B 5083

ANTIGÉNEK, ILL. ANTISZÉRUMOK ELŐÁLLITÁSA NEUROTRANSZMITTEREK KIMUTATÁSÁRA

Doktori értekezés

Joó Béla *

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.

Szeged 1982

Szegedi Orvostudományi Egyetem
Orvosi Vegytani Intézete

* Nem SOTE dolgozó, SZTK-nál vált.

B 508
SZTE Egyetemi Könyvtár
SZEGED
14.
SZTE Egyetemi Könyvtár
SZEGED
14.
ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM KÖNYVTÁRA Szeged
E 2.158

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK 1.

II. ELMÉLETI RÉSZ 3.

A./ Neurotranszmitterek és kimutatási módszereik 3.

B./ Antigének szintézise 10.

1./ Antigének előállításának általános szempontjai 10.

2./ Neurotranszmitter antigének szintézise /irodalmi előzmények/ 15.

a./ Katekolamin antigének 15.

b./ Hisztamin antigének 21.

c./ Szerotonin antigének 22.

d./ Acetilkolin antigének 25.

3./ Neurotranszmitter antigének szintézise /saját eredményeink/ 26.

a./ Kapcsolásra alkalmas haptének előállitása 33.

b./ Karboxilált neurotranszmitterek kapcsolása fehérjehordozóhoz 53.

4./ Immobilizált származékok előállitása 57.

5./ Immunizálási eredmények és az antiszérumok jellemzése 63.

III. KISÉRLETI RÉSZ 65.

IV. ÖSSZEFOGLALÁS 98.

V. IRODALOM 100.

A dolgozatban felhasznált rövidítések jegyzéke

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

THF	-	tetrahidrofurán
DMF	-	dimetilformamid
SDS	-	nátrium-dodecil-szulfát
BOC-	-	terc. butiloxikarbonil csoport
BOC_2O	-	di-terc. butil-pirokarbonát
Z-	-	benziloxikarbonil csoport
Bzl-	-	benzil csoport
DCC	-	diciklohexil-karbodiimid
Bu^t-	-	terc. butil csoport
FMOC-	-	fluorenilmetiloxikarbonil csoport
TFA	-	trifluorecetsav
DCHA	-	diciklohexilamin

I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Az élő szervezet rendkivül bonyolult működését, az egyes szervek és funkcióiknak összehangolását az idegrendszer és hormonok irányitják. Az idegrendszer a gyors, nem tartós változásokért felelős. Vizsgálata az élettan, a biofizika és a biokémia tárgykörét egyaránt érinti.

A vegetativ idegrendszer működésének elemzése vezetett a kémiai transzmisszió mechanizmusának felismeréséhez /Langley, 1901/ /1/. Az első lépés ezen az uton idegrendszeri jelenségek kiváltására képes anyagok létezésének a felismerése volt. 1894-ben Oliver és Schäfer a borju mellékvesevelő kivonatának vérnyomásnövelő hatását mutatta ki. 1897-1899 között a kivonat aktiv anyagát, az adrenalint Abelnek sikerült izolálnia. Ez volt az első kristályosan kinyert hormon, amelyet később, 1904-ben Stolz szintetikus uton is előállitott.

Az acetilkolint már 1867-ben szintetizálták, az idegrendszeri folyamatokban betöltött szerepét viszont csak sokkal később Hunt és munkatársai, majd Dale 1914-ben ismerték fel.

A neurokémiai transzmisszió elméletének alapját Loewinek /1921/ az a felismerése jelentette, hogy a bolygóideg /nervus vagus/ ingerlésekor az idegvégződéseken egy anyag, az un. "Vagusstoff" szabadul fel. Ez az anyag az acetilkolin, ez vesz részt az ingerület továbbitásában. Későbbi kutatások során a noradrenalin és egyéb neurotranszmitter-funkciót ellátó anyagoknak a létezése és élettani hatása is ismertté vált.

Egy anyagot akkor tekintünk neurotranszmitternek, ha az alábbi kritériumoknak megfelel /2/:

a./ Mennyisége idegingerlés hatására a nyugalmi értékhez képest jelentősen megnövekszik.

b./ Jelenléte farmakológiai, fiziológiai és kémiai módszerekkel egyaránt igazolható.

c./ Bizonyitható, hogy a szervezetbe történő adagolása az idegingerléssel azonos hatást vált ki.

d./ Bizonyos vegyületek azonosan befolyásolják az idegingerlést, ill. az injiciált anyag hatását.

e./ Az adott idegsejtben kimutatható a neurotranszmitter szintéziséért felelős specifikus enzimrendszer.

f./ A neurotranszmitter anyagot enzim vagy enzimrendszer hatástalanitja.

A fenti kritériumoknak mai ismereteink szerint az acetilkolin, adrenalin, noradrenalin, dopamin, hisztamin és a szerotonin felelnek meg. Ujabb kutatási eredmények alapján bizonyos aminosavak, igy pl. a gluteminsav, aszparaginsav és a glicin is az egy legfontosabb gyors hatásu neurotranszmitter anyagai közé tartoznak /1/.

Mivel az emlitett anyagok reális feltételezések alapján neurotranszmitter-funkcióval rendelkeznek, ezért ezekkel az anyagokkal végeztem kisérleteimet.

A neurotranszmitterek élettani szerepének kutatásához elengedhetetlenül szükséges, hogy ezeknek a kis molekuláju anyagoknak az élő szervezeten belüli lokalizációját és pontos koncentrációját meg tudjuk határozni. Hasonló feladatok megoldására a magas specificitásbeli és érzékenységi igényeket is kielégitő immunológiai módszerek bizonyultak legalkalmasabbnak. Ilyen módszerek kidolgozásához, ill. alkalmazásához elengedhetetlenül szükséges azonban a neurotranszmitterek antigénjeinek előállitása.

<u>A következő célokat tüztük ki:</u>

a./ Előállitjuk a fent emlitett antigéneket, amelyek lehetővé teszik az adrenalin, noradrenalin, dopamin, acetilkolin, hisztamin és szerotonin immunfluorescens kimutatását és meghatározását.

b./ Az immunizálás után kapott antiszérumok ellenőrzésére, ill. specificitásuk növelésére affinitás kromatográfiás adszorbenseket állítunk elő.

II. ELMÉLETI RÉSZ

A./ Neurotranszmitterek és kimutatási módszereik

A neurotranszmitterek az idegsejtekben keletkeznek és az idegvégződéseken hatnak, az ingerület továbbitása specifikus kémiai reakcióik eredménye. Az ingerület továbbitása bonyolult folyamatok során történik. A neurotranszmitterek az idegsejtek membránján végbemenő bioelektromos változásokkal, iontranszportfolyamatokkal, mechanizmusokkal összehangoltan fejtik ki hatásukat.

Bioszintézisük több reakciólépésben történik. Az acetilkolin pl. két egymást követő reakció eredményeként keletkezik:

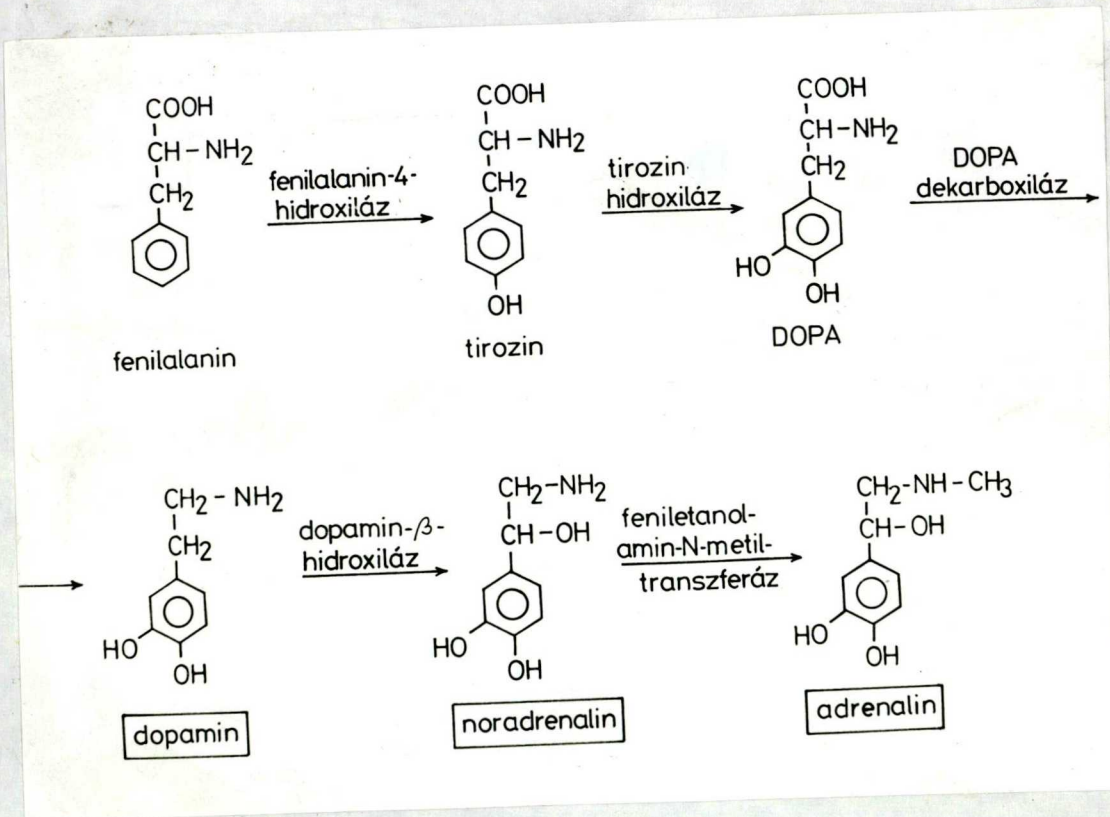
1./ Acetát + CoA $\xrightarrow{\text{acetilkináz}}$ acetil-CoA

2./ kolin + acetil-CoA $\xrightarrow[\text{ATP}]{\text{kolinacetiláz}}$ acetilkolin+CoA

1. ábra

Az acetilkolin szintézise a neuron citoplazmájában történik, majd a keletkező acetilkolin az ugynevezett kolinerg idegvégződéseken felhalmozódik és inger hatására robbanásszerüen szabadul fel. A szabaddá vált acetilkolin bomlását, ill. inaktiválását a kolinészteráz-enzim katalizálja.

A katekoleminok bioszintézisének fő lépései a 2. ábrán láthatók:



2. ábra

A mechanizmus helyességét izotóp jelzéssel egyértelműen sikerült igazolni.

