4.
	2. A ligand-receptor kölcsönhatás közvetlen mérése	6.
	2.1. A reakciókörülmények megválasztása	6.
	2.2. A specifikus kötés meghatározása és kritériumai	7.
	2.3. A szabad és kötött ligand elválasztása	9.
	2.4. A kötési adatok értékelése	10.
	3. A benzodiazepin receptor	12.
	4. Irodalmi adatok a gasztrin hatásmechanizmusát illetően	13.
III.	CÉLKITÜZÉSEK	18.
IV.	MÓDSZEREK	20.
	1. Szinaptoszóma preparálás patkány előagyból	20.
	2. Receptorkötési kísérletek a diazepam receptor mérésére	20.
	3. Radioaktivitás-méréseknél használt szcintillációs koktélok	21.
	4. Gyomor nyálkahártya szubcelluláris frakcionálása	22.
	5. Elektronmikroszkópos feldolgozás	23.
	6. Fehérje-meghatározás	23.
	7. Adenozin-trifoszfátázok aktivitásának mérése	23.
	8. Gasztrin-analógok előállítása	23.
	9. Biológiai aktivitás meghatározások	24.
	10. Kötési kísérletek dimer-tetragasztrinnal	24.

V.	EREDMÉNYEK	26.
1.	³ H-diazepám kötődésének jellemzői patkány előagy szinaptoszómában	26.
2.	Receptorkötési kísérletek dimer-tetragaszt- rinnal	31.
2.1.	A gasztrin kötés mérésére használt ana- lógok biológiai aktivitása	31.
2.2.	Gyomor nyálkahártya szubcelluláris frak- ciók jellemzése	32.
2.3.	A specifikus kötés szubcelluláris meg- oszlásának vizsgálata sertés gyomorban	36.
2.4.	A kötődés jellemzői sertés gyomor "durva mitokondrium" frakcióban	38.
VI.	AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	44.
VII.	ÖSSZEFOGLALÁS	53.
VIII.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	55.
IX.	IRODALOMJEGYZÉK	56.
	KÖSZÖNETNYILVÁNITÁS	62.

I. B E V E Z E T É S

Az utóbbi néhány évben ugrásszerűen megnöttek ismereteink a hormonok és neurotranszmitterek hatásmechanizmusát illetően. Bár a farmakológusok már korábban feltételezték, hogy a hormonhatás első lépése a specifikus helyeken való kötődés [1-3], a receptorok létezését csak a hatvanas években sikerült biokémiai módszerekkel igazolni. A radioaktív jelöléstechnika és a sejtfractionálási módszerek fejlődése tették lehetővé, hogy a hormon-receptor kölcsönhatást és annak molekuláris alapjait közvetlenül tanulmányozzuk.

Jelenlegi ismereteink szerint a hormonok kötődésekor a receptorok térszerkezete megváltozik, ennek hatására többlépcsős reakciólánc eredményeként az adott sejtre jellemző anyagcsereváltozások történnek. Aminerg és peptiderg receptorok esetén az információ átvitele általában az adenil cikláz enzimén keresztül történik. Az $ATP \rightarrow cAMP$ reakció eredményeként keletkező cAMP, a "második messenger" /Sutherland, (4)/ egyéb enzimrendszerek, pl. protein-kináz, foszforiláz működését, a membrán transzportfolyamatait stb. befolyásolva kiváltja a megfelelő sejtválaszt.

A klasszikus fehérjetisztítási módszerek és az affinitáskromatográfia segítségével egyre több receptorfehérje izolálható, így fizikai, kémiai tulajdonságaik a tisztított formában meghatározhatók. Az így nyert információk szolgáltatják a végső bizonyítékot a receptorkötési technikával



membránkötött és szolubilizált formában leírt tulajdonságok igazolására.

A receptorkötési módszer gyors elterjedését az indokolja, hogy amellet, hogy rövid idő alatt eredményt ad, felhasználási területe igen széles. A ligand-receptor kölcsönhatás molekuláris szinten történő jellemzése az egyik alkalmazási terület. Emellett olyan kérdések vizsgálatára is használható, mint a hypo- és hyperszenzitivitás [5], kimutatható, hogy a receptorok számában [6] vagy affinitásában [7] következik be változás a normális állapothoz képest. Egyes pathológiás esetek is összefüggésbe hozhatók a receptorok tulajdonságainak megváltozásával [8]. A receptor karakterizálása exogén ligandokkal elvezethet addig ismeretlen, fiziológias anyagok felfedezésére. Ennek klasszikus példája, hogy az opiát receptorok jellemzése morfinnal [9] elvezetett az endorfinok [10] és enkefalinok [11] felfedezéséhez. Ennek analógiájára napjainkban kiterjedt kutatás folyik a benzodiazepin receptor [12] endogén ligand keresésére. A gyógyszeripar szempontjából igen nagy jelentőségű, hogy a kölcsönhatás mibenlétét ismerve bizonyos tulajdonságokkal rendelkező vegyületek, pl. antagonisták szerkezete előre megtervezhető, másrészt az új vegyületek tesztelése lényegesen rövidebb időt vesz igénybe, mint a hagyományos farmakológiai vizsgálatokkal.

Disszertációm egyik tárgya a diazepam kötődésének mérése patkány előagyból készített szinaptoszómán.

Disszertációm másik tárgya a gyomor sósavtermelését fokozó hormon, a gasztrin feltételezett receptorának kimutatása és jellemzése. A receptorkötési technika segítségével

Vizsgáltuk egy új, az irodalomban még le nem irt dimer-tetragasztrin kötődését gyomor nyálkahártyában in vitro. Ez a munka szervesen kapcsolódik korábbi kísérleteinkhez, melynek során az általunk szintetizált affinitásadszorbens segítségével vizsgáltuk a pentagasztrin vérben történő transzportját és megkíséreltük a gasztrin kötő fehérje tisztítását szolubilizált membránfrakcióból [13, 14].

A kétféle receptor jellemzésével alkalmunk adódott annak bemutatására, hogy a receptorkötési technika általánosan használható, a központi idegrendszerben és a perifériás szerveken egyaránt.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A receptor fogalma és általános jellemzése

Nagyszámu irodalmi adat bizonyítja, hogy a peptidhormonok hatásmechanizmusának döntő, első lépése a célsejteken lévő specifikus kötőhelyekkel, az ún. receptorokkal való kölcsönhatás. Ugyanez vonatkozik egyes gyógyszermolekulákra és neurotranszmitterekre is. Az így kapott információ különböző utakon továbbíthat a sejt belseje felé. Ezen utak közül peptidhormonok esetén legáltalánosabb az adenil cikláz enzim aktiválása, ill. gátlása, amely a cAMP-n keresztül váltja ki a megfelelő sejtválaszt. Azonban pl. az inzulin és az angiotensin II. nem tartoznak ebbe a kategóriába. Egy másik lehetséges út valamelyik ioncsatorna működésének befolyásolása. Függetlenül a második messenger mibenlététől fentiekből következik, hogy a "receptor" fogalma 2 funkciót foglal magába:

1.) a reguláló ágens (hormon, neurotranszmitter, gyógyszer-molekula stb.) felismerése és megkötése;

2.) a megfelelő sejtválasz kiváltása.

E kettős funkció alapján a receptorok világosan megkülönböztethetők azoktól a molekuláktól, amelyek ugyan "specifikusan" megkötik az egyes ligandokat, de a jellemző sejtválasz elmarad (pl. transzport fehérjék, inaktiváló és katabolizáló enzimek). Ezeket a valódi receptoroktól megkülönböztetve akceptoroknak nevezzük.

Míg a szteroidhormonok belépnek a sejtbe és a sejttagon vagy a citoszolban lévő receptorokon kötődnek, a peptidhormonok receptorai a plazmamembránon vannak. Ezt igazolja, hogy cellulózhoz kötött ACTH [16], Sepharosehoz kötött inzulin [17] képesek voltak az intakt sejtek választ kiváltani. Ami ennél is fontosabb, plazmamembrán preparátumban a receptorok 30-50-szeresére tisztulnak az eredeti homogenátumhoz képest [18]. Ujabban néhány szerző katekolamin és peptid kötőhelyeket talált intracelluláris organelleumokon is [19].

Kémiai természetüket illetően a receptorok általában fehérjék, amint azt tripszinnel való emészthetőségük mutatja [20]. A fehérje hidrofób részei kölcsönhatásban vannak a lipidmátrixszal, a hidrofil rész pedig kinyulik a vizes fázis felé. Ez utóbbi számos kovalensen kötött oligoszacharid láncot tartalmaz.

Egy bizonyos receptormintázat az adott sejtre jellemző, és ez határozza meg, hogy melyik hormonra képes reagálni. A receptor specifitása igen nagyfokú, és még akkor is elkülöníti a hormonokat, ha azok szerkezete nagyon hasonló.

A receptorok tanulmányozását megnehezíti, hogy rendkívül kis mennyiségben (néhány ezer kötőhely/sejt, ill. néhány pmol/mg membrán fehérje) fordulnak elő.

A receptor nagy affinitással rendelkezik a neki megfelelő ligandhoz.

2. A ligand-receptor kölcsönhatás közvetlen mérése

2.1. A reakciókörülmények megválasztása

A receptorok felismerő funkciójának direkt analízise radioaktív ligandok kötődési sajátságainak mérésével történik. Figyelembe véve a receptorok kis számát és a méréseknél használatos alacsony, a fiziológiáshoz közeli ligandkoncentrációkat, nyilvánvaló, hogy mérésük csak nagy fajlagos aktivitású (>10 Ci/mmol) radioaktív ligandokkal lehetséges. Ráadásul a vegyületnek a radioaktív jelölés során a teljes biológiai aktivitását meg kell őriznie. Jódózással ugyan sokkal nagyobb specifikus aktivitásokat lehet elérni mint más radioaktív jelölésekkel, számos példa van arra, hogy jódózás során a biológiai aktivitás lecsökken vagy elvész (pl. oxitocin és vazopresszin, ill. inzulin esetén [21]). Ezért a triciált ligandok használata általánosabb.

A radioaktív jelöléstechnika fejlődése mellett a sejtfractionálási módszerek kialakulása tette lehetővé, hogy a hormon-receptor kölcsönhatást közvetlenül tanulmányozzuk. A módszer elméleti és gyakorlati megalapozásában Cuatrecasas végzett úttörő munkát az inzulin receptor sajátságainak vizsgálatával [22, 23].

A megfelelő ligand kiválasztása nagy körültekintést igényel. A katekolaminok és opiátok esetén nagyszámu analóg áll rendelkezésre. Általában az antagonisták affinitása nagyobb, mint az agonistáké. Az újabb adatok azonban arra mutatnak, hogy az agonisták és antagonisták nem ugyanazokhoz a re-

ceptor-helyekhez kötődnek [24]. Az opiát receptornak létezik egy un. agonista és egy un. antagonistákonformációja. Az előbbi nagyobb affinitással köt agonistákat, az utóbbi antagonistákat [25]. Ugyancsak eltérően befolyásolja az agonisták és antagonisták kötődését a Na^+ [26] ill. GTP [27] jelenléte. Peptidhormonok esetén azonban a rendelkezésre álló analógok kis száma, ill. az antagonisták hiánya a választási lehetőséget erősen korlátozza.

A plazmamembránon kapott eredményeket célszerű összehasonlítani intakt sejtekével. A sejtek összetörésekor ugyanis a receptorok tulajdonságai vagy száma megváltozhat, pl. az un. tartalék /spare/ receptorok hozzáférhetővé válnak, vagy a receptor deszenzitizálódik [28]. Gyakran ezt a lehetőséget korlátozza az intakt sejteken tapasztalt magas nem-specifikus kötés és az uptake, vagyis a ligand felvétele.

2.2. A specifikus kötés meghatározása és kritériumai

A gyakorlatban nagyon ritkán lehet olyan feltételeket teremteni, hogy a radioaktív ligand csak a receptoron kötődjön. Szinte mindig számolnunk kell a ligand kötődésével különböző felületeken (sejtorganellumok, reakciócső, filterek stb). Ezt nevezzük nem-specifikus kötésnek. Mivel az ilyen kötőhelyek száma gyakorlatilag végtelen, ez a kötődés a ligand koncentrációjának növelésével lineárisan nő. A másik komponens a ligand koncentráció növelésével alacsony koncentrációknál eleinte nő, majd a fiziológiás koncentráció

körül telítési értéket ér el és a továbbiakban nem változik. Ez megfelel a receptorhelyek telítésének. Ezt a komponenszt nevezzük specifikus kötésnek.

Fentiekből következik, hogy a mindig jelentkező nem-specifikus kötés miatt a specifikus kötést közvetlenül mérni nem tudjuk, hanem az összes és a nem-specifikus kötés különbségeként számoljuk. Az összes kötés mérésekor az izotóp koncentrációt növelve mind a receptorhelyeket, mind a nem-specifikus helyeket jelöljük. Ha azonban nagy feleslegű / ≥ 1000 -szeres/ nem radioaktív, "hideg" ligand van jelen, akkor a sejtenként hozzáférhető néhány ezer receptorhelyről a hideg ligand mintegy "kiszorítja" az izotópot, hiszen minden 1000 hideg molekulára 1 db jelölt molekula jut. Az izotóp így a nem-specifikus helyekre kötődik. Így tehát a nem-specifikus kötés elkülönítve mérhető.

Több feltétel együttes teljesülése szükséges a kötés specificitásának igazolására [23, 29]. Ezek a következők:

- telithetőség, ami a receptorhelyek véges számára utal;
- nagy affinitás, amelynek mérőszáma a ligand-receptor komplex disszociációs állandója, K_D . Nagy affinitású rendszereknél a K_D 10^{-10} - 10^{-8} M;
- reverzibilitás;
- specificitás, amely egyrészt jelenti, hogy csak az az anyag, ill. csak az a sztereoizomer kötődik, amely biológiailag is aktív, másrészt jelent szövetspecificitást;
- egyezés a farmakológiai adatokkal, vagyis a vegyületek affinitási sora hasonló a biológiai aktivitások alapján adódó sorrenddel.

Ezen feltételek együttes teljesülése szükséges a valódi receptorok létének bizonyítására, mert mint közismert, számos ligand látszólag "specifikusan" reagál inert anyagokkal (talkum, üvegcső, filter). Ez a kötődés esetenként hőmérséklet- és időfüggő ([30]), sőt sztereospecifikus is lehet [31], ld még [32-33].

2.3. A szabad és kötött ligand elválasztása

Tekintetbe véve, hogy a méréseknél alkalmazott radioaktív ligandnak csak egy része (<10%) kötődik a biológiai mintánkon (sejt, homogenátum, plazmamembrán), a kötött és a szabad radioaktív ligandot egymástól el kell választani. A ligand-receptor komplex mennyisége pontosabban meghatározható, ha a kötött mennyiséget mérjük. A szabad és kötött ligand elválasztására elsősorban a hagyományos fizikai elválasztási műveletek - centrifugálás, szűrés, egyensúlyi dialízis, gélszűrés - használatosak.

