

GASZTRIN ÉS KOLECISZTOKININ-OKTAPEPTID ANALÓGOK
ELŐÁLLITÁSA A BIOLÓGIAI HATÁS ÉS A KÉMIAI SZER-
KEZET ÖSSZEFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATÁRA

Doktori értekezés

Herczegh Ottilia



Szeged 1981

Szegedi Orvostudományi Egyetem
Orvosi Vegytani Intézete

B 508



E 2.137

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	2.
I. BEVEZETÉS, CÉLKITÜZÉSEK	3.
II. ELMÉLETI RÉSZ	
A. Irodalmi előzmények	
1. A gasztrin és a kolekisztokinin kémiaja és biológiája	6.
2. A hormonok hatásmechanizmusa	14.
3. A hormon-receptor kötés vizsgálá- tának módszerei	19.
4. A peptidszintézis általános problémái	23.
B. Kísérleti munka	
1. Térszerkezeti vizsgálatok céljára szintetizált gasztrin analógok	27.
2. A hormon-receptor kölcsönhatás tanul- mányozására szintetizált gasztrin analógok	35.
3. Kolekisztokinin oktapeptid szintézise farmakológiai vizsgálatok céljára	43.
4. Élő sejtek izolálása kutya gyomor nyálkahártyából; a sejtek kötődésé- nek vizsgálata	47.
III. KÍSÉRLETI RÉSZ	56.
ÖSSZEFOGLALÁS	83.
IRODALOM	85.

A dolgozatban felhasznált rövidítések jegyzéke

A rövidítések általában megfelelnek a IUPAC javaslatának /J. Biol. Chem. 247, 977 /1972/ /, a ritkábban használt rövidítések a következők:

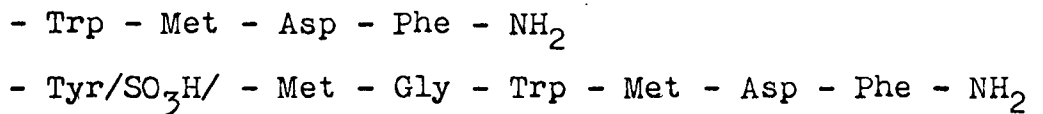
- DMF - dimetilformamid
- TEA - trietilamin
- BOC- - terc. butiloxikarbonil csoport
- Z- - benziloxikarbonil csoport
- Bzl- - benzil csoport
- Bu^t- - terc. butil csoport
- DCC - diciklohexil-karbodiimid
- DCU - diciklohexil-karbamid
- BMA - benzil-malonsav-félamid
- Gla - γ -karboxi-glutaminsav
- TFA - trifluorecetsav
- THF - tetrahidrofurán
- BSA - marhaszérum albumin
- EDTA - etiléndiamin-tetraecetsav

I. BEVEZETÉS, CÉLKITÜZÉSEK

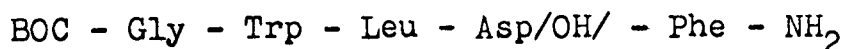
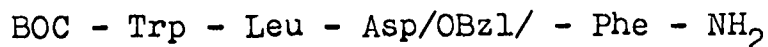
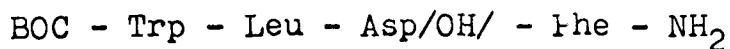
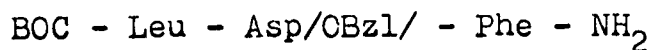
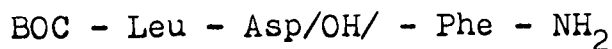
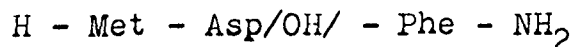
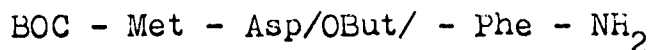
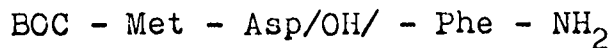
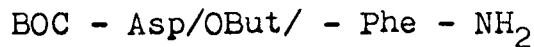
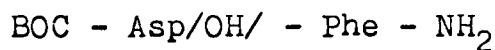
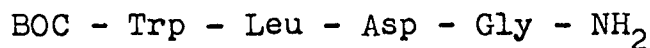
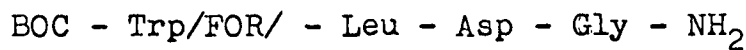
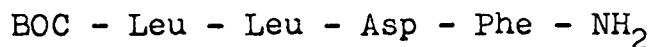
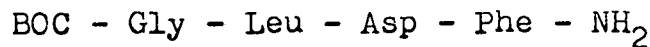
A peptidhormonok között jelentős helyet foglalnak el a gyomor és bélcsatorna nyálkahártyájában képződő ugynevezett gasztrointesztinális hormonok. E család két fontos képviselője a gasztrin és a kolekisztokinin /CCK/. Larsson és Rehfeld legújabb kutatásai szerint [1] a két hormon evolúciós eredete közös.

A gasztrin a gyomorsav és a pepszin termelését serkentő hormon; a gyomornyálkahártya termeli és a véráram útján a gyomornyálkahártyába kerülve a fali /parietális/ sejtekre hat. A hormonok szövetspecifitásának az a magyarázata, hogy a célszerv sejtjei jelfogót, receptort tartalmaznak, ami a hormonok hatására aktiválja a sejtekben az anyagcsereváltozást előidéző enzimet. A peptidhormonok receptorai a sejtmembránban helyezkednek el [2].

A kolekisztokinin is több biológiai hatásért felel, így epehólyag kontrakciót okoz, másrészt stimulálja a hasnyálmirigy enzimszekrécióját. A legutóbbi évek kutatásai szerint ugyanakkor az idegrendszerben neurotransmitter, illetve neuromodulátor funkciót lát el. Mindkét hormonban közös, hogy a különböző biológiai hatásokért a teljes molekulának egy kis része, az aktiv centrum a felelős. Ez az aktiv centrum a gasztrin esetén a C-terminális tetrapeptid, a CCK esetén a C-terminális heptapeptid szulfátészter:



A két fentemlitett hormon hatásmechanizmusáról igen keveset tudunk, inkább csak hipotézisek vannak a hormon-receptor kölcsönhatás módozatairól. Ezért célul tűztük ki a gasztrin kémiai szerkezete és biológiai hatása közötti összefüggések vizsgálatát. E célból olyan analógok szintézisét terveztük, amelyekkel a gasztrin aktiv centrumának térszerkezete tanulmányozható. Ezek a következők:



BOC - Tyr - Gly - Trp/FOR/ - Leu - Asp/OH/ - Phe - NH₂

H - Leu - Asp/OH/ - Phe - OCH₃

Z - Leu - Asp/OBzl/ - Phe - OCH₃

BOC - Trp - Leu - Asp/OH/ - Phe - OCH₃

A térszerkezet vizsgálatok valamint a párhuzamosan elvégzett biológiai aktivitásmérések adataiból következtetni lehet a hormon-receptor kötés természetére.

A gasztrin és receptora közötti kölcsönhatást más módszerekkel is tanulmányozni kívántuk. A hormon-receptor kölcsönhatás tanulmányozásának több módszere is van, ezek közül mi a következőket alkalmaztuk:

- a./ élősejt izolálás, majd kötődés vizsgálatok alkalmas hormonszármazékok segítségével.
- b./ hormon analógok biológiai hatásának komplex vizsgálata.

BOC - Gly - Nmetil Trp - Leu - Asp - Phe - NH₂

Z - Val - Trp - Leu - Asp - Phe - NH₂

BOC - β Ala - Trp - Leu - Asp - Phe - N₂H₃

BOC - DL7AzaTrp - Leu - Asp - Phe - NH₂

Z - LGla - Gly - Trp/FOR/ - Leu - Asp - Phe - NH₂

Z - DGla - Gly - Trp/FOR/ - Leu - Asp - Phe - NH₂

A gasztrin analógokkal végzett szintetikus és biokémiai munkákon kívül célul tűztük ki a CCK-oktapeptid szulfát észter egy új szintézis módszerének kidolgozását is.

II. ELMÉLETI RÉSZ

A. Irodalmi előzmények

1. A gasztrin és aolecisztokinin kémiája és biológiája

A gasztrin

A gasztrint 1905-ben Edkins [3] fedezte fel. Vizsgálatai szerint a gyomor nyálkahártya vizes kivonata intravénásan adva fokozza a gyomornedv kiválasztását azáltal, hogy a gyomornyálkahártya fedősejtjeinek és fősejtjeinek működését serkenti. Hatására a gyomornedvben a sósav-pepszin arány is változik a sósav javára, ami gyomorfekélyhez vezethet.

1964-ben Gregory és Tracy [4] izolált sertés gyomor nyálkahártyából két olyan heptadekapeptidet /gasztrin-I = G-I. és gasztrin-II = G-II./, amelyek gasztrin hatást mutattak. Szerkezetüket Gregory és munkatársai [5] határozták meg és szintézisüket is elvégezték. A sertés gasztrin-I. szerkezete az 1. ábrán látható. A gasztrin-II. szekvenciája ettől a szerkezettől csak abban különbözik, hogy a 12-es helyzetű tirozin hidroxilcsoportja szulfátészter-kötésben van. A szulfátésztercsoport megléte vagy hiánya nem befolyásolja a molekula gasztrointesztinális hatását. Később izolálták az emberi gasztrint [6] valamint több emlős állat hasonló hormonját is, sőt ezek szintézisét is megoldották [7, 8]. /1. ábra./

1. ábra

Az emlősekből izolált gasztrointesztinális peptidhormonok szerkezete

Hormon	A m i n o s a v - s z e k v e n c i a	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
Kütyugasztrin	Met Ala	2,0
Marhagasztrin	Val Ala	0,5
Juhgasztrin	Val Ala	0,5
Macskagasztrin	Ala	1,0
Sertés CCK	-24-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	

x = H a gasztrin I-ben; x = SO₃H a gasztrin II-ben, a caeruleinben és a phyllocaeruleinben

I/II = gasztrin I / gasztrin II arány a szervezetben.

Minden fajspecifikus heptadekapeptidamidban közös az aminovégi tetrapeptid, a 6-os, 7-es, 9-es és 10-es helyzetű L-glutaminsav egység, valamint a karboxilvégi Ala - Tyr - Gly - Trp - Met - Asp - Phe - NH₂ szekvencia [9]. A karboxilvégi penta- és tetrapeptidamid, sőt már a tripeptid is rendelkezik a hormon gasztrin hatásával csak az aktivitás intenzitásában van különbség[9]. Moláris alapon számolva a heptadekapeptid 7.5-szer aktívabb a tetrapeptidnél. Még nem tisztázódott egyértelműen, hogy az 1 - 13-as fragmens csak az enzimes lebontás ellen véd, vagy a biológiai hatáshoz szükséges aktív konformáció kialakításában is szerepe van, esetleg további kötéseket létesít a receptorral és így növeli a biológiai aktivitást.

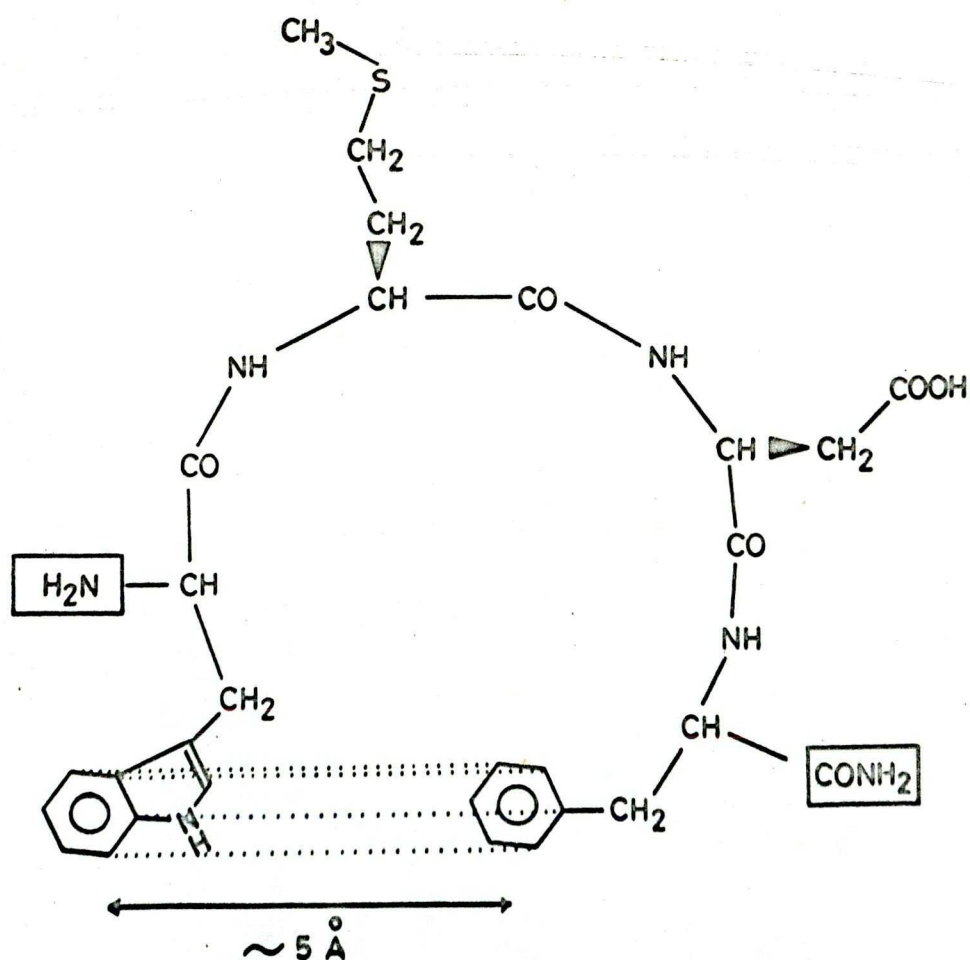
A peptidhormonok fontos szerepet játszanak mint neuroregulátorok. A legújabb kutatások során Rehfeld és munkatársai kimutatták a hasnyálmirigy Langerhans-szigetek idegvégződéseiben a tetragasztrint [10]. Megvizsgálták a különböző molekulasúlyu gasztrin és kolekisztokinin fragmensek hatását a hasnyálmirigyre és megállapították, hogy a tetrapeptidamid lényegesen hatásosabb az inzulin és más szigethormonok szekréciójára, mint a gasztrin és a CCK nagyobb molekulasúlyu formái. Ez arra utal, hogy a tetrapeptidamid neurális felszabadulása szerepet játszik a hasnyálmirigy hormonszekréciójának szabályozásában.

A gasztrinmolekula aktív centrumát képező tetrapeptid térszerkezetét 1972-ben Kier és George[11] egy

molekulapálya számítási módszer alapján próbálták értelmezni. E szerint a molekula "gerince" közel planáris, a szénatomok közötti vegyértékszög kb. 120° , a C és N terminális nitrogének $13 \text{ \AA}$ -re vannak egymástól. A triptofán és fenilalanin aromás gyűrűi a molekulának ugyanazon az oldalán vannak $11 \text{ \AA}$ -re egymástól, míg a metionin és aszparaginsav oldalláncai a molekula másik oldalán $5 \text{ \AA}$ -re.

1972-ben Feeney [12] nagy felbontóképességű / 100, ill. 220 MHz/ NMR spektroszkóp segítségével vizsgálta az aszparaginsevet, fenilalanint és a gasztrin C-terminális fragmenseit /Asp - Phe - NH_2 , Met - Asp - Phe - NH_2 és a BOC - β Ala - Trp - Met - Asp - Phe - NH_2 /. A mérési eredmények alapján megpróbálta meghatározni a C-terminális tetrapeptid térszerkezetét. A korábbi modellel összhangban úgy találta, hogy a tetrapeptid konformációja α helix-szerű, a triptofán és fenilalanin aromás gyűrűi legalább $5 \text{ \AA}$ -re vannak. A 14-17-es tetrapeptidamid receptorhoz való kötődésének meghatározása céljából Penke és munkatársai több analógot is szintetizáltak [13]. Ezek térszerkezetét Pham és munkatársai vizsgálták ORD, CD és NMR módszerekkel [14]. Eredményeikből kitűnik, hogy az aszparaginsav β -karboxiljának a már előzőleg bizonyított funkcionális szerepén kívül szerkezetmeghatározó szerepe is van. A metionin oldalláncának apoláros kölcsönhatás révén elsősorban a receptorhoz való kötődésben lehet szerepe. A triptofán és fenilalanin közötti

aromás kölcsönhatás /tapadás, stacking/ révén a molekula β kanyarulathoz /" β -turn"/ hasonlít. Hidrogénkötést nem észleltek a molekulán belül. A célkitűzésekhez említett, általunk szintetizált analógok szerkezetvizsgálata is igazolta a "stacking" konformációt [15].



A kémiai szerkezet és biológiai hatás közötti összefüggés vizsgálata céljából Morley és munkatársai számos analóg szintézisét és biológiai vizsgálatát végezték el [16, 17].

Eredményeik a következőkben foglalhatók össze:

- 1./ A szabad tetrapeptidamid és analógjai kevésbé aktívak mint az acilezett származékok;
- 2./ A triptofán indol vázában a homoaromás gyűrű helyettesítése nem, vagy alig csökkenti a biológiai hatást. A heteroaromás gyűrű helyettesítése jelentősebb hatáscsökkenéssel jár.
- 3./ A metionin helyzetében a kén izosztér helyettesítése /Nle/, a kén elmozdítása az oldalláncban /S-etil-Cys/, az oldallánc elágaztatása /Leu/ nem változtatja meg az aktivitást, viszont a kénatom részleges vagy teljes oxidációjával jelentősen csökken a biológiai hatás [18].
- 4./ Az aktiv centrum egyik legérzékenyebb része az aszpartil egység. Az oldalláncban levő karboxilcsoport legtöbb módosítása és az oldallánc hosszának növelése /Glu/ megszünteti a biológiai hatást [19].
- 5./ A fenilalanin helyzetében végzett változásokra kevésbé érzékeny a molekula.
- 6./ A láncvégi savamid csoport módosítására érzékenyen reagál a peptid, a metilamid és hidrazid kivételével minden analóg kevésbé aktív.

A kolecisztokinin

A bélnyálkahártyából Ivy és Oldberg 1928-ban [20] egy epehólyagkontrakciót kiváltó anyagot izolált, amelyet "kolecisztokinin"-nek neveztek el. Később Harper és Raper [21] "pankreoizimin"-nek nevezte el az ugyanebből a kivonatból izolálható anyagot, amely stimulálja a hasnyálmirigy enzimszekrécióját. Mutt és Jorpes [22] igazolták, hogy a két különböző biológiai hatásért ugyanaz a vegyület felelős. Az ő nevükhöz fűződik e hormon aminosav-szekvenciájának felderítése is [23]:

Lys - Ala - Pro - Ser - Gly - Arg - Val - Ser - Met -
- Ile - Lys - Asp - Leu - Gly - Ser - Leu - Asp - Pro -
- Ser - His - Arg - Ile - Ser - Asp - Arg - Asp -
-Tyr/SO₃H/ - Met - Gly - Trp - Met - Asp - Phe - NH₂

A CCK C-terminális pentapeptidje azonos a gasztrinével. A gasztrin-CCK család nagyjából azonos vékonybél-motilitást okozó, továbbá sósavszekréciót kiváltó hatását a közös pentapeptid csoporttal magyarázzák. A CCK kolecisztokinetikus és pankreasz-enzim szekréció fokozó hatásában a 27-es tirozinon lévő szulfátészter csoport játszik központi szerepet [24]. Elsőként Ondetti és Pluscec szintetizálták a C-terminális oktapeptid-szulfátésztert és néhány analógját. Azt találták, hogy maga az oktapeptid szulfátészter, valamint néhány analógja lényegesen hatásosabb a kolecisztokinin-pankreoizimin teljes molekulánál [25-28]. Súlyegységre számítva a

CCK oktapeptid szulfátészter biológiai aktivitása 5-8-szorosa a teljes molekulásénak. A származékok biológiai vizsgálatával a szerkezet és a hatás között néhány összefüggést állapítottak meg:

- 1./ A hormonhatás kiváltásához szükséges a tirozin szulfátészter.
- 2./ Az oktapeptidben a tirozin szulfátészter átvitele a 2-es vagy a 3-as helyzetbe jelentős aktivitás csökkenéssel jár. A szulfátészter és a molekula más része közötti távolság fontos szerepet játszik a receptorhoz való kapcsolódásban.
- 3./ A metionint hidrofób aminosavval /Ile, Leu - / helyettesítve csökkent az aktivitás. Nagyobb mértékű az aktivitás csökkenése a 6-os helyzetben metionin helyett leucint tartalmazó oktapeptid esetén.