A katekolaminok az adrenerg idegvégződéseken raktározódnak. Szekreciójukat a mellékvesevelőben felszabaduló acetilkolin váltja ki! Emberi mellékvesevelő-szekrétumban 4:1 az adrenalin-noradrenalin arány. A plazmában dopamin is található, ennek fiziológiai szerepe még nem ismert. A katekolaminok metabolizmusának végterméke a 4-OH-3-MeO-mandulasav.

A neurokémiai transzmisszió folyamatát az átkapcsolási helyeken specifikus mediátorok segitik. Feltételezhető, hogy számos anyag létezik, amely e folyamatra moduláló hatást gyakorol. Sok kisebb tagszámu peptidnek is tulajdonitanak modulátor hatást. Jogos a feltételezés, hogy a neurotranszmitterek hatásmechanizmusában nagyon fontos szerep jut a mediátorok mellett a modulátor anyagoknak is.

A neurotranszmitter anyagok kutatása kvalitativ és kvantitativ kimutatási módszerek kidolgozását igényelte. A neurotranszmitterek egyes szervekben, sejtekben való jelenlétét, koncentrációjuk változását, átalakulásaik követését, majd később izolálásuk eredményességét többféle módszerrel próbálták mérhetővé tenni.

Tekintettel a meghatározandó anyagok rendkivül kis koncentrációjára /az emberi mellékvese velőállományában 1 g szövetben kb. 0,5 mg az adrenalin-tartalom, de egyéb szervekben ennél nagyságrendekkel kisebb/ és a vizsgált biológiai közegben végbemenő gyors és bonyolult átalakulásokra, bomlási folyamatokra, a kimutatási módszereknek specifikusnak és igen érzékenynek kell lenniük.

Az eddig alkalmazott kimutatási módszerek a következők:

1./ <u>Bioassay.</u> A "biológiai titrálás" módszerével rendkivül nagyfoku érzékenység érhető el, amelyet a fizikai és kémiai módszerek meg sem közelitenek. Igy pl. az acetilkolin már 10^{-14} mól/l koncentrációban is kimutatható. A biológiai titrálás rendkivül nagy érzékenysége a vizsgált

anyag specifikus hatásának /pl. toxicitásának/ mérésén alapszik. A módszer nem igényli a mérendő minta előzetes tisztitását, viszont jellemzője a kémiai és fizikai módszerekhez képest a nagyobb szórás is.

Példaként megemlithetjük, hogy adrenalin "titráláskor" a denervált macskaszivre ható frekvenciagyorsitó hatás mérése alkalmazható. Az acetilkolin bizonyos kagylók szivére kifejtett kontrakció csökkentő hatása alapján 100 milliárdszoros higitásban /0,00001 µg/ml/ is kimutatható!

2./ S-adenozil-metioninnal történő analizisek. K.Engelman és B. Portnoy 1970-ben uj, radioenzimatikus módszert dolgozott ki a katekolaminok egymás melletti meghatározására. Később P.G. Passon és J.D. Penler /3/ fejlesztette a módszert rutin eljárássá, majd többen kisebb-nagyobb módositást alkalmaztak.

Napjainkban Da Prada és G. Zürcher - féle változatot /4/ alkalmazzák leginkább. Eszerint mindhárom katekolamint OMe-származékká alakitják katekol-oxi-metil-transzferáz /COMT/ segitségével, triciummal jelzett S-adenozil-metionin /SAM/ jelenlétében, majd tetra-fenil-borát hozzáadása és extrakció után a háromféle terméket vékonyrétegkromatográfia segitségével választják el. A foltok radioaktivitásának mérésével lehetséges az adrenalin, noradrenalin és dopamin mennyiségének meghatározása; mintegy 10^{-15} mól/l érzékenységi határral.

Rutinszerü analitikai célokra Da Prada és G. Zürcher mérési elvét alkalmazza az Upjohn-cég radioenzimatikus készlete, amely segitségével az adrenalin 3, a noradrenalin 5 és a dopamin 20 pikogramm/50 µl minta érzékenységi határral határozható meg. A metodika 40-45 minta analizisét teszi lehetővé két nap alatt.

Utóbbi évek sikeres kisérletei alapján E. Endert /5/ a fenti módszerben alkalmazott vékonyrétegkromatográfiát

intenziv folyadék kromatográfiával cserélte fel. A kromatográfálás előtti műveletek változatlanul hagyása mellett ezuttal többszöri extrakcióra van szükség. A radioaktiv komponenseket tartalmazó kromatográfiás csucsokat elkülönitve Na-perjodáttal egyaránt vanillinné oxidálja és a frakciók radioaktivitásának mérésével határozza meg a háromféle katekolamint.

Ez a módszer napi 45 minta analizisére alkalmas, miközben az érzékenység noradrenalin és adrenalin esetében 32 pikogramm/ml, ill. 16 nanogramm/ml. E módositás előnye, hogy a kromatográfiás lépés automatizálása esetén az analizisek száma növelhető.

A SAM-ot alkalmazó metodikák igen jól beváltak a katekolaminok analizisére. Ezt bizonyitja, hogy az alapelv meghagyása és felhasználása mellett kisebb változtatásokkal ujabb módszereket dolgoztak ki - pl. P. Hjemdahl /6/ és Y. Yoshiki /7/ is.

3./ <u>Fluoreszcensz technika.</u> A fluoreszcencia mérésének módszere általában felülmulja az abszorpciós spektrofotometriás módszerek érzékenységét és szelektivitását, mivel viszonylag kevés anyagról mondható el, hogy az elnyelt fény hullámhosszával azonos hullámhosszuságut képes kibocsátani.

Katekolaminok mérésére először 1957-ben B. Cohen és M. Goldenberg /8/ alkalmazták a fluoreszcensz technikát, a katekolaminokat tri-OH-indol-származékká oxidált formában mérték. 1962-ben A.H. Anton és D.F. Shyre /9/ az adrenalin és a noradrenalin differenciál analizise céljából oxidált származékait különböző pH-n, de azonos hullámhosszon mérték. Ezt a módszert 1970-ben C. Valori és C.H. Brunori /10/ módositotta, ill. továbbfejlesztette. A két katekolamin differenciál analizisét azonos pH mellett az oxidált származékok különböző hullámhosszon történő fluorometriás mérésével valósitották meg.

Korábban, 1962-ben Falk és Hillarp vizuális módszert fejlesztett ki /11, 12/; először alkalmazott formaldehid gőzös eljárást a központi idegrendszeri katekolaminok kimutatására. Kisérleteikkel ki tudták mutatni a dopamin, a noradrenalin és bizonyos mértékben a szerotonin neuronon belüli megoszlását. Ez a módszer azonban már nem alkalmas a három katekolamin elkülönitésére közel azonos gerjesztési és emissziós hullámhosszuk miatt.

A módszer a neurotranszmitterek kimutatásában jelentős előrelépést jelentett, mert ezeknek az anyagoknak a sejteken, szöveteken belüli jelenlétét láthatóvá tudta tenni.

4./ <u>Immuncitokémiai módszerek.</u> Coons és munkatársai /13/ által korábban kifejlesztett módszert Geffen, Livett és Rush /14/ módositotta és a perifériás katekolamin-tartalmu neuron és a mellékvesevelő katekolamin-tartalmu mirigysejtjeinek kimutatására használta fel. Módszerük elvi alapja az, hogy a katekolaminok bioszintézisében résztvevő adott enzimmel szemben termelt antiszérum specifikusan reagál az enzimmel. Ennek alapján az enzim a megfelelő katekolamin-tartalmu sejt, ill. neuron jelzőjévé válik. Az eljárásnak az az egyik nagy előnye a Hillarp-módszerrel szemben, hogy a katekolaminok között differenciálni is képes: elkülönithetők egymástól a dopamin, a noradrenalin és adrenalin-tartalmu sejtek. A módszer másik nagy előnye, hogy bármely neurotranszmittert szintetizáló enzimmel szemben nyerhető antitest, igy az eljárás segitségével elvileg bármely transzmitter láthatóvá tehető.

A módszer hátrányaként kell azonban megemliteni, hogy az immunizáláshoz nagy tisztaságu enzimkészitményekre van szükség.Ezek izolálása nagyon hosszadalmas folyamat, s ugyanakkor nem zárható ki, hogy más enzim vagy fehérje az antiszérummal nem specifikus reakcióba lép.

Az analizist fajspecifikusság is nehezitheti, ami abból adódik, hogy különböző állatfajok azonos funkciót végző

enzimei között antigenitásbeli különbség lehet. Elvileg ahány állatfajjal kívánunk dolgozni, annyiféle antiszérummal kellene rendelkeznünk.

A kapott eredmény a neurotranszmitter mennyiségi meghatározását nem teszi lehetővé, nem ad választ arra a kérdésre, hogy az adott sejtben mennyi neurotranszmitter található a vizsgálat pillanatában. Az eredmény alapján nem dönthető el, a kimutatott enzim aktiv vagy inaktiv állapotban volt jelen - csupán egyetlen kérdés válaszolható meg biztonsággal: a vizsgált sejtben a neurotranszmitter szintézishez szükséges enzim rendelkezésre áll-e, vagy sem.

Problémát jelenthet a metszetek vizmentesitése is: a beágyazás vagy a liofilizálás megváltoztathatja az enzim antigenitását. A fenil-etanolamin-N-metil-transzferáz /PNMT/ esetében ilyet nem észleltek /15/, mig a dopadekarboxilás /DDC/ és dopamin-β-hidroxiláz /DBH/ esetében beágyazást követően többé nem jelentkezett immunfluorescencia /16/. Ez utóbbi tapasztalat is hangsulyozza a fixálási módszer jelentőségét az immunhisztológiában. A fixálási módszerek megfelelő megválasztásával a kimutatás specifikussága növelhető.

Kevesebb hibalehetőséggel kell számolnunk, ha közvetlenül a neurotranszmitterek antiszérumait állitjuk elő. Ez esetben a szövet vizmentesitése nem jár a neurotranszmitterek antigenitásának megváltozásával, mivel ezek rendszerint a fehérjéknél jóval egyszerübb térszerkezeti kis molekulák. A módszer közvetlenül a neurotranszmittereket mutatja ki, ezért nincs szükség a szintetizáló enzimek izolálására. A szintetizáló enzimekkel ellentétben a neurotranszmitterek szinte minden állatfajban azonosak, ezért fajspecificitással nem kell számolnunk.