Mivel a szűrés gyorsabb és hatékonyabb eljárás, ezenkívül a centrifugálás hosszabb ideje alatt egyes rendszereknél számolni lehet a centrifugácson való kötődéssel is, a szűrés ma jobban elterjedt. A megfelelő szűrő (üveg, cellulóz-acetát, -nitrát stb) kiválasztása minden egyes ligandra külön kísérleteket igényel, hogy a filteren való "specifikus" kötés lehetőségét kizárjuk. Abban az esetben, ha a ligand-receptor komplex felezési ideje rövid, így fennáll a disszociáció veszélye az elválasztás alatt, valamelyik egyensúlyi módszert (egyensúlyi dialízis, gélszűrés) kell választani.

2.4. A kötési adatok értékelése

A specifikus kötés kvantitatív jellemzése a következő adatokkal történik:

- disszociációs konstans, K_D
- specifikus kötőhelyek száma, B_{\max} .

A hormon-receptor kölcsönhatásra általában érvényesek az enzimkinetikából ismert összefüggések. Abban az esetben, ha csak egyféle kötőhely van és a ligand is homogén, a kölcsönhatás leírása a bimolekulás, reverzibilis reakciókra megállapított egyenletek alapján lehetséges:



a tömeghatás törvénye szerint:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[L][R]}{[LR]} \quad /2/$$

ahol K_D : a ligand-receptor komplex disszociációs állandója;

k_1 és k_{-1} : az asszociációs és disszociációs sebességi állandók;

[L]: a szabad ligand egyensúlyi koncentrációja;

[R]: a szabad receptor egyensúlyi koncentrációja;

[LR]: a ligand-receptor komplex koncentrációja

A kötési paraméterek meghatározásának egyik lehetősége az eredeti egyenlet linearizálása.

Mivel:

$$[R] = [R_T] - [LR] \quad /3/$$

ahol $[R_T]$: a receptorok összes koncentrációja

$$\frac{[LR]}{[L]} = \frac{1}{K_D} ([R_T] - [LR]) \quad /4/$$

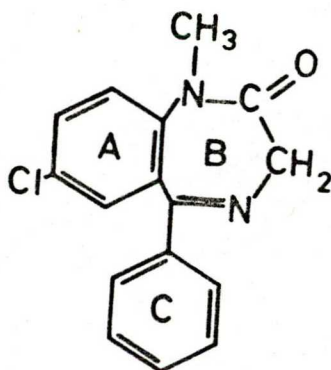
Ez az ún. Scatchard-összefüggés [34]. Ha feltüntetjük $[LR]/[L]$ -t $[LR]$ függvényében, akkor egy olyan egyenest kapunk, melynek iránytangense $-1/K_D$, az abszcisszával való metszéspontja $R_T = B_{\max}$. Hasonlóan, a Lineweaver-Burk-féle ábrázolás is egyenest ad, ennek alkalmazása azonban bizonyos feltételekhez kötött [35].

A ligand kötődése nem minden esetben írható le a fenti összefüggésekkel. Nagyszámu receptor-modell létezik [36], melyek mindegyike speciális matematikai értékelést igényel. Az egyik modell szerint a kötőhelyek több alegységből állnak, amelyek mindegyike a ligand egy-egy funkciós egységével reagál, többlépcsős reakcióban [37, 38]. A kötőhelyek között pozitív vagy negatív kooperativitás állhat fenn, azaz a ligand kötődése növeli vagy csökkenti a további kötődés affinitását [39]. Számolni lehet a ligandnak az inkubációs elegyben történő aggregációjával is [40]. Azt, hogy a receptornak kedvezményezett állapotai, ill. helyei vannak, ahol az agonisták vagy antagonisták kötődnek, több rendszerre kimutatták [24, 41, 42]. Ennek figyelembe vételére Rodbard és munkatársai dolgoztak ki új matematikai eljárást [43]. Ugyancsak eltérő számolásmódot igényel, ha relative magas ligandkoncentrációknál ($>10 K_D$) dolgozunk [44].

Annak eldöntésére, hogy melyik modell felel meg leginkább mérési adatainknak, általában többféle koordinátarendszerben történő ábrázolás szükséges. A leggyakrabban használatosak a Scatchard-analízis mellett a logaritmikus, a kettős-logaritmikus és a Hill-féle ábrázolások. A Hill-féle ábrázolás különösen alkalmas a kooperativitás felismerésére [45].

3. A benzodiazepin receptor

A benzodiazepinek jelentős szedatív, antikonvulzív és izomrelaxáns hatással rendelkeznek. A gyógyászatban a klórdiazepoxid /Librium/ és a diazepam /Seduxen/ jelentős. A strukturát Sternbach 1933-ban szintetizálta, a hatás-szerkezet összefüggéseket 1961-ben Sternbach és Reader tisztázták. A benzodiazepinek ez idő szerint a klinikailag leghatékonyabb minor trankvillánsok.



DIAZEPÁM

Elsőként Bosmann és társai mutatták ki specifikus, nagy affinitású benzodiazepin kötőhelyek létét patkány agy szinaptoszómán [46]. Squires mérései [47] eredményeiket alátámasztották. Azóta nagyszabású kutatások indultak, hogy megtalálják azt az eddig ismeretlen endogén anyagot, amely a benzodiazepin receptor természetes ligandja [48]. Többen vallják, hogy a benzodiazepin és a GABA receptorok funkcionális kapcsolatban vannak, de ez a kérdés még nem tisztázott [49]. Mindenesetre a benzodiazepin receptor biokémiai jellemzése az endogén ligand mi-benlétének ismerete nélkül is elvégezhető, és ennek segítségével új gyógyszermolekulák egyszerűen és gyorsan tesztelhetők.

4. Irodalmi adatok a gasztrin hatásmechanizmusát illetően

A gyomorsav kiválasztást serkentő legfontosabb hormont, a gasztrint Edkins fedezte fel 1905-ben; szerkezetét Gregory és Tracy tisztázta [50]. Az emlősökből izolált gasztrin heptadekapeptid-amid két formában fordul elő, a szulfátésztert tartalmazó és nem tartalmazó hormonok aránya fajonként eltérő. Ettől eltekintve a különböző állatfajokban talált gasztrinok szerkezete nagyon hasonló, ld 1. Táblázat.

A szerkezet-hatás vizsgálatok kimutatták, hogy a molekula karboxilvégi tetrapeptid-amidja rendelkezik a heptadekapeptid valamennyi biológiai hatásával. A gasztrin számos formában fordul elő a keringésben, a G-17 mellett G-34, G-13, G-45 a fő komponensek, de eddig több mint 20 aktív formát azonosítottak.

1. Táblázat: Az emlősökből izolált gasztrinok és egyéb rokon peptidek szerkezete

Hormon	Aminosav-szekvencia	I/II
Emberi gasztrin	Glp-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu ₂ -Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr ^x -Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	1,7
Sertésgasztrin	Met	0,75
Kutyagasztrin	Met Ala	2,0
Marhagasztrin	Val Ala	0,5
Juhgasztrin	Val Ala	0,5
Macskagasztrin	Ala	1,0
Sertés CCK-PZ	1-23-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	
Caerulein	Glp-Gln-Asp-Tyr ^x -Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	
Phyllocaerulein	Glp-Glu-Tyr ^x -Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	
Pentagasztrin	BOC-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	

- 14 -

^x = H a gasztrin I-ben; ^x = SO₃H a gasztrin II-ben, a caeruleinben és a phyllocaeruleinben
 I/II = a gasztrin-I/gasztrin-II arány a szerkezetben

Biológiai vizsgálatokra a legelterjedtebb a pentapeptid használata, melyet pentagasztrinnak nevezünk.

A gasztrin receptor létezésére először a farmakológiai vizsgálatok utaltak, mivel sikerült egyértelmű összefüggést találni az injektált gasztrin mennyisége és a savtermelés között. Amikor saját kísérleteinket megkezdtük, csak egy közvetlen biokémiai bizonyíték volt leírva az irodalomban a gasztrin receptor létezésére vonatkozóan. Lewin és mtársai közölték triciált humán G-17 kötődését patkány gyomor nyálkahártyából tisztított plazmamembránon. Ugyanitt jelentős mértékű adenil cikláz aktiválást tudtak kimutatni [51]. Hasonló méréseket végeztek élő parietális sejteken is [52]. E munkák hiányossága, hogy tulajdonképpen nem különítették el a specifikus kötődést a nem-specifikustól. 1978-ban Brown és Gallagher közölte a ^{125}J -gasztrin specifikus kötődését patkány gyomor nyálkahártya partikuláris frakción [53]. Azonban ezt nem hasonlították össze valamilyen biológiai effektus mérésénél kapott értékekkel. Hasonló rendszerben Johnson és mtársai meghatározták a kötődés kinetikai és egyensúlyi paramétereit [54].

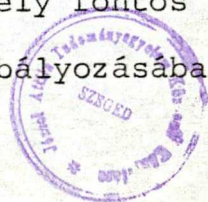
Ugyanakkor jelenleg is számos kutatócsoport vallja, hogy a hisztamin a gasztrin végső mediátora. Ezen irányzat egyik képviselője, Salganik és mtársai szerint [55-56] a gasztrin a hisztidin-dekarboxiláz aktivitását fokozza. Az így felszabadult hisztamin a cAMP-rendszeren keresztül váltja ki a fiziológias választ, a parietális sejtek HCl-termelését.

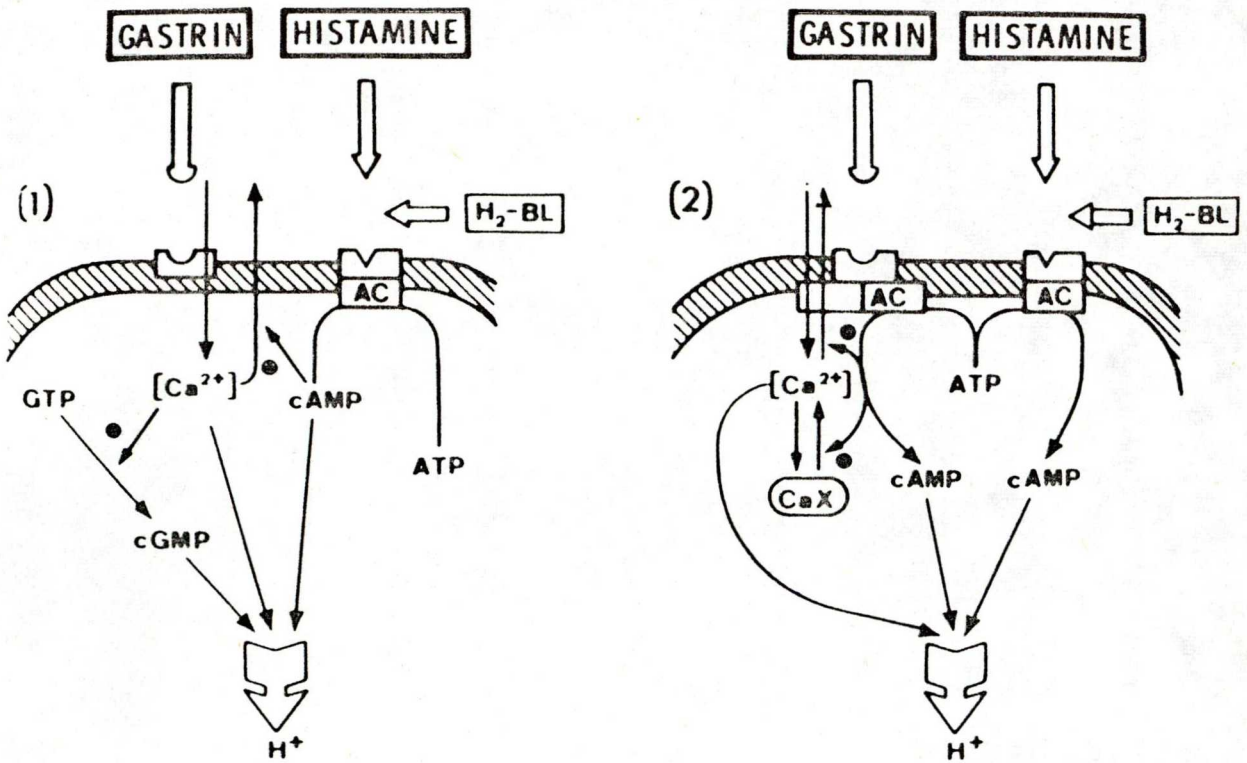
A másik elképzelés a gasztrin savszekréciós hatásában a ciklikus nukleotidok elsődleges szerepére épül /Amer, 1972/

[57]. Eszerint a gasztrin fokozza a foszfodiészteráz aktivitást, s a csökkent cAMP-szint HCl-termelést indukál. Más szerzők szerint [51, 58, 59] viszont a savszekréciót fokozó ágensek adenil cikláz, ill. cAMP-szint emelkedést váltanak ki. Emlősöknél azonban az eredmények különböznek állatfajok szerint. Egy adott állatfaj esetén az in vivo és in vitro vizsgálatok eltérő eredményt adnak. A ciklikus nukleotidok vitatott hatásáról jó összefoglaló Kimberg [60], valamint Jacobson [61] munkája.

A savszekréciót fokozó és gátló interakciókra épül Grossman és Konturek hipotézise [62]. A szerzők feltételezik, hogy a savtermelést fokozó 3 ágens, a hisztamin, a gasztrin és az acetilkolin külön-külön receptoron hat, de a receptorok kölcsönhatásban vannak egymással. Ha valamelyik receptorra kötődik a megfelelő ligand, ennek hatására a másik receptor(ok)/kötő kapacitása megváltozik. E hipotézist látszanak alátámasztani Soll fiziológiás mérései [63]. Több szerző a Ca^{++} -nak tulajdonít fontos szerepet. Szelényi és mtársai szerint [64], feltételezve, hogy a gasztrin és a hisztamin receptor nem azonos, a gasztrin 2 uton válthatja ki a HCl-termelést, ld 1. ábra.

Érdekes megemlíteni, hogy specifikus antiszérum segítségével Rehfeld és mtársai [65] kimutatták a gasztrin jelenlétét a központi idegrendszerben. Ennek fiziológiás jelentőségét eddig még nem sikerült megfejtetni. Különösen figyelemre méltó az endogén gasztrin jelenléte a hipotalamuszban, amely fontos szerepet tölt be az emésztőrendszer működésének szabályozásában.





1. ábra. A sósavtermelés lehetséges mechanizmusa Szelényi szerint.

Tepperman és társai eredményei szerint [66] a gasztrin növelheti a HCl-termelést a hipotalamuszon és a parietális sejteken keresztül egyaránt.