A CCK konformációs viszonyairól, térszerkezetéről még semmit sem tudunk.

2. A hormonok hatásmechanizmusa

A receptor

Az egysejtű élőlény a környezet változásait sejtmembránja révén érzékeli. A változásokra adott válasza gyors, fennmaradása jórészt reakcióinak sebességétől függ. A magasabbrendű szervezetekben a sejteknek szintén gyors reakciókészséggel kell rendelkeznie, membránjuk érzékenysége tehát megmarad. A különböző sejtek válasza csak a sejt életfeltételeit érintő ingerekre azonos a sejt speciális funkcióira nézve különböző. A kívülről érkező jelet felfogó képleteket receptoroknak, jelfogóknak nevezzük. Két főtipust különböztetünk meg: a sejtfelszíni vagy membránreceptorokat és az intracelluláris receptorokat. A polipeptid hormonok a membránon hatnak, míg a szteroid hormonok a sejten belüli receptorokon [2]. A sejtmembránt kívülről egy glikoproteid burok veszi körül /glikokalix vagy external coat/. Az ebben elhelyezkedő molekulák alkotják azt a receptor mintázatot, amely az adott sejtre jellemző. Feladatuk a hormonok felismerése és anyagtranszportban való részvétel. Az ugynevezett "marker" receptorok adják a sejt faji, szöveti és egyedi jellegét. A hormonok és a receptorok közötti kötés sztereospecifikus. A receptorok kémiaiilag összetett fehérjék, melyeknek térbeli orientációja döntő fontosságu. A receptorok száma dinamikusan változó:

egy adott sejt felszínén a különböző időpontokban különböző mennyiségben vannak jelen és a környezetben levő hormonoknak a mennyisége növelheti vagy csökkentheti a számukat. A receptorok specifikusak: minden hormonnak megvan a hormon konfigurációjának megfelelő, jellegzetes receptora. A receptor specifitása igen nagyfokú, még akkor is elkülöníti a hormonokat, ha azok egyik vagy másik összetevője nagymértékben hasonlít vagy azonos. Így pl.: Baur és Bacon [29] kimutatták, hogy a CCK-oktapeptid és a gasztrin nem kötődik ugyanahhoz a receptorhoz.

A hormon-receptor komplex kötés reverzibilis: nem kovalens kötés jön létre a hormon és receptora között /Hidrogénhid kötés, van der Waals kölcsönhatások, stb. révén/.

Az adenil-cikláz rendszer

Az adenil-cikláz rendszer valószínűleg a hormon specificitását biztosító hormon-receptorból és magából az adenil-ciklázból áll. A hormon úgy változtatja meg a receptor fehérjét, hogy allosztérikusan aktiválja [30] az adenil-cikláz, és ez adenzin-trifoszfátból /ATP/ a 3',5'-ciklusos adenzin-monofoszfát /cAMP/ szintézisét katalizálja. A ciklikus AMP-t szekunder messengernek is nevezik, mivel ez közvetíti a hormonok /primer messenger/ üzenetét a celluláris anyagcseréhez. /Nem a cAMP az egyetlen szekunder messenger, más ciklusos nukleotidok illetve a kalcium ionok is hasonló szerepet töltenek be./



A ciklusos AMP a sejt különböző folyamatait befolyásolja. Aktiválhat enzimrendszereket, befolyásolja a membrán-transzport folyamatait. Végül egy foszfatáz enzim, a ciklusos foszfodiészteráz 5'-AMP-vé bontja. A kör ezzel bezárul: a hormon által közölt információt a receptor felvette és az adenil-ciklázon keresztül a cAMP szintézisét indukálta, melynek hatására beindult a sejtre jellemző válaszreakció. Lényegében tehát csak a hormon és a receptor specifikus, a jelzést közvetítő cAMP és az utóbbit lebontó foszfatáz az egész élővilágban azonos. A hormonok hatásmechanizmusában valamennyi kémiai lépés a hormon hatásától kezdve egészen a foszforiláz aktivitásáig pontosan ismert, csak az marad bizonytalan, hogy a hormon kötődése hogyan aktiválja az adenil-ciklázt.

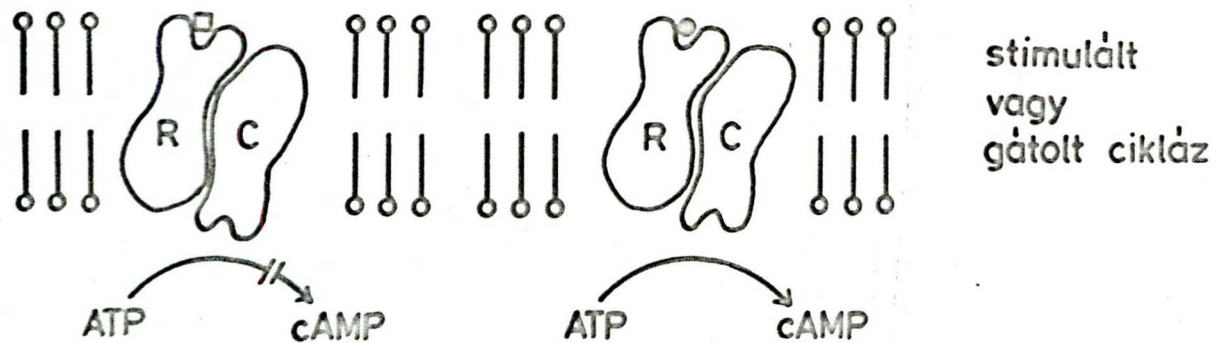
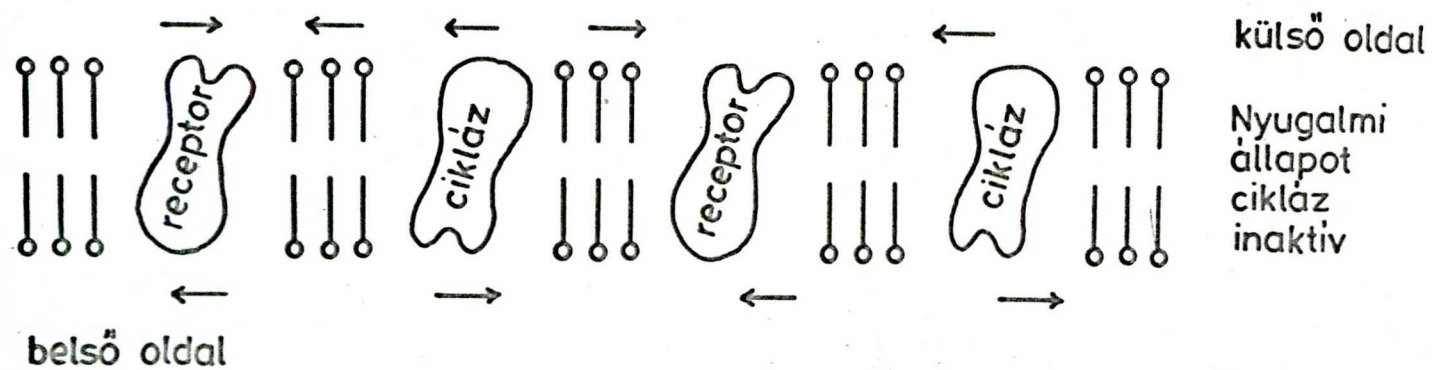
Néhány szerző feltételezi, hogy a receptor és az adenil-cikláz azonos [31]. Ez az értelmezés leegyszerűsítést jelent. Minden hormon specifikus hatást fejt ki egy bizonyos szövetre. Ha viszont minden szövet azonos adenil-ciklázal rendelkezik és az adenil-cikláz azonos a receptorral, akkor a különböző hormonoknak azonos hatása lenne, ami természetesen nem igaz.

Más elméletek szerint a receptorok mint regulátor alegységek veszik körül az enzimet [32]. A regulátor alegységek szövetről szövetre változnak és csak a specifikus hormonnal kötődnek. A kötődés aktiválja az enzimet. Ha az egyes regulátor alegységeknek a molekulaszáma 100.000-200.000 között van, akkor nagyon nehéz, vagy

lehetetlen, hogy ilyen molekulacsoport fizikailag a membránban helyezkedjen el, és a komplexben az összes receptor a vizes fázisban legyen.

A hagyományos modellek tehát egyrészt feltételezik, hogy a receptorok szerkezetileg összefüggnek az adenil-ciklázal, másrészt hogy ezek a szerkezetek a membránban rögzítve vannak.

A mobilis receptor hipotézist Cuatrecasas [33] és Benett [34] állították fel. A membrán dinamikus és folyékony természetéről kialakult koncepcióból indultak ki [35-37]. A membrán a fehérjék és lipidek dinamikus rendszere, a membrán fluiditása biztosítja az egyes molekulák vándorlási lehetőségét. A mobilis receptor hipotézis szerint a receptorok regulátor molekulák, amelyek nem asszociálódnak az enzimmel, ha a hormon nincs jelen. A hormon kötődése után a receptorok kombinálódnak az enzimmel, a membrán fluiditása folytán. A receptor új és egyedi tulajdonságokat vesz fel, a hormon kötődésekor. Ezen új tulajdonságok egyike az, hogy a receptor-hormon komplex speciális affinitást mutat az adenil-ciklázhoz.

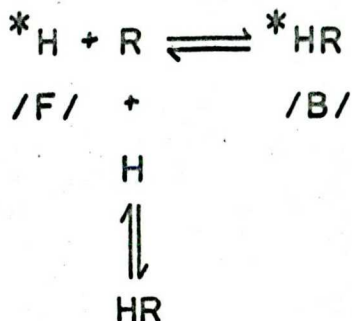


3. A hormon-receptor kötés vizsgálatának módszerei

Mivel a receptor egy adott fehérje adott konformációs állapotát is jelenti, nagyon lényeges azt denaturálás nélkül, biológiailag aktív formában izolálni. A hormon-receptor kötés vizsgálatokat ezért a következő rendszerekkel lehet elvégezni:

- élő sejt-preparátummal
/élő sejtnek tekintjük azokat a sejteket, amelyeknek anyagcseréjük van, ezek intakt módon tartalmazzák a receptorokat/
- izolált membránfrakcióval, amely a receptorokat tartalmazza
- izolált receptorokkal
/az izolálás a szolubilizált sejtmembránból affinitás kromatográfiával történik/

A receptor assay, azaz kötésvizsgálat során azt figyelik, hogy a radioaktív hormonnal telített receptorról /pl.: élő sejtuszuspenzió Ringer oldatban/ a hormon analógok hogyan szorítják le a hormont.



H = hormon

R = receptor

*H = jelzett hormon

HR = hormon-receptor komplex

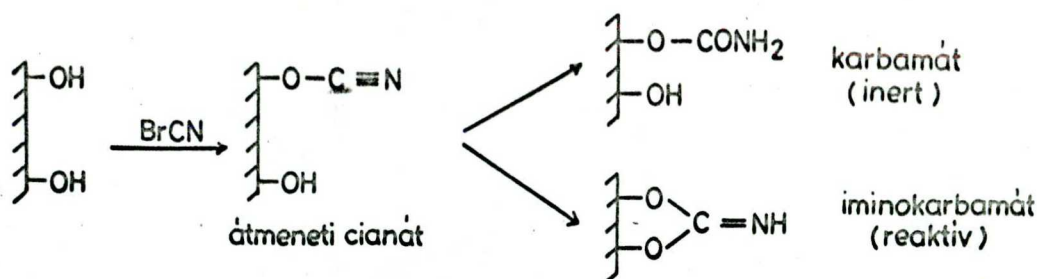
*HR = jelzett hormon-receptor
komplex

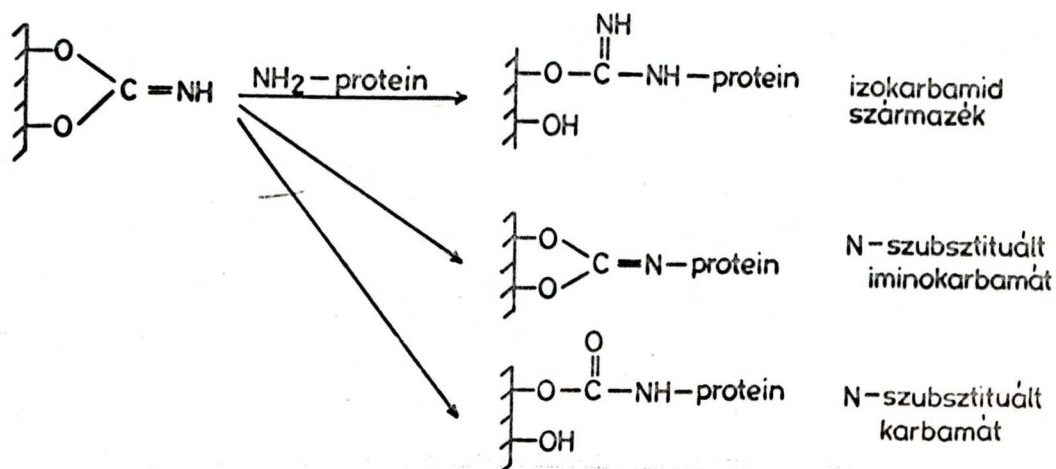
A szabad /F/ és kötött /B/ hormon arányából következtetnek a hormon-receptor kötés természetére. A vizsgálathoz nagy specifikus aktivitású /25-50 Ci/mM/ hormonokra van szükség. A leszorítás mellett adenil-cikláz aktivitás is mérhető. A ciklusos AMP szint mérése kötőproteinnel vagy radioimmunassay-vel történik.

A gasztrin receptor és a pentagasztrin kapcsolatának vizsgálatára egy új módszert dolgoztunk ki, az ugynevezett affinitás mikroszkópiát [38]. Abból a hipotézisből kiindulva, hogy ha egy hormont alkalmas hordozón /pl.: Sepharose/ immobilizálunk és ez az affinitás abszorbens affinitás kromatográfiára alkalmas, akkor elképzelhető, hogy az adszorbens nem csak a szolubilizált receptor fehérjéket köti meg, hanem az élő sejteket is, amelyeknek a felszínén intakt, működőképes receptorok vannak. Mivel a gélszemcsék /100-200 μ / és az izolált élő sejtek /10-20 μ / mikroszkóppal jól láthatók, a kötés így mikroszkóppal tanulmányozható. Az immobilizált hormont tartalmazó Sepharose szemcséket és az élő sejtek szuszpenzióját +20⁰-on adott ideig /2 perc/ fiziológiai körülmények között inkubáljuk. Ezután megszámláljuk, hogy mennyi sejt kötődött az affinitás adszorberhez. A módszer alkalmazása során szükséges, hogy valamennyi paramétert standardizáljunk, hogy a mérési eredmények megismételhetők legyenek. Az affinitás mikroszkópia céljára affinitás adszorbensek szükségesek. Ezek

az affinitás kromatográfiában jól ismertek. Az affinitás kromatográfia biospecifikus adszorbción alapuló elválasztás. Ha egy enzim és szubsztrátja, egy hormon és receptora, egy antigén és antitest rendszerből az egyik molekulát egy szilárd hordozón immobilizálják, a kapott adszorbens specifikusan megköti a komplementer molekulát. A specifikusan és reverzibilisen kötött molekula eluálható [39]. A fehérjék tisztításához agaroz /Sephарose/ hordozót használnak, ez 0-40° között pH 4-9 tartományban ideális tulajdonságu. Könnyen aktiválható brómcianánnal, ligandumok kötése céljából.

A brómcianós aktiválás egyszerű, könnyen reprodukálható egy lépéses módszer, amely nem változtatja meg lényegesen a polimer fizikai tulajdonságait /Axén [40]/. A reakció a következő módon játszódik le:





A ligandum a szilárd hordozón immobilizált molekula. Nagy molekulásulyu, kis affinitásu ligand /hormon/ esetén sztérikus gátlás léphet fel a hormon és receptor közötti kötődésnél [41]. Emiatt sok esetben szükség van egy megfelelő hosszúságu karra /spacer-re/ így a ligand a szubsztrátba, mint kulcs a zárba, bele tud illeszkedni, térgátlás nélkül. A spacer-ek általában ϵ -aminoalkil vegyületek. Lowe [42] kimutatta, hogy a spacer-nek van egy optimális hosszúsága, ez a kinázok esetén 8-10 Å.

A receptor kötőhelyének /receptor site/, aktiv centrumának meghatározására szolgáló módszer az affinity labelling. Az irodalomban eddig főleg enzimek aktiv centrumának meghatározására írták le. A hormon-receptor, illetve az enzim-szubsztrát között kovalens kötést építhetünk ki oly módon, hogy előállítjuk a hormon vagy szubsztrát kémiaiilag reakcióképes /pl.: azido/ formáját, majd miután a nem-kovalens biospecifikus kötés létrejött a hormon és receptor fehérjéje között, megfelelő hullámhosszuságú ultraibolya fénnel besugározzuk a komplexet, így kovalens kötést hozunk létre. Ha a hormont radioaktiv izotóppal jelezzük, a hormon-receptor komplex könnyen kimutatható, így meghatározható a receptor helye a sejtben.

4. A peptidszintézis általános problémái

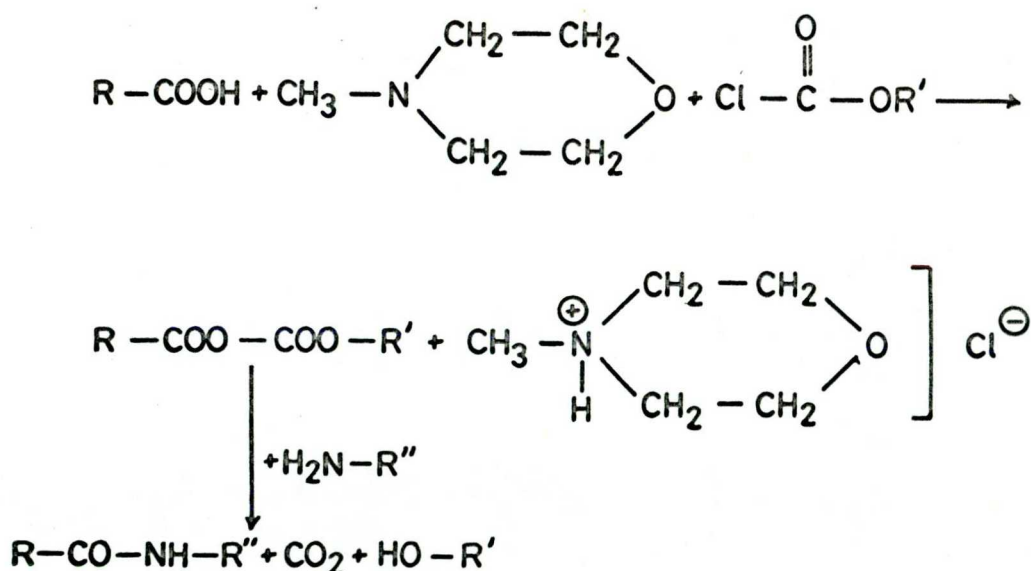
A peptidlánc felépítésének két módszere ismert: a lépésenkénti /stepwise/ módszer és a fragmenskondenzáció. Mindkét módszernél szükséges a megfelelő funkciós csoportokat könnyen kiépíthető, könnyen és szelektíve eltávolítható védőcsoportokkal ellátni.