Mivel a módszer közvetlenül neurotranszmittereket tesz láthatóvá, a fluoreszcencia mértéke felvilágositást ad az adott sejtben aktuálisan jelen lévő neurotranszmittertartalomról. A módszer kidolgozásához szükség van olyan

mesterségesen szintetizált antigénekre, amelyekkel szemben specifikus neurotranszmitter-ellenes antiszérumok termeltethetők. A dolgozatban összefoglalt munka célja éppen az adrenalin, noradrenalin, dopamin, acetilkolin, hisztamin és szerotonin megfelelő antigénjeinek előállitása volt.

B./ Antigének szintézise

1./ Az antigének előállitásának általános szempontjai.

Az antigének - definició szerint - olyan anyagok, amelyek a fejlett és ép immunrendszerrel biró gerincesek szervezetében specifikus immunválaszt eredményező folyamatot képesek inditani és ennek során ellenanyag - antitest képződik. Bizonyos leegyszerüsitéssel az immunválasz eredményeként kapott immunglobulinok két helyen koncentrálódhatnak:

1. Humorális immunválasz esetén az ellenanyagtermelés során keletkező globulinok az immunizált egyén vérében jelennek meg és az antigént in vivo, vagy in vitro reakció során semlegesitik.

2. Celluláris immunválaszkor a szervezetbe juttatott antigének általában 1-2 nap elteltével váltják ki az antitestek termelését és ezek az anyagok nem a vérbe kerülnek, hanem sejtekhez, főként limfocitákhoz kötődnek.

Immunbiológiai kutatások során kimutatták, hogy a megvalósuló immunválasz tipusáért a limfociták felelősek, amelyek a nyirokkal folyamatosan a véráramba jutnak és ezáltal állandó anyagtranszportot létesitenek a sejtek, szövetek és a vér között. Az immunreakciókért felelős limfociták, az ugynevezett immunociták kialakulásuk, képződésük helyétől függően "T"-, ill. "B"-limfociták lehetnek.

Nagyon jelentős volt az a felismerés, amely szerint a humorális immunreakciókért a "B"-, mig a celluláris immunreakciókért a "T"-limfociták a felelősek.

Bármilyen immunválasz létrejöttéhez megfelelő immunogenitással rendelkező antigénekre van szükség. Az immunogén tulajdonságot régebben kizárólag a molekulatömeg függvényének tekintették. A legkisebb, önmagában is antigénsajátságot mutató molekula az 1082-es molekulatömegü vazopresszin, bár igen gyenge immunogén.

1921-ben Landsteiner ismerte fel, hogy ennél kisebb molekulák is rendelkezhetnek antigén tulajdonságokkal, ha nagy molekulákhoz, pl. fehérjékhez kapcsoljuk. Ezeket a viszonylag kis molekuláju anyagokat Landsteiner <u>hapténeknek</u> nevezte.

Az antigéneket nagyfoku fajlagosság jellemzi, amelyért az antigénmolekula ugynevezett determináns csoportjai felelősek. A fajlagosság és a kémiai szerkezet között szoros összefüggés van, a determináns csoportok szerkezetének megváltozása maga után vonja az antigén fajlagosságának változását is.

A legjobb antigének a fehérjék, de jó immunogenitással rendelkeznek a nagymolekuláju poliszaharidák is, ilyenek pl. a vércsoport-antigének.

Kimutatták, hogy az antigén sajátságokat nemcsak a molekulatömeg, hanem a molekulák merevsége is befolyásolja.

Specifikus antitestek nyeréséhez egységes, megfelelő minőségü antigénre van szükség.

Midgley és Niswender /17/ nevéhez fűződik az antigének és antitestek néhány fontos tulajdonságának tisztázása. Az antigének tisztasága szükséges, de nem elégséges feltételnek számit. Megállapitották; az antitest legtöbb esetben nem ismeri fel a haptén fehérjéhez való kapcsolási helyéhez közeli csoportok minőségét, vagyis "messzelátó" - "for sighted". Az antitestek másik tulajdonsága, hogy a fehérjéhez való kapcsolásban résztvevő csoportok kötés előtti szerkezetét sem ismeri fel - "nem emlékezik" - "non remembered". Ezek a megállapitások kétségtelenül

nagy mértékben helytállóak, de néhány speciális esetben eltérő viselkedés is tapasztalható.

A haptének fehérjékhez való kapcsolásakor az előzőek ismeretében, olyan megoldást kellett keresni, amelyekkel az eredeti funkciós csoportokat lehetőleg érintetlenül hagyjuk és a kapcsolást uj funkciós csoportok bevételével valósitjuk meg. A gyakorlat számára is nagy jelentőségü az antigén sajátságok és a várható immunválasz tipusa közötti összefüggés vizsgálata. E problémakör kutatásának gyakorlati jelentőségét az adja, hogy tudnunk kell, hogy a kisérleteinkkel kapcsolatban alkalmazott immunológiai módszerekkel csak celluláris, vagy humorális immunválaszt is fogunk kapni. Nekünk humorális immunkreakciók kialakitására kell törekednünk, mert igy sokkal könnyebben lehet az antitestképződést ellenőrizni. A humorális immunválasz előnye az is, hogy a keletkező antitesteket, ill. antiszérumokat viszonylag nagyobb mennyiségben, egyszerüen az immunizáláshoz használt kisérleti állatokból levett vérből tudjuk izolálni.

D.E. Nitecki és munkatársai /18/ vizsgálták az antigéndeterminánsok és a humorális immunválasz összefüggéseit egy viszonylag kis molekula - az L-tirozin-para-azo-benzolarzenát /RAT/ esetében. Ugy találták, hogy ez a molekula a tengerimalacban csak celluláris immunválaszt vált ki, ugyanugy, mint dinitrofenil /DNP/ -származéka, amely aszimmetriás bifunkcionális antigén. Két RAT-molekulának egy rigid-spacerhez - a dekaprolinhoz - való kapcsolásával szimmetrikus bifunkcionális antigént állitottak elő, amellyel szemben celluláris és humorális immunválaszt is kaptak.

A spacer hajlékonysága, ill. merevsége meghatározó szerepet játszik, bizonyitja ezt az a körülmény, hogy amikor szintén két RAT-molekulát flexibilis spacerre, a 6-amino-kapronsavra /ε-ACA/ vittek fel, az igy előállitott antigén csak celluláris immunválaszt váltott ki. Fentiekből

következik, hogy kisérleti körülményeinkhez szükséges teljes immunválaszt akkor érhetünk el, ha mi is rigid spacert alkalmazunk és antigénünknek legalább két determinánst - haptént - kell tartalmaznia. Nitecki és munkatársai szerint legalább két hapténre ezért van szükség, hogy ezek hidat tudjanak képezni a "B" és "T" - limfociták között.

Kisérleteink során hordozó fehérjének alkalmazott marhaszérum-albumin /BSA/ nemcsak neurotranszmitterek, hanem egyéb haptének - pl. bizonyos szteroidok - esetében is ideális hordozó-fehérjének bizonyult. A hordozó molekulának önmagában is jó immunogénnek kell lennie, mert gyenge immunogenitásu hordozó használatakor csak alacsony titerü antiszérumot kaphatunk.

A haptének BSA-hoz történő kapcsolása a fehérjemolekula Lys-ε-NH_2 csoportjain keresztül történik, s mivel a BSA Lys-tartalma ismert, különböző módszerekkel meghatározható az acilezett és a szabadon maradt aminocsportok száma és ez alapján kiszámitható az antigén jellemzésére is alkalmas haptén/BSA hányados. A hányados megmutatja, hogy egy hordozó molekulára hány haptén kapcsolódott fel. Az irodalomban egymásnak ellentmondóan itélik meg a mutató jelentőségét, eredményeink azonban arra utalnak, hogy egy konjugátum antigenitása annál jobb lesz, minél magasabb a haptén/BSA arány.

Az antigénszintéziseк összetett és speciális problémák megoldását igénylik, bizonyos törvényszerüségek szem előtt tartása, megvalósitása azonban általánoс érvénnyel elősegiti jó minőségü antigének, ill. antitestek, antiszérumok előállitását.

Nemcsak az segiti elő a jó immunválaszt, hogy minél nagyobb számu haptént kötünk a hordozó fehérjéhez, hanem egyéb szempontok figyelembe vétele is szükséges. Igy, jelentőséggel bir a kapcsoláshoz használt összekötő lánc hossza is, amelynek bizonyos távolságot /7-10 Å / kell elérnie ahhoz, hogy a haptén mintegy "kiemelkedjék" a fehérjemolekula felszinéről.

Tapasztalataink szerint különös jelentősége van a fehérjéhez történő kapcsolás technikájának.

Ezen kisérleti körülmények minél jobb megválasztásával csökkenthetjük az ugynevezett keresztreakciók valószinüségét, ill. számát.

Az antigénszintézisek és sajátságok fenti, általános jellegü leirása csak érinti e problémakörben rejlő sokféle, megoldásra váró feladat összetettségét. Az antigénszintézisek és általában az antigénekkel kapcsolatos kutatások - ezen belül a neurotranszmitter-funkcióval rendelkező anyagok antigénjeinek kutatása is - folyamatosan jelentkező, specifikus problémák megoldását igénylik. A neurotranszmitter-antigének eddigi irodalmában is találkozhatunk bizonyos közös, általános érvényü megállapitásokkal, de ugyanakkor az egyes neurotranszmitterek kutatásában a végső célok eléréséhez többnyire egyedi, speciális problémákat is meg kell oldani.

A neurotranszmitterek antigénszintéziseinek irodalmi áttekintésekor szükségszerünek látszik a közös tárgyalásmód, amit egyrészt az indokol, hogy a kutatók nemcsak egyes neurotranszmitterek antigénjeivel, hanem többnyire ezen anyagok mindegyikével foglalkoztak, másrészt kétségtelenül fellelhetők az antigénszintézisek problémakörében bizonyos közös vonások. A peptidkémiában használatos kapcsolási módszerek az antigénszintézisek során is alkalmazhatók, de figyelembe kell vennünk, hogy peptidek szintézisekor a savamid-kötés kialakitását általában egyszerübb technikai megoldással tudjuk megvalósitani.

Az antigénszintézisek során alkalmazott kapcsolási módszereket - a teljesség igénye nélkül - az alábbiak szerint csoportosithatjuk:

1. formaldehides kapcsolás
2. vegyes-anhidrides kapcsolás
3. karbodiimides kapcsolás

4. aktiv-észteres kapcsolás
5. azokötés kialakitása
6. egyéb módszerek.

Az antigénszintéziseknél feltétlenül figyelembe kell vennünk, hogy az antigéneket biológiai kisérletek céljára állitjuk elő.