III. CÉLKITÜZÉSEK

A receptorkötési módszer kifejlesztése óta a legkülönbözőbb receptorok jellemzésénél került alkalmazásra. A módszert viszonylagos egyszerűsége és sokoldalúsága teszi kedvelt biokémiai eszközzé. Mint minden metodikánál, itt is az alapelvek ismerete szükséges a megfelelő alkalmazáshoz. E célból, mielőtt a gasztrin receptorának kimutatására irányuló munkát elkezdjük, kerestünk egy olyan rendszert, amely jól mérhető, követi a klasszikus összefüggéseket, így a metodika elsajátítására és a későbbi eredmények összehasonlítására szolgálhat. Így célkitűzéseink a következőkben foglalhatók össze:

1. Az irodalomban található adatokra támaszkodva a diazepám receptor mérésére alkalmas optimális kísérleti feltételek kiválasztása és a rendszer kinetikai és egyensúlyi jellemzése.
2. A gasztrin feltételezett receptorának kimutatása és karakterizálása. Mivel távolabbi célunk a receptor tisztítása volt, kísérleteinket sertés gyomorral végeztük, amelyből a tisztításhoz szükséges nagy mennyiségű kiindulási anyag rendelkezésre áll. A receptorkötési módszer segítségével tanulmányozni kívántuk, hogy
 - a. van-e, ill. kimutatható-e specifikus kötés a célszerven, tehát gyomorban;
 - b. megállapítani, hogy van-e olyan szubcelluláris frakció, amelyben a receptorok "feldusulnak" és kedvező

tulajdonságokkal rendelkeznek a későbbi, esetleges tisztitáshoz;

c. részletesen jellemezni a specifikus kötést.

IV. MÓDSZEREK

Szinaptoszóma preparálás patkány előagyból

A kb. 150-200 g-os CFY patkányokat dekapitálással megöltük, az előagyat 10 tf 0,32 M szacharózban teflon-betétes homogenizátorral homogenizáltuk, négy réteg gézen átszűrtük. A szubcelluláris alkotórészek elkülönítése differenciál-centrifugálással történt Braestrup szerint [67]. A homogenátumot 1000 g-vel 10 percig centrifugáltuk, az üledéket mostuk és újra centrifugáltuk. A két centrifugálás során kapott felül-uszót egyesítettük és 14.000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. Az így nyert üledék a nyers mitokondrium-frakció, P_2 , amelynek további tisztításához a frakciót 0,32 M szacharózban szuszpendáltuk és rárétegeztük egy 1,2 M /0,8 M/ 0,32 M lépcsős szacharóz gradiensre, majd 54.000 g-vel 2 órán át centrifugáltuk /Beckman SW-25.1 rotor/. A cső alján a mitokondriális frakció, az 1,2 M /0,8 M határon a szinaptoszóma frakció, a 0,8 M/ 0,32 M határon a mielin frakció található. Az így kapott szinaptoszómát vagy közvetlenül felhasználtuk, vagy mélyhűtőben lefagyasztva tároltuk. Valamennyi műveletet 0-4 °C-on végeztük.

Receptorkötési kísérletek a diazepam receptor mérésére

A kötési kísérletekhez 87 Ci/mmól (3,22 TBq/mmól) fajlagos aktivitású [N-metil-³H] Diazepamot /Amersham/ hasz-

náltunk. A törzsoldatot etanolban -20°C -on tároltuk; a megfelelő higitásokat 50 mM Tris-HCl pH 7,4 pufferrel végeztük.

Az 1,0 ml végtérfogatu elegy /az egyensulyi mérésektől eltekintve/ 5 nM ^3H -diazepámot, 50 mM Tris-HCl pH 7,4 puffert és 300-600 μg fehérjetartalmu szinaptoszóma készítményt tartalmazott. Az inkubálás 37°C -on 5 percig történt, a reakciót a szinaptoszóma hozzáadásával indítottuk. Az inkubálás végén a reakciót Whatman GF/C üvegfilteren történő vákuum alatti gyors szűréssel állítottuk le. A nem kötődött ligandot 2×10 ml 0°C 50 mM Tris-HCl pH 7,4 pufferrel való mosással távolítottuk el. A szűrés és mosás együttesen kevesebb mint 20 másodpercet igényelt. A filteren maradt radioaktivitást 10 ml Bray-szcintillációs koktélaban Nuclear Chicago szcintillációs számlálóban mértük, 33-37 %-os hatásfokkal. A nem-specifikus kötés mérése hasonló módon 3 μM hideg /nem jelölt/ diazepám jelenlétében történt. Valamennyi mérési pont 3-3 párhuzamos inkubálás eredményének átlaga. A specifikus kötéset az összes és a nem-specifikus kötés különbségeként számoltuk.

Radioaktivitás-méréseknél használt szcintillációs koktélok

Dioxános-koktél /Bray/:

60 g naftalin, 4 g PPO, 0,2 g POPOP, 100 ml metanol,
20 ml etilén-glikol, 1000 ml dioxán

Toluolos-koktél

4 g PPO, 0,2 g POPOP, 1000 ml toluol

Gyomor nyálkahártya szubcelluláris frakcionálása

A disznó gyomrot a Vágóhidről kaptuk, jégben szállítottuk. Fiziológias NaCl-dal alaposan átmostuk, s a felületi nyálkát papírtörülközővel letöröltük. A fundus mucosát /nyálkahártyát/ egy tompa ollóval lekapartuk az alatta levő kötőszöveti rétegről és 10 tf 0,25 M szacharóz, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,4 pufferben homogenizáltuk. 4 rétegen átszűrtük, majd centrifugáltuk, először 300 g-vel 10 percig. Az üledéket szuszpendáltuk a homogenizáló közegben, s újra centrifugáltuk /üledék: "magfrakció", P₁/. Az egyesített felüluszót 20.000 g-vel 15 percig centrifugáltuk, az üledéket mostuk /üledék: "mitokondrium-frakció", P₂/. Az egyesített felüluszót 78.000 g-vel 60 percig centrifugáltuk /üledék: "mikroszóma-frakció", P₃/. Az üledékeket 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA pH 7,4 pufferben homogenizáltuk, és a preparálás napján felhasználtuk. Valamennyi műveletet 4 °C-on végeztük.

Egyes esetekben Johnson [54] módszerét követtük, amely annyiban különbözik a fentiektől, hogy homogenizálás előtt a fiziológias sóban szuszpendált sejteket 300 g-vel 10 percig lecentrifugáltuk, a nyálkát tartalmazó felüluszót kiöntöttük. A sejteket 0,25 M szacharóz, 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7,4-ben homogenizáltuk, majd centrifugáltuk fentiek szerint.

Elektronmikroszkópos feldolgozás

Az egyes frakciókat Karnovsky-féle aldehid rögzítőben, majd foszfát-pufferes mosás után Millonig-féle 1 %-os ozmium tetroxidban rögzítettük. Uranil-acetáttal, majd Reynolds-féle ólom-citráttal festettük. A felvételeket JEOL 100 B elektronmikroszkópon Dr. Párducz Árpád az SzBK Biofizikai Intézetében készítette.

Fehérje meghatározás

Peterson-módszerével történt [68].

Adenozin-trifoszfátázok /ATP-ázok/ aktivitásának mérése

A különböző fémion-dependens ATP-ázok és az 5'-nukleotidáz mérésére az Emmelot, Boss módszert [69] alkalmaztuk Hanoune szerint [70]. A mintákat 37 °C-on 10 percig inkubáltuk, a reakciót triklórecetsav hozzáadásával állítottuk le. A fehérjét centrifugálással eltávolítottuk és a felüluszból meghatároztuk az inorganikus foszfátot Eibl [71] szerint.

Gasztrin-analógok

Az "Acignost" /pentagasztrin injekció VEB Berlin-Chemie/ kivételével a vegyületeket magunk szintetizáltuk.

BOC-Gy-Trp-Met-Asp-PheNH₂, pentagasztrin szintézise lépésenként BOC-aminosav-pentaklórfenilészterek alkalmazásával történt [13].

A mukonil-bisz-tetragasztrint Dr. Seprődi János /SOTE I.sz. Kémiai-Biokémiai Intézet/ és Dr. Penke Botond /SZOTE, Orvos-vegytani Intézet/ szintetizálták mukonsav-pentafluorfenil-észter segítségével /közlés alatt/.

A vegyület tríciumos jelölését Dr. Tóth Géza /SZBK, Izotóplaboratórium/ végezte Pd/Al₂O₃ katalizátorral dimetilformamid oldószerben. A nyers termék tisztítása vékonyréteg-kromatográfián Silikagel-DC-Fertigplatten-60 lapon etil-acetát: piridin : jégecet : viz = 120:20:6:11 oldószerkelemben történt. A tisztított termék kromatográfián egységes, fajlagos aktivitása 60 Ci/mmól (2,22 TBq/mmól). Metanolban oldva -20 °C-on tároltuk, hígítása 50 mM Tris-HCl pH 7,4-ben történt.

Biológiai aktivitás meghatározások

A SZOTE I. sz. Belklinikán történtek, patkányban a Lawrence-féle konduktometriás módszerrel [72] vagy kutyában az un. Heidenhain-féle kisgyomorral.

Kötési kísérletek dimer-tetragasztrinnal

A kötési kísérleteket a 60 Ci/mmól fajlagos aktivitású ³H-adipoil-bisz-tetragasztrin /ABTG/ segítségével végeztük. A 600 µl térfogatú reakcióelegy általában 10 nM ³H-ABTG-t, 50 mM Tris-HCl pH 7,4 puffert tartalmazott. A reakciót a fehérje hozzáadásával indítottuk, s szobahőn 4 percig inkubáltuk.

A reakció befejezésére 500 μ l térfogatu aliquotot Whatman GF/C filterre szűrtünk vákuum-szivatás mellett. A filtereket 2x10 ml 0 °C 50 mM Tris-HCl pH 7,4 pufferrel mostuk. Egy éjszakán át szobahőn száradni hagytuk, majd 10 ml toluolos koktélba helyezve a radioaktivitást Nuclear Chicago szcintillációs számlálóban mértük 40-44 % hatásfokkal. A nem-specifikus kötést 10^{-5} M BOC-pentagasztrin jelenlétében határoztuk meg. Valamennyi inkubálást 3-3 párhuzamosban végeztünk. A specifikus kötést az összes és a nem-specifikus kötés különbségeként számoltuk.

A disszociációs kísérleteket a következőképpen hajtottuk végre. A mitokondrium-frakciót /1-1,6 mg fehérje/ 10 nM 3 H-ABTG-vel inkubáltuk 50 mM Tris-HCl pH 7,4 pufferben 400 μ l végtérfogatban az egyensúly eléréséig, 10 percig szobahőn. Ekkor 100 μ l-es aliquotokat /3 paralel/ pipettáztunk a/ 10 ml szobahőmérsékletű 50 mM Tris-HCl pH 7,4 pufferbe /100-szoros higitás/; b/ egy másik csőből 100 μ l-eket 10^{-6} M BOC-pentagasztrint tartalmazó 10 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,4-be /100-szoros higitás +hideg ligand/. A higitás után a 6 cső tartalmát azonnal szűrtük /t=0/. A higitás után további időpontokig inkubálva, majd leszűrve a disszociáció mértékét a különböző időpontokban hasonlóan határoztuk meg. A filtereket 2x10 ml 0 °C 50 mM Tris-HCl pH 7,4-gyel mostuk, a radioaktivitást szobahőn, 1 éjszakán át történő szárítás után toluolos koktélban mértük.

V. EREDMÉNYEK

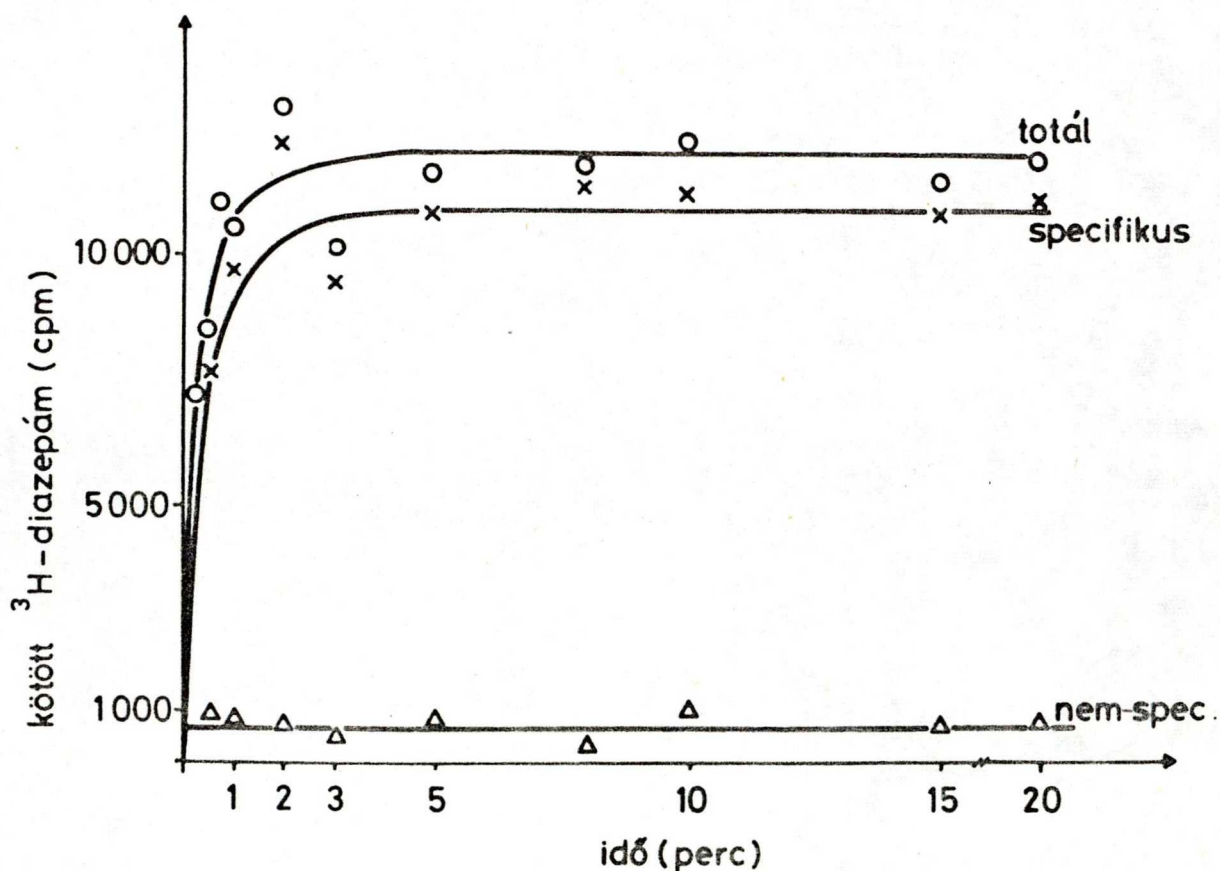
1. ^3H -diazepám kötődésének jellemzői patkány előagy szinaptoszómában

Irodalmi adatok alapján [46-47] ismert a diazepám receptor megoszlása a különböző agyterületeken. A legtöbb diazepám receptor az előagyból tisztított szinaptoszómán fordul elő [46].