Az aminocsoportot acilezéssel, alkilezéssel, és sóképzéssel védhetjük. A karboxilcsoportot észterképzéssel és sóképzéssel védhetjük. A peptid kapcsolásnál mindig a karboxilcsoport aktiv származékait kapcsolják a szabad aminocsoportéhoz. A leggyakrabban alkalmazott karboxilcsoport aktiválási módszerek a következők:

- vegyes anhidrides kapcsolás
- aktiv észteres kapcsolás
- DCC - kondenzációs kapcsolás
- azidos kapcsolás
- savkloridos kapcsolás

a./ Vegyes anhidrides aktiválás.

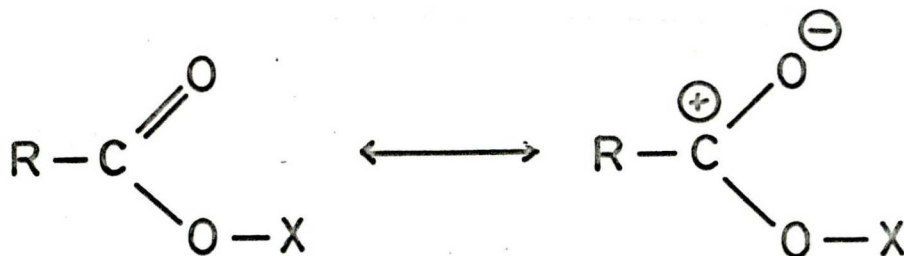
Szénsav-féleszterekkel a vegyes anhidridek gyorsan képződnek és a kapcsolási reakciók nagy sebességgel, viszonylag jó termeléssel játszódnak le. Mellékreakcióként az aminoszén-savészter résszel reagál és uretán képződik. Ez utóbbi mellékreakció elkerülésére kezdték a klórszénsav-etilészter helyett a klórszénsav izobutilésztert alkalmazni vegyes anhidrid képzésére. Az elágazó lánc nagy térkitöltése és pozitív induktív effektusa révén csökkenti a szénsav karbonilcsoportjának reaktivitását.



Az N-metil-morfolin a racemizáció mentes szintézis szempontjából kedvezőbb, mint a trietilamin [43].

b./ Aktiv észterek

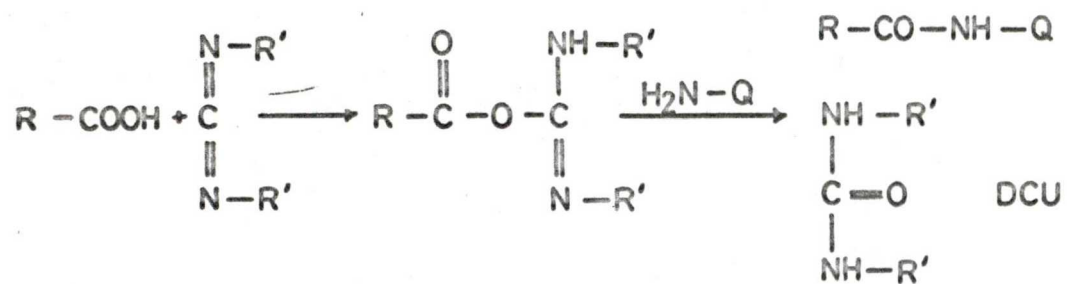
Az aminocsoportján védett aminosavat elektronszívó csoportot tartalmazó alkohollal vagy fenollal észterestíve, úgynevezett "aktiv észter"-ek nyerhetők, amelyeknél a karboxilcsoport szénatomja pozitív polározottságot nyer és így nukleofil támadásra érzékenyvé válik:



Leggyakrabban szubsztituált fenolok /p-nitrofenol, pentaklór- illetve pentafluorfenol/ diciklohexil-karbodiimides /DCC/ kondenzációjával állítják elő az aktiv észtereket.

c./ Diciklohexilkarbodiimiddel /DCC/ végzett kondenzáció

A módszert Sheehan [44] vezette be 1955-ben s azóta is az egyik leggyakrabban használt peptidképzési eljárás. A szabad karboxil- és aminocsoportot tartalmazó komponensek DCC-vel kondenzálnak. A módszer hátránya, hogy az előző módszereknél nagyobb mértékű racemizáció következhet be.



R' = ciklohexil

B. Kísérleti munka

1. Térszerkezeti vizsgálatok céljára szintetizált gasztrin analógok

A gasztrin tetrapeptid "stacking" szerkezetének vizsgálatára szintetizáltunk olyan peptideket, ahol az egyik aromás aminosav hiányzik, az aromás kölcsönhatás eldöntése céljából. Egyrészt a triptofánt glicinre és leucinra cseréltük ki:

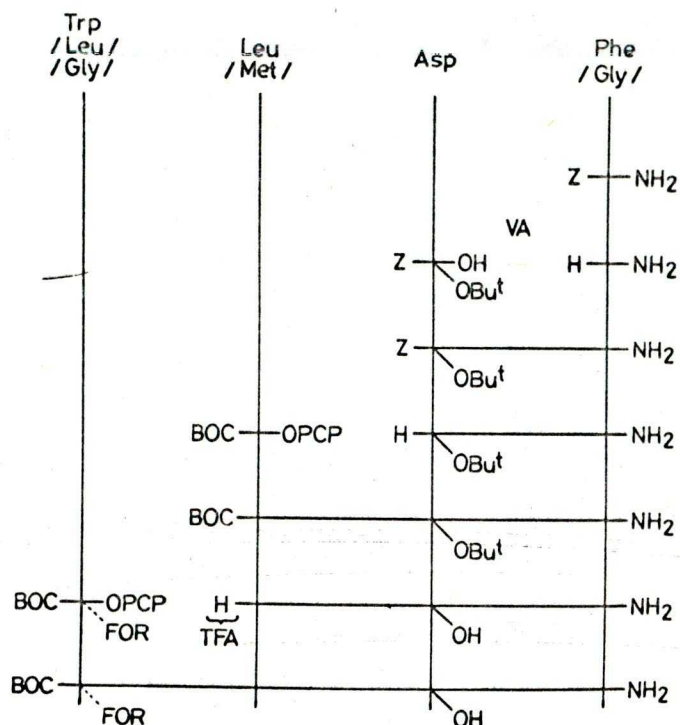
1. BOC - Gly - Leu - Asp - Phe- NH₂
2. BOC - Gly - Met - Asp - Phe - NH₂
3. BOC - Leu - Leu - Asp - Phe - NH₂

Másrészt a fenilalanint glicinre cseréltük:

4. BOC - Trp/FOR/ - Leu - Asp - Gly - NH₂
5. BOC - Trp - Leu - Asp - Gly - NH₂

A glicinnél nincs, a leucinnál fellelhető apoláros kölcsönhatás.

Az előállított tetrapeptidek /1, 2, 3, 4, 5/ valamint két metionint tartalmazó tripeptid /9, 10/ szintézisre a következő:



A dipeptid előállításához az aszparaginsav β karboxilját terc. butilészterrel védtük a vegyes anhidrides kapcsolásnál. Az aminocsoport védelme karbobenzoxi-csoporttal történt. Azért alkalmaztuk ezt a védőcsoport kombinációt, mert a karbobenzoxi-csoport a terc. butilészter mellől hidrogenolizissel szelektíve eltávolítható, és terc. butilészter esetén hidrogenoliziskor gyűrűzárással járó mellékreakció igen ritkán következik be.

A tri- és tetrapeptid kiépítését aktiv-észteres kapcsolással pentaklórfenilészterek alkalmazásával valósítottuk meg. Az aminocsoportokat terc. butiloxi-karbonil

csoporttal védtük. Ezt trifluorecetsavas kezeléssel könnyen eltávolítottuk, egyidejűleg az aszparaginsav terc. butilészter is hasadt. A metionin tartalmu peptidek tio-metil csoportja könnyen oxidálódik és könnyen alkileződik a védőcsoportok acidolitikus hasításánál keletkező kationok /terc. butil-, benzil-/ hatására. Ezért nitrogén atmoszférában kellett velük dolgozni, trifluorecetsavas kezeléskor pedig merkaptotetanolt és vizet használtunk gyökfogóként. /Mosásra, vagy kifőzésre pedig csak peroxidmentes éter használható/.

A triptofán a peptidszintézis szempontjából a metioninhoz hasonló: Oxidációval szemben érzékeny, savas közegben könnyen alkileződik. A mellékreakciók elkerülésére az indol-nitrogént formilcsoporttal védtük [45, 46]. A védőcsoport bázis hatására /pl.: piperidin/ lehasadt, így könnyen eltávolítható volt. A fenilalanin-amid tartalmu peptidek jól kristályosodtak, ezért átkristályosítással tisztítottuk őket /etilacetát/petroléter/. A glicin-amid tartalmu peptidek nehezen kristályosodó olajok. Tisztításuk megoszlási kromatográfiával szilikagél oszlopon etilacetát-viz-piridinacetát oldószer-elegy alkalmazásával történt.

A β -helyzetű karboxilcsoport konformációt befolyásoló szerepének eldöntésére összehasonlító térszerkezeti vizsgálatok céljából olyan peptideket is szintetizáltunk, melyeknél az aszparaginsav β karboxilcsoportja szabad illetve terc. butil vagy benzil-védőcsoportot tartalmaz:

6. BOC - Asp/OH/ - Phe - NH₂
7. BOC - Asp/OBu^t/ - Phe - NH₂
8. BOC - Met - Asp/OH/ - Phe - NH₂
9. BOC - Met - Asp/OBu^t/ - Phe - NH₂
10. H - Met - Asp/OH/ - Phe - NH₂
11. BOC - Leu - Asp/OH/ - Phe - NH₂
12. BOC - Leu - Asp/OBzl/ - Phe - NH₂
13. BOC - Trp - Leu - Asp/OH/ - Phe - NH₂
14. BOC - Trp - Leu - Asp/OBzl/ - Phe - NH₂
15. BOC - Gly - Trp - Leu - Asp/OH/ - Phe - NH₂
16. BOC - Tyr - Gly - Trp/FOR/ - Leu - Asp/OH/ - Phe - NH₂

A fenilalanin savamid-csoportját metilészterrel helyettesítettük az alábbi analógoknál:

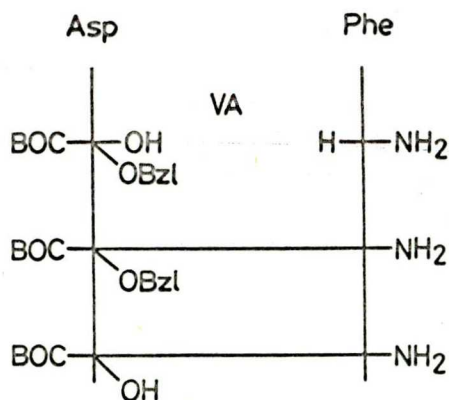
17. H - Leu - Asp/OH/ - Phe - OCH₃
18. Z - Leu - Asp/OBzl/ - Phe - OCH₃
19. BOC - Trp - Leu - Asp/OH/ - Phe - OCH₃

A peptidek szintézissterve:

A BOC - Asp/OBu^t/ - Phe - NH₂/7/ peptidet aktiv-
-észteres kapcsolással nyertük, az acilező reagens pen-
taklór-fenilészter /BOC - Asp/OBu^t/ - OPCP/ volt. A BOC
védőcsoportot eredetileg a szabad dipeptiden /H - Asp/OBu^t/ -
- Phe - NH₂/ akartuk kiépíteni diterc. butil-pirokarbo-
nát [47] segítségével, dioxánban, majd dimetilformamid-

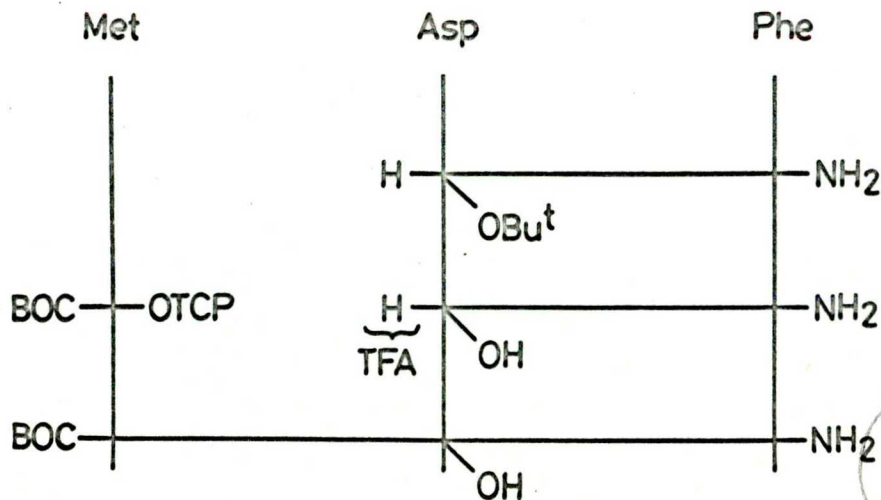
ban. Egyik reakció sem volt sikeres. A bázisos közegben számos mellékreakció következett be, /gyűrűzárás, $\alpha \rightarrow \beta$ -transzpeptidáció/ a dipeptidet nem sikerült tisztán ki-nyernünk. Az aktiv-észteres kapcsolással éteres kifő-zés után a dipeptidet kromatográfiásan tiszta formában kaptuk meg. —

BOC - Asp - Phe - NH₂ /6/



A vegyes anhidrides kapcsolás során az aszparaginsav aminocsoportját terc. butiloxi-karbonil csoporttal, a β karboxilcsoportot benzilészterrel védtük. A benzil-észter a BOC védőcsoport mellől hidrogenolizissel Pd/csont-szén katalizátort alkalmazva szelektive eltávolítható.

BOC - Met - Asp - Phe - NH₂ /8/

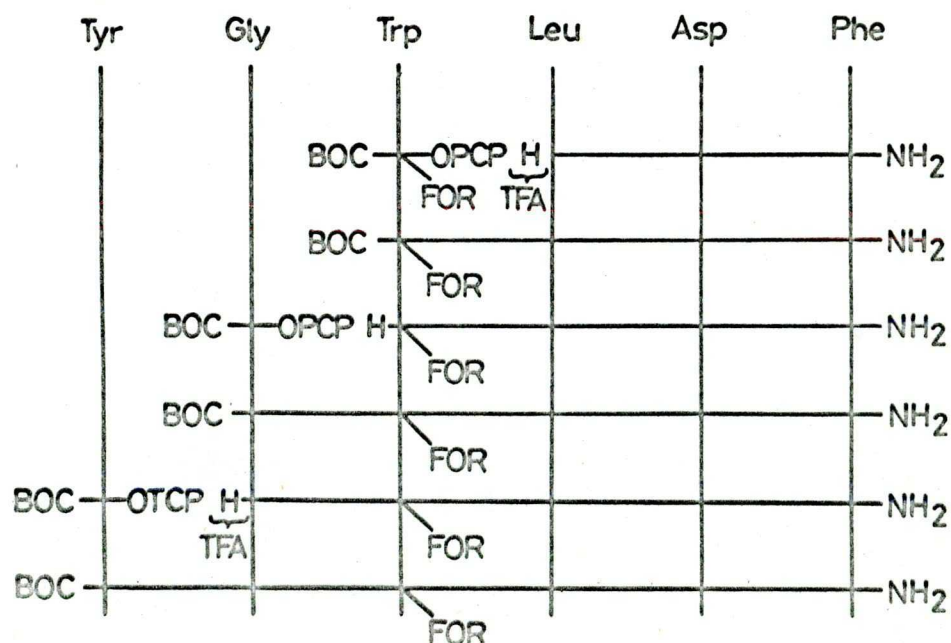


A dipeptidről a β terc. butilészter csoportot trifluor-ecetsavval távolítottuk el, majd BOC-metionin-triklór-fenil-észterrel nitrogén atmoszférában végeztük el az aktiv-észteres kapcsolást.

Egy korábban előállított tripeptidünkben a metionin oxidálódott. Megpróbáltuk az oxidálódott metionint a peptiden belül redukálni. Redukálószerként merkaptó-etán-szulfonsavat /MES/ használtunk. A reakciót 50°C-on végeztük, és a reakció lefutását vékonyréteg-kromatográfián ellenőriztük: 5%-os vizes piridin-acetát-etil-acetát pufferben. A módszer nem vált be, mert a metionin-szulfoxid ugyan redukálódott, de az erős sav /MES/ hatására a savérzékeny BOC védőcsoport is jórészt lehasadt.

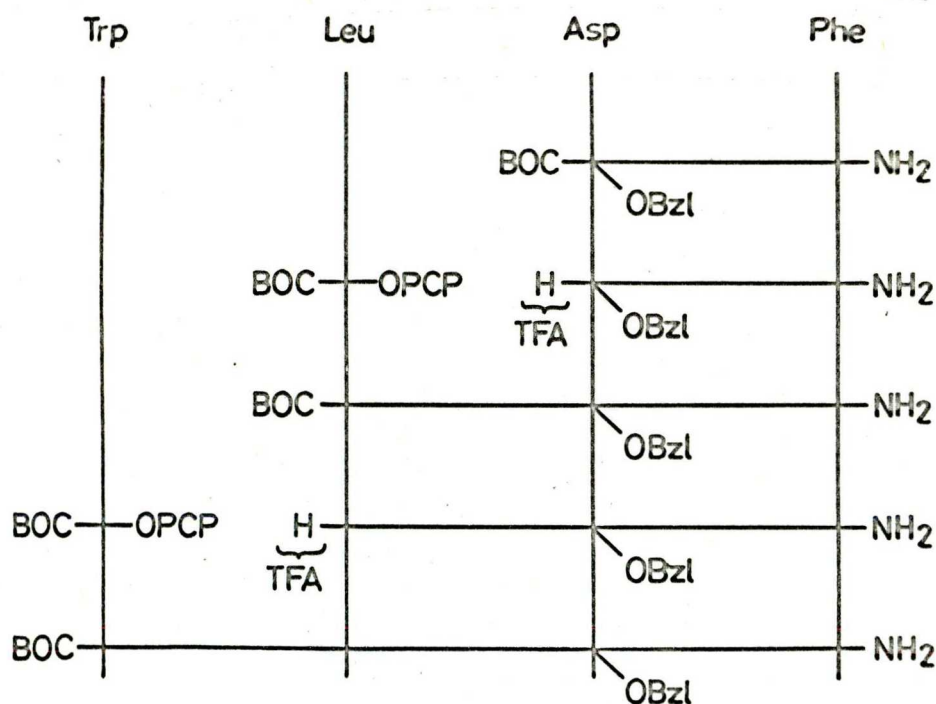
A BOC - Leu - Asp - Phe - NH₂ /11/ úgy állítottuk elő, hogy a TFAXH - Asp - Phe - NH₂ szabad dipeptidet a BOC - Leu - OCPH-vel acileztük.