Példaként emlithetjük, hogy az azokapcsolásnál kialakuló azokötés testidegen jellege miatt az antigénszintézisekhez nem kivánatos megoldás.

2./ Neurotranszmitter antigének szintézise /irodalmi előzmények/

a./ Katekolamin antigének

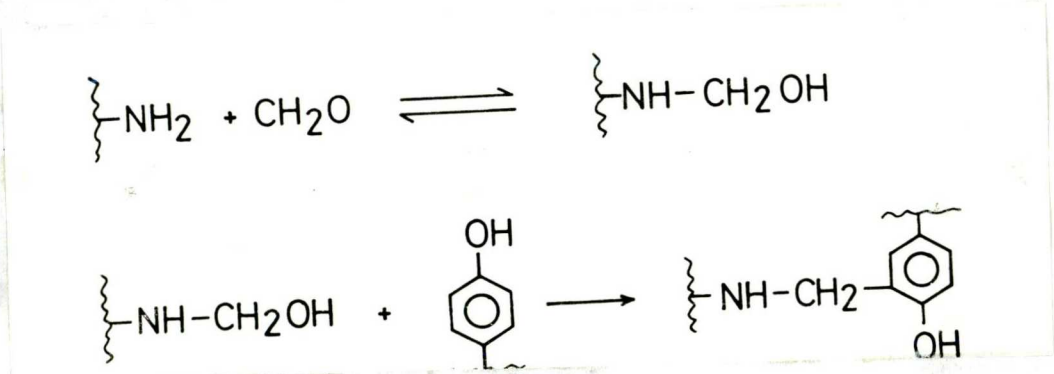
A katekolamin-antigénszintézisek időrendi áttekintésekor először S. Went és L. Kesztyüs /19/ munkáit kell megemliteni. Az emlitett szerzők 1939-ben pirokatechinből kiindulva ennek nitroszármazékát, majd redukcióval aminopirokatechint szintetizáltak. Ezután a Stolz-szintézis analógiájára amino-adrenalint állitottak elő, amit diazotálással kapcsoltak marhaszérumhoz. Bár az igy nyert antigénnel szemben az immunizálás során anti-adrenalin hatást mutató antiszérumot sikerült nyerniük, mégis módszerük hibájául róható fel, hogy az azokötéssel nyert antigének a kötés testidegen jellege miatt nem tekinthetők jó minőségüeknek, továbbá a diazotálás miatt számolni kell az alifás aminocsoportok reakciójával is. Az antiszérum specificitását nem vizsgálták.

Jelentős metodikai ujitásnak számitott a formaldehiddel történő kapcsolás alkalmazása. A formaldehides kondenzációs reakció már 1876. óta ismert volt, de fehérjék és haptének összekapcsolására 1945-ben H. Frankel-Conrat /20/, majd R.L. Wormell és munkatársai /21/ alkalmazták először. A reakció során a haptén amino- /22/, guanidino- /23/, indol- /24/ csoportján keresztül történik a kapcsolás a fehérjét

alkotó aminosavkomponensek aromás gyürüjéhez. Elsősorban a hisztidinen és tirozinen keresztül jön létre a kapcsolat, de kisebb mértékben a Phe és a Trp is reakcióba léphet.

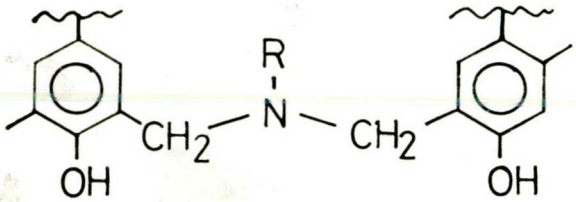
E módszer legnagyobb előnyét az jelenti, hogy a létrejött kötés nem testidegen és a reakció megfelelően megválasztott /3-8 közötti/ pH-értéken egy lépésben játszódik le.

A formaldehides kondenzációs reakció mechanizmusának ^{13}C NMR-spektroszkópiával történő vizsgálata /25/ azt mutatta, hogy a formaldehid a fehérje lizinjeinek NH_2-csoportjával metilol-származékot képez, s ezen keresztül történik a kapcsolás az aromás gyürühöz - adott esetben orto-helyzetben:



3. ábra

A ^{13}C NMR módszer segítségével - amelyhez ^{13}C-ben dusitott formaldehiddel végzik a kapcsolási reakciót - azt is kimutatták, hogy polimerizáció is számolni kell:



4. ábra

A ^{13}C NMR analitikai módszer lehetővé teszi a kialakitott kötések kvantitativ mérését is.

D. Tome és munkatársai /26/ az előzőektől eltérően, nem egy-egy aminosavval modellezve tanulmányozták a formaldehid-kötés mechanizmusát, hanem a kapcsolási viszonyoknak jobban megfelelő kisérleti körülményt választottak: komplett fehérjén vizsgálták - szintén ^{13}C NMR módszer segitségével - a kapcsolási mechanizmust. Megállapitották, hogy első lépésben valóban addiciós reakció játszódik le és ennek eredményeként metilolszármazékok keletkeznek. A reakció az amino-, guanidino-, hidroxil-, indolil- és imidazol -csoportokkal nem teljes, a szulfhidril- és amidocsoportok viszont kvantitative reakcióba lépnek. Azt tapasztalták, hogy aszparagin, treonin, hisztidin és triptofán N-α-OH-CH_3 - származékai az oldallánc bázikus csoportjaival ciklikus vegyületeket képeznek.

Mivel a katekolaminok könnyen oxidálódnak és ez a körülmény önmagában is nehezíti antigénjeik előállitását, L.Grota és G.M. Brown /27/ 1976-ban olyan megoldást keresett, amellyel az oxidáció által okozott problémát ki lehet küszöbölni. Kisérleteikben a dopamin, noradrenalin és adrenalin helyett a nem oxidálódó, 3-as helyzetü OH-csoportot nem tartalmazó analógjaiknak, a tiraminnak, oktopáminnak és szinefrinnek az antigénjeit állitották elő

formaldehides kapcsolással. Ezek az antigének a dopamin, noradrenalin-és adrenalin antigénekhez hasonlóan alkalmasak antiszérum nyerésére, de 100 %-ot meghaladó mértékü keresztreakciókat adtak a 3-as helyzetü metoxilált származékokkal. A szinefrin - metanefrin vegyületpár esetében a keresztreakció 800 %-os volt!

Elméleti és gyakorlati jelentősége miatt is meg kell emliteni A. Miwa és munkatársainak antigénszintézisét /28/. Először maleil-csoporttal védték a katekolaminok aminocsoportját, majd az igy védett hapténeket formaldehides kondenzációval kapcsolták BSA-hoz. A védőcsoport eltávolitását 60 °C-on 3 órán át 0,01 n HCl-val történő kezeléssel oldották meg. A haptén/BSA hányadosokra Doty-módszerével /29/ 18-30 közötti értékeket kaptak. Az antiszérumok specificitását az immundiffuziós elven alapuló Ouchterlony-módszerrel ellenőrizték és komoly mértékü keresztreakciókat mutattak ki. Később az ugyanigy szintetizált antigének haptén/BSA hányadosait aminosavanalizis segitségével határozták meg /30/. Véleményünk szerint aminosavanalizis alapján csak megbizhatatlan adatokat kaphatunk a hányadosok értékére vonatkozóan, mivel a formaldehides kapcsolási mód során nemcsak a hapténekkel, hanem a reakcióelegy egyéb - pl. amido -, guanidino-, indol-csoportokat tartalmazó molekuláival is létrejön kapcsolás.

A. Miwa és munkatársai további kisérleteikben /31/ egyszerübb vegyületeken - 1,2-dihidroxi-4-metil-benzolon és etilaminon modellezték a korábbi antigénszintéziseik körülményeit. Megállapitották pl., hogy az etilamino-csoport az aromásgyürü 5-ös helyére kapcsol. A noradrenalin esetében a kapott antigén segitségével RIA-módszert is leirtak. Kellően magas titert tudtak elérni és igy 0,1 pikogramm adrenalint tudtak meghatározni analógok jelenlétében.

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.

S. Spector /32/ 1969-ben a peptidkémiában használatos karbodiimides kapcsolási módszer mintájára vizoldható etilkarbodiimid /EDC/ segitségével noradrenalint kapcsolt BSA-hoz. Nem védett csoportokon keresztül történt tehát a kapcsolás és a haptén/BSA hányados is alacsony; 8 volt. A kapott antitest hatásosságát noradrenalin által kiváltott pressor-válasz gátlásával jellemezte. 1972-ben /33/ a fenti EDC-s kapcsolást a katekolaminok mindegyikével elvégezte és ezuttal is 8-as haptén/BSA mólarányt kapott. Az antiszérum hatásosságát ezuttal a noradrenalin által kiváltott lipolitikus aktivitás gátlásával mérte. A mérés a noradrenalinnak azon az élettani hatásán alapszik, amely szerint a szabad noradrenalin az izolált zsirsejteken is gyorsitja a zsirok lebontását, mig a kapcsolt noradrenalin nem. Hatásos antiszérum tehát a zsirbontási folyamat gátlását idézi elő.

Spector katekolaminok dimetil-acetamidos oldatának poli-γ-benzil-L-glutaminsavval történő reakcióját követően is előállitotta azok antigénjeit. Az immunizálás után nyert antiszérum antitestjeit azonban csak molekulatömegük alapján azonositotta. Ez azonban nem kielégitő módszer, tekintettel arra, hogy egy szérumban mindig jelen van valamennyi immunglobulinosztály képviselője.

1973-ban Spector és munkatársai /34/ ε-Z-L-Lys-NCA-t és γ-benzil-L-Glu-NCA-ból kopolimert képeztek, majd ezeket dimetoxi-fenil-etil-aminnal reagáltatták. A védőcsoportok BBr_3-mal történő eltávolitását követően olyan antigént sikerült előállitani, amelynek segitségével nyert antiszérum normetanefrin, feniletilamin és tiramin megkötésére volt képes. E antigénszintézis hibájául róható fel, hogy a kapcsolási reakció igénybe veszi az aminocsoportokat, majd tekintettel a katekolaminok savérzékenységére, a BBr_3-dal történő védőcsoport eltávolitásakor a katekolaminok könnyen károsodhatnak.

J.B. Richardson /35/ glutáraldehid segitségével primer-aminocsoporttal rendelkező biogén aminok polimerét állitotta elő. A polimerek a reakcióelegyből nem oldódó csapadék formájában váltak ki.