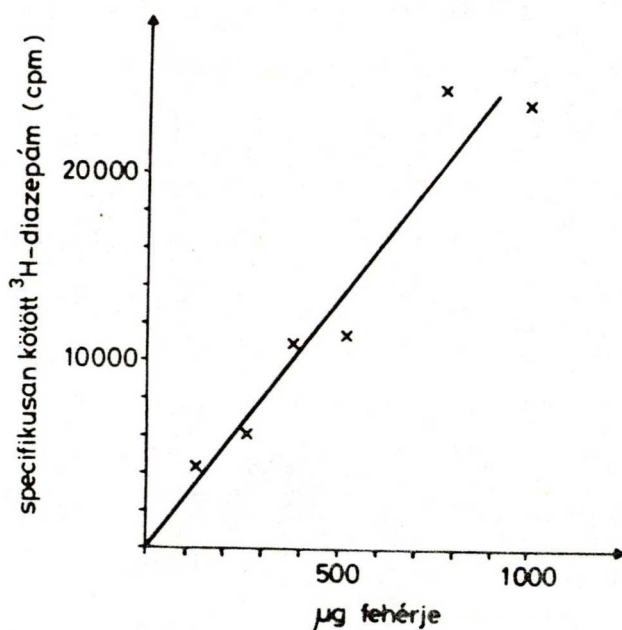
Vizsgáltuk a ^3H -diazepám kötődésének időbeli lefolyását patkány előagy szinaptoszóma frakcióban $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A nem-specifikus kötés, amelyet $3\text{ }\mu\text{M}$ nem jelölt diazepám jelenlétében mértünk, rendkívül alacsony érték, az összes kötésnek 7-8 %-a. Mint az a 2. ábrán látható, a nem-specifikus kötés pillanatszerűen kialakul és a továbbiakban nem változik. A specifikus kötés, amelyet tehát az összes és a nem-specifikus kötés különbségeként számolunk, 4-5 percig növekszik, azután egyensúlyi értéket ér el. Ez az érték az összes bevitt radioaktivitásnak 2-3 %-a, ha a kötést 5 nM ^3H -diazepám jelenlétében mérjük. A további kísérleteket 5 perces inkubálási idővel végeztük.

Egy adott ligandkoncentrációnál az egyensúlyi értékek arányosak a fehérje mennyiségével, 3. ábra. A legtöbb kísérletben $300\text{-}600\text{ }\mu\text{g}$ fehérjével dolgoztunk.

A specifikus kötés koncentrációfüggő és $50\text{-}100\text{ nM}$ ^3H -diazepám koncentrációnál telítési értéket ér el, ami megfelel a receptorhelyek telítésének.



2. ábra ^3H -diazepám kötődésének időfüggése 37°C -on patkány előagy szinaptoszómán. 5 nM ^3H -diazepám, $320\text{ }\mu\text{g}$ szinaptoszóma fehérje. A nem-specifikus kötést (Δ) $3\text{ }\mu\text{M}$ hideg diazepám jelenlétében határoztuk meg. A specifikus kötést (X) a totál- és a nem-specifikus kötés különbségeként számoltuk.



3. ábra Specifikus ³H-diazepám kötés változása a fehérje mennyiségével 5 nM ³H-diazepám jelenlétében.

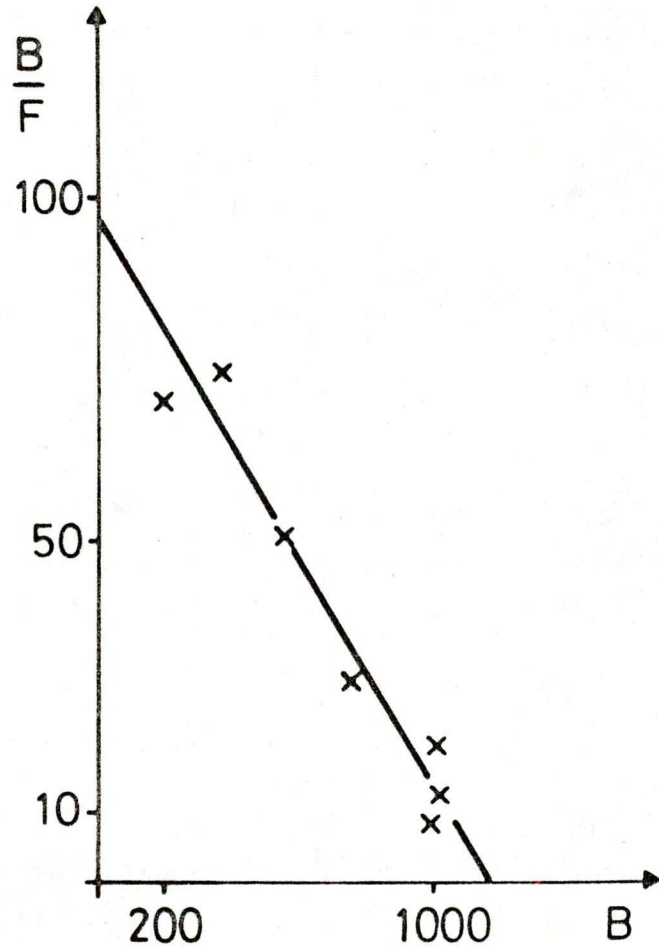
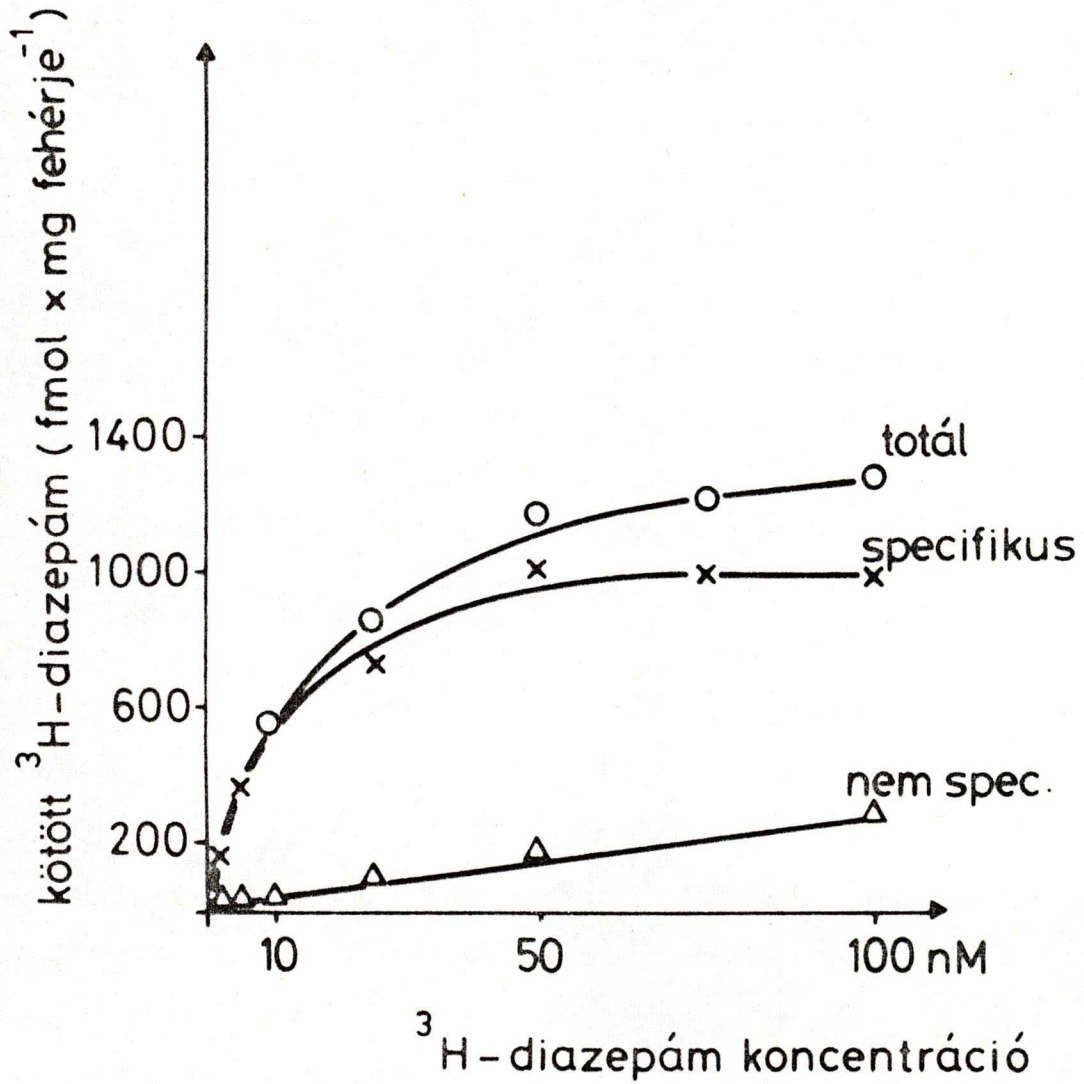
A 4. ábra ugyanakkor mutatja, hogy a nem-specifikus kötés a koncentráció növelésével lineárisan nő, nem ér el telítést, ami megfelel a nem-specifikus helyek gyakorlatilag végtelen kapacitásának. A kötést jellemző egyensúlyi paraméterek meghatározása az ún. Scatchard-féle ábrázolás segítségével történhet. Mivel ez az ábrázolás egy egyenest eredményezett, ez arra utal, hogy csak egyféle kötőhely van és kooperatív kölcsönhatások nem jelentkeznek. A disszociációs állandó, $K_D=12,8$ nM /ez számszerűleg a féltelítéshez szükséges ³H-diazepám koncentrációt adja meg/.

A kötőhelyek száma, $B_{max}=1187$ fmol/mg fehérje.

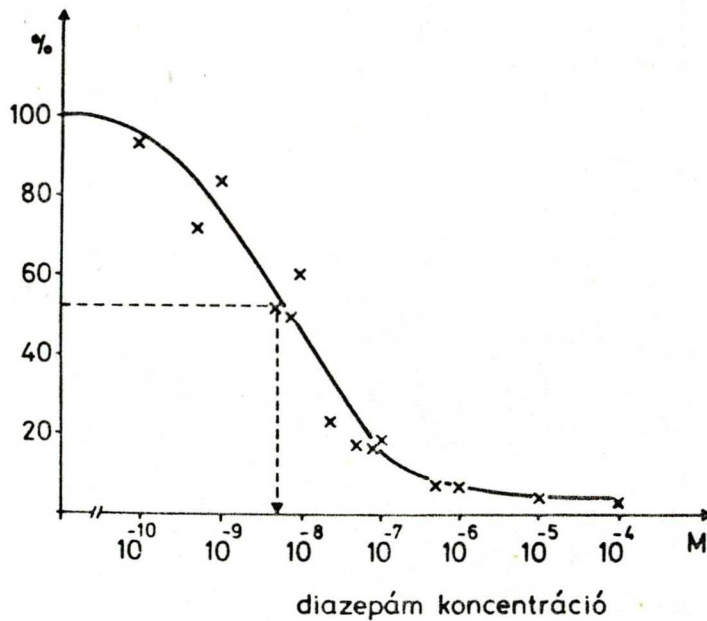
4. ábra A/ ^3H -diazepám kötődése patkány előagy szinaptoszómában a diazepám koncentráció függvényében. A specifikus kötés (X) a totál kötés (O) minusz az a kötés, melyet 3 M hideg diazepám nem szorít le (Δ).

B/ A specifikus kötés Scatchard-analizise.

B a kötött ligand mennyisége egyensúlyban, $\text{fmolxmg fehérje}^{-1}$. F a szabad ligand koncentrációja, nM. Az egyenes illesztése regressziós analízissel történt, a regressziós koefficiens, $r=-0,97$.



Különböző ligandok diazepam receptorhoz való kötődésének meghatározására az un. leszorítási görbe alkalmas. Ilyenkor állandó, a K_D körüli izotóp koncentráció mellett a nem jelölt, vizsgálandó anyagok koncentrációját növeljük. Az egyes anyagok hatékonyságának jellemzésére az un. IC_{50} érték szolgál, vagyis a nem jelölt ligandnak az a koncentrációja, amely a jelölt ligand specifikus kötődésének 50 %-os gátlását okozza. Egy ilyen típusu kísérletet mutat az 5. ábra. /Ezen az ábrán az összes kötés van feltüntetve, nem a specifikus, ezért nem az 50 %-os érték van levetítve!.

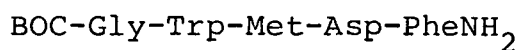


5. ábra 3H -diazepam /5 nM/ kötődésének változása a hideg diazepam koncentrációjának függvényében. 100 % az az érték, amikor hideg ligand nincs jelen.

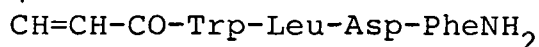
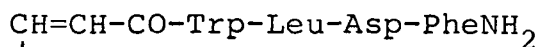
2. Receptorkötési kísérletek dimer-tetragasztrinnal

2.1. A gasztrin kötés mérésére használt analógok biológiai aktivitása

A mukonil-bisz-tetragasztrin egy új, az irodalomban eddig le nem írt gasztrin-analóg. Biológiai aktivitása patkányban a Lawrence-módszerrel [72] mérve 7,5-szer nagyobb a pentagasztrinénál. Érdekes, hogy kuttyában a dimer-tetragasztrin és a pentagasztrin biológiai aktivitása azonos. A vegyület tríciumos jelölése 60 Ci/mmól (2,22 TBq/mmól) specifikus aktivitású anyagot eredményezett. A ³H-adipoil-bisz-tetragasztrin /³H-ABTG/ biológiai aktivitása a pentagasztrinéhoz hasonló. Receptorkötési kísérleteinkhez ezt a dimer-tetragasztrint használtuk, mivel a pentagasztrin tríciumos jelölése csak 3,7 Ci/mmól fajlagos aktivitást eredményezett, amely nem elegendő a receptorok tanulmányozásához.