A BOC - Tyr - Gly - Trp/FOR/ - Leu - Asp/OH/ - Phe - NH₂/16/ szintézise:



A kapcsolásokat aktiv-észteres /pentaklórfenilészter, triklórphenilészter/ kondenzációval végeztük; az aktiv-észteres acilezések rendszerint igen jó hozammal járnak, a termék tisztítása egyszerűbb, s emellett nem vész kárba az értékesebb aminokomponens. Az aminocsoport védelmére minden esetben a BOC-csoportot alkalmaztuk, amit acidolizissal távolítottunk el. A mellékreakciók elkerülésére a triptofán indolgyűrűjét formil-csoporttal védtük.

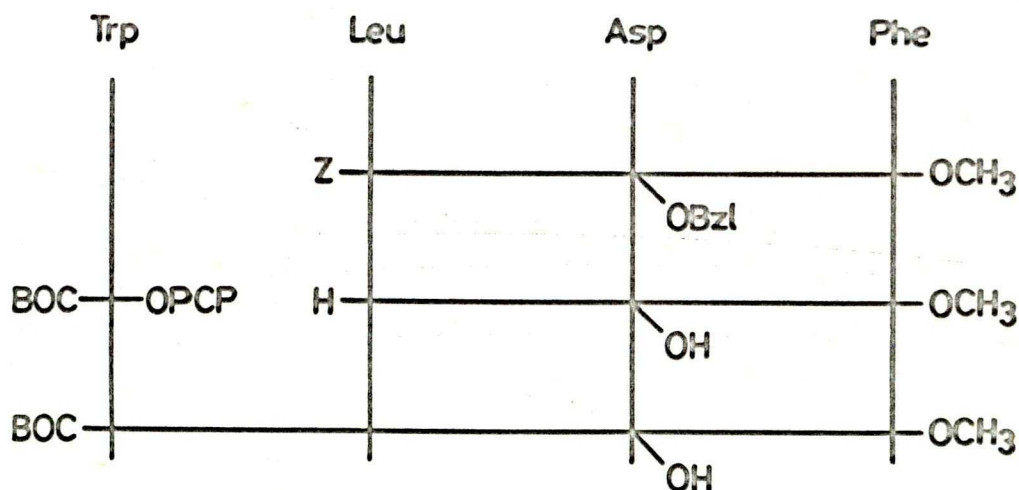
A 12 és 14 peptidek szintézise:



A szintézisterv jellegében hasonló az előzőhöz. Az aszparaginsav β karboxilját benzilészterrel védtük, hogy a BOC-csoport szelektíve eltávolítható legyen.

A BOC - Trp - Leu - Asp - Phe - NH₂/13./ és a BOC - Gly - Trp - Leu - Asp - Phe - NH₂/15./ tetra- és penta-peptidet a formil-védőcsoportot tartalmazó származékból állítottuk elő. A védőcsoportot a peptidekről piperidines kezeléssel távolítottuk el.

A 17., 18. és 19. peptidek szintézise:



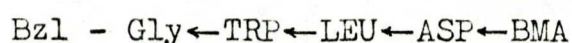
A tripeptidről a benziloxikarbonil- és benzilészter védőcsoportokat egy lépésben, hidrogenolizissal távolítottuk el. A 19. tetrapeptidet aktiv-észteres kapcsolással nyertük.

A térszerkezeti vizsgálatokat Párizsban, a Francia Atomenergia Központ Biokémiai Intézetében végezték magmágneses rezonancia spektroszkópia és cirkulár dikroizmus mérések segítségével. A mérések egy része vizes oldatban, másik része trifluoretanol-viz elegyében történt./A trifluoretanol-viz elegy kevésbé poláros jellegű, mint a tiszta víz így ezzel az oldószereleggyel szimulálják a sejtmembrán és közvetlen környezetének viszonyait./

Az eddigi mérési eredmények teljes mértékben megerősítik a "stacking" konformációt [15].

2. A hormon-receptor kölcsönhatás tanulmányozására szintetizált gasztrin analógok

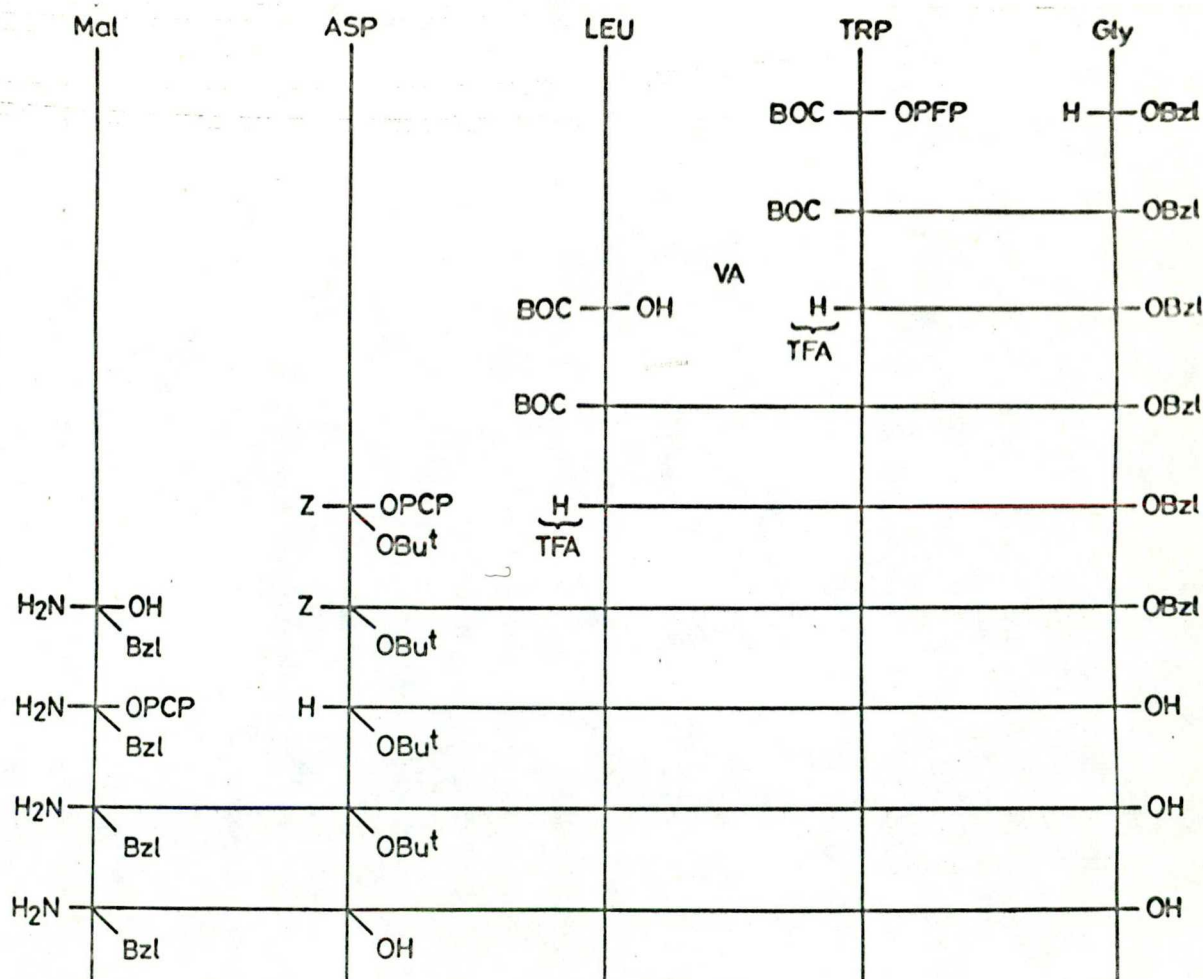
A hormon-receptor kölcsönhatás vizsgálatára szintetizáltuk a D-retro pentagasztrint:



/Konvenció szerint a D aminosavakat csupa nagybetűvel rövidítjük. A nyíl a $\text{CO} \rightarrow \text{NH}$ kötésirányát jelzi/.

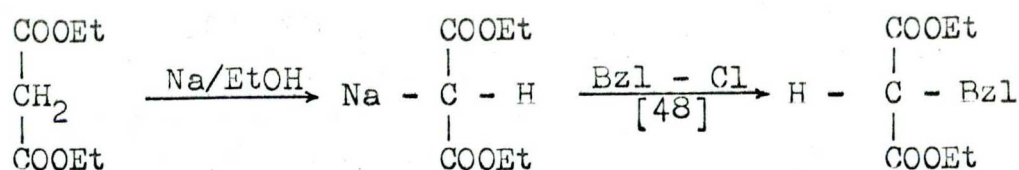
A fenilalaninamid helyett benzilmalonsav-félamidot /BMA/ használtunk. Ezen analóg segítségével megállapítható, hogy a peptidkötések részt vesznek-e a receptorhoz való kötődésben.

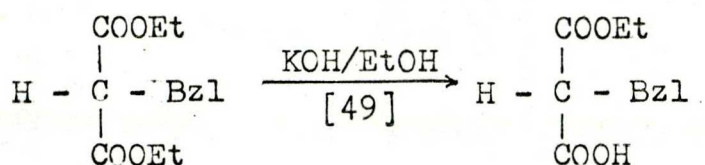
A pentapeptid szintézissterve:



A glicin-benzilésztert hidroklorid sójából szabadítottuk fel. A sófelszabadítást és az aktiv-észteres kapcsolást nagyon gyorsan kell elvégezni, mivel a benzilészter nagyon könnyen diketopiperazint képez. Ezért használtuk a pentafluorfenilésztert acilező-szerként. A BOC védőcsoportot N₂ atmoszférában trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el; gyökfogóként az indolgyűrű védelmére merkaptóetanolt és vizet adtunk. A tripeptidet vegyes-anhidrides kapcsolással nyertük, mert a mellékreakció /gyűrűzáródás/ a gyors acilezési reakcióval elkerülhető. A tetra- és penta peptidet már aktiv-észteres kondenzációval /pentaklórfenilészterek/ állítottuk elő. Az aszparaginsav aminocsoportját karbobenzoxi csoporttal, a karboxilt terc. butilészterrel védtük. Ezzel a védőcsoport kombinációval a karbobenzoxi- és a benzilészter csoportok egy lépésben hidrogenolizissel a β terc. butilészter mellől szelektíve eltávolíthatók voltak. A terc. butilésztert savas hidrolizissel /trifluorecetsav/ hasítottuk le a pentapeptidről.

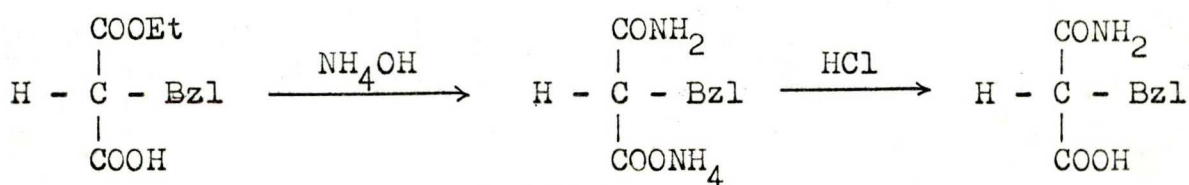
A benzil - malonsav - félamid előállítása többlépéses reakció, a vegyületet két módszerrel is előállítottuk. Első lépés a benzil - malonsav - félészter előállítása:



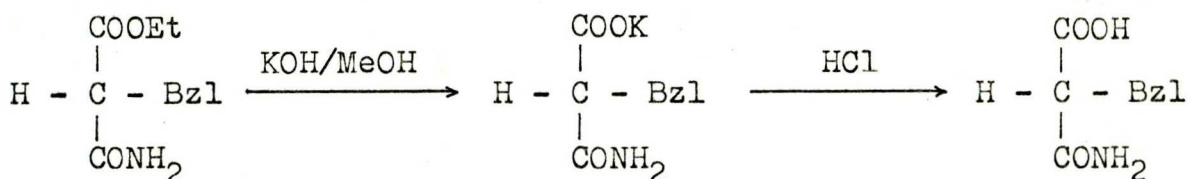


A kapott félésztért megfeleztük és két különböző módszer szerint állítottuk elő a benzilmalonsav-félamidot:

1./ Amidálás vizes közegben ammóniával:

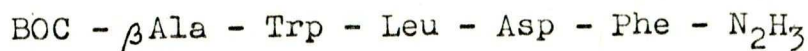


2./ Amidálás tetrahidrofuránban:



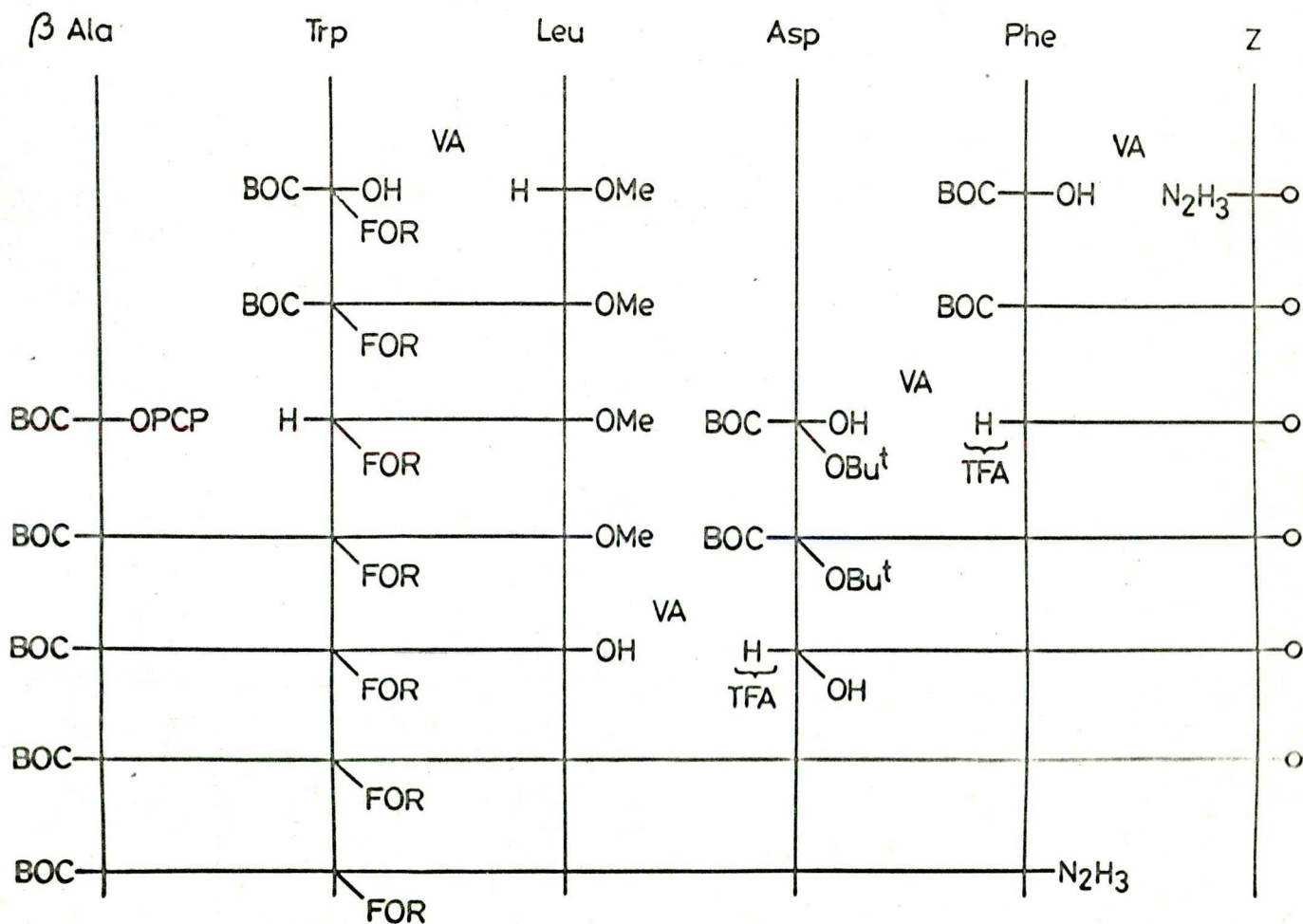
Az első módszerrel kisebb termeléssel fehér, kristályos terméket kaptunk, amely kromatográfiásan tiszta volt. A második módszerrel másfélszer jobb termeléssel sárgás olajat kaptunk, amely kromatográfiásan szintén egységes. A pentapeptid szintézise közben publikálta Morley[76], hogy előállította a D-retro-pentagasztrint és ennek nincs gyakorlatilag semmi biológiai aktivitása. Ezért a szintézisünket mi is lezártuk, a malonsav-amid rész rezolválását már nem végeztük el.

A hormon-receptor kölcsönhatása affinity labelling-gel is vizsgálható/23.o./. Ezért előállítottuk a következő pentapeptidet:



Ebből a peptidből egy lépésben /reakció salétromossavval/ előállítható a pentapeptid-azid, amely stabil kovalens kötést képez a kötőfehérjével./Figyelembe véve, hogy az azid nem stabil, a hidrazid benziloxi-karbonil csoporttal védett származékát adtuk át biológiai vizsgálatra. A vizsgálatok még folyamatban vannak/.

A pentapeptid szintézissterve a következő:



A pentapeptidet a C-terminális di- és az N-terminális tripeptid fragmenskondenzációjával állítottuk elő.

A C-terminális dipeptidet vegyes-anhidrides kapcsolással nyertük, az aszparaginsav aminocsoportjának és β karboxiljának védelmére a BOC- és terc. butilészter védőcsoportokat használtuk, mert ezek acidolizissel szelektívek, egy lépésben eltávolíthatók a benziloxi-karbonil csoport mellől.

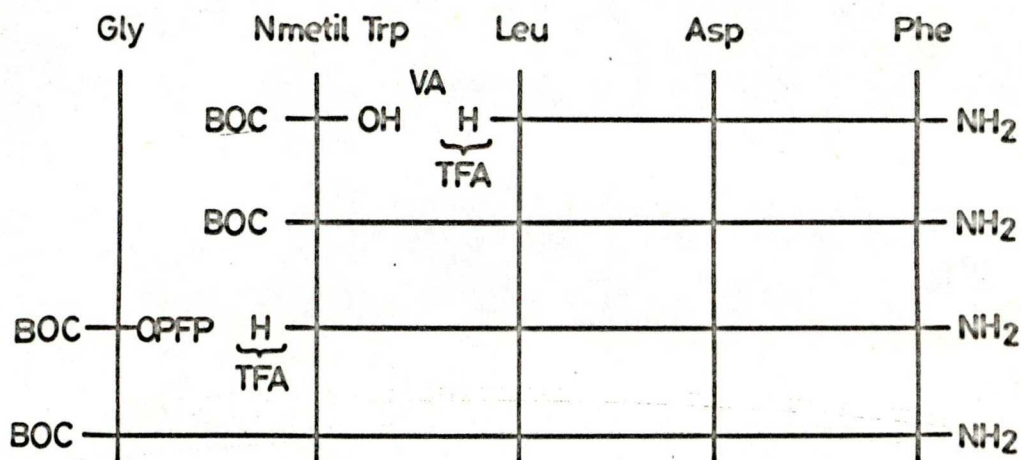
Az N-terminális tripeptidet vegyes-anhidrides és aktiv-észteres kondenzációval kaptuk. Az aminocsoportot itt is BOC-csoporttal védtük és trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el a metilészter mellől. A triptofán indolgyűrűjét formilcsoporttal védtük. A metilésztert lugos körülmények között hidrolizáltuk. A fragmenseket vegyes-anhidrid segítségével kapcsoltuk össze.