L.T. Cheng és munkatársai /36/ magas titerü, nagy specificitásu antiszérum képzésére alkalmas amphetamin-antigéneket állitottak elő. Első lépésként az amphetaminokat N/4-Br-butil/-ftálimiddel reagáltatták, majd hidrozinolizissel távolitották el a védőcsoportokat. A kapott anyagot izolálása után, az aminocsportokon keresztül EDC-vel BSA-hoz kapcsolták. Ezek a kisérleti körülmények katekolamin-antigének szintézisét nem teszik lehetővé/a forralás, majd a bázikus közegben végzett hidrozinolizis a katekolaminok bomlását okoznák/.

S.J. Gross /37/ para-amino-benzoesavat diazotált, majd lugos közegben adrenalinhoz kapcsolta. A reakcióelegyet oszlopkromatográfiával tisztitotta. A kapott adrenalin-azobenzoesavat haemocianinhoz kapcsolta és dializissel tisztitotta, majd liofilizálta. A testidegen azokötések és a nem egységes, nehezen tisztitható termékek miatt ez a módszer nem tünik előnyösnek.

B.A. Faraj /38/ para-amino-hippursavat EDC-vel kapcsolt haemocianinhoz, a kapott komplexet diazotálta és 3-OMe--dihidroxi-fenil-alanin-t kapcsolt hozzá, s igy haemocianin-molekulánként 20-25 haptén felvitelét tudta elérni. Később a kapott antiszérum segitségével RIA-t dolgozott ki.

A legutóbbi irodalmi közlések alapján T.K. Keeton és munkatársai /39/ 1981-ben a noradrenalin metabolitjának a - metoxifeniletilén-glikolnak /MOPEG/ antigénjét készitették el ugy, hogy először a MOPEG és 6-brómhexánsav reakciójával 3-metoxi-4/5-karboxipentoxi/-feniletilénglikolt állitották elő, majd EDC-vel thyregglobulinhoz kapcsolták. Immunizálás után a nyert antiszérum segitségével RIA-módszert is kidolgoztak.

b./ Hisztamin antigének

A hisztamin lényegesen egyszerűbb vegyület, mint a katekolaminok, s ebből eredően kevesebb kapcsolási lehetőséget kínál. Oxidációra korántsem érzékeny annyira, mint a katekolaminok. A problémát az imidazolgyürü különleges kémiai tulajdonsága okozhatja. A gyürü kvaternizálható nitrogénjének acilátvivő sajátsága miatt nehezen kapcsolható. A hisztaminnal végzett különböző reakciók során többnyire számos melléktermék keletkezik és a kivánt vegyület csak alacsony termeléssel képződik, ugyanez az antigénszintézisekre is érvényes.

A hisztamin antigénszintézisek időrendi áttekintésének élére L. Kesztyüs és S. Went /19/, valamint N. Fell és munkatársainak /40/ kisérletei kivánkoznak, akik egyaránt azokötés kialakitásával kivántak hisztaminantigént előállitani. Fell az 1941-ben végzett kisérletek folytatásaként, 1943-ban hisztamin és para-nitro-benzoil-klorid reakciójával para-nitro-benzoil-hisztamint állitottak elő, majd ezt paraaminobenzoil-hisztaminná redukálták és diazotálást követően fehérjéhez kapcsolták. Az immunizálási folyamatot az antigén-antitest reakciót követő csapadékkiválás alapján vizsgálták. A kapott antiszérumban csak "bizonyos foku" antihisztamin aktivitást észleltek. Később, 1947-ben M.B. Cohen és munkatársai /41/ a Fell módszerével előállitott antiszérumot különböző klinikai kórképekben próbálták ki és urticáriában és az asztma különböző eseteiben hatásosnak találták.

G. Rodney és N. Fell 1943-ban /42/ β-/5-imidazolil/etil-karbamido-protsint állitottak elő hisztamin és foszgén reakciója során keletkező hisztaminizocianátból. A nyert antiszérumot in vivo és in vitro körülmények között is hatásosnak találták. Az antiszérumot anafilaxiás /allergiás/ sokk kivédésére gyakorolt életteni hatásán keresztül vizsgálták. Fell a fenti módszereken kivül még további megoldásokat is közölt az imidazolgyürü fehérjékhez való kapcsolására /43/.

S. Spector és tőle függetlenül T.R.A. Davis /44/ EDC-es kapcsolással állitott elő antigént. Davis nyul-szérum-albuminhoz való kapcsolással jutott antihisztamin aktivitás kiváltására alkalmas antigénhez, mig Spector BSA-t használt hordozófehérjéül.

A formaldehides kapcsolást C.J. Martin /45/ alkalmazta, s azt tapasztalta, hogy a formaldehid az imidazolil-gyürü nitrogénjével N-OH-metil-származékot képez.

Kovács P. és Csaba Gy. /46/ para-amino-benzoil-azo--hisztamint kapcsoltak humánszérum-albuminhoz, s az antigénnel szemben nyert antiszérumot fluorescein-izo-tiocianáttal /FITC/ jelölték meg. Kidolgozták a hisztamin direkt immuncitológiai kimutatását formalinnal, ill. Cornay-módszerrel fixált metszetekre egyaránt.

c./ Szerotonin antigének szintézise

A katekolaminoknál már korábban alkalmazott különböző kapcsolási módszerekkel a szerotonin antigének szintéziseinél is találkozunk. A kisérleti körülmények kialakitásánál feltétlenül ügyelni kell arra, hogy a kapcsolás nemcsak a láncvégi NH_2-csoporton, hanem az indolilgyürü nitrogénjén, sőt egyéb helyein is létrejöhet. Ezáltal fennáll a lehetőség, hogy nem egységes antigént kapunk, amiből pedig az is következik, hogy immunizálás után az antiszérumban többféle antitest jelenik majd meg.

Szerotonin antigének azokötés kialakitásán keresztül történő előállitása G. Filipp és H. Schneider nevéhez fűződik, akik első reakciólépésben para-helyzetben diazotált acetanilidet kapcsoltak szerotoninhoz és az acetil védőcsoport eltávolitása után szabaddá váló NH_2-csoport ujabb diazotálását követően valósitották meg a fehérjéhez való kapcsolást /47/.

A kapcsolási reakcióba lépő csoport alkalmas megválasztására irányult az a módszer is, amelyet N.S. Ranadive és

S.H. Sehon dolgozott ki /48/, akik antigénszintézisükhöz kiindulási anyagként a szerotoninhoz nagyon hasonló szerkezetü 5-OH-indol-ecetsavat választották. Első lépésben DCCI segitségével az 5-OH-indol-ecetsav anhidridjét képezték és azzal acilezték a fehérje molekulák NH_2-csoportjait. A kapcsolást albumin és globulin molekulákra is elvégezték és igen kedvezőnek mondható 18-as haptén/albumin, ill. haptén/globulin hányadost értek el. Az antigéneket a velük szemben termeltetett antiszérumnak anafilaxiás sokk kivédésére gyakorolt hatásán keresztül, továbbá Ouchterlony-módszerével jellemezték.

Az előző két módszer során alkalmazott reakciólépések segitségével p-amino-fenil-alaninból kiindulva 1973-ban S. Spector és munkatársai készitettek szerotonin antigént /49/. Először a kiindulási anyagot vizoldható EDC segitségével BSA-hoz kapcsolták, majd e komplexum diazotálásával jutottak a célvegyülethez /50/.

A katekolaminok antigénszintézisére, valamint szövetekben történő fixálására is igen jól bevált formaldehides kapcsolási módszer alkalmazásá a szerotonin-antigének előállitására is kézenfekvőnek mutatkozott.

A kapcsolást Ranadive és Sehon klasszikusnak mondható körülmények között - semleges pH-ju Na-acetát pufferben, formaldehid, szerotonin és a hordozófehérjéül használt BSA elegyének reagáltatásával végezték /51/. Ezuttal azonban az azokötés kialakitásával járó megoldáshoz hasonlóan - nemcsak az oldallánc, hanem az indolgyürü nitrogénjén keresztül is létrejött kapcsolás. Erre a körülményre a nyert antiszérumok keresztreakcióiból következtettek. Az antigénnel szemben termeltetett antiszérum alacsony titere miatt nem volt alkalmas RIA módszer kidolgozására, s ezt azért is érdemes megemliteni, mert egyes kutatók véleménye szerint /52/ ez éppen a kétféle - vagy még további - kapcsolási lehetőség következményeként adódott.

Szerotonin antigénszintézisek eddig ismertetett módszerei során problémát okozott, hogy a hordozófehérjéhez való kapcsolásra a szerotonin molekula különböző csoportjain keresztül több lehetőség is mutatkozott. Ezeknek a lehetőségeknek a megismerése céljából többen vizsgálták a szerotoninhoz hasonló szerkezetű melatonin /5-MeO-N--acetil-triptamin/ kapcsolási körülményeit, mechanizmusait. A melatonin azért alkalmas az egyéb kapcsolási lehetőségek tanulmányozására, mert nem rendelkezik a szerotonin láncvégi szabad NH_2-csoportjával, viszont az indolilgyűrün keresztül létesülő kapcsolatok kialakulásának tanulmányozására ideális lehetőséget nyujt. A kisérletekből az a következtetés vonható le, hogy a melatonin nem a 6. helyzetben reagál formaldehiddel. Több kutatócsoportnak is sikerült specifikus melatonin-antiszérumot előállitani és immunhisztológiában felhasználni.

A szerotonin immunhisztokémiai meghatározásának céljára Ranadive és Sehon karbodiimides kapcsolási módszerével H.W.M. Steibusch és munkatársai /53/ állitottak elő szerotonin antigént, amely felhasználásával a szerotonin kimutatását patkány központi idegrendszerében krioszták-metszetek alkalmazásával végezték. Mások, igy pl. R. Buffa is kidolgozott ICC-módszert a szerotonin lokalizációjának kimutatására /54/. Az általa alkalmazott megoldás még érzékenyebbnek bizonyult, mint a klasszikus Falk-Hillarp technika. A nyert antiszérum keresztreakciót adott az 5-MeO--triptaminnal.