pentagasztrin



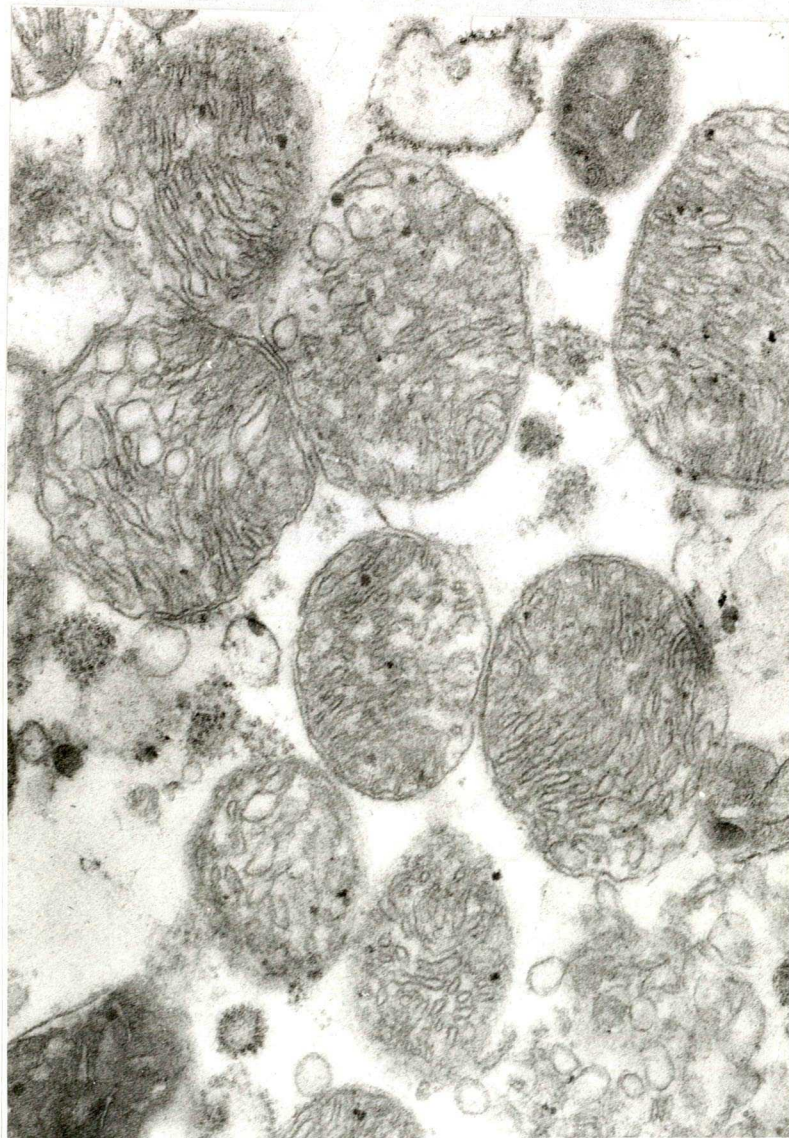
mukonil-bisz-tetragasztrin

2.2. Gyomor nyálkahártya szubcelluláris frakciók jellemzése

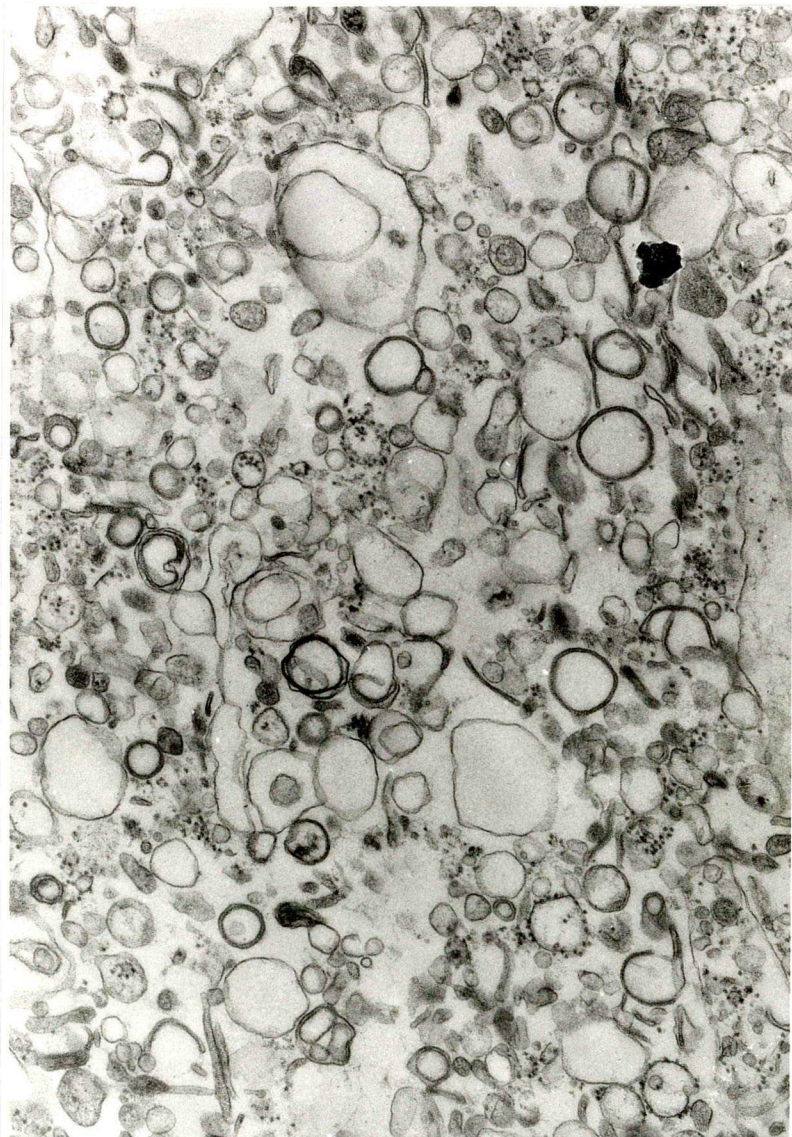
Kísérleteink első részében arra a kérdésre kerestünk választ, hogy van-e olyan biológiai preparátum, amelyen specifikus gasztrin kötés kimutatható. Ezért sertés és patkány gyomor fundus nyálkahártyából differenciál-centrifugálással különböző frakciókat állítottunk elő /Ld Módszerek/. Az egyes frakciókat elektronmikroszkópos felvételekkel és markerenzim-mérésekkel azonosítottuk. A jellemző sejtalkotók alapján az egyes üledékeket "mag"- /P₁/, "mitokondrium"- /P₂/ és "mikroszóma"- /P₃/ frakciónak neveztük el. A 6-8. ábra a sertés gyomorból kapott elektronmikroszkópos képeket mutatja.



6. ábra Sertés gyomor P₁ frakció elektronmikroszkópos képe
15.000-szeres nagyítás.



7. ábra Sertés gyomor P_2 frakció elektronmikroszkópos képe
50.000-szeres nagyítás.



8. ábra Sertés gyomor P_3 frakció elektronmikroszkópos képe
30.000-szeres nagyítás.

Az elektronmikroszkópos felvételek mutatják, hogy a P_2 frakció főként mitokondriumot tartalmaz, de egyéb organellek, endoplazmás retikulum, plazmamembrán is előfordulnak benne. A 2. táblázat az egyes készítmények ATP-áz aktivitását tünteti fel.

2. Táblázat Különböző ATP-ázok megoszlása sertés fundus nyálkahártya szubcelluláris frakciói között

	Na^+, K^+ -ATP-áz		Mg^{++} -ATP-áz		Ca^{++} -ATP-áz	
	spec.akt.	%	spec.akt.	%	spec.akt.	%
H	0,4	-	2,9	-	2,4	-
P_1	0,3	16	2,6	19	2,2	14
P_2	0,5	26	3,8	28	4,0	25
P_3	0,9	47	6,6	48	9,5	59
S	0,2	11	0,8	6	0,5	3

Az enzim aktivitások $\mu\text{mol } P_i \text{ x mg fehérje}^{-1} \text{ x óra}^{-1}$ egységben vannak megadva.

Irodalmi adatok [73] alapján ismert, hogy patkány gyomorban a Mg^{++} -ATP-áz összes aktivitásának 75 %-a származik a plazmamembránból, míg 24 %-a a mitokondriumokból. Így a plazmamembrán előfordulásáról az 5'-nukleotidáz enzim megbízhatóbb adatokat nyújt. Méréseink szerint sertés gyomorban az enzim-



aktivitás megoszlása a következő: 28 % a P₁-ben, 24 % a P₂-ben, 42 % a P₃-ban és 6 % a felüluszóban található.

2.3. A specifikus kötés szubcelluláris megoszlásának vizsgálata sertés gyomorban

Mivel távolabbi célunk a gasztrin receptor tisztítása volt, amennyiben erre alkalmas rendszert találunk, a kötési kísérletekhez elsősorban sertés gyomrot használtunk, amelyből a tisztításhoz szükséges nagymennyiségű kiindulási anyag rendelkezésre áll. A differenciál-centrifugálással előállított frakciók mindegyikében több koncentrációban megmértük a radioaktív dimer-tetragasztrin. /³H-ABTG/ kötődését, hogy megállapítsuk a specifikus kötés előfordulását, illetve megoszlását az egyes frakciók között /Ld 3. Táblázat/. A nem-specifikus kötést 10⁻⁵ M pentagasztrin jelenlétében határoztuk meg. Ezt a választást több szempont indokolta, egyrészt a pentagasztrin és a ³H-ABTG biológiai aktivitása hasonló, míg a telitetlen mukonil-bisz-tetragasztriné 7,5-ször több és ez megnehezítené az eredmények matematikai értékelését; másrészt a 10⁻⁵ M-os koncentrációt az indokolja, hogy a nem-specifikus kötés ilyen módon, hideg liganddal történő elkülönítésében a nem jelölt ligandnak 500-1000 x-es feleslegben kell lennie.

Amint az a 3. Táblázatból látható, a specifikus kötés valamennyi alkalmazott koncentrációnál csak a P₂ frakcióban található és az abszolút értékek is itt a legnagyobbak,

Mivel ennek mérése a magas nem-specifikus kötés mellett nehéznek bizonyult, a továbbiakban a specifikus hányad növelésére törekedtünk.

3. Táblázat. ^3H -adipoil-bisz-tetragasztrin specifikus kötődése sertés gyomor szubcelluláris frakciókban

be- vitt ^3H -ABTG	Speci- fikus kötés	P_1	P_2	P_3
		$\frac{\text{cpm}}{\text{mg fehérje}}$	$\frac{\text{cpm}}{\text{mg fehérje}}$	$\frac{\text{cpm}}{\text{mg fehérje}}$
1,5 nM		0	965	244
6 nM		0	1093	50
15 nM		0	7461	155
60 nM		39	5170	0

A nem-specifikus kötést 10^{-5}M pentagasztrin jelenlétében mértük. A specifikus kötést az összes és a nem-specifikus kötés különbségeként számoltuk.

Gondolhattunk arra, hogy a gasztrin receptor labilis, amely a homogenizálás során károsodást szenved, ezért a teflon-betétes homogenizátoron kívül egyebeket, pl. Dounce kézi homogenizálót, Braun-Potter S-t is kipróbáltuk. Változtattuk a homogenizáló oldat összetételét, pl. ditiotreitolt, Mg, K-iont, EDTA, EGTA-t alkalmaztunk. Később kipróbáltuk a Johnson és mtársai által [54] leirt módszert. Mindezek a módosítások lényeges változásra nem vezettek, így a Módszerek

című fejezetben leírt preparálást alkalmaztuk.

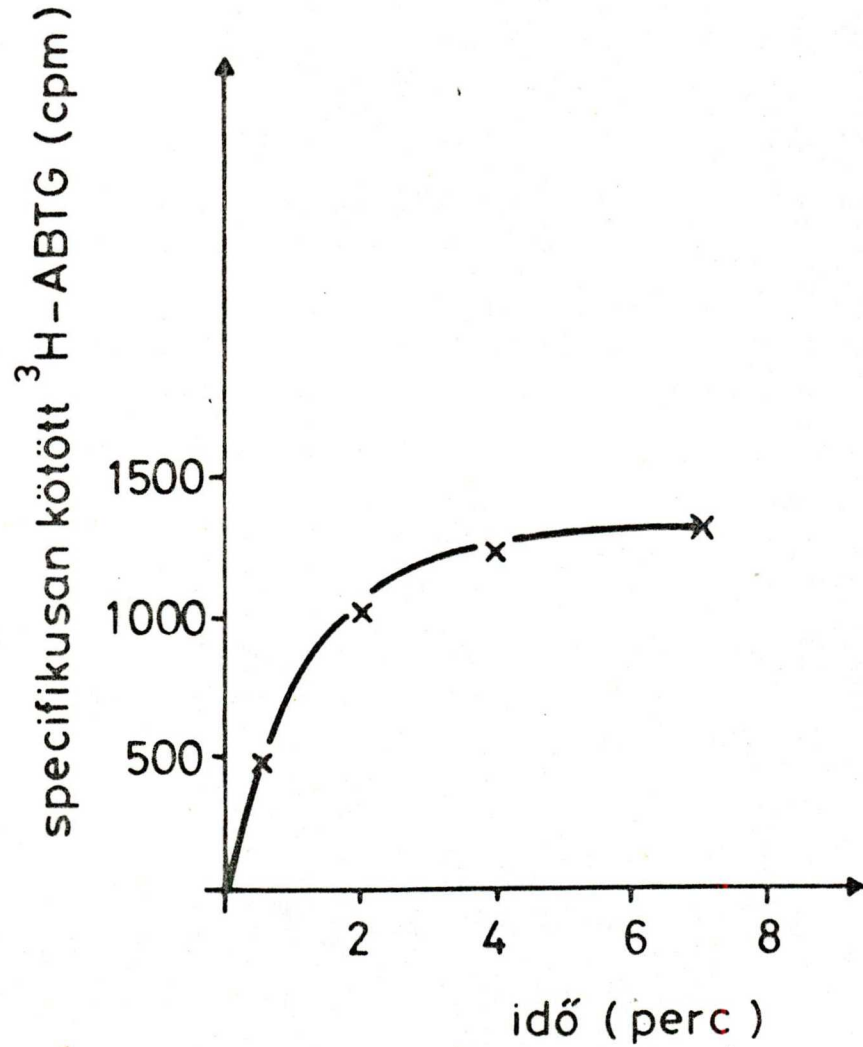
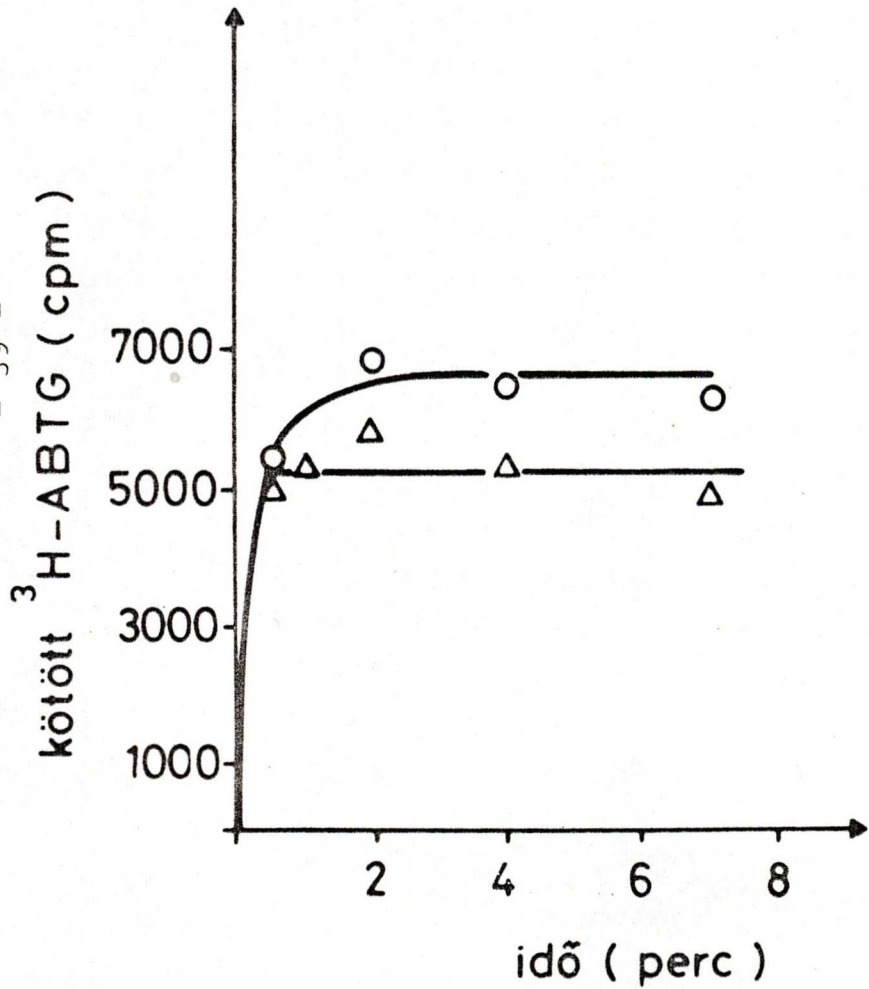
Összehasonlításképpen patkány gyomor nyálkahártyából előállított partikuláris frakciókban is megmértük a ^3H -ABTG kötődését, ill. a specifikus kötés megoszlását az egyes frakciók között. Azonban nem találtunk egy olyan frakciót, amelyben a specifikus kötés "feldusulna", hanem mindhárom frakcióban előfordult és az összes kötésnek csak egy kis hányadát alkotta /az adatok nincsenek feltüntetve/.