Metabolizmus vizsgálatokkal már előzőleg valószínűsítették, hogy egy metabolizáló enzim a glicin és triptofán között hasítja a pentragasztrint [50]. Ezért olyan peptideket szintetizáltunk, amelyekben térgátlás miatt a triptofán és az N-terminális aminosav közötti kötés az enzim számára kevésbé hozzáférhető; ezeknél feltételeztük, hogy elhuzódó biológiai hatást mutatnak:

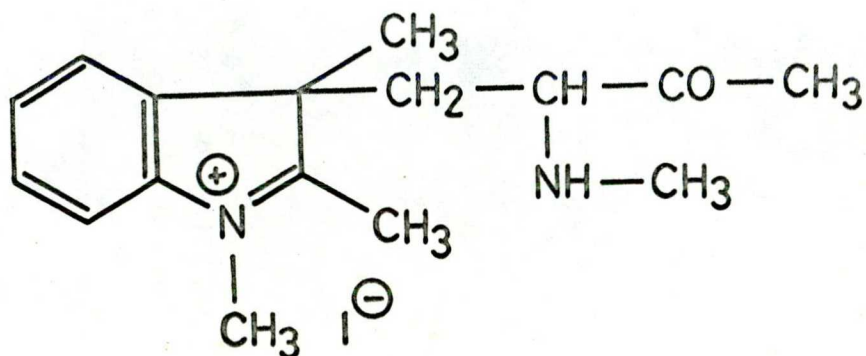
BOC - Gly - Nmetil Trp - Leu - Asp - Phe - NH₂

Z - Val - Trp - Leu - Asp - Phe - NH₂

Az előállított peptidek szintézissterve:



A BOC - Nmetil Trp - metilészter előállítása Olsen [51] módszere alapján történt. A BOC-triptofánt DMF-es oldatban CH₃I-dal, frissen leválasztott Ag₂O katalizátor jelenlétében metileztük. A metilezett terméket kromatográfiásan tisztítottuk. Felmerül a kérdés, vajon a triptofán indolgyűrűje metilezhető-e a fenti reakció során. /Az indolgyűrűben elvileg az 1-es, 2-es, 3-as atom, valamint az α-amino és a karboxilcsoport [52] metilezhetőhet/



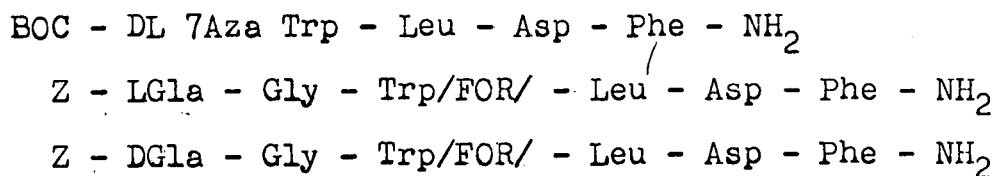
A proton NMR vizsgálatok azt mutatták, hogy csak az α amino- és karboxilcsoport metileződött.

A metilészteret lugos hidrolizissal elhidrolizáltuk, az így nyert N-metil-triptofán kromatográfiásan tiszta. A tetrapeptidből tisztítás után, aktiv-észteres kapcsolással nyertük a pentapeptidet. Aktiv-észterként az N-metil-triptofán α imino csoportjának a primet aminokhoz képest csökkent reakciókészsége miatt pentafluorfenilészteret használtunk.

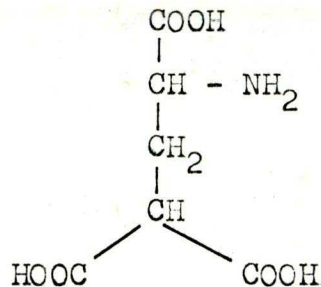
A valin. tartalmu pentapeptidet a már korábban előállított TFAXH - Trp - Leu - Asp - Phe - NH₂ tetrapeptidből aktiv-észteres kapcsolással nyertük. A valin elágazó szénláncja miatt az α -karboxilcsoport reakciói nagymértékben gátoltak [53], ezért az aminosav pentafluorfenilészter származékát használtuk kapcsoláshoz.

Az eddigi vizsgálatok szerint az N-metil-triptofán tartalma peptid hatástalan, a valin tartalma peptid pedig csökkent biológiai hatása. Feltételezhető, hogy térszerkezeti okok miatt nem tudnak megfelelően kötődni a receptorhoz.

Megvizsgáltuk, hogy savas és bázikus csoportok beépítése hogyan módosítja a gasztrin biológiai hatását. Ebből a célból szintetizáltuk az alábbi analógokat:



A γ -karboxi-glutaminsav /Gla/ szerkezete a következő:



A γ -karboxi-glutaminsav származékok előállításának több célja is volt:

- 1./ A fehérjék és peptidek szekvencia analizise és aminosav analizise alapján igen nehezen dönthető el, hogy csak glutaminsav illetve γ -karboxi-glutaminsav is van a molekulában? Az analizist megelőző savas hidrolízis során ugyanis a γ -karboxi-glutaminsav elbomlik glutaminsavra. Lehetséges, hogy számos peptid /így a gasztrin is/ melyben jelenleg csak glutaminsavat feltételezünk a valóságban γ -karboxi-glutaminsavat is tartalmaz.
- 2./ A γ -karboxi-glutaminsavnak nagyon jó a Ca^{2+} ion kötő képessége /kelátot képez/. A Ca^{2+} ion az élő szervezetben igen nagy jelentőségű, az újabb kutatások szerint "second messenger" szerepet tölt be a hormonhatás közvetítésében, akár csak a ciklikus AMP.
- 3./ Nem ismert, hogy a hormon hatását hogyan befolyásolhatja egy újabb karboxilcsoport beépítése. /A gasztrinhoz hasonló kolekisztokininnél a biológiai hatásért nagymértékben a tirozin szulfátészter csoport a felelős./

A peptidek szintézise:

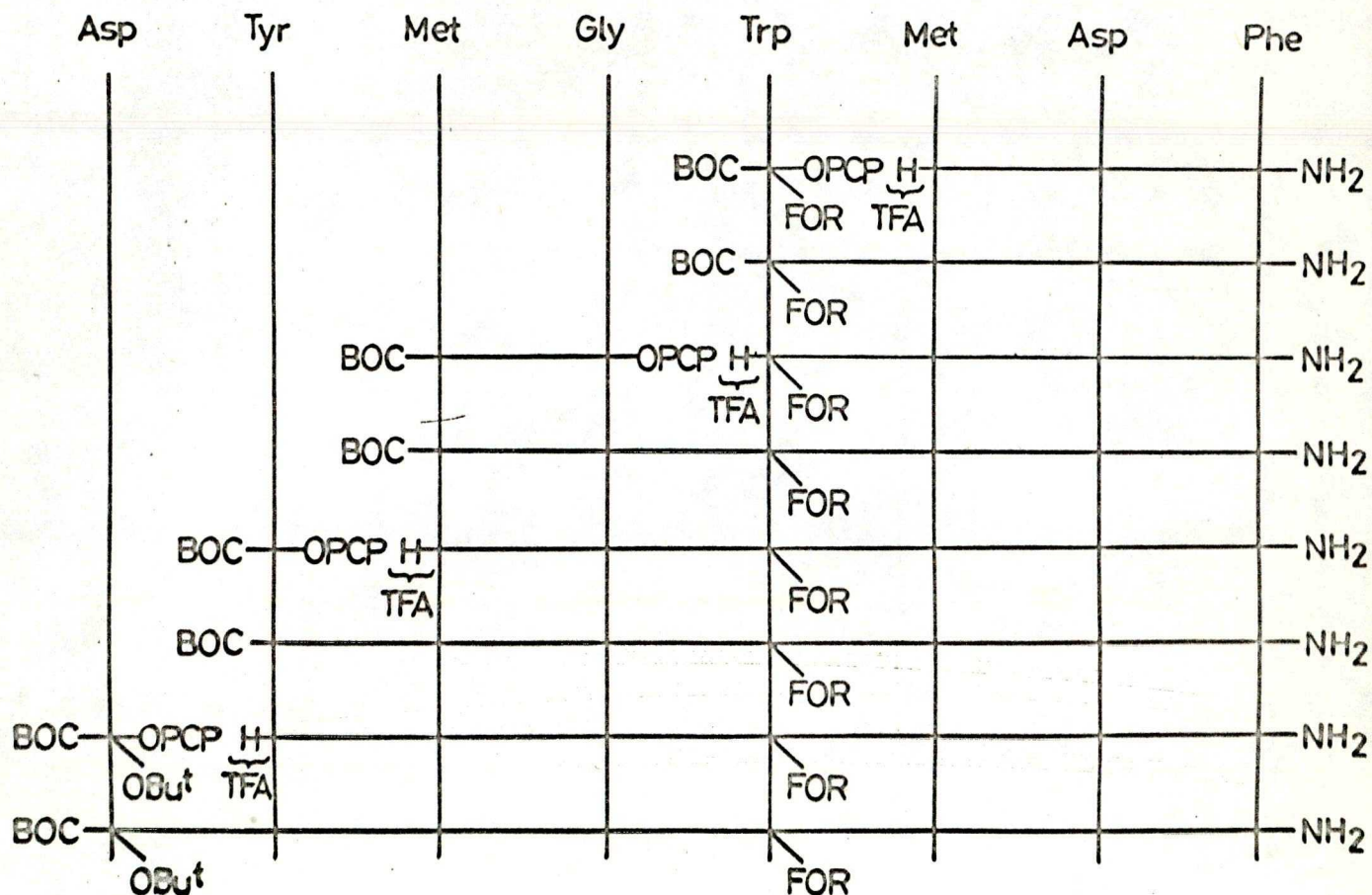
A BOC - 7Aza Trp - Leu - Asp - Phe - NH₂ tetrapeptidet a tripeptidből /TFaxH - Leu - Asp - Phe - NH₂/ vegyes-anhidrides kapcsolási módszerrel állítottuk elő. A γ -karboxi-glutaminsav tartalmu hexapeptideket szabad pentapeptidből /H - Gly - Trp/FOR/ - Leu - Asp - Phe - NH₂/ pentaklórfenil-észteres kapcsolással állítottuk elő, az aminocsoportot karbobenzoxi-csoporttal a Gla γ -karboxilt pedig terc. butilészterrel védtük.

Az eddig elvégzett biológiai aktivitás vizsgálatok szerint a bázikus csoport bevitele a hormon hatását csökkenti: a 7-azatriptofánt tartalmazó peptid biológiai aktivitása 30%-kal csökkent a gasztrin tetrapeptidhez képest [54]. Ez valószínű azzal magyarázható, hogy a triptofán és fenilalanin közötti aromás kölcsönhatás erősebb, stabilabb térszerkezetet ad, mint a 7-azatriptofán analóg tetragasztrinnál.

A γ -karboxi-glutaminsavat tartalmazó hexapeptidek biológiai vizsgálata és komplexképzési tulajdonságai közötti összefüggések felderítése most van folyamatban.

3. Kolecisztokinin oktapeptid szintézise farmakológiai vizsgálatok céljára

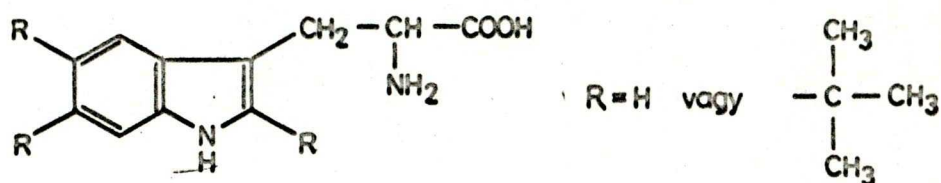
Előállítottuk a gasztrin család másik tagját, a kolecisztokinin /CCK/ C-terminális oktapeptidjét az alábbi szintézisterv alapján farmakológiai vizsgálatok céljára:



A szintézistervben szereplő H - Met - Asp - Phe - NH₂ és BOC - Met - Gly - OPCP peptideket az irodalomból ismert módon aktiv-észteres kapcsolással állítottuk elő, BOC - aminosav - pentaklórfenilészterek alkalmazásával. Amint az ábrából is látható a Trp, Tyr és Asp kapcsolását is pentaklórfenil-észterek segítségével oldottuk meg.

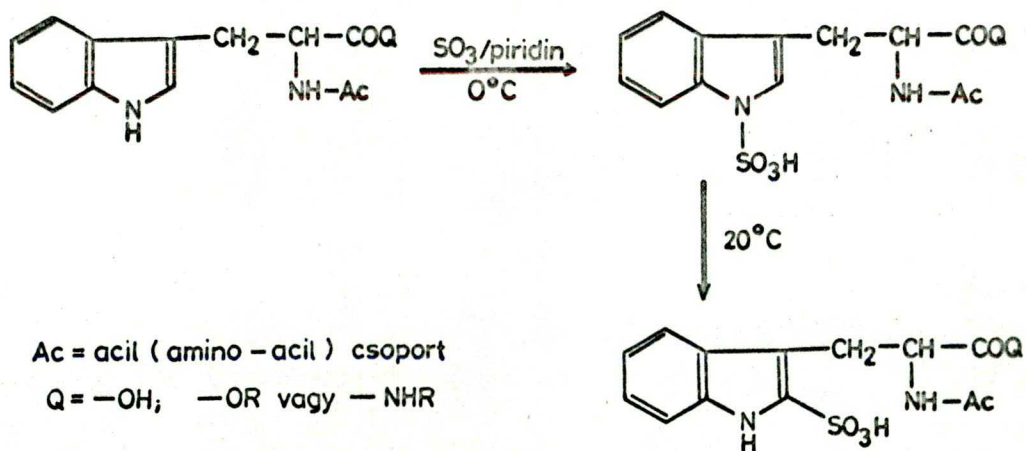
A peptidkémiai szakirodalomban az oktapeptid és oktapeptid - szulfátészter előállítására korábban leírt módszerek egyike sem alkalmaz védőcsoportot a triptofán indolgyűrűjének védelmére. Az irodalom és a saját kísérleti tapasztalataink szerint ez számos mellékreakciót okoz.

Az N^d - BOC - védőcsoportok eltávolítása közben a triptofán aromás gyűrűje terc. butileződik



Ezáltal olyan stabil melléktermékek képződnek, amelyek kémiai és fizikai tulajdonságaikat tekintve nagyon közel állnak a kívánt peptid főtermékhez, s rendkívül nehéz tőlük megszabadulni, a végtermék hormon aktivitását pedig jelentősen csökkentik.

További melléktermék képződéshez vezet, hogy a szulfátészter képződésnél a nagy feleslegben alkalmazott piridin - kéntrioxid komplex a triptofánt szulfonálja; intermedierként N^i -szulfonsav képződik, amely magasabb hőfokon 2-szulfonsavvá alakul át:



Ez a kísérleti tapasztalatunk jó összhangban van Terentyev és Gimbol kísérleti eredményeivel [55].

Az említett mellékreakciókat úgy kerültük el, hogy a triptofán indol N-jét az oktapeptid szintézise során formilcsoporttal védtük. Az N-acil- és N-formil-triptofán csak igen magas hőfokon /130-140°C/ szulfonálható a piridin -SO₃ komplexszel [56].

További problémát okozott a védett oktapeptidből a szabad oktapeptid-szulfátészter előállítása. Az oktapeptid szulfatálását eddig úgy oldották meg, hogy a tirozin fenolos hidroxilcsoportját piridin-kéntrioxid komplexszel [63] ill. koncentrált kénsavval reagáltatták [25]. A teljesen védett peptid a DCC- H₂SO₄ reagens segítségével [64, 65, 66] is szulfátészterre alakítható. A kénsavas módszernél eleve nagy mennyiségű melléktermék képződésével /szulfonálódás/ kell számolni. Megvizsgáltuk a piridin-kéntrioxid komplexen kívül jó néhány tercier amin kéntrioxiddal képzett komplexét, abból a célból, hogy megállapítsuk, melyik komplex a legalkalmasabb a szulfátészter előállítására. Vizsgálataink szerint legalkalmasabb erre a célra a TEA, ill. N-metil-morfolin-kéntrioxid komplex. Az N-metil-morfolin-kéntrioxid komplex reaktivitása THF ill. dioxán adagolásával fokozható. Ezek katalizátor szerepe azzal magyarázható, hogy a kéntrioxiddal adduktumot képeznek.

A gyakorlatban problematikus a szulfátészter-cso-

port mellett a védőcsoportok eltávolítása. A peptid mentionin tartalma miatt erre a célra csak a nagy savérzékenységű védőcsoport /BOC/ jöhet számításba. A szulfátészter savérzékenysége miatt a BOC-csoport eltávolítására alkalmazott igen rövid /15-20 perc/ trifluorecetsavas kezelés is mintegy 20-30%-ban hasítja a szulfátésztert is. A Na, ill. K-só viszont megakadályozza a szulfátészter acidolitikus hasítását. Ezzel a módszerrel jó termeléssel nyerhető az oktapeptid-szulfátészter Na-sója, és a végtermék tisztítása könnyen megvalósítható szilikagél oszlopkromatográfiával.

Ezek az újítások magyar szabadalmi védelmet nyertek [57, 58].

4. Élő sejtek izolálása kutya gyomor nyálkahártyából; a sejtek kötődésének vizsgálata.

a./ Élő sejt izolálás

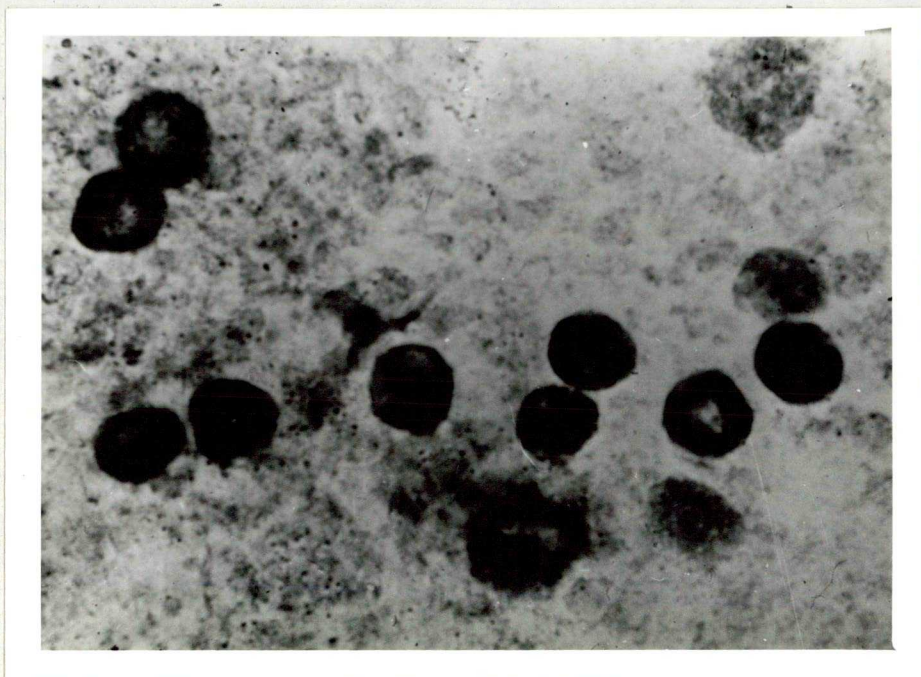
A hormon-receptor kölcsönhatás vizsgálatának egyik módszere hormonok kötődésének mérése élő sejt preparátumon. Élő sejtnek tekintjük azokat a sejteket, amelyeknek anyagcseréjük van. Célunk élő parietális sejt izolálása volt [59], a tetragasztrin, pentagasztrin és analógjai biológiai hatásának vizsgálatára. A parietális sejt izolálását az irodalomban leírt módszerek ismeretében terveztük meg.