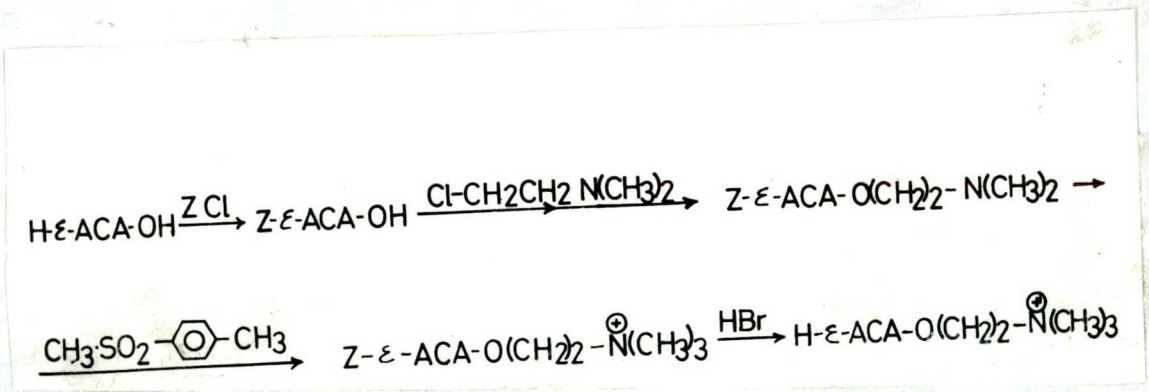
RIA mérési célokra S. Spector és B. Peskar által előállitott antigén /49/ /50/ /p-amino-fenil-alanin EDC-es kapcsolása BSA-hoz, majd az igy nyert komplexum diazotálása/ immunizálást követően olyan antiszérumot eredményezett, amely 100 pikogramm anyag meghatározását tette lehetővé, bár titere egyszer sem érte el az 50-et, mégis alkalmas volt már a szerotonin vérben történő mérésére /55/.

Ismert és általunk is alkalmazott az az elv, amely szerint jobb tulajdonságu antiszérumokat nyerhetünk, ha a haptén és a hordozófehérje közötti távolságot növeljük. További előnyös hatást eredményez, ha a meghosszabbitott lánc egyuttal merev is /merev specer/. Ennek az az oka, hogy igy a haptén jobban kiemelkedik a hordozófehérje felületéről és az immunreakció során jobban "felismerhető" lesz.

A fenti elv hasznositásával 1981-ben M.A. Delaage és J.J. Puizillout /56/ is előállitott RIA módszerrel történő mérésre is alkalmas szerotonin antigént. Első lépésben az ON-diszukcinil-szerotonint 11-es pH-n hidrolizálták, majd G 25-ös oszlopon sómentesitették és utána DCCI segitségével kapcsolták BSA-hoz. Az immunizálást nyulban végezték és 10^4 titerü antiszérumot kaptak. RIA módszer kidolgozásához az előzőekhez hasonlóan a glicinamid-származékok előállitására volt szükség.

d./ Acetilkolin antigének

Acetilkolin elleni antiszérumot először Spector és munkatársai állitottak elő 1978-ban /57/. Antigénszintézisre alkalmas származékot igen bonyolult módon nyertek:



5. ábra

A négylépéses szintézis végén kapott ε -aminokaproil--kolint vizoldható karbodiimiddel kapcsolták BSA-hoz. Az immunizálás után kapott antiszérum felhasználásával radioimmun-analitikai eljárást dolgoztak ki acetilkolin meghatározására. Annak ellenére, hogy a publikáció már 4 éve megjelent, sehol nem olvasható a szakirodalomban, hogy a Spector-antiszérummal acetilkolint határoztak meg, ezért a módszer alkalmazhatósága kérdőjelesnek tünik.

Az acetilkolin RIA-meghatározása és közvetlen immunhisztológiai kimutatása nagyon jelentős módszertani ugrás lenne az acetilkolin-kutatás területén. Ezért nem csoda, ha Spector publikációja után más kutatócsoport is megpróbálkozott acetilkolin-RIA kidolgozásával[58]. Az antigént jóval egyszerübben állitották elő, mint Spector: kolint piridinben glutáranhidriddel acileztek, majd a gluteril-kolint vizoldható karbodiimiddel kapcsolták BSA-hoz. Az antigénnel szemben termelődött antiszérum alkalmas volt az acetilkolin RIA-meghatározására.

3./ Neurotranszmitter antigének előállitása /saját eredményeink/

A neurotranszmitterek antigénjeinek szintézisét, majd antiszérumaik előállitását három fő kisérletcsoport céljára kivántuk megvalósitani:

1./ Az utóbbi években rendkivüli fejlődéssel jellemezhető RIA mérési módszer céljára, mivel a módszer már rutinfeladatok megoldására is ideálisnak bizonyult. Neurotranszmitterek RIA-módszerrel történő meghatározásához ezért a mindennapi gyakorlat is igényelte a szükséges antigének előállitását.

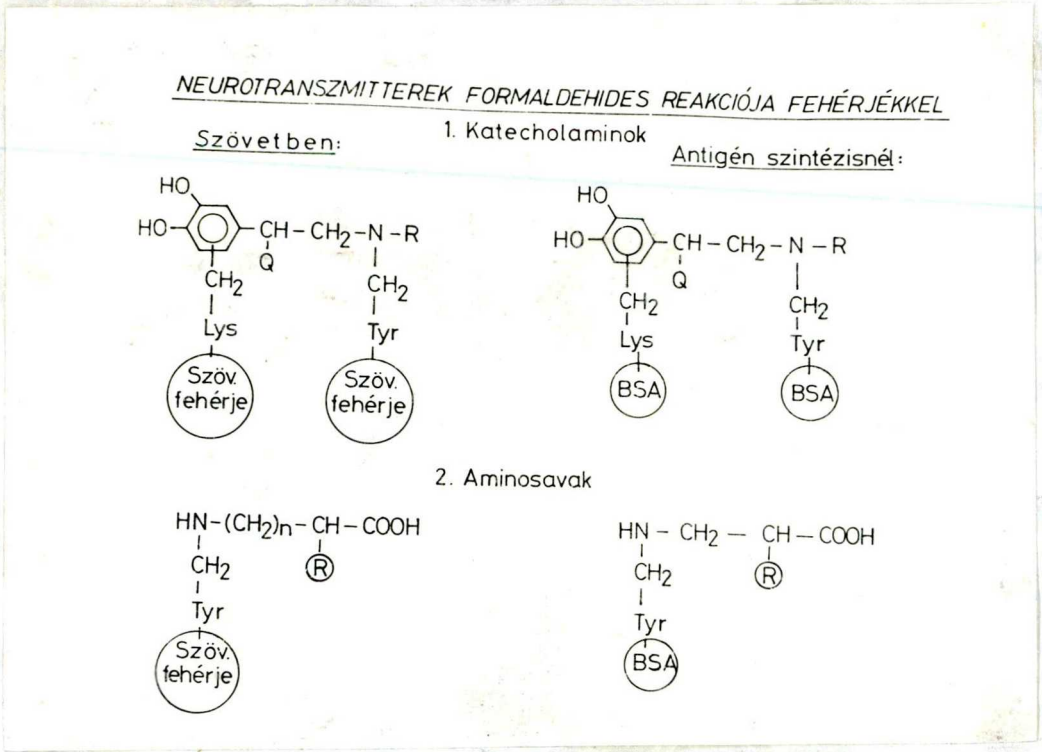
2./ Antigéneket kivántunk előállitani immunfluoreszcencia-mikroszkópos kisérletekhez is, mivel ennek eredményei a RIA-módszer adataival jól kiegészithetik egymást és közösen átfogó analitikai érté-

kelést képesek adni. Immunfluoreszcencia-mikroszkópos vizsgálatok segitségével ugyanis a neurotranszmitterek nemcsak kimutathatók, hanem egyuttal helyi lokalizációjuk is láthatóvá tehető és egyuttal kvantitativ meghatározásukra is lehetőség nyilik.

3./ A kapott antiszérumok tisztitását affinitás kromatográfiás módszerrel terveztük megoldani. Erre a célra pedig szükséges az antiszérumok alkalmas hordozókhoz kapcsolt immobilizált származékainak előállitása.

Eredeti elképzeléseink szerint RIA, ill. a fluoreszcencia-mikroszkópos kisérletek céljára ugyanazon kisérleti körülmények között előállitott antiszérumok felhasználását terveztük, de később tapasztalataink alapján nyilvánvalóvá vált, hogy az antiszérumok egyidejüleg nem alkalmazhatók mindkét módszerre. Ugy találtuk, hogy a RIA-hoz más szempontok szerint kell antigént szintetizálni; és pedig a determináns csoportok változatlanul hagyásával.

A neurotranszmitterek szövetekben történő kimutatására, ill. meghatározására több módszer ismeretes. A bevezetésben már részletesebben volt szó ezekről a megoldásokról. E módszerek közös és lényeges lépésének számitó fixálással kapcsolatban ezuttal is érdemes megemliteni, hogy fixáláskor lényegében ugyanaz a kapcsolási reakció játszódik le, mint az antigénszintéziskor. Ezért a neurotranszmitterek mindkét esetben ugyanabban a formában lesznek jelen: az antigének szerkezete hasonló a szövetben fixált fehérje-neurotranszmitter szerkezethez.



6. ábra

A fenti megállapitás teljes mértékben helytálló a formaldehides kapcsolásra. Ezt a kapcsolási módszert mi is gyakran alkalmaztuk, mert fixálási vagy antigén előállitási célokra egyaránt előnyös. A formaldehides kapcsolás egyszerü kisérleti feltételek mellett, jó kitermeléssel valósitható meg és BOC-védett haptének kapcsolására is alkalmasnak bizonyult.

Katekolaminok esetében problémát okozott a kapott antigének gyenge vizoldékonysága, továbbá ezen anyagok oxidációs hajlama. Ezt az antigénszintézis szempontjából is hátrányos körülményt Grota és Brown sokkal kevésbé oxidálódó katekolamin-analógok /tiramin, oktopamin, szinefrin/ alkalmazásával igyekeztek kiküszöbölni /27/.

Mi antioxidáns anyag alkalmazásával kivántuk a katekolaminok oxidációját visszaszoritani. A számba vehető antioxidánsok közül a legoptimálisabb kiválasztására

szokásos antigénszintézis körülmények között próbakapcsolásokat végeztünk. Az idő függvényében figyelemmel kisértük a keletkező antigének szinét és oldódási viszonyait. Fontos szempont a reakció lejátszódásának sebessége mellett az antioxidáns eltávolithatósága a reakcióelegyből. Az antioxidánsok közül a ditio-eritritol, Na-borohidrid, merkaptoetanol, Na-ditionit, C-vitamin alkalmazásával és antioxidáns nélkül 20 perces és 3 órás reakcióidő után is vizsgáltuk az antigénszintézis körülményeit. Végül a C-vitamin bizonyult a legalkalmasabbnak. Nem okoz antigén kicsapódást, a kettős kötéseket nem redukálja, vizes oldatban alkalmazható. Stabil és végül az antigén tisztitásakor dializissel könnyen eltávolitható. A reakcióidőt tapasztalataink szerint célszerü volt 20-24 órára növelni.