2.4. A kötődés jellemzői sertés gyomor "durva mitokondrium" frakcióban

Miután több kísérletben meggyőződünk arról, hogy a specifikus kötés a P_2 , az un. mitokondrium készítményben található, a továbbiakban főként ezzel a frakcióval dolgoztunk. Meg kell jegyezni, hogy valamennyi preparátumot csak frissen használhattunk, tárolás közben elvesztették aktivitásukat. Így nem lehetett tárolni $+4\text{ }^\circ\text{C}$, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on, sőt cseppfolyós nitrogénben sem, sem üledék, sem szuszpenzió formájában. Ugyancsak sikertelen volt a P_2 frakció tisztítására irányuló kísérletünk folyamatos szacharóz gradiensben.

A 9. ábrán feltüntettük az összes, a nem-specifikus és a specifikus kötés változását az idővel szobahőmérsékleten. A specifikus kötés gyors és már 4 perc körül eléri az egyensúlyi értéket. A nem-specifikus kötés pillantszerűen kialakul és nem változik az idővel. A specifikus kötés fehér-

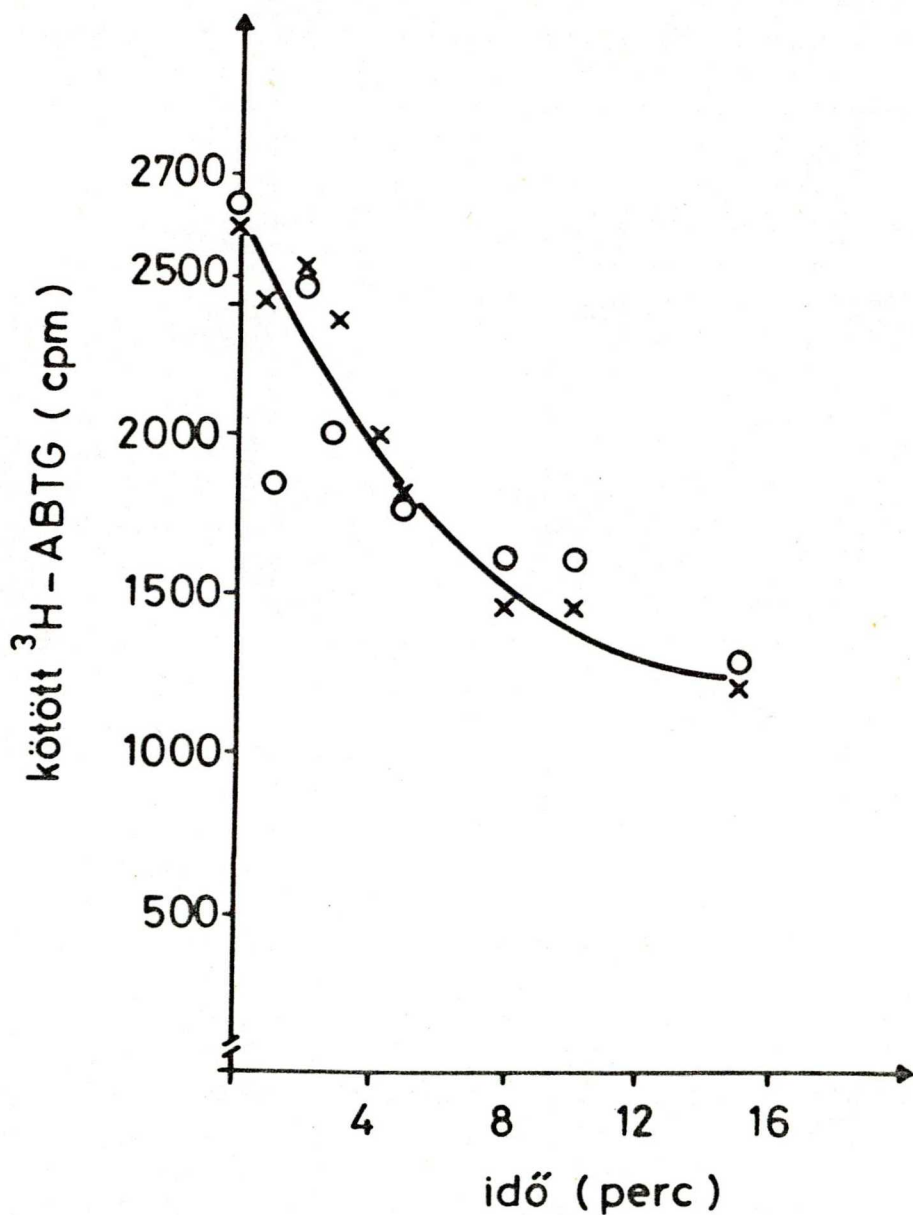
9. ábra ^3H -adipoil-bisz-tetragasztrin (^3H -ABTG) kötődésének időfüggése sertés gyomor P_2 frakcióban szobahőmérsékleten. Az összes kötést (O) $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ^3H -ABTG jelenlétében mértük. A nem-specifikus kötés (Δ) elkülönítése 10^{-5}M BOC-pentagasztrinnal történt. A specifikus kötést (X) az összes és a nem-specifikus kötés különbségeként számoltuk.



jefüggését vizsgálva azt találtuk, hogy az $\approx 500 \mu\text{g}$ fehérje/min-ta értékig lineáris.

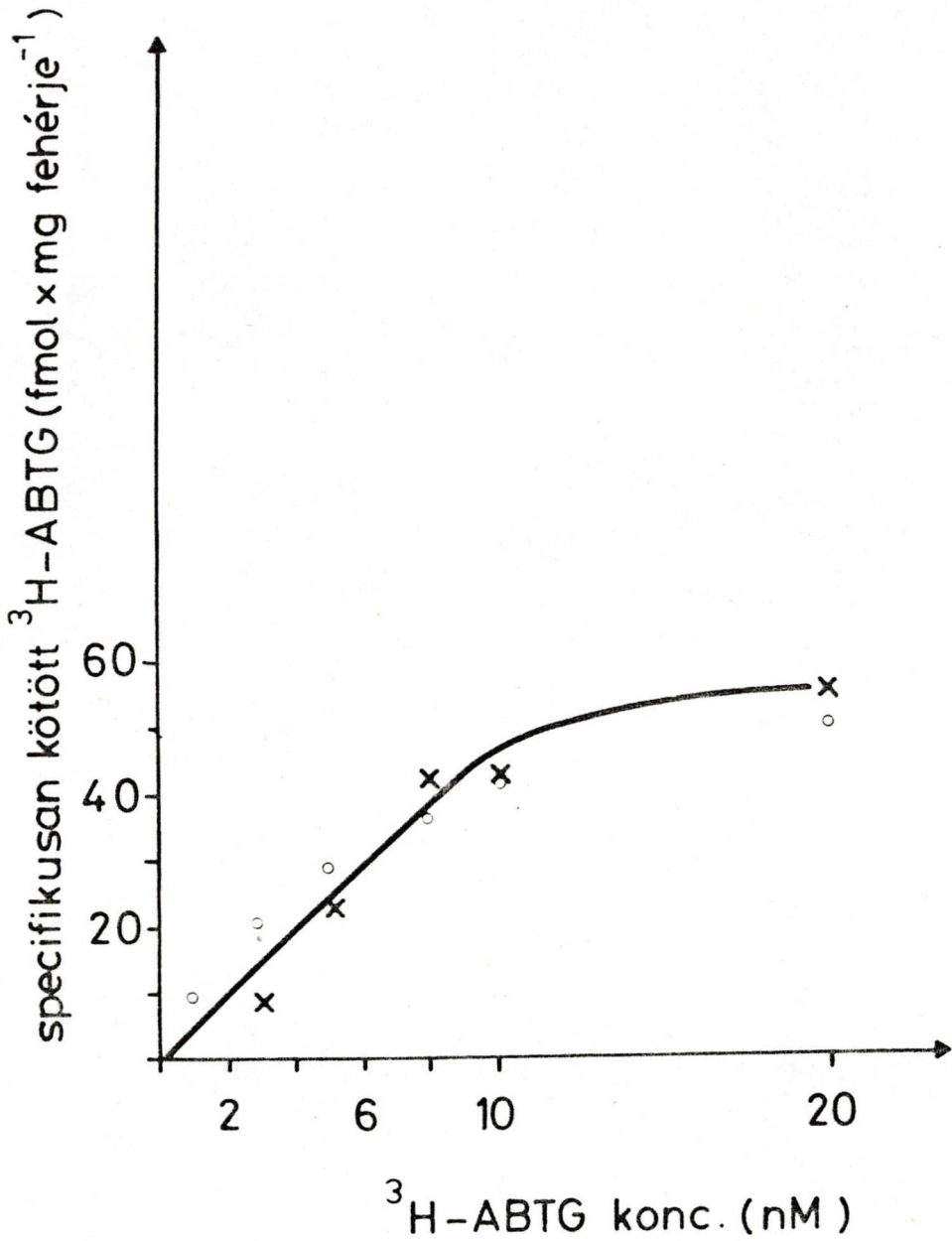
A disszociáció lefolyását oly módon vizsgáltuk, hogy 10 perces inkubálás után a mintákat 100-szorosára hígítottuk egyrészt pufferben, másrészt nem jelölt pentagasztrin jelenlétében. Mivel a hideg ligand jelenlétében a disszociáció sebessége nem változott meg /ld 10. ábra/, ez arra utal, hogy a kötőhelyek között nincs kooperativitás [74]. A módszer alapfeltétele, hogy az izotóp koncentrációt alacsony értéknek választva a kötőhelyeknek csak kis hányada legyen elfoglalva. Mivel esetünkben a ^3H -ABTG fajlagos aktivitása határt szabott az izotóp koncentráció csökkentésének, a fenti követelménynek úgy próbáltunk eleget tenni, hogy a szokásosnál 6-7-szer több fehérjét alkalmaztunk.

A kötődés koncentrációfüggését vizsgálva érdekes jelenséget találtunk. A nem-specifikus kötés elkülönítésére 2 ligandot használtunk, az egyik az általunk szintetizált és a többi kísérletben általánosan használt pentagasztrin volt, a másik az "Acignost" nevű pentagasztrin-injekció. Ez utóbbival 2-3-szor nagyobb leszorításokat kaptunk, mint az általunk szintetizált pentagasztrinnal, de az "Acignost" az üvegfilteren is leszorítást eredményezett, ami azt jelentené, hogy az üvegfilteren is látszólagos "specifikus" kötések vannak. Hasonló esetekről az irodalomban is olvashatunk, ld. [29, 31]. A jelenség okát nem ismerjük, okozhatja az injekció valamelyik komponense, mindenesetre kizárja az "Acignost" alkalmazását receptorkötési kísérletekben.



10. ábra ^3H -adipoil-bisz-tetragasztrin ($^3\text{H-ABTG}$) időbeli diszszociációja sertés gyomor P_2 frakcióban. 10 perces inkubálás után a mintákat 100-szorosra hígítottuk pufferben (X) illetve 10^{-6}M BOC-pentagasztrint tartalmazó pufferben (O) és különböző időpontokban mértük a kötött radioaktivitást.

A 11. ábra a specifikus kötés koncentrációfüggését mutatja. A specifikus kötés 10-20 nM ^3H -dimer-tetragasztrin koncentrációknál telítést ér el, a telítési érték 50-60 fmol/mg fehérje. E tartomány felett a nem-specifikus kötés olyan magas, hogy elfedi a specifikus kötést. A kötési paraméterek, K_D és B_{\max} pontos meghatározásához figyelembe kellett vennünk, hogy egy dimer liganddal dolgozunk. Mivel az irodalomban nem talákoztunk hasonlóval, levezettünk egy összefüggést, amely leírja a receptorhoz kötött ligand mennyiségét a dimer ligand koncentrációjának függvényében /ld. Az eredmények megvitatása, 49. old./ A kapott egyenlet alapján számítógépes görbeillesztést végeztünk. A mért és az elméletileg számított értékeket a 11. ábrán tüntettük fel. A számítógépes értékelés szerint az adipoil-bisz-tetragasztrin látszólagos kötődési paraméterei: $B_{\max}=60$ fmol/mg fehérje; az affinitási állandó: $2K=0,2 \cdot 10^9 \text{M}^{-1}$, a disszociációs állandó $K_D=5$ nM.



11. ábra A ^3H -adipoil-bisz-tetragasztrin ($^3\text{H-ABTG}$) specifikus kötésének változása a ligand koncentráció függvényében sertés gyomor P_2 frakcióban.

X: mérési pontok

O: elméleti görbe alapján számított pontok

VI. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Elektrofiziológiai, farmakológiai és magatartási tanulmányok nyújtották az első információkat arra vonatkozóan, hogy az idegrendszerre ható gyógyszerek valószínűleg a neurotranszmitter receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. A receptorkötési módszer kialakulása ezt a feltételezést bizonyította. A benzodiazepinek széles hatásspektruma és alacsony toxicitása indokolja, hogy az utóbbi időben az érdeklődés középpontjába kerültek. Mivel egyetlen eddig ismert neurotranszmitter sem kötődik számottevő affinitással a diazepam receptorhoz [67], nagyszabású kutatások indultak, hogy megtalálják a receptor endogén ligandját.