Kutyagyomor artériába kollagenázt adtunk be. Így az enzim a véráram útján jutott el a gyomorba. A kollagenáz lebontja a sejtek közötti ragasztó fehérjéket. /Ezt a lépést a későbbi élősejt izolálások alkalmával elhagytuk, mert e nélkül is jó eredményt értünk el./

Gyors kioperálás után a belső nyálkahártya réteget eltávolítottuk mosással. /A mosó oldatot előzőleg $O_2 - CO_2$ -dal telítettük./ A kivágott darabot Krebs-Ringer oldatban emésztettük kollagenázzal, hialuronidázzal és kimotripsinnel $37^{\circ}C$ -on. Az oldathoz glükózt és komplett aminosav-szuplementet adtunk, valamint állandóan biztosítottuk az $O_2 - CO_2$ 95:5% arányát, hogy a sejtek életben maradjanak.

Az első enzimes emésztés után EDTA adagolásával kalcium-kelátot képeztünk, ez elősegíti a szövet fellazulását és sejtekre történő szétesését. ViSSzapótoItuk a kalcium és magnézium sókat, elvégeztük a második emésztést. A sejtek disszociációját mágneses keveréssel segítettük elő. Ezután a sejtek szeparálása és mosása következett - közben megszabadultunk az enzimtől és a sejttörmeléktől - gradiens centrifugálással. Ily módon sikerült élő, parietális sejtet nyerni kutyagyomor nyálkahártyából, mely alkalmas receptor vizsgálatokra. Ez a módszer költséges, de hormonok kötődésének vizsgálatára közvetlenül alkalmas. Közvetlenül az izolálás után a sejtek 95-98%-a élt, ezt tripánkék festék kizáródása és a szukcinil-dehidrogenáz enzim kimutathatósága bizo-

nyitotta.

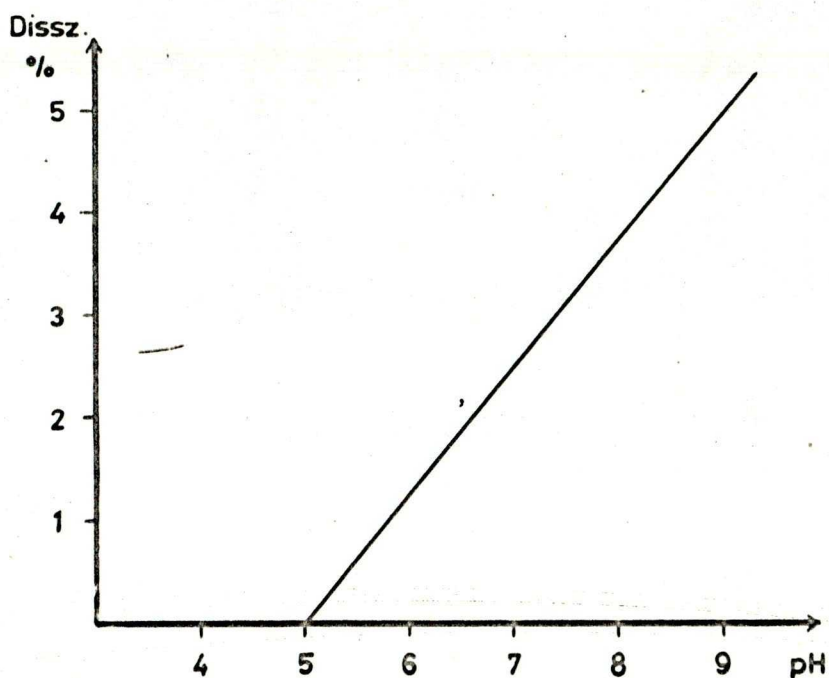


Az izolált élő sejtek hűtőszekrényben, megfelelő körülmények között jól tárolhatók. Még 4 nappal az izolálás után is kb. a sejtek 70%-a életben marad O_2 - CO_2 -dal telített $+4^\circ C$ -on tárolt Krebs-Ringer oldatban, amely adalékként glükózt és komplett aminosav szupplementet tartalmazott.

b./ Affinitás adszorbensek készítése

Az élő sejt preparátummal affinitás mikroszkópai vizsgálatokat végeztünk. Ehhez affinitás adszorbenseket készítettünk. A hexagasztrint BrCN-nal aktivált Sepharose 4B-hez immobilizáltuk. Spacerként ϵ -aminokaprónsavat / ϵ -ACA/ használtunk.

A védett ϵ -ACA- hexapeptidet /BOC - ϵ ACA - Tyr - Gly -
- Trp - Met - Asp - Phe - NH_2 -ot/ már korábban előállít-
tották. Ez nem volt megfelelő tisztaságu, ezért szili-
kagél oszlopkromatográfiával tisztítottuk. A BOC védő-
csoportot trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el.
Az így nyert ϵ -ACA-hexagasztrint BrCN-nal aktivált
Sepharose 4B gélhez kapcsoltuk [60]. A BrCN-os aktivá-
lás 20°C -on, pH 11-en történt. A reakció során felsza-
baduló sav miatt 8N KOH adagolásával tartottuk a pH-t
11-en. A reakció exoterm, ezért a reakció elegyet jéggel
hűtöttük. /Az aktiválási idő 25-30 perc./ Ezután a gél
azonnal szűrtük és 0,2 M NaHCO_3 pufferrel /pH 9,5/
mostuk. A gél gyorsan áttettük egy edénybe, amely a li-
gandumot tartalmazta. A kapcsolási idő $+4^\circ\text{C}$ -on 20 óra.
A kapcsolás mértékét a reakcióelegy pH-ja meghatározza,
mert az aminos csoport nem-protonált formája a reaktív.
A szubsztituált gél nagy ionerősségű /2M KCl/ oldattal,
majd 0,2 M Na-acetát pufferrel /pH 5/ mostuk, és 0,2 M
pH 5 Na-acetát pufferben tároltuk $+4^\circ\text{C}$ -on.
A mosás célja: a nem-kovalensen kötött ligand eltávolítása.
Tároláskor fellép a "szivárgás" /leakage/ jelensége,
amelynek során a ligandum lehasad a hordozóról. A folya-
mat pH függő, pH 5 alatt nem játszódik le, mivel a kötés
stabil.



A kapcsolt ligand mennyiségét UV spektrofotométerben, 1 mm-es küvetákat használva $\lambda = 270$ nm-nél határoztuk meg. A hexapeptidnek mintegy 90%-a kapcsolódott a hordozóhoz /90 mg/20 ml gél/.

A fent leírt módszerrel a következő adszorbenseket készítettük el:

- a./ Sepharose - ϵ ACA - Tyr - Gly - Trp - Met - Asp - Phe -NH₂
- b./ Sepharose - ϵ ACA - Butilamin
- c./ Sepharose - ϵ ACA

Az a./ adszorbens készítésénél 20 ml Sepharose 4B-t 2 ml, 2 g BrCN tartalmu BrCN/acetonitril oldattal aktiváltuk, majd 100 mg ϵ ACA - hexagasztrinnal kapcsoltuk. 90 mg / 10^{-3} M/1/ hexapeptid kötődött a mátrixhoz.

A b./ adszorbens készítésénél 20 ml Sepharose 4B-t a fenti módon aktiváltuk, majd 2 ml n-butilaminnal reagáltattuk. Ez az adszorbens szolgált az apoláros kölcsönhatások vizsgálatára.

A c./ adszorbens csak a "spacer" tartalmazta. Erre azért van szükség, mert néhány esetben megfigyelték [61, 62], hogy a makromolekula és ligand közötti specifikus kötődés mellett nem-specifikusan is kötődnek fehérjék azáltal, hogy hidrofób oldalláncuk kölcsönhatásba lép a térkitöltő molekulával. Ha tehát teljesen azonos körülmények között elvégezzük a kísérletet a gél - spacer - ligand és a gél - spacer adszorbenssel és a makromolekula csak az első adszorbenshez kötődik, akkor kizárhatjuk a nem-specifikus kötődés lehetőségét.

Laboratóriumunkban neurotranszmittereket is immobilizáltak AH - Sepharose-hoz vegyes anhidrides kapcsolási módszerrel. Neurotranszmitterként hisztamint, acetilkolint, szerotonint és noradrenalinat használtak. Ezeket az adszorbenseket is felhasználtuk a gyomor parietális sejt affinitás mikroszkópiai vizsgálatához.

Affinitás mikroszkópiai vizsgálatok

Az élő sejt preparátummal és az affinitás adszorbensekkel affinitás mikroszkópiai vizsgálatokat végeztünk /20.o./ Az immobilizált hormont tartalmazó Sepharose szemcséket és az élő sejt szuszpenziót +20°C-on 2 percig Krebs-Ringer oldatban inkubáltuk, amely még glükózt és komplett amino-

sav szupplementet tartalmazott.

Ezután megszámláltuk, hogy mennyi sejt kötődött az adsorbenshez. A vizsgálatok során az alábbi paramétereket standardizáltuk:

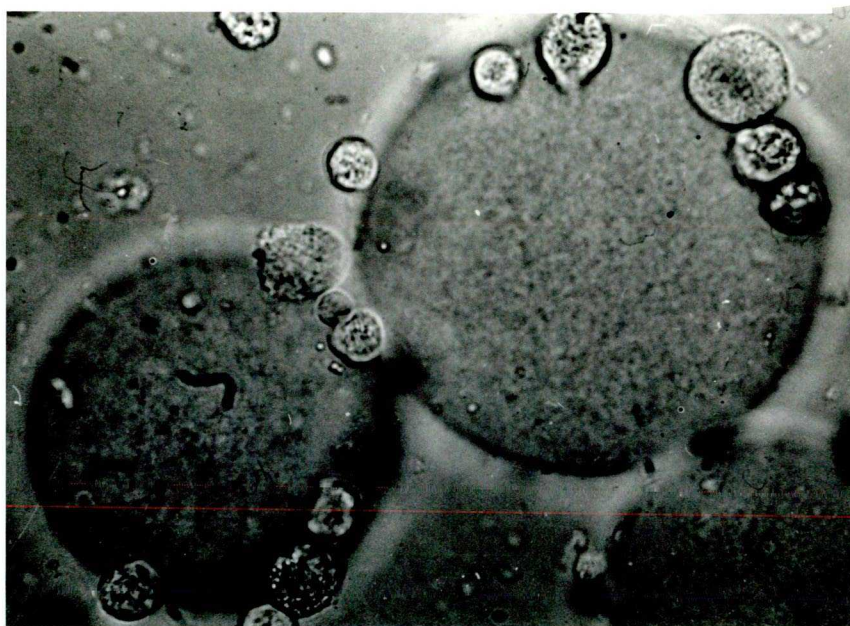
1. Sepharose szemcsék koncentrációja
2. Parietális sejtek koncentrációja
3. Hőmérséklet
4. A preparátum vastagsága
5. Inkubációs idő
6. Az alkalmazott közeg pH-ja
7. Vizsgálandó látóterek száma
8. Aspecifikus kötődés viisszaszorítása

A standard paramétereket betartva az alábbi mérési eredményeket kaptuk:

Adsorbens	Reagens az inkubáló oldatban	Kötött sejt /%/
Sepharose 4B-BrCN	-	17 - 19
Seph. 4B-butylamin	-	16 - 19
Seph. 4B-hexagasztrin	-	28
Seph. 4B-hexagasztrin	Hisztamin $10^{-4}M$	33
Seph. 4B-hexagasztrin	Hisztamin $10^{-5}M$	33,7
Seph. 4B-hexagasztrin	Pentagasztrin $2 \cdot 10^{-5}M$	24
AH-Seph. 4B-hisztamin	-	41
AH-Seph. 4B-acetilcolin	-	33
AH-Seph. 4B-szerotonin	-	17
AH-Seph. 4B-noradrenalin	-	21

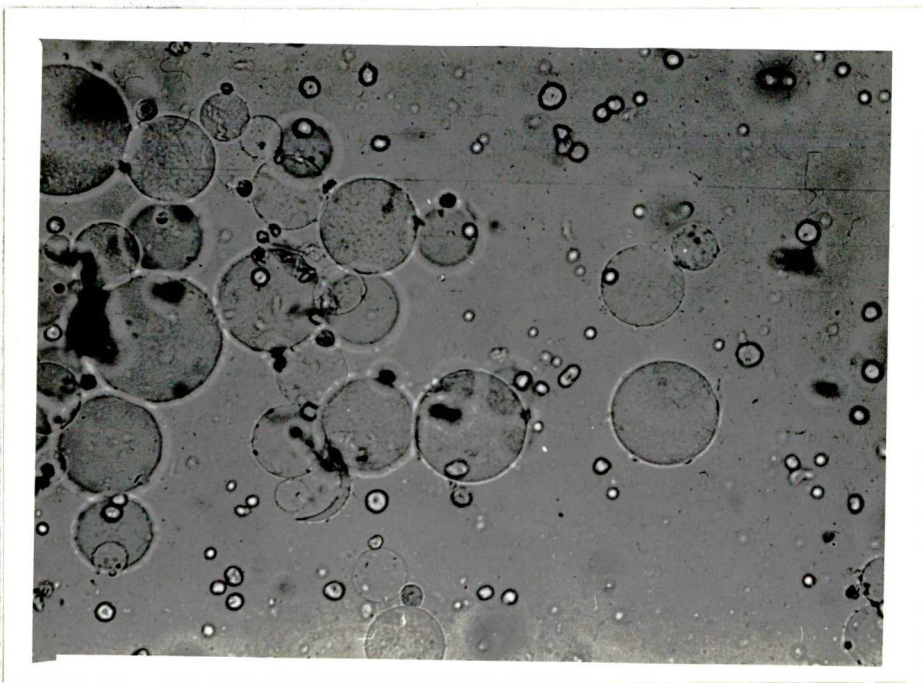
A mérések 8 sejttizolálás utáni átlag értékeket tartalmaznak és alkalmanként 5-10 mikroszkóplátótérben számoltuk meg a sejteket.

Méréseink alapján úgy tűnik, hogy a szerotonin és a noradrenalin nem kötődik a gyomor mucosa sejtekhez. A hexagasztrin, a hisztamin és az acetilkolin immobilizált alakban is kötődik az izolált sejtekhez. A hexagasztrin - Sepharose - ról a sejtek pentagasztrinnal leszoríthatók, 10^{-4} - 10^{-5} M hisztamin pedig erősíti a kötést /interdependencia/

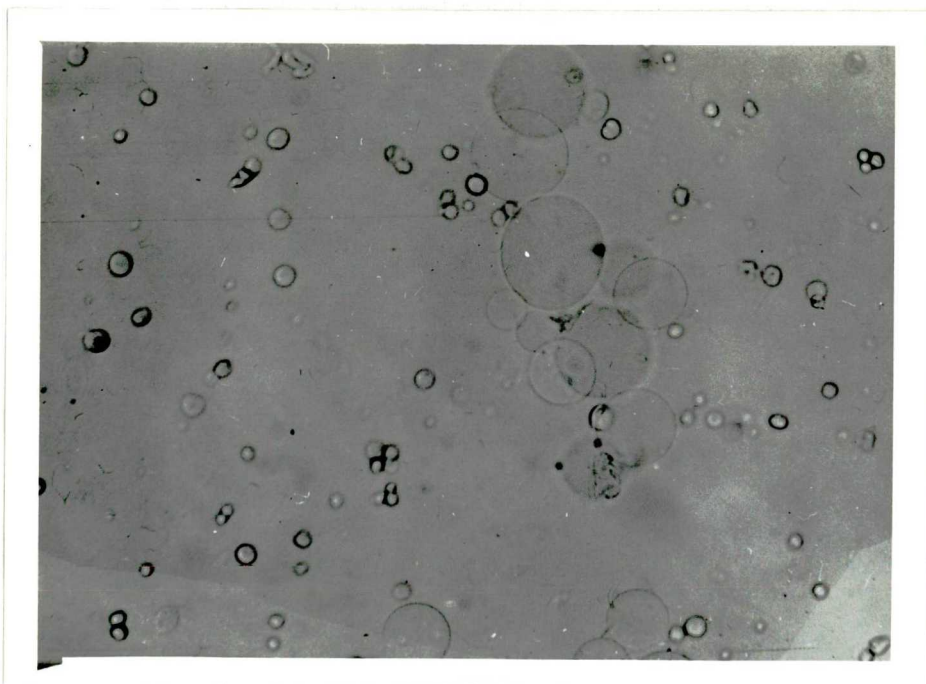


Az élő sejtek kötődnek az immobilizált hisztaminhoz





Aspecifikus kötődés



A szerotonin csak az aspecifikus kötődésnek megfelelő
értékben kötődik az élő sejtekhez

A kísérleteket /élő sejt izolálás és aff. mikroszkópia/
a Szegedi Orvostudományi Egyetem I. sz. Belgyógyászati
Klinikájával közösen végeztük.

III. KISÉRLETI RÉSZ

Általános megjegyzések

Az olvadáspontok mérésére Koffler-készüléket használtunk. Az optikai forgatóképességet Zeiss asztali polariméteren mértük. A vékonyrétegkromatogramokat Kieselgél G adszorbensen fejlesztettük ki, néhány esetben kész gyári rétegeket alkalmazva.

A vékonyréteg kromatográfiában alkalmazott oldószer rendszerek az alábbiak voltak:

1/ Kloroform: acetón	9:1
2/ Kloroform: metanol	8:2
3/ Kloroform: metanol	9:1
4/ Kloroform: metanol: ecetsav	9:1:0,3
5/ Benzol: ecetsav	7:1
6/ n-Butanol: ecetsav: víz	4:1:1
7/ Piridin-acetát puffer: etilacetát /piridin: jégcet: víz = 20:6:11/	x:/100-x/
8/ Metil-acetát puffer: etilacetát /metanol: jégcet: víz = 2:1:2/	x:/100-x/
9/ Kloroform: acetón: metanol	8:1:1
10/ Kloroform: metanol	7:3
11/ Kloroform: hexán	4:1
12/ Kloroform: metanol: víz	70:30:1

A vékonyréteg kromatogramok előhívására a következő reagenseket alkalmaztuk:

Ninhydrin reagens:

0,5 g ninhidrint 75 ml 96%-os etanol, 25 ml viz és 0,5 ml 1N NaOH elegyében oldottunk, az oldatot szűrtük.

Tolidin reagens:

A : 0,05 M KI oldat

B : 0,2 g o-tolidint 3 ml jégecetben oldottunk és vízzel 100 ml-re egészítettünk ki.

Az A:B = 1:5 arányu elegyét használtuk.

A vékonyréteg lapokat először ninhydrin oldattal permeteztük le, majd azt kb. 6 percig infralámpa alatt tartottuk. Ezt követően a kromatogramot néhány másodpercre klórgázba helyeztük, majd szellőztetés után tolidin reagenssel hívtuk elő.

Néhány esetben UV abszorpció alapján is értékeltünk. Az UV-elnyelést 280 illetve 254 nm-en mértük.

Az anyagok oszlopkromatográfiás tisztításához Kieselgél 60 adszorbenst és a fenti oldószerkelegyeket használtunk. A frakciókat MÜFÉM gyártmányu frakciószedővel gyűjtöttük. A kromatográfia követésére részben vékonyrétegkromatográfiát, részben UV abszorpciómérést használtunk.

Z-Phe-OH

A fenilalanin acilezését karbobenzoxi-kloriddal /Z-Cl/

végeztük Bergmann és Zervas módszere [67] szerint 0,3 M fenilalaninból kiindulva.

Termelés: 88 g / 0,294 M / / 98% /

op: 88 - 89°C

R_F^1 : 0,4

M: 299,32

Z-Phe-NH₂

A karbобенzoxi-fenilalanin amidálását vegyes anhidrides módszerrel végeztük [68] 0,25 M Z-Phe-OH-ból indultunk ki.

Termelés: 69 g / 0,23 M / / 92% /

op: 165°C

R_F^5 : 0,6 R_F^1 : 0,1

M: 298,3

H-Phe-NH₂

A karbобенzoxi-fenilalanin-amidról az amino-védőcsoportot hidrogenilizissel távolítottuk el [67] Pd/C katalizátor jelenlétében [69] .