UV-spektrofotometriás módszerrel meghatároztuk a katekolamin-antigének haptén/BSA hányadosait és csak 10-20 közötti értékeket kaptunk. Tapasztalataink szerint a hányados igen jól használható antigének jellemzésére, bár jelentőségét nem egyértelmüen itélik meg. Az alacsony hányadosok egyik feltételezett oka az antigének inhomogenitása, ill., hogy a neurotranszmitterek aminocsoportja is részt vehet a kapcsolásban és ezáltal - mintegy blokkolódik. Ezek a tényezők hibaforrásként szerepelhetnek az antigén-antitest reakcióban, amelyekre már Midglay és Niswender is felhivta a figyelmet /17/. Megállapitották, hogy az antitestképzéshez fontos az antigén homogenitása, de ez nem elégséges feltétel. Ezen kivül figyelembe kell venni az antitestnek azt a tulajdonságát is, amely szerint a fehérjéhez kapcsolásban résztvevő csoportok kötés előtti szerkezetét nem ismeri fel.

A formaldehides kapcsolással előállitott katekolamin-antigének immunfluoreszcencia-mikroszkópos vizsgálatokhoz kiválóan megfeleltek, RIA céljára azonban nem bizonyultak alkalmasnak. Mint beigazolódott, ennek oka nemcsak az alacsony haptén/BSA hányadosban keresendő. 8 mólos karbamid,

ill. Na-dodecil-szulfát /SDS/ segitségével sikerült a 10-20 közötti értékeket 20-40-re növelni. A növekedés a két denaturáló ágens hatásának eredményeként jelentkezett. Hatásuk a fehérjelánc "kifeszitését" eredményezi és ez az állapot ezáltal kedvezőbb feltételeket teremt a kapcsolásra, mivel a fehérjemolekula mind az 59 lizin komponensét a molekula felszinére irányitja. Ez a beavatkozás nem érintette az antigének oldódási viszonyait, azok továbbra is vizoldékonyak maradtak.

Formaldehides kapcsolással - hagyományos módon - a hisztamin-formaldehid-BSA antigént is előállitottuk. Kiindulási anyagként hisztamin x HCl-t használtunk. Antigénünk vizoldhatónak bizonyult. Dializissel tisztitottuk, majd liofilizáltuk. UV-spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg a hordozófehérjére felkapcsolódott hisztamin többletet. Az analizis eredményeként csak 6 hisztamin molekula növekedést tudtunk kimutatni egy-egy BSA molekulán. Tekintettel arra, hogy a hisztamin és a BSA elnyelési maximuma igen közel esik egymáshoz, mi is ugy itéltük meg, hogy az UV spektrofotometriás módszer ezuttal csak tájékoztató jellegü információt adhat a BSA-ra kapcsolt hisztamin molekulák számát illetően. Ezért ^{14}C-izotóppal jelzett hisztaminnal is tervbe vettük az antigénszintézist, amelynek eredményességét igymár egyszerü radioaktivitás méréssel megbizhatóan lehet ellenőrizni.

A szerotonin-formaldehid-BSA antigént C-vitamin antioxidáns jelenlétében szerotonin-kreatinin-szulfát kiindulási anyagból állitottuk elő. A kapcsolást fénytől védve és lényegesen hosszabb ideig kellett végezni. UV-spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg a haptén/BSA arányt, eredményként 10-12-es értéket kaptunk.

Kedvezőbb tulajdonságu antigének szintézise érdekében tapasztalataink figyelembevételével kettős követelményt tüztünk ki:

1./ A haptének valamennyi funkciós csoportját érintetlenül hagyjuk a kapcsolás során.
2./ Egyértelmü kémiai kapcsolási módszert alkalmazunk.

Az első követelménynek ugy kivántunk eleget tenni, hogy a neurotranszmitter-molekulákat karboxil-csoporttal bővitettük, vagyis a neurotranszmitterek karboxilált származékaival végeztük az antigénszintézist. Az adrenalin esetében szükségessé vált a 3,4-dihidroxi-fenil-N-metil-szerin - az ugynevezett "adrenalin-karbonsav" - előállitása. A dopamin helyett a dihidroxi-fenil-alanint /DOPA/, noradrenalin helyett a dihidroxi-fenil-szerint /DOPS/, szerotonin helyett az 5-OH-triptofánt, hisztamin helyett a hisztidint és γ-amino-vajsav /GABA/ helyett a glutaminsavat kapcsoltuk hordozófehérjéhez. Ezt a megoldást azért tartottuk észszerünek és hasznosnak, mert a karboxil-csoporton keresztül stabil és nem testidegen kötés kialakitására van lehetőség. Egyuttal a második követelmény megvalósitására is jó lehetőség nyilik, mert a karboxil-csoport egyértelmü kémiai kapcsolat kialakitására ad alkalmat.

A kapcsolás előtt a haptének aminocsoportját átmenetileg védeni kellett pl. terc.-butiloxi-karbonil csoporttal /BOC/.

Az acetilkolin helyett - az antigenitás javitása céljából - a hosszabb láncu szukcinil-monokolin antigénjét képeztük.

A peptidkémiai kapcsolási módszerek közül a jól ismert vegyes-anhidrides módszerrel végeztük a kapcsolást. Ez a megoldás tekinthető a legjobbnak. Előnye, hogy a karboxil-csoporton nem kell előzetesen átalakitást végezni. A kapcsolási reakció gyorsan, kiméletes körülmények között alacsony hőmérsékleten játszódik le és általában jó termeléssel jár, s a vegyes-anhidrid közvetlenül izolálás nélkül alkalmazható. A többi módszer alkalmazásakor legalább egy-egy olyan kedvezőtlen körülmény jelentkezik, amely az antigénszintézis gyakorlati megvalósitását jelentősen nehezíti.

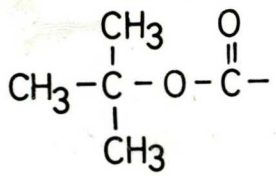
Igy pl. a karbodiimides kapcsolás során bonyolult szerkezetü oligomerek kialakulásával kell számolnunk, mert a kapcsolás nemcsak a haptének és a fehérjemolekulák aminocsoportjai között jöhet létre, hanem fehérjemolekulák intra- és intermolekulás kapcsolására is lehetőség van.

Az aktiv-észteres módszerhez szükséges az aktiv-észter előzetes előállitása és ezen kivül a kapcsolási reakciót szerves közegben kell lefolytatni.

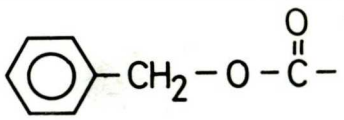
Az azidos módszer alkalmazásához először szükség van a neurotranszmitter-sav hidrazidjának előállitására. Ez némely neurotranszmitter-sav esetében nehezen valósitható meg. Ez a módszer alkalmazhatóságát is korlátozza, bár továbbiakban hidrazidból az azid előállitása már nem szokott problémát okozni.

Kisérleteink során az egyértelmü kémiai kapcsolat kialakitásához a neurotranszmitter-savak amino-csoportját védtük, hogy ezáltal a kapcsolás csak a neurotranszmitter-sav karboxil-csoportja és a fehérje amino-csoportja között jöjjön létre. A peptidkémiában alkalmazott védőcsoportokat használtuk, amelyek az antigénszintézist követően - az antigén szerkezetét már nem érintő - egyszerü körülmények között távolithatók el /védőcsoportra az acetilkolin esetében azért nincs szükség, mert nem rendelkezik reakcióképes amino-csoporttal/.

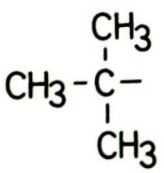
Az alkalmazott védőcsoportok a következők:



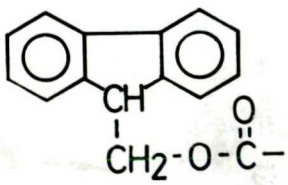
terc.-butil-oxi-karbonil
(BOC)



benzil-oxi-karbonil
(Z)



terc-butil
(But)



fluorenil-metil-oxi-karbonil
(FMOC)

7. ábra

Az-adrenalin és noradrenalin kivételével - eredetileg optikailag inaktiv neurotranszmitterekből a karboxil-csoport bevitelével optikailag aktiv neurotranszmitter-savak keletkeznek, ill. az adrenalin és a noradrenalin esetében második aszimmetriacentrum alakul ki. Ezért a lehetséges D- és L-módosulatok közül az antigenitás kifejezettebbé tétele érdekében a D-származékokból is előállitottuk a védett hapténeket. A D-konfigurációju karboxilált neurotranszmitter-antigénektől az alábbi hatások jelentkezését vártuk:

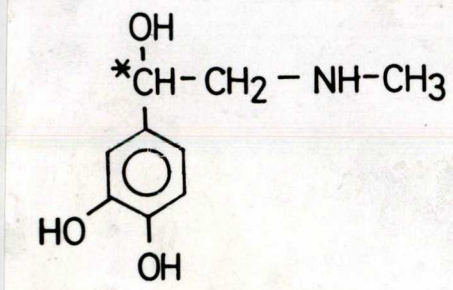
1./ Elsősorban az antigenitás fokozódását, mivel a D-származékok feltehetően erősebb antigének /testidegenek/.

2./ A D-származékok a peptidázoknak jobban ellenállnak, ezáltal hosszabb ideig mutathatók ki a keringésben és igy több eséllyel találkoznak immunkompetens sejtekkel.

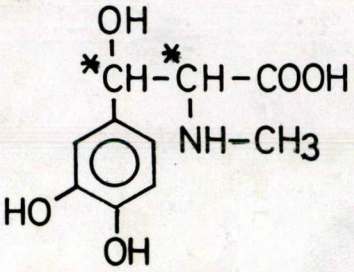
3./ Amint már többször emlitettük, a karboxilált mediátorok L-módosulatai a szervezetben is előfordulnak, igy várhatóan az L-izomér formában kapcsolt mediátorokkal szemben termelt antiszérum keresztreakciót ad a transzmitterek prekurzoraival is. A D-módosulatok a szervezetben nem fordulnak elő, igy a keresztreakció mértéke várhatóan kisebb lesz. A mediátorokkal adott reakciót ez a változtatás előreláthatóan nem befolyásolja, mivel ezek aszimmetriacentrumot nem tartalmaznak, ill. a változtatás eredetileg inaktiv szénatomon történik.

a./ A kapcsolásra alkalmas haptének, ill. neurotranszmitterek karboxilált származékainak előállitása:

1./ Adrenalin: Kisérleteink célja az adrenalin karboxilált származékának, az "adrenalin-karbonsavnak", kémiai nevén a 3,4-dihidroxi-fenil-N-metil-szerinnek az előállitása volt.