Kísérleti körülményeink között az előagyból tisztított szinaptoszóma frakcióban a specifikus kötés az összes kötésnek 92-93 %-át teszi ki. Az asszociáció sebességét mérve azt kaptuk, hogy 37 °C-on az egyensúly gyorsan beáll, 1 perces inkubálásnál már eléri az egyensúlyi érték több mint 80 %-át, és 4-5 perc után az egyensúlyi értéken marad, ld. 2. ábra. Ezzel szemben 0 °C-on az egyensúly eléréséhez 30 percre van szükség [46].

A telítési görbe Scatchard-analízisét elvégezve /ld 4. ábra/ egy egyenest kaptunk, amely arra utal, hogy a diazepam kötődése a bimolekulás, reverzibilis reakciókra érvényes összefüggés szerint történik, ahol mind a receptor, mind a ligand homogén és nincsenek kooperatív kölcsönhatások. A disszociációs állandó, $K_D=12,8$ nM, a kötőhelyek száma 1,2 pmol/mg szinaptoszóma fehéreje.

Irodalmi adatok szerint [75] a disszociációs állandó a hőmérséklet növekedésével nő, ugyanakkor a receptorok száma csökken. Fenti szerzők 0 °C-on a disszociációs állandóra 3,8 nM, 37 °C-on 24 nM értéket határoztak meg. Más szerzők [46] mérései alapján 0 °C-on a $K_D=14,8$ nM, $B_{max}=363$ fmol/mg szinaptoszóma fehérje. A fenti értékeket összehasonlítva az általunk kapott eredményekkel megállapíthatjuk, hogy azok jó egyezésben vannak. A kötőhelyek számára kapott magas érték azt mutatja, hogy szinaptoszóma készítményünk nagy tisztaságu volt. Ugyancsak ezt látszik alátámasztani, hogy viszonylag kis mennyiségű 300-600 µg/ml inkubációs elegy fehérje volt szükséges, míg az irodalomban 4 mg fehérje/minta alkalmazásáról olvashatunk [46].

Miután a kísérleti körülményeket optimalizáltuk, lehetőség van új benzodiazepin származékok vizsgálatára. A receptorkötési módszer előnye, hogy gyors, megbízható és néhány mg anyaggal elvégezhető. Az EGYT-vel együttműködve új, az eddigieknél szelektivebb benzodiazepin analógok előállítását tervezzük.

A receptorkötési módszer más irányú felhasználási területe a biológiailag aktív anyagok specifikus kötőhelyeinek kimutatása. A gyomor sósavtermelését fokozó hormon, a gasztrin esetén a specifikus kötőhelyek feltételezése több szempontból indokolt [76]. Ugyanakkor e kötőhelyek kimutatása nagy nehézségekbe ütközik. Egyes autoradiográfiás vizsgálatok [77] nem tudták kimutatni a pentagasztrinnak a parietális sejteken való kötődését, más vizsgálatok szerint [78] ugyan megkötődik, de a radioaktivitás a beadás után 2 perccel eltűnik a parietális sejtekről.



Receptorkötési kísérleteinkhez egy olyan radioaktív ligandra volt szükségünk, amely nagy specifikus aktivitással rendelkezik és lehetőleg önerőből elő tudjuk állítani. A pentagasztrin ugyan rendelkezik a teljes gasztrin valamennyi biológiai hatásával, ennek tríciumos jelzésekor csak 3,7 Ci/mmol specifikus aktivitást kaptunk, amely nem elegendő a receptorok vizsgálatához. Seprődi korábban tapasztalta, hogy az LH-RH dimerizálása a biológiai aktivitás jelentős növekedéséhez vezet [79]. Az ő ötlete alapján a SZOTE Peptidkémiai Csoportjával közösen szintetizálták a mukonil-bisz-tetragasztrint. A dimer tríciumos jelölése 60 Ci/mmol specifikus aktivitású anyagot eredményezett, amelynek biológiai aktivitása megegyezett a pentagasztrinével. Így ez megfelelő ligand a receptorkötési vizsgálatokhoz.

Elsődleges célunk egy olyan preparátum keresése volt, amelyben a specifikus kötés kimutatható. A differenciál-centrifugálással kapott frakciókat elektronmikroszkópos felvételekkel és markerenzim-mérésekkel jellemeztük. A legnagyobb specifikus kötést a sertés gyomorból 20.000 g-vel előállított üledékben kaptuk. Ez a frakció főként mitokondriumot tartalmaz, de plazmamembrán, endoplazmás retikulum, lizoszóma szintén található benne.

Hasonló eredményre jutott Brown és Gallagher [53]; valamint Johnson és mtsai [54] is. Lewin és mtsai [51] viszont a gasztrin "receptor" mikroszómális előfordulásáról számoltak be, ahol az 5'-nukleotidáz aktivitás, vagyis a plazmamembrán mennyisége a legnagyobb. E munka hibája azonban, hogy valójában a ³H-gasztrin összes kötését mérték, a nem-specifikus komponenst nem külö-

nitették el. A kétféle eredmény származhat a preparálási módszerek különbözőségéből, vagy hasonlóan az inzulinhoz, a gasztrin receptor is esetleg több sejtorganellel helyezkedhet el. Elképzelhető, hogy a gasztrin receptor a mitokondriumokon helyezkedik el, amelyek feltűnően nagy száma jellemzi a parietális sejteket. A gasztrin receptor pontos szubcelluláris lokalizációjának megállapítása azonban természetesen csak parietális sejtekből tisztított sejtalkotókkal lehetséges.

Méréseink során problémát jelentett a magas nem-specifikus kötés. Ennek egyik oka lehet a gasztrin molekula negatív töltése és a pozitív töltésű sejtalkotók közötti kölcsönhatás [80]. A másik ok a gyomor heterogenitása. A parietális sejtek, melyekben a HCl-termelés történik, a gyomor sejtpopulációjának csak kb. 1 %-át, a nyálkahártyáénak 10 %-át alkotják. A parietális sejtek izolálására jelenleg alkalmazott módszerek kitermelése azonban rendkívül alacsony. Valamennyi módszert enzimes emésztés /kollagenáz, pronáz/ vezet be, amely károsíthatja a sejtek felismerő funkciójában szerepet játszó glükoproteid-burkot. Ez lehet a magyarázata, hogy kutyából izolált parietális sejteken nem tudtunk megfelelő specifikus kötést mérni. A parietális sejtekkel való munka csak megfelelő módszerek kidolgozása után válik lehetővé.

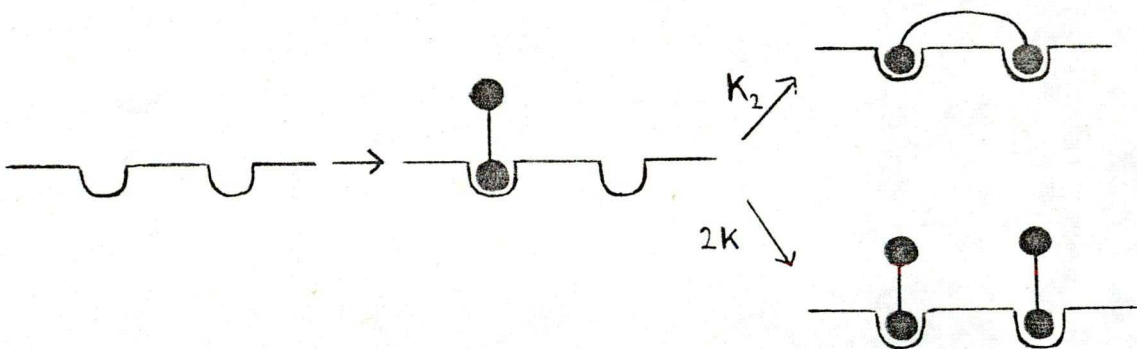
A sertés gyomorból 20.000 g-val előállított üledékben vizsgáltuk az asszociáció időbeli lefolyását /ld 9. ábra/. A kötődés gyors, szobahőmérsékleten már 4 perc körül eléri az egyensúlyi értéket.

A De Meyts-féle [74] disszociációs kísérlettel arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a kötőhelyek között van-e koope-

rativitás. Eszerint a receptorhoz kötött radioaktív ligand disszociációjának sebességét mérve, feltéve, hogy a disszociált ligand újra nem kötődhet, a nem jelölt ligand jelenléte megváltoztatja a disszociáció sebességét, amennyiben a kötőhelyek között kooperativitás van. A módszer alapfeltétele, hogy az izotóp koncentrációt alacsony értékek választva a receptorhelyeknek csak kis hányada legyen elfoglalva.

A 10. ábrán bemutatott kísérlet szerint a hideg ligand nem befolyásolta az izotóp higitás utáni disszociációját, így valószínű, hogy a kötőhelyek között nincs kooperativitás.

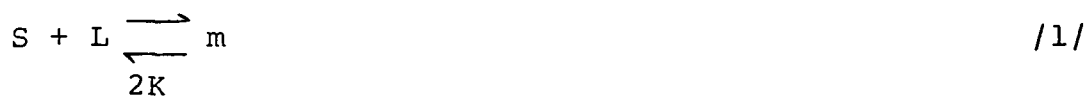
A specifikus kötés a ligandkoncentráció növelésével telithető /11. ábra/, ami megfelel a receptorok véges számának. A kötési paraméterek, K_D és B_{max} meghatározásához azonban figyelembe kell vennünk, hogy egy dimer liganddal dolgoztunk, tehát egy molekula 2 funkciós részt /2 tetragasztrint/ tartalmaz. Egy ilyen típusu ligand kötődésekor létrejövő állapotokat a következő ábra tünteti fel:



Alacsony ligand koncentrációknál kicsi annak a valószínűsége, hogy az egyszeresen kötött ligand másik hatócsoportjával egy újabb receptorhoz kötődne. Amint a ligand koncentráció növekszik, az ilyen keresztkötések valószínűsége nő, mert a receptorok egyre nagyobb hányada betöltött. Nagy ligand koncentrációknál viszont az egyszeres kötések válnak uralkodóvá, mert a ligand molekulák nagy száma miatt a keresztkötés térgátolt. Természetesen a fenti kötődések csak akkor jöhetnek létre, ha a receptorok szabadon diffundálnak a membrán síkjában. Az irodalomban nem találtunk olyan adatokat, melyek dimer ligand receptorkötésére vonatkoztak volna. Ezért a bivalens antigének kötődésére érvényes matematikai eljárás [81] alapján megkíséreltük egy olyan összefüggés felállítását, amely leírja a receptorhoz kötött ligand mennyiségét a dimer ligand koncentrációjának függvényében.

A számítás a következő:

Egy bivalens ligand $2K$ affinitással kötődik a receptorhoz, ha az egyszeres kötődés affinitása K . A receptorok diffúziója miatt az egyszeresen kötött ligand egy másik receptorhoz kötődhet, így keresztkötések jönnek létre. Ennek a második kötődésnek az affinitása K_2 . Feltételezzük, hogy mindkét típusú kötődésre érvényes a tömeghatás törvénye.



S: a szabad receptorok koncentrációja egyensúlyban

L: a szabad dimer ligand koncentrációja "

m: az egyszeresen kötött ligand koncentrációja

M: a keresztkötésben lévő /kétszeresen kötött/ ligand koncentrációja.

kifejezve az affinitási állandókat:

$$\frac{m}{S \cdot L} = 2K \quad \text{és} \quad \frac{M}{m \cdot S} = K_2 \quad /3/$$

$$K_1 = 2K$$

$$L \approx L_0$$

Az összes receptor koncentráció, S_0 kiszámításánál figyelembe kell venni, hogy a mért radioaktivitás ugyanakkora, ha a ligand egyszeresen vagy kétszeresen kötődik, ez utóbbi esetben azonban a jelölt receptorok száma kétszer akkora:

$$S_0 = S + m + 2M \quad /4/$$

az összes kötött ligand:

$$B = m + M \quad /5/$$

A fenti képletekből m-et és M-t kifejezve és a megfelelő átrendezéseket elvégezve az összes kötött izotóp mennyisége:

$$B = S_0 \left(\frac{1}{2} + \frac{K_1 L - 1}{1 + K_1 L + \sqrt{(1 + K_1 L)^2 + 8K_1 K_2 L S_0}} \right) \quad /6/$$

A fenti képletből megállapítható, hogy:

ha $L = 0$; $B = 0$

$L \rightarrow \infty$; $B = S_0 = B_{\max}$

$$K_1 L = 1; \quad B = \frac{S_0}{2} \longrightarrow L \text{ (féltelítés) } = \frac{1}{K_1}$$

A /6/-os egyenleg alapján a legkisebb négyzetek módszerével komputeres görbeillesztést végeztünk. Ez alapján az adipoil-bisz-tetragasztrin látszólagos kötődési paraméterei:

$B_{\max} = 60$ fmol/mg fehérje, az affinitási állandó $2K = 0,2 \cdot 10^9 M^{-1}$, a disszociációs állandó $K_D = 5nM$.

Számításaink szerint a K_2 csak rendkívül pontatlanul határozható meg, értéke több nagyságrenden belül változhat anélkül, hogy ez befolyásolná a kötődést leíró elméleti görbét.

A féltelítéshez szükséges ligandkoncentráció, K_D (látszólagos) kísérleti körülményeink között nem függ K_2 értékétől.

Az így kapott eredményeket érdemes lenne összehasonlítani a radioaktív monomer kötődésére kapott értékekkel, amennyiben megfelelő fajlagos aktivitású monomert elő lehetne állítani.

A pentagasztrin tríciumos jelölése azonban csak 3,7 Ci/mmól specifikus aktivitást eredményezett.

Mint a bevezetőben említettük, több feltétel együttes teljesülése szükséges ahhoz, hogy egy specifikus kötéstől azt mondhassuk, hogy az azonos a receptorkötéssel. A gasztrin esetén sikerült kimutatni a kötődés telithetőségét, reverzibilitását, nagy affinitását. A specifitás további megerősítéséhez szükséges lenne antagonisták ill. sztereoizomerek kötődésének mérése, ilyen vegyületek azonban nem állnak rendelkezésre.

kezésre. A receptorkötésre kapott eredmények és egy ehhez kapcsolt biológiai effektus mérésénél kapott értékek korrelációja szintén kívánatos. Kitűnő lehetőség, ha a receptor az adenil cikláz enzimen keresztül továbbítja az információt a sejt felé. Ez a kérdés azonban a gasztrin esetén még nem eldöntött /ld 15. old/. Sertés gyomor homogenátummal és partikuláris frakciókkal végzett kísérleteink szerint a hisztamin az adenil cikláz aktivitást mintegy 3-szorosára aktiválta, pentagasztrinnal azonban nem sikerült szignifikáns hatásokat elérni. Rodbell alapvető munkája [82] óta ismeretes, hogy a hormonok hatásának megnyilvánulásához guanil nukleotidok jelenléte is szükséges lehet. Rendszerünkben azonban sem a GTP, sem annak nem-hidrolizáló analógja, a Gpp(NH)p nem segítette elő a pentagasztrin-stimulálást /az eredmények nincsenek feltüntetve/.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A receptorkötési technika kifejlesztése óta eltelt rövid idő alatt bebizonyosodott, hogy a módszer alkalmas a legkülönbözőbb biológiailag aktív anyagok /hormonok, neurotranszmitterek, gyógyszerek/ hatásmechanizmusának vizsgálatára.