0,134 M-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 21,7 g / 0,131 M / / 98% /

op: 80 - 81°C

R_F^7 : 0,15 / 20% / R_F^7 : 0,3 / 40% /

M: 165

Z-Asp/OBu^t/-OH

A terméket mint diciklohexilamin sóát állítottuk elő. A só felszabadítása után szintelen olajat kaptunk [70].

0,138 M diciklohexilamin sóból indultunk ki.

Termelés: 42 g / 0,1298 M / / 94% /

M: 323,41

A peptideket vegyes anhidrides és aktivészteres módszerekkel állítottuk elő.

A vegyes anhidrides módszer alkalmazásakor az alábbi általános recept szerint jártunk el:

10 mM amino-védőcsoportot tartalmazó aminosav absz. etilacetátos oldatához intenzív keverés mellett -15°C -on 10 mM N-metil-morfolint és 10 mM klórszénsav-izobutilésztert adtunk. 5 perc múlva öntöttük a vegyes anhidridhez a 10 mM aminokomponens absz. DMF-es oldatát, majd egy órán át kevertettük $0 - -5^{\circ}\text{C}$ között és 10-12 órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az N-metil-morfolin x HCl-ot kiszűrtük, a szűrletet vákuumban szárazra pároltuk, a kapott olajos maradékot etilacetátban oldottuk. Az etilacetátos oldatot 5%-os KHSO_4 oldattal, vízzel majd 5%-os KHCO_3 oldattal és ismét vízzel mostuk. Na_2SO_4 -on szárítottuk, s utána bepároltuk.

A BOC-aminosavakat Schnabel [71] módszere szerint állítottuk elő.

A BOC-aminosav-aktiv észtereket pedig diciklohexil-karbo-diimides kondenzációval [72, 73] nyertük.

A peptidek aktiv észteres kapcsolását az alábbi általános recept alapján végeztük:

5 mM aminokomponenst és 5,5 mM aktiv észtert szuszpendáltunk 40 ml absz. DMF-be, majd ekvivalens mennyiségű TEA-t adtunk hozzá. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten állni hagytuk. A reakció lejátszódása után a DMF-es oldatot kb. 6 ml-re bepároltuk és 0°C -on 40 ml 5%-os KHSO_4 és 20 ml éter elegyében öntöttük. A kivált kristályokat szűrtük, vízzel és éterrel mostuk.

Z-Asp/Obu^t/-Phe-NH₂

A dipeptidet vegyes anhidrides módszerrel állítottuk elő, 0,086 M-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 34,2 g / 0,0728 M / / 85% /

op: 158°C

R_F^3 : 0,5

R_F^1 : 0,45

M: 469,6

H-Asp/Obu^t/-Phe-NH₂

A Z-védőcsoportot hidrogenolizissal távolítottuk el a védett dipeptidről, 72,6 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 24 g / 71,8 mM / / 99% /

op: 120°C

R_F^6 : 0,6

R_F^1 : 0,6

M: 334

BOC-Leu-OH

A BOC védőcsoport kiépítésekor 15 mM leucinből indultunk ki.

Termelés: 2,4 g / 10,37 mM / / 69% /

op: $86 - 87^{\circ}\text{C}$

R_f^7 : 0,9 / 5% /

M: 231,33

BOC-Leu-OPCP

Az aktív észter előállításához 39 mM BOC-leucint használtunk fel.

Termelés: 10,2 g / 21,26 mM / / 54% /

op: 95 - 100°C

R_f^L : 0,65

M: 479,66

BOC-Leu-Asp/OBu^t/-Phe-NH₂

A tripeptidet aktív észteres módszerrel állítottuk elő, 23 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 5,6 g / 10,2 mM / / 44% /

op: 158-160°C

R_f^7 : 0,9 / 5% /

M: 548,63

$[\alpha]_D^{20} = -42,7^\circ$ / c = 1, etanol /

TFaxH-Leu-Asp/OH/-Phe-NH₂

A védett tripeptidről a BOC és a terc. butilészter védőcsoportot vízmentes trifluorecetsavval távolítottuk el [74, 75]. 102 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 3,6 g / 9,18 mM / / 90% /

op: 185°C

R_f^7 : 0,4 / 40% /

M: 392,01

BOC-Gly-Leu-Asp-Phe-NH₂

Az aktiv észteres kapcsolást 1 mM tripeptidből kiindulva végeztük.

Termelés: 400 mg / 0,73 mM / /73% /

op: 145-150°C

R_f⁷: 0,33 / 20% / R_f⁷: 0,15 / 10% /

M: 549

BOC-Leu-Leu-Asp-Phe-NH₂

Az aktiv észteres kapcsolást 0,4 mM tripeptidből kiindulva végeztük.

Termelés: 150 mg / 0,248 mM / / 62% /

op: 115-120°C

R_f⁷: 0,5 / 20% / R_f⁷: 0,25 / 10% /

M: 605,33

Z-Gly-NH₂

A N-karbobenzoxi-glicin amidálását vegyes anhidrides módszerrel végeztük, 50 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 9,4 g / 45 mM / / 90% /

op: 138-139°C

R_f⁷: 0,75 / 5% /

M: 208,25

Z-Asp/Obu^t-Gly-NH₂

A védett dipeptidet vegyes anhidrides módszerrel állítottuk elő, 16,5 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 2,5 g /6,6 mM/ /40%/

op: 110 - 115°C

R_f^3 : 0,65

M : 379,51

BOC-Leu-Asp/OBu^t/-Gly-NH₂

A tripeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő
9,5 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 3,4 g /7,41 mM/ /78%/

olaj

R_f^7 : 0,5 /2%/

M : 458,7

BOC-Trp/FOR/-Leu-Asp-Gly-NH₂

A tetrapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő
3,3 mM-os mennyiségekből kiindulva

Termelés: 1,5 g /2,23 mM/ /67%/

op: 65-70°C

R_f^7 : 0,3 /20%/ R_f^7 : 0,15 /10%/

M : 672,9

BOC-Trp-Leu-Asp-Gly-NH₂

1 g /1,48 mM/ BOC-Trp/FOR/-Leu-Asp-Gly-NH₂ peptidet

5 ml absz. DMF-ben oldottunk, hozzáadtunk 0,8 ml

/5 ekvivalens/ piperidint, 10-15 perc után éterrel ki-
csaptuk, a kivált kristályokat szűrtük, éterrel mostuk.

Termelés: 800 mg /1,24 mM/ /83,8%/

op: 95 - 100°C

R_f^7 : 0,3 /20%/

R_f^7 : 0,15 /10%/

M : 644,9

BOC-Asp/OBu^t/-Phe-NH₂

A dipeptidet aktivészteres kapcsolással állítottuk elő
1,4 mM-os mennyiségből kiindulva

Termelés: 310 mg /0,71 mM/ /50,7%/

op: 65 - 70°C

R_f^7 : 0,75 /5%/

R_f^7 : 0,9 /20%/

M : 435,59

BOC-Asp/OBzl/-Phe-NH₂

A dipeptidet vegyesanhidrides módszerrel állítottuk elő
6,2 mM-ból indultunk ki.

Termelés: 2,4 g /5,1 mM/ /82,2%/

op: 125 - 130°C

R_f^8 : 0,8 /2%/

R_f^7 : 0,75 /5%/

M : 469,57

BOC-Asp/OH/-Phe-NH₂

A dipeptidről az aszparaginsav β -benzilésztert hidrogenolizissal távolítottuk el, 5,2 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 1,7 g /4,5 mM/ /87%/

R_f^7 : 0,25 /5%/

R_f^7 : 0,4 /10%/

M : 379,43

TFaxH-Asp/OH/-Phe-NH₂

A dipeptidről a BOC védőcsoportot trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el, 2,7 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 900 mg /2,3 mM/ /85%/

R_f^7 : 0,25 /30%/

R_f^7 : 0,32 /40%/

M : 393,33

BOC-Leu-Asp/OH/-Phe-NH₂

A tripeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő 1,33 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 340 mg /0,69 mM/ /52%/

R_f^7 : 0,25 /10%/

R_f^7 : 0,5 /20%/

M : 492,63

BOC-Trp/FOR/-Leu-Asp-Phe-NH₂

A tetrapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő 5 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 2,9 g /4,1 mM/ /82%/

op: 205 - 208

R_f^7 : 0,5 /20%/

M : 707,01

BOC-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂

A tetrapeptidben a triptofán indolgyűrűjéről a formilcsoportot piperidines kezeléssel távolítottuk el, 0,28 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 160 mg /0,235 mM/ /82%/

op: 185°C

R_f⁷: 0,15 /10%/

R_f¹²: 0,35

M : 678,83

BOC-Gly-Trp/FOR/-Leu-Asp-Phe-NH₂

A pentapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő, 4,5 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 2,4 g /3,1 mM/ /68,9%/

R_f⁷: 0,1 /10%/

R_f⁷: 0,35 /30%/

M : 763,94

BOC-Gly-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂

A pentapeptidben a triptofán indolgyűrűjéről a formilcsoportot piperidines kezeléssel távolítottuk el, 0,67 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 430 mg /0,58 mM/ /87%/

R_f⁷: 0,13 /10%/

R_f⁷: 0,4 /30%/

M : 737,10

TFaxH-Glv-Trp/FOR/-Leu-Asp-Phe-NH₂

A pentapeptidről BOC védőcsoportot trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el 2,28 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 1,6 g /2 mM/ /87,7%/

R_F^7 : 0,8 /40%/

M : 776,84

BOC-Tyr-Gly-Trp/FOR/-Leu-Asp-Phe-NH₂

A hexapeptidet aktivészteres kapcsolással állítottuk elő,
0,4 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 315 mg /0,34 mM/ /85%/

op: 197 - 200°C

R_F^8 : 0,45 /20%/

R_F^8 : 0,25 /10%/

M : 927,14 $[\alpha]_D^{20} = - 30,52$ / c = 2,665; DMF /

H-Leu-Asp/OH/-Phe-OCH₃

Z-Leu-Asp/OBzl/-Phe-OCH₃ hidrogenolizisével nyertük,
0,27 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 100 mg /0,245 mM/ /91%/

op: 60 - 62°C

R_F^7 : 0,25 /20%/

M : 407,50

BOC-Trp-Leu-Asp/OH/-Phe-OCH₃

A tetrapeptidet aktivészteres kapcsolással állítottuk elő,
0,19 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 83,8 mg /0,12 mM/ /63%/

op: 85 - 90°C

R_F^7 : 0,35 /5%/

M : 693,83

BOC-Leu-Asp/OBzl/-Phe-NH₂

A tripeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
0,1 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 34 mg /0,058 mM/ /58%/

op: 120 - 125°C

R_F⁷: 0,8 /5%/

M : 582,8

BOC-Trp-Leu-Asp/OBzl/-Phe-NH₂

A tetrapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
0,04 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 23,4 mg /0,03 mM/ /75%/

op: 135 - 140°C

R_F⁷: 0,5 /5%/

M : 769

BOC-Met-Asp/Obu^t/-Phe-NH₂

A tripeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
17,6 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 6,3 g /11,1 mM/ /63%/

op: 150°C

R_F⁷: 0,8 /5%/

R_F²: 0,64

M : 566,79

TFAxH-Met-Asp-Phe-NH₂

A tripeptidről a BOC védőcsoportot trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el, 1,165 mM-os mennyiségekből

kiindulva.

Termelés: 520 mg /1,025 mM/ /88%/

op: 110 - 115°C

R_f^7 : 0,2 /30%/

M : 507,52

BOC-Gly-Met-Asp-Phe-NH₂

A tetrapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
0,88 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 300 mg /0,53 mM/ /60%/

op: 93 - 95°C

R_f^7 : 0,45 /20%/

M : 568,7

BOC-TRP-Gly-OBzl

Termelés: 620 mg /1,37 mM/ /80%/

op: 35 - 40°C

R_f^1 : 0,36

M : 451,57

TFaxH-TRP-Gly-OBzl

A dipeptidről a BOC védőcsoportot trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el, 1,2 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 430 mg /0,6 mM/ /80%/

olaj

R_f^7 : 0,9 /40%/

M : 447

BOC-LEU-TRP-Gly-OBzl

A tripeptidet vegyesanhidrides módszerrel állítottuk elő,
1,42 mM-os mennyiségekből indultunk ki.

Termelés: 193 mg /0,34 mM/ /24%/

op: 85 - 86°C

R_f^7 : 0,6 /5%/

M : 565

TFAxH-LEU-TRP-Gly-OBzl

A tripeptidről a BOC védőcsoportot trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el, 0,32 mM-os anyagmennyiségből kiindulva.

Termelés: 147 mg /0,26 mM/ /81%/

olaj

R_f^7 : 0,5 /20%/

M : 562

Z-ASP/OBu^t-LEU-TRP-Gly-OBzl

A tetrapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
0,26 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 61 mg /0,20 mM/ /77%/

olaj

R_f^7 : 0,25 /10%/

M : 306

Benzil-malonsav-dietilészter

250 ml absz. etanolban oldottunk 11,5 g /0,5 ats./ nátriumot. Oldódás után a visszafolyós hűtőre CaCl_2 -os csövet tettünk és 83 g /0,518 M/ malonésztert adagoltunk be állandó ütemben, keverés közben. Majd 62,2 g /0,5 M/ benzilkloridot csepegtettünk be 2-3 óra alatt. Az elegyet refluxáltattuk 8-10 órán át /közel 7-es pH-ig/. Az alkoholt vákuumban bepároltuk, a maradékot 200 ml sós vízzel mostuk. Az észter fázist éterrel extraháltuk, Na_2SO_4 -on szárítottuk. Az étert lepároltuk, a maradékot vákuumban desztilláltuk.

Termelés: 69 g /0,276 M/ /55%/

fp: 145 - 155°C/5 Hgmm

n_D : 1,4910

M : 250

Benzil-malonsav-félészter

55 g /0,22 M/ benzil-malonsav-dietilészter absz. etanolos oldatához 12,34 g /0,22 M/ káliumhidroxid absz. etanolos oldatát adtuk. A félészter káliumsója csapadékként kivált. A hidrolízis lejátszódása után az etanolt vákuumban bepároltuk, a maradékot a legkevesebb vízben feloldottuk. Az elhidrolizálatlan diésztert éterrel extraháltuk. A vizes oldatot hűtés közben sósavval pH 2-re savanyítottuk, majd éterrel többször extraháltuk. Az éteres oldatot Na_2SO_4 -on szárítottuk, az étert ledesztilláltuk.

A félészter sárgásfehér olaj.

Termelés: 43,2 g /0,19 M/ /86%/

n_D : 1,4995

M : 222

Benzil-malonsav-félamid

1/ 21,6 g /0,095 M/ benzil-malonsav-félésztert feloldotunk 230 ml 20%-os NH_4OH -ban és egy hétig 20°C -on tartottuk. Az NH_3 jelentős részét levegőbefuvatással eltávolítottuk a rendszerből, majd a pH-t 7-re állítottuk és a víz jelentős részét bepároltuk vákuumban, ezután a vi-
zes oldat pH-ját 2-re állítottuk. A félamid kristályosan kivált, forró vizből átkristályosítottuk.

Termelés: 8 g /0,0342 M/ /36%/

op: $142 - 143^\circ\text{C}$

R_F^2 : 0,3

M : 234

2/ Az amidálást THF-ban vegyesanhidrides módszerrel végeztük, 0,095 M-ból kiindulva. A benzil-malonsav-félamid-félésztert lugos körülmények között, abszolút metanolban hidrolizáltuk.

Termelés: 14 g /0,0598 M/ /54%/

R_F^2 : 0,3

M : 234

BOC-Phe-N₂H₂-Z

A BOC-Phe-N₂H₂-Z-ot vegyes anhidrides módszerrel állítottuk elő, 11,3 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 3,8 g /9,2 mM/ /81,4%/

op: 65 - 70°C

R_f²: 0,8

M : 413,48

TFaxH-Phe-N₂H₂-Z

A BOC védőcsoportot az aminosav származékról trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el, 9,3 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 3,3 g /7,7 mM/ /83%/

op: 40 - 45°C

R_f^f: 0,8 /30%/

M : 427,38

BOC-Asp/OBu^t/-Phe-N₂H₂-Z

A dipeptidet vegyes anhidrides kapcsolással állítottuk elő, 5 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 2 g /3,4 mM/ /68%/

op: 58 - 63°C

R_f⁷: 0,78 /5%/

M : 584,74

TFAxH-Asp/OH/-Phe-N₂H₂-Z

A dipeptidről a BOC védőcsoportot trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el, 3,2 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 1,03 g /1,9 mM/ /59,3%/

op: 65 - 70°C

R_f⁷: 0,75 /30%/

M : 542,48

[α]_D²⁰ = + 5,25 /c = 1,56,DMF/

BOC-Trp/FOR/-Leu-OCH₃

A védett dipeptidet vegyes anhidrides kapcsolással állítottuk elő, 10 mM-os mennyiségekből indultunk ki.

Termelés: 3,5 g /7,6 mM/ /76%/

op: 68 - 70°C

R_f⁷: 0,9 /10%/

R_f⁹: 0,85 /

M : 459,57

TFAxH-Trp/FOR/-Leu-OCH₃

A dipeptidről a BOC védőcsoportot trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el, 76 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 2,6 g /6,25 mM/ /82%/

olaj

R_f⁷: 0,45 /20%/

M : 473,46

BOC- β Ala-Trp/FOR/-Leu-OCH₃

A védett tripeptidet aktivészteres kapcsolással állítottuk elő, 4 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 1,76 g /3,3 mM/ /82,45%/

op: 125 - 130°C

R_f⁷: 0,5 /2%/ R_f¹⁰: 0,7 R_f⁷: 0,75 /5%/

M : 530,66

BOC- β Ala-Trp/FOR/-Leu-OH

A metilészter lugos hidrolizisét, az alábbi recept szerint végeztük el: 1,44 g /2,63 mM/ BOC- β Ala-Trp/FOR/-Leu-OCH₃-t feloldottunk 30 ml metanolban, majd 10 ml vizet és annyi 2 N NaOH-ot /12 ml-t/ adtunk hozzá, hogy az oldat pH-ja 9 legyen. A hidrolizis 5-6 óra alatt lejártszódot, a reakciót kromatográfiásan ellenőriztük. /7-es /5% és 10%-os/ futtatószerben/. A reakció lejártszódása után 1:1 HCl-al a pH-t 7-re állítottuk. A metanolt vákuumban lepároltuk, majd a pH-t 1 N NaOH hozzáadásával 8-ra állítottuk. Az esetleg megmaradt metilésztert etilacetátos extrakcióval eltávolítottuk. A vizes fázist hűtés mellett 1:1 HCl-val pH 3-ra savanyítottuk, majd etilacetáttal extraháltuk.

A szerves fázist Na₂SO₄-on szárítottuk, vákuumban bepároltuk.

Termelés: 1,30 g /2,5 mM/ /95%/

op: 85 - 88°C

R_f⁷: 0,33 /5%/ R_f⁷: 0,5 /10%/

M : 516,64

[α]_D²⁰ = -15,16 /c = 1,58, DMF/

BOC- β Ala-Trp/FOR/-Leu-Asp-Phe-N₂H₂-Z

A fragmenseket vegyesanhidrides módszerrel kapcsoltuk össze, 0,4 mM-os mennyiségekből indultunk ki.

Termelés: 113 mg /0,122 mM/ /30,5 %/

op: 97 - 98°C

R_F⁷: 0,7 /20%/

R_F⁷: 0,3 /10%/

M : 927,09

BOC-Nmetil Trp-OCH₃

A BCC-Nmetiltriptofán-metilészt Olsen módszere szerint [51] állítottuk elő, 0,02 M BOC-triptofánból kiindulva.

Termelés: 4,7 g /0,014 M/ /70,7%/

olaj

R_F¹: 0,8,

R_F¹¹: 0,25

M : 332,36

BOC-Nmetil Trp-OH

A BOC-Nmetiltriptofánt 9 mM BOC-Nmetiltriptofán-metilésztből nyertük lugos hidrolizissal. A hidrolizist vizes-lugos metanolban végeztük.

Termelés: 1,16 g /3,6 mM/ /40%/

op: 135 - 140°C

R_F¹: 0,15

R_F³: 0,2

R_F⁷: 0,75 /2%/

M : 318,33 $[\alpha]_D^{20} = -18,95$ / c = 1,6355; DMF /

BOC-Nmetil Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂

A tetrapeptidet vegyes anhidrides módszerrel állítottuk elő, 2 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 1,14 g /1,64 mM/ /82%/

op : 65 - 70°C

R_f⁸: 0,17 /5%/ R_f⁸: 0,33 /10%/ R_f⁹: 0,11

M : 692,83 $[\alpha]_D^{20} = -30,27$ / c = 1,7835; DMF /

TFAXH-Nmetil Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂

A tetrapeptidről a BOC védőcsoportot trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el, 143 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 745,3 mg / 1,06 mM / /74%/

op: 210 - 213°C

R_f⁷: 0,8 /30%/

M : 701,72 $[\alpha]_D^{20} = -28,37$ / c = 1,68; DMF /

BOC-Gly-Nmetil Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂

A pentapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő, 1 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 589,3 mg /0,79 mM/ /79%/

op: 215 - 217°C

R_f⁷: 0,5 /20%/ R_f⁸: 0,2 /10%/

M : 744,92

$[\alpha]_D^{20} = -30,52$ / c = 2,665; DMF /

Z-Val-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂

A tetrapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
0,257 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 80 mg /0,095 mM/ /37%/

op: 95°C

R_F⁷: 0,7 /20%/

R_F⁷: 0,3 /10%/

M : 840,02

BOC-7Aza Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂

A védett tetrapeptidet vegyes anhidrides módszerrel állítottuk elő, 0,68 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 280 mg /0,317 mM/ /46,6%/

op: 60 - 65°C

R_F⁸: 0,14 /10%/

R_F⁹: 0,06

M : 884,03

Z-LGla/Obu^t/₂-Gly-Trp/FOR/-Leu-Asp-Phe-NH₂

A hexapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
0,23 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 144,14 mg /0,133 mM/ /57,8%/

op: 125 - 130°C

R_F⁷: 0,5 /20%/

R_F⁷: 0,25 /10%/

M : 1083,38

Z-DGla/OBu^t/2-Gly-Trp/FOR/-Leu-Asp-Phe-NH₂

A hexapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
0,23 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 69,5 mg /0,064 mM/ /27,8%/

op: 120 - 125°C

R_f⁷: 0,52 /20%/

R_f⁷: 0,85 /30%/

M : 1083,38

BOC-Trp/FOR/-Met-Asp-Phe-NH₂

A tetrapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
2,7 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 1,7 g /2,3 mM/ /85%/

op: 204 - 206°C

R_f⁷: 0,3 /20%/

R_f⁷: 0,7 /40%/

M : 724,38

[α]_D²⁰ = -22

/ c = 2 ; DMF /

BOC-Met-Gly-OH

A dipeptidet aktivészteres kapcsolással nyertük, 10 mM-os
mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 1,9 g /6,2 mM/ /62%/

op: 124 - 126°C

R_f⁷: 0,55 /20%/

M : 306,38

BOC-Met-Gly-OPCP

A dipeptid aktivésztert DCC-s kondenzációval állítottuk

elő, 6,2 mM-os mennyiségből indultunk ki.

Termelés: 2,19 g /3,95 mM/ /63,6%/

op: 169 - 171°C

R_F^2 : 0,8

M : 554,72

BOC-Met-Gly-Trp/FOR/-Met-Asp-Phe-NH₂

A hexapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
2,47 mM-os mennyiségekből kiindulva.

Termelés: 1,5 g /1,64 mM/ /66,3%/

op: 180 - 182°C

R_F^7 : 0,45 /20%/

M : 913,09

BOC-Tyr-Met-Gly-Trp/FOR/-Met-Asp-Phe-NH₂

A hexapeptidet aktivészteres módszerrel állítottuk elő,
1,65 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 1,28 g /1,19 mM/ /72%/

R_F^7 : 0,55 /20%/

M : 1076,26

BOC-Asp/Obu^t/-Tyr-Met-Gly-Trp/FOR/-Met-Asp-Phe-NH₂

A védett oktapeptidet aktivészteres kapcsolással állítottuk elő, 1 mM-os mennyiségekből indultunk ki.

Termelés: 1 g /0,8 mM/ /80%/

op: 220 - 221°C

R_F^7 : 0,7 /20%/

M : 1247,45

BOC-Asp/OBu^t/-Tyr/SO₃Na/-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

1,3 ml klórszulfonsavat 1,6 ml kloroformban feloldottunk, -10°C-on erős keverés közben hozzácsepegtettünk 15 perc alatt 2,7 ml N-metil-morfolint 4 ml absz. dioxánban oldva. Az oldatot 5 percig szobahőmérsékleten kevertettük, majd hozzáöntöttük az 1 g /0,8 mM/ védett oktapeptid 8 ml DMF-es oldatát, és 3 órán át kevertettük szobahőmérsékleten. Ezután 0°C-on, keverés közben 0,8 ekvivalens 4N NaOH-ot adtunk hozzá. A reakcióelegvet szárazra pároltuk, a párlási maradékot jeges vízben eldörzsöltük, a pH-t 3-4-re állítottuk HCl-val. A kivált kristályokat szűrtük, vízzel, majd kevés éterrel mostuk. A kiszűrt kristályokat metanol:víz = 1:1 elegyében feloldottuk, az oldat pH-ját 7,8-8-ra NaOH hozzáadásával beállítottuk. 10 perc múlva az oldatot szárazra pároltuk, aceton alatt kristályosítottuk.

Termelés: 723 mg /0,547 mM/ /68%/

R_F⁷: 0,35 /20%/

R_F⁷: 0,5 /30%/

M : 1321,45

TFaxH-Asp/OH/-Tyr/SO₃Na/-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Az oktapeptid-szulfátészter-Na sójáról BOC és terc. butil védőcsoportot trifluorecetsavas kezeléssel távolítottuk el, 0,547 mM-os mennyiségből kiindulva.

Termelés: 490 mg /0,383 mM/ /70%/

R_F⁷: 0,15 /40%/

R_F⁶: 0,27

M : 1278,22

Élősejt izoláláshoz szükséges oldatok:

Krebs-Ringer + adalékok pH 7,4

NaH_2PO_4	0,5 mM
Na_2HPO_4	1 mM
NaHCO_3	20 mM
NaCl	70 mM
KCl	5 mM

HEPES	50 mM
Glükóz	80 mM
BSA	1 %

Aminosav szuplement

Gyomormucosa mosó oldat pH 7,4

NaHCO_3	20 mM
NaCl	97 %
KCl	5 mM
Glükóz	80 mM
CaCl_2	0,1 mM
MgCl_2	1,2 mM

Aminosav szuplement

Aminosav	mM	mg/l
Arg	0,6	105
Cys	0,1	24
Gln	2,0	292
His	0,2	31
Ile	0,4	52
Leu	0,4	52
Lys	0,4	58
Met	0,1	15
Phe	0,2	32
Thr	0,4	48
Trp	0,05	10
Tyr	0,2	36
Val	0,4	46

BSA 40%-os törzsoldat

CaCl₂ 0,1 M törzsoldat

MgCl₂ 0,1 M törzsoldat

EDTA 0,2 M törzsoldat

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánkban gasztrin analógokat szintetizáltunk, melyek vizsgálatával megismerhető a gasztrin illetve a kolekisztokinin aktív centrumának térszerkezete, és következtetések vonhatók le a hormon és receptora kapcsolatáról.

Összesen 26 analóg szintézisére került sor.

A gasztrin tetrapeptid "stacking" szerkezetének vizsgálatára olyan analógokat állítottunk elő, melyekkel a triptofán és fenilalanin között fellépő aromás kölcsönhatás bizonyítható volt, valamint az aszparaginsav β -helyzetű karboxilcsoportjának konformációt befolyásoló szerepét el lehetett dönteni. A különböző spektroszkópiai módszerekkel végzett térszerkezet vizsgálatok eddigi adatai azt bizonyítják, hogy már a tetrapeptidnek jól jellemezhető, stabil térszerkezete van vizes és nemvizes oldatban egyaránt.

A hormon-receptor kölcsönhatás tanulmányozására szintetizált gasztrin analógok biológiai hatásvizsgálata alapján elmondható, hogy ha a 4. vagy 5. aminosavat nagy térkitöltésű csoporttal helyettesítjük /N-metil-triptofán, valin/, az így kapott analógok feltételezhetően térszerkezeti okok miatt nem tudnak megfelelően kötődni a receptorhoz.

A 7-azatriptofánt tartalmazó analóg csökkent biológiai aktivitása alapján arra következtettünk, hogy a bázikus csoport bevitele a hormon-receptor kötődést gyengíti. Valószínű, hogy a triptofán és fenilalanin közötti aromás kölcsönhatás is erősebb, mint a 7-azatriptofán analóg tetragasztrinnál.

Előállítottuk a gasztrin család másik tagját, a kolekisztokinin C-terminális oktapeptid-szulfátésztert. A szintézisben néhány új módszert vezettünk be /a triptofán N^1 -formil védelme a szintézis és a szulfátészter képzés során, az N-metil-morfolin-kéntrioxid komplex alkalmazása dioxán jelenlétében, valamint a védőcsoportok acidolitikus hasítása a szulfátészter Na-sóráról/. Ezek lehetővé tették, hogy a CCK oktapeptid szulfátésztert jó termeléssel, tisztán és teljes biológiai aktivitással állítsuk elő.

Egy új módszert, az affinitás mikroszkópiát dolgoztunk ki, a hormonok kötődésének mérésére élő sejt preparátumon. Ehhez élő parietális sejt preparátumot és affinitás adszorbenseket készítettünk. Méréseink alapján a hexagasztrin, hisztamin és acetilkolin immobilizált alakban is kötődik az izolált sejtekhez. A hexagasztrin-Sepharose-ról a sejtek pentagasztrinnal leszoríthatók, a hisztamin pedig erősíti a kötést. Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy a hisztamin elősegíti a gasztrin hatását.

IRODALOM

1. Larsson, L - I. és Rehfeld, J.F.: Nature 269, 335 /1977/
2. Csaba, Gy.: Természet Világa 11, 521 /1976/
3. Edkins, J.S.: Proc. Roy. Soc. 137B, 376 /1905/
4. Gregory, R.A., Tracy, H.J.: Gut. 5, 103 /1964/
5. Gregory, H. et al.: Nature 204, 931 /1964/
6. Gregory, R.A., Tracy, H.J., Grossman, M.I.: Nature 209, 583 /1966/
7. Agarwal, K.L., Kenner, G.W., Sheppard, R.C.: J. Chem. Soc. /C/ 1384 /1968/
8. Gregory, R.A., Tracy, H.J., Grossman, M.I., de Valois, D., Lichter, R.: Experientia 25, 364 /1969/
9. Tracy, H.J., Gregory, R.A.: Nature 204, 935 /1964/
10. Rehfeld, J.F., Larsson, L.-I., Goltermann, N.R., Schwartz, T.W., Holst, J.J., Jensen, S.L., Morley, J.S.: Nature 284, 33 /1980/
11. Kier, L.B., George, J.M.: J. med. Chem. 15, 384 /1972/
12. Feeney, J.: Roberts, G.C.K., Brown, J.P., Burgen, A.S.V.: J. Chem. Soc. /B/ 1972, 601
13. Penke, B., Zarándi, M., Kovács, K., Náfrády, J., Varró, V.: Elsevier 1511 /1979/
14. Pham Van Chnong, P., Penke, B., De Castiglione, R., Fromageot: Montpellier, France May 3-5 /1979/
15. Zarándi, M., Herczegh, O, Kovács, K., Penke, B., Varró, V.: Magyar Gasztroenterológiai Társaság, Kutatói Fórum Harkány, 1979 nov. 30 - dec. 1.

16. Morley, J.S.: Proc. Roy. Soc. /B/ 170, 97 /1968/
17. Morley, J.S., Tracy, H.J., Gregory, R.A.: Nature 207,
1356 /1965/
18. Lin, T.M., Southard, G.L., Spray, G.F.: Gastroentero-
logy 70, 733 /1976/
19. Lin, T.M., Spray, G.F., Southard, G.L.: Gastroentero-
logy 72, 566 /1977/
20. Ivy, A.C., Oldberg, E.: Amer. J. Physiol. 86, 599 /1928/
21. Harper, H.A., Raper, H.S.: J. Physiol. 102, 115 /1943/
22. Jorpes, I.E., Mutt, V., Toczko, K.: Acta Chem. Scand.
18, 2408 /1964/
23. Mutt, V., Jorpes, I.E.: Biochem. J. 125, 578 /1971/
24. Ondetti, M.A., Rubin, B., Engel, S.L., Pluscec, I.,
Sheehan, J.T.: Am. J. Dig. Dis. 15, 149 /1970/
25. Ondetti, M.A., Pluscec, I., Sabo, E.F., Sheehan, J.T.,
Williams, N.: J. Am. Chem. Soc. 92, 195 /1970/
26. Ondetti, M.A., Pluscec, I.: J. Med. Chem. 13, 349,
/1970/
27. Magyar szabadalom 162 875
28. Magyar szabadalom 163 626
29. Baur, M., Bacon, B.: Symposium on Hormones and
Ulcer /Los Angeles, 1979/
30. Karlson, P., Sekeris, C.E.: Acta Endocrinol. 53,
505 /1966/
31. Robinson, G.A., Sutherland, E.W.: Ann. N.Y. Acad. Sci.
139, 703 /1967/

32. Kimberg, D.V.: Gastroenterology 67, 1023 /1974/
33. Cuatrecasas, P.: Biochemistry 12, 3547 /1973/
34. Bennett, V., O'Keefe, E., Cuatrecasas, P.: Proc. Nat. Acad. Sci.U.S. 72, 33 /1975/
35. Frye, L.D., Edidin, M.: J. Cell. Sci. 7, 319 /1970/
36. Singer, S.J., Nicolson, G.L.: Science 175, 720 /1972/
37. Edidin, M.: Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 2, 179 /1974/
38. Zarándi, M., Penke, B., Náfrádi, J., Herczegh, O.,
Varga, J., Karácsonyi, G., Kovács, K., Varró, V.:
Magyar Gasztroenterológiai Társaság 22. kongresszusa
1980. május 21-24 Keszthely.
39. Lowe, C.R., Dean, P.D.G.: Affinity chromatography
/J. Wiley and Sons, London, 1974/
40. Axen, R., Ernback, S.: Eur. J. Biochem. 18, 351 /1971/
41. Dean, P.D.G., Lowe, C.R.: Biochem. J. 127, 11 /1972/
42. Lowe, C.R. et al.: Biochem. J. 133, 499 /1973/
43. Anderson, G.W., Zimmermann, J.E., Callahan, F.M.:
J. Am. Chem. Soc. 89, 5012 /1967/
44. Sheehan, J.C., Hess, G.P.: J. Am. Chem. Soc. 77,
1067 /1955/
45. Ohno, M., Tsukamoto, S., Sato, S., Izumiya, N.:
Bull. Chem. Soc. Japan 46, 3280 /1973/
46. Yamashiro, D., Li, C.H.: J. Org. Chem. 38, 2594 /1973/
47. Moroder, L., Hallett, A., Wunsch, E., Keller, O.,
Wersin, G.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
Bd. 357, S 1651-1653 /1976/

48. Organic Syntheses vol. 21 /Wiley, N.Y., 1941/ 99.p.
49. Marguery: Bulletin de la Societé Chimique de France
/3/ 33, 542
50. Varró, V., Varga, L., Náfrádi, J., Penke, B., Balás-
piri, L.: 1st International Symp. on Gastro-
intestinal Hormones, California 1976 szeptember
51. Olsen, R.K.: J. Org. Chem. 35, 1912 /1970/
52. Bruckner, Gy.: Szerves Kémia III/1 kötet 174.o.
/Tankönyvkiadó, Budapest 1964/
53. Kemp, D.S., Choung, S.L.H., Pekaar, J.: J. Org. Chem.
39, 3841 /1974/
54. Penke, B.: Zarándi, M., Kovács, K., Náfrády, J.,
Varró, V.: Elsevier 1511 /1979/
55. Terentyev, A.P., Cimbol : Zs. Org. Khim. 19, 781 /1949/
56. Terentyev, A.P., Janovszkaja, L.A.: Zs. Org. Khim.
21, 1295 /1951/
57. Magyar szabadalom 162 875
58. Magyar szabadalom 163 626
59. Amsterdam, A., Jamieson, J.: J. Cell. Biol. 63,
1037 /1974/
60. Axen, R., Porath, J., Ernback, S.: Nature 214, 1302
/1967/
61. Er-El, Z., Zaidenzaig, Y.: Biochem. Biophys. Ras.
Commun. 49, 383, /1972/
62. Yen, R.J.: Biochem. J. 126, 765 /1972/
63. Reitz, H.C., Ferrel, R.E., Fraenkel-Conrat, M.,
Olscott, M.S.: J. Am. Chem. Soc. 68, 1024 /1946/

64. Hoiberg, C.P., Mumma, R.O.: J. Am. Chem. Soc. 91,
4273 /1969/
65. Wieland, T., Penke, B., Birr, C.: Liebigs Ann. Chem.
759, 71 /1972/
66. Penke, B., Balásperi, L., Zarándy, M., Kovács, K.,
Kovács, L.: Proc. of 15th Eur. Peptide Symp.
/Kupriszewsky, G. ed./ Wroclaw Univ. Press Publ.
Wroclaw 1979 p. 581.
67. Bergmann, M., Zervas, L.: Ber. Deut. Chem. Ges.
65, 1192 /1932/
68. Benoiton, L.: Can. J. Chem. 40, 570 /1962/
69. Ben-Ishai, D.: J. Org. Chem. 19, 62 /1954/
70. Taschner, E., Chimiak, A., Biernat, J.F., Wasiclewski,
C., Sokolowska, T.: Ann.Chem. 633, 188 /1963/
71. Schnabel, E.: Liebigs Ann. Chem. 702, 188-196 /1967/
72. Bodánszky, M. és Du Vigneud, V.: Am. Soc. 81, 5688
/1959/
73. Kisfaludy, L.: J. Org. Chem. 35, 3563 /1970/
74. Schwyzer, R. et al.: Angewandte Chemie Ang. Ch.
72, 915 /1960/
75. Kappeler, H., Schwyzer, R.: Helvetica Chimica Acta
Helv. 44, 1136 /1961/
76. Morley, J.S.: Hormone receptors in Digestion and
and Nutrition /Ed.: Fromageot, P/ Royadmont
1977 /Nort Holland, Amsterdam/ p. 3-15.



Köszönetet mondok DR. KOVÁCS KÁLMÁN tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra disszertációm elkészítését.

Megköszönöm témavezetőmnek, DR. PENKE BOTOND egyetemi docensnek a sokoldalú elméleti és gyakorlati segítséget.

Köszönöm a laboratórium és az Intézet azon dolgozóinak fáradozásait, akik munkám végzése során segítségemre voltak.