Disszertációm első részében a specifikus diazepám kötést jellemeztük triciált diazepám segítségével patkány előagyból tisztított szinaptoszómán 37°C -on. Az asszociáció sebessége gyors, az általunk vizsgált körülmények között az egyensúly 3-4 perc alatt áll be. A specifikus kötés telíthető és nagy affinitású, a receptorhelyek száma $1,2 \text{ pmol/mg}$ szinaptoszóma fehérje, a disszociációs állandó $12,8 \text{ nM}$. A telítési görbe Scatchard-analizise egy egyenest eredményezett, amely arra utal, hogy mind a receptor, mind a ligand homogén és nincsenek kooperatív kölcsönhatások.

A disszertáció második része a gasztrin receptor kimutatására és jellemzésére irányuló munkát foglalja magában. Ennek során egy új, az irodalomban eddig le nem írt vegyület, a ^3H -adipoil-bisz-tetragasztrin kötődését mértük sertés gyomor fundus mucosából előállított szubcelluláris frakciókban. Megállapítottuk, hogy a specifikus kötés a legnagyobb a 20.000 g -vel előállított üledékben. Elektronmikroszkópos felvételek és markerenzim-mérések segítségével megállapítottuk, hogy ez a frakció főként mitokondriumot tartalmaz, de egyéb organelumok, pl. plazmamembrán is található benne. A specifikus kötés szobahőmérsékleten $100\text{-}500 \text{ }\mu\text{g}$ fehérjetartalom mellett 4 perc körül éri el az egyensúlyi értéket. A specifikus kötés

reverzibilis, telithető és nagy affinitásu. Figyelembe véve a ligand dimer jellegét, a kötési paraméterek kiszámítására egy összefüggést vezettünk le. A számítógépes kiértékelés alapján a specifikus kötőhelyek száma 60 fmol/mg fehérje, a disszociációs állandó 5 nM. Disszociációs kísérletekkel megállapítottuk, hogy a kötőhelyek között nincs kooperativitás.

Összefoglalva, a gasztrin és a receptora közötti kölcsönhatás ugyan nagy affinitásu, de a receptorok száma alacsony. Valószínű, hogy a receptor elég labilis, erre utal, hogy tárolás közben elvesztette aktivitását. A fenti eredmények alapján úgy tűnik, hogy a gasztrin receptor tisztítása a jelenleg ismert módszerekkel nem célszerű.

VIII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP	: adenzin-trifoszfát
cAMP	: ciklikus adenzin-monofoszfát
GTP	: guanozin-trifoszfát
Gpp(NH)p	: guanil-5'-il-imido-difoszfát
EDTA	: etilén-diamin-tetraecetsav
Tris	: tris-hidroximetil-amino-metán
PPO	: 2,5-difenil-oxazol
POPOP	: 1,4-di-[2-(5-fenil)-oxazoil]-benzol
BOC	: terc. butiloxikarbonil-csoport
H	: homogenátum
P ₁	: "mag-frakció"
P ₂	: "mitokondrium-frakció"
P ₃	: "mikroszóma-frakció"
S	: végső felüluszó

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- /1/ P. EHRLICH, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 42, 17 (1909)
- /2/ O. HECHTER, Vitamins and Hormones, 293. Academic Press, New York, N.Y. (1955)
- /3/ A.S. HORN, "Handbook of Psychopharmacology" L.L. Iversen, S.D. Iversen and S.H. Snyder, eds., Vol. 2, p. 129. Plenum, New York (1975)
- /4/ E.W. SUTHERLAND and T.W. RALL, J. Biol. Chem. 232, 1077 (1958)
- /5/ S SWILLENS and J.E. DUMONT, J. Cyclic Nucl. Res. 3, 1 (1977)
- /6/ J.W. NAGY, T. LEC, P. SEEMAN and H.C. FIBIGER, Nature (London) 274, 278 (1978)
- /7/ C. MUKHERJEE, M. CARON and R.J. LEFKOWITZ, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1945 (1975)
- /8/ C.R. KAHN, Jr. D.M. NEVILLE and J. ROTH, J. Biol. Chem. 248, 244 (1973)
- /9/ A. GOLDSTEIN, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1947 (1973)
- /10/ L. TERENIUS and A. WAHLSTRÖM, Acta Pharmacol. Toxicol. 35, 55 (1974)
- /11/ J. HUGHES, Brain Res. 88, 295 (1975)
- /12/ I.L. MARTIN, Trends in Neuro Sciences 3 (12), 299 (1980)
- /13/ SZÜCS, M., Gasztrint kötő fehérjék izolálása affinitás-kromatográfiával. Diplomamunka, (1977)
- /14/ B. PENKE, M. SZÜCS, M. ZARÁNDY und K. KOVÁCS, in "Proteinstoffwechsel" ed. H.J. Hütter und P. Bohley Halle/Saale 1979. p. 173

- /15/ P.R. DAVOREN and E.W. SUTHERLAND, J. Biol. Chem. 238,
3016 (1963)
- /16/ B.P.SCHIMMER, K. UEDA and G.H. SATO, Biochem. Biophys.
Res. Commun. 32, 806 (1968)
- /17/ P. CUATRECASAS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 450 (1969)
- /18/ P. FREYCHET, J. ROTH and D.M. Jr. NEVILLE, Proc. Natl.
Acad. Sci. 68, 1833 (1971)
- /19/ L. JARETT, R.M. SMITH and S.R. CRESPIU, Endocrinology 94,
719 (1974)
- /20/ M. RODBELL, L. BIRNBAUMER and S.L. POHL, J. Biol. Chem.
245, 718 (1970)
- /21/ C.J. GARRATT, D.M. HARRISON and M. WICKS, Biochem. J.
126, 123 (1972)
- /22/ P. CUATRECASAS, Annu. Rev. Biochem. 43, 169 (1974)
- /23/ P. CUATRECASAS and M.D. HOLLENBERG, Advances in Protein
Chemistry 251 (1976)
- /24/ G.A. WEILAND, K.P. MINNEMAN and P. B. MOLINOFF,
Nature 281, 114 (1979)
- /25/ K.J. CHANG and P. CUATRECASAS, J. Biol. Chem. 254, 2610
(1979)
- /26/ C. B. PERT, G. PASTERNAK and S.H. SNYDER, Science N.Y.
182, 1359 (1973)
- /27/ R.S. ZUKIN, S. WALCZAK and M.H. MAKMAN, Brain Res. 186,
238 (1980)
- /28/ S. A. WALCZAK, D. WILKENING and M.H.MAKMAN, Brain Res.
160, 105 (1979)
- /29/ P. CUATRECASAS, M.D. HOLLENBERG, K.J. CHANG and
V. BENNETT, Recent Progress in Hormone Research 31,

- 37 (1974)
- /30/ P. CUATRECASAS and M.D. HOLLENBERG, Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 31 (1975)
- /31/ S.H. SNYDER, G.W. PASTERNAK and C.B. PERT, In "Handbook of Psychopharmacology" L.L. Iversen, S.D. Iversen and S.H. Snyder, eds. Vol. 5, Chapter 6, p 329. Plenum, New York (1975)
- /32/ S. MAAYANI and H. WEINSTEIN, Life Sci. 26, 2011 (1980)
- /33/ S.R. ZUKIN and R.S. ZUKIN, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5372 (1979)
- /34/ G. SCATCHARD, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949)
- /35/ H. LINEWEAVER and D. BURK, J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
- /36/ J.M. BOEYNAEMS and J.E. DUMONT, J. Cyclic Nucl. Res. 1, 123 (1975)
- /37/ A. MAELICKE, B.W. FULPIUS, R.K. KLETT and E. REICH, J. Biol. Chem. 252, 4811 (1977)
- /38/ P.W. TAYLOR, R.W. KING and A.S.V. BURGEM, Biochemistry 9, 2638 (1970)
- /39/ W. KRAWIETZ, M. WEINSTEIGER, M. PRUCHNIEWSKI and E. ERDMANN, Biochem. Pharmacol. 28, 2999 (1979)
- /40/ L.W. NICHOL, G.D. SMITH and A.G. OGSTON, Biochim. Biophys. Acta 184, 1 (1969)
- /41/ E.J. ARIENS and A.M. SIMONIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 144, 842 (1967)
- /42/ D.A. GREENBERG and S.H. SNYDER, Molec. Pharmac. 14, 38 (1978)
- /43/ A.D. LEAN, P.J. MUNSON and D. RODBARD, Molec. Pharmac. 15, 60 (1978)

- /44/ T. AKERA and V.K. CHENG, *Biochim. Biophys. Acta*, 470,
412 (1977)
- /45/ A.V. HILL, *J. Physiol.* 40, 190 (1910)
- /46/ H.B. BOSMANN, K.R. CASE and P. DISTEFANO, *FEBS Letters* 82,
368 (1977)
- /47/ R.F. SQUIRES and C. BRAESTRUP, *Nature* 266, 732 (1977)
- /48/ I.L. MARTIN, *Trends in Neuro Sciences* 3, 299 (1980)
- /49/ E. COSTA and A. GUIDOTTI, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 19,
531 (1979)
- /50/ H.J. TRACY, R.A. GREGORY, *Nature* 204, 935 (1964)
- /51/ M.I.M. LEWIN, A. SOUMARMON, J.P. BALI and S. BONFILS,
FEBS Letters 66, 168 (1976)
- /52/ A. SOUMARMON, A.M. CHERET and M.I.M. LEWIN, *Gastro-
enterology* 73, 900 (1977)
- /53/ J. BROWN and N.D. GALLAGHER, *Biochim. Biophys. Acta* 538,
42 (1978)
- /54/ K. TAKEUCHI, G.R. SPEIR and L.R. JOHNSON, *Amer. J. Physiol.*
237, 284 (1979)
- /55/ R.J. BERSIMBAEV, S.V. ARGUTINSKAYA and R.J. SALGANIK,
Experientia 27, 1389 (1971)
- /56/ R.J. SALGANIK, S.V. ARGUTINSKAYA and R.J. BERSIMBAEV,
Experientia 28, 1190 (1972)
- /57/ M.S. AMER, *Am. J. Dig. Dis.* 17, 945 (1972)
- /58/ J. NÁFRÁDY and M. WOLLEMANN, *Biochem. Pharmac.* 26, 2083
(1977)
- /59/ H.J. RUOFF and K. Fr. SEWING, *Acta Hepato-Gastroenterol.*
20, 172 (1973)

- /60/ D.V. KIMBERG, *Gastroenterology* 67, 1023 (1974)
- /61/ E.D. JACOBSON and W.J. THOMPSON, *Adv. in Cyclic Nucl. Res.*
Vol. 7., 199, (1976) edited by P. Greengard and G.A.
Robison, Raven Press, New York.
- /62/ M.J. GROSSMAN, S.J. KONTUREK, *Gastroenterology* 66, 517
(1974)
- /63/ A.H. SOLL and J.H. WALSH, *Ann. Rev. Physiol.* 41, 35 (1979)
- /64/ I. SZELÉNYI, *Agents and Actions* 10, 187 (1980)
- /65/ J.F. REHFELD, *Nature /Lond./* 271, 771 (1978)
- /66/ B.L. TEPPERMAN, M.D. EVERED, *Science* 209, 1142 (1980)
- /67/ C. BRAESTRUP and R.F. SQUIRES, *Eur. J. Pharmac.* 48, 263
(1978)
- /68/ G.L. PETERSON, *Anal. Biochem.* 83, 346 (1977)
- /69/ P. EMMELOT and C.J. BOSS, *Biochim. Biophys. Acta* 120,
369 (1966)
- /70/ A. CHAMBAUT, F. LERAY-PECKER, G. FELDMANN, J. HANOUNE,
J. General Physiology 64, 104 (1974)
- /71/ H. EIBL and W.E. LANDS, *Anal. Biochem.* 30, 51 (1969)
- /72/ A. J. LAWRENDE, G.M. SMITH, *Br. J. PHARMAC.* 35, 371 (1969)
- /73/ A. SOUMARMON, M. LEVIN, A.M. CHERET, S. BONFILS, *Biochim.*
Biophys. Acta 339, 403 (1974)
- /74/ P. De MEYTS, J. ROTH, D.M. NEVILLE, J.R. GAVIN and
M.A. LESNIAK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 154
(1973)
- /75/ E. COSTA, A. GUIDOTTI and G. TOFFANO, *Br. J. Psychiatry*
133, 239 (1978)
- /76/ M.I.M. LEWIN, A. SOUMARMON and S. BONFILS, in
"Progress in Gastroenterology" Ed. G.B.J. Glass,

Vol. 3, p. 203, Grune and Stratton INC, New York,
London (1977)

- /77/ R.J. BERSIMBAEV, The Localization of the Histamine Re-
ceptors in Rat Gastric Mucosa Cells,
Poster from the 12-th FEBS Meeting, Dresden, July 2-8,
(1978)
- /78/ VÁRKONYI T., VARGA NÁFRÁDI J., KOZMA M., KÁSA P. és
VARRÓ V., Kisérletes Orvostudomány 28, 318 (1976)
- /79/ J. SEPRŐDI, D.H. COY, J.A. VILCHEZ-MARTINEZ, E. PEDROZA
and A.V. SCHALLY, J. Med. Chem. 21, 276 (1978)
- /80/ J. Del MAZO and J.E. Mc GUIGAN, J. Lab. Clin. Med. 88,
292 (1976)
- /81/ R. CHABAY, Ch. De LISI, W.A. HOOK and R.P. SIRAGANIAN
J. Biol. Chem. 255, 4628 (1980)
- /82/ M. RODBELL, M.C. LIN and Y. SALOMON, J. Biol. Chem. 249,
59 (1974)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezuton szeretném megköszönni Dr. Wollemann Mária igazgató-
nak, hogy munkámat intézetében lehetővé tette és értékes taná-
csaival segítette.

Hálával tartozom Dr. Penke Botond adjunktusnak /SZOTE
Orvosi Vegytani Intézet/ sokoldalú elméleti és gyakorlati tá-
mogatásáért, e munkában való aktív részvételéért. Ugyancsak
köszönettel tartozom Dr. Náfrády József adjunktusnak /SZOTE
I. sz. Belklinika/ készséges együttműködéséért.

Köszönet illeti Dr. Tóth Gézát a radioaktív jelölések,
Dr. Párducz Árpádot az elektronmikroszkópos felvételek ké-
szítéséért, Dr. Fajszai Csabát az eredmények matematikai ér-
tékelésében nyújtott segítségéért.

Külön köszönettel tartozom Dr. Borsodi Annának és
Dr. Kiss Zoltánnak a hasznos konzultációkért, valamint
Szabó Attilánének és Szigethy Kálmánnének a kísérletek vég-
zésében nyújtott segítségükért.