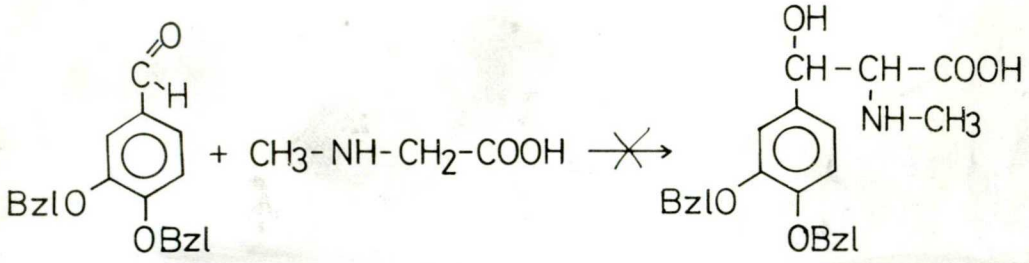
Adrenalin



3,4-dihidroxi-fenil-N-metil-szerin
"adrenalin-karbonsav"

8. ábra

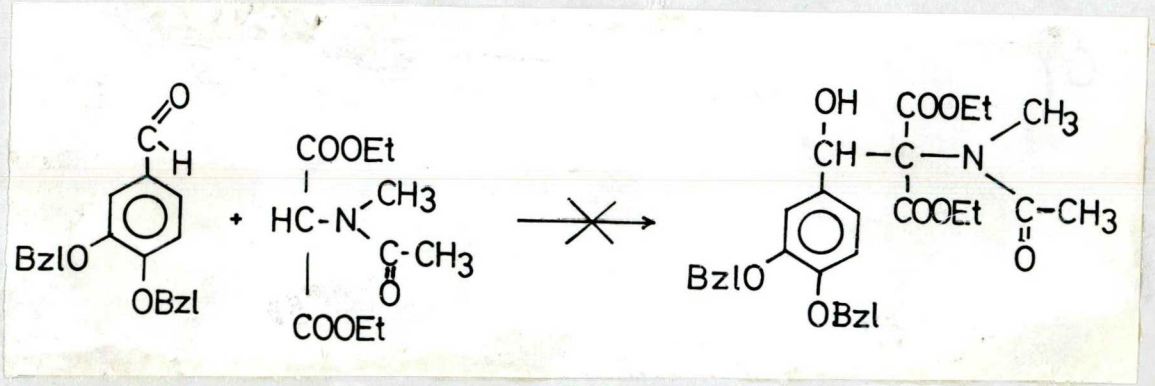
Célkitüzésünk megvalósitásához több lehetőség is kinálkozott. Igy először a Hegedüs-féle recept /59/ analóg megoldásaként glicin helyett, annak metilezett származékával, a szarkozinnal hajtottuk végre a reakciót.



9. ábra

A várt uj termék, az "adrenalin-karbonsav" azonban csak nyomokban keletkezett és a szükséges mennyiségben nem volt izolálható. Sajnos a reakciófeltételek módositásaival sem sikerült kedvezőbb eredményt elérni.

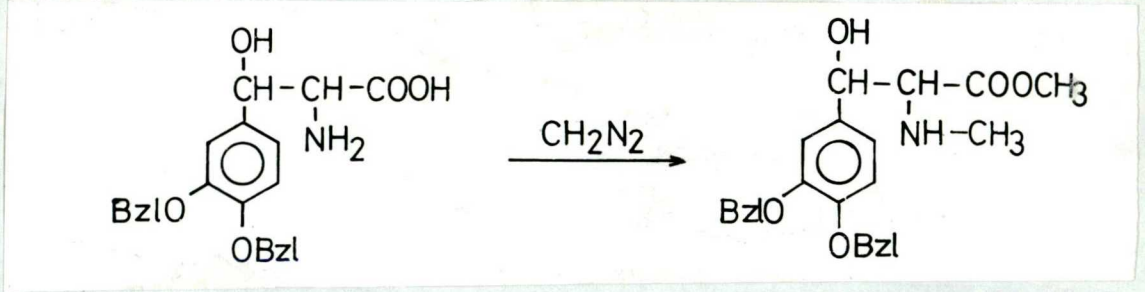
Hasonlóképpen, nem volt eredményes a Knoevenagel-Cope szintézis sem, amely szerint dibenziloxi-benzaldehidet reagáltattunk N-metil-N-acetamido-malon-észterrel.



10. ábra

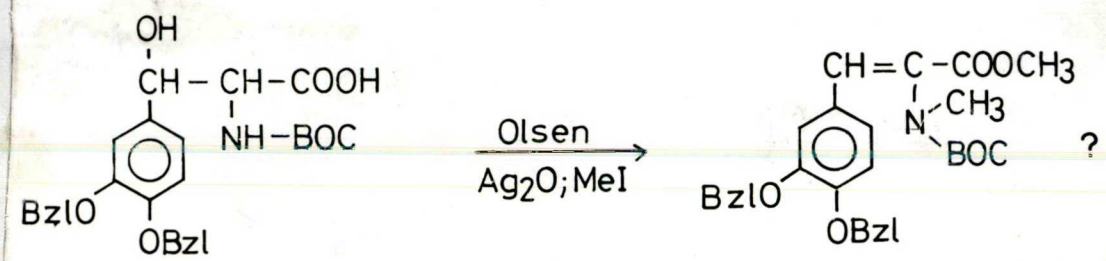
Ezek után úgy döntöttünk, hogy célvegyületünket védett noradrenalin-karbonsav /3,4-dihidroxi-fenil-szerin;DOPS/ metilezésével próbáljuk meg előállitani.

Először diazometános közvetlen metilezéssel kivántuk célvegyületünket előállitani. E megoldás során sajnos számos többszörösen metilezett termék is keletkezett és ezek mellől az adrenalin-karbonsav védett származékának izolálását nem sikerült kellő mennyiségben megoldani.



11. ábra

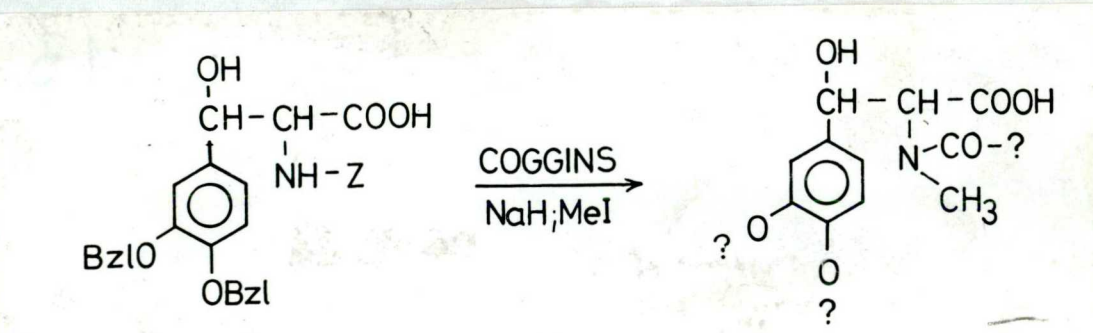
Ezt követően az Olsen-féle metilezési eljárással /60/ próbáltuk célunkat elérni. Ez a módszer DMF-es közegben Ag_2O katalizátor és metiljodid metilező ágens alkalmazásával általában jó termeléssel eredményesen alkalmazható. Esetünkben azonban feltehetően béta-elimináció miatt csak nyomokban szolgáltatta a kivánt vegyületet.



12. ábra

Jobb eredményt vártunk a hidroxil-csoportok előzetes védésétől. A szerin és treonin hidroxil-csoportjainak benzilcsoporttal történő védését Hruby irta le /61/ és treonin esetében csak 6 %-os termelést tudott elérni. A szerin és treonin összehasonlitását az indokolta, hogy a treonin szekunder OH-csoportjához hasonlóan a szerin - eredetileg primer - OH-csoportja pl. a fenilszerin, vagy DOPS esetében is szekunderré válik. Igy a treoninhoz hasonlóan az OH-csoport védése DOPS esetében is csak rossz termeléssel ment végbe, amihez az aromás gyürü térbeli gátló hatása is hozzájárult. A hidroxil-csoportok védésére jobb termelést igérő megoldás is szóba került. Schröder terc-butiléter védőcsoportot alkalmazó módszere /62/ azonban 3-4 reakciólépéssel hosszabb és ez már eleve megkérdőjelezte alkalmazását.

Ujabb lehetőséget jelentett a Coggins-féle metilezési eljárás /63/. Ezt Z-védett aminosvakra irták le és jó kitermeléssel jellemezték.



13. ábra

A reakció THF-ben NaH és metiljodid jelenlétében megy végbe. Szerin és treonin metilezésekor ugy találták, hogy a kivánt N-metileződés mellett O-metileződés is lejátszódik. Ezek alapján kétféle metileződésre számithattunk. A várakozással összhangban két kristályos frakciót nyertünk, amelyekről feltételeztük, hogy N-, ill. O-metil származékokról van szó. A karboxil-csoportok szabadon maradtak, ill. csak igen kis mértékben metileződtek. A két kristályos frakciót tisztitás után NMR-spektrum felvételével analizáltattuk. A 60 MHz-es felbontásu készülékkel csak valószinüsiteni lehetett a kérdéses vegyületek szerkezetét, ezért 90 MHz-es felbontásu készülékkel is felvettük a spektrumot. Ezen kivül, miután D, L-treo-módosulatból indultunk ki, választ szerettünk volna kapni arra a kérdésre is, hogy történt-e konfigurációváltozás valamelyik szénatomon. Sajnos, a nagyobb felbontásu készülékkel sem lehetett a kérdést egyértelmüen eldönteni. Ezért a treo-eritro módosulatok arányának eldöntésére tervbe vettük 360 MHz-es felbontásu készüléken történő szerkezetvizsgálatukat is.

Az egyik frakcióról 90 MHz-es protonon NMR spektrum /14. ábra/ alapján sikerült igazolni, hogy O-metil származék. Ez a vegyület kb. 15 %-ban keletkezett /Op. 195-196 ^{o}C/.

A proton-NMR spektrum /15. ábra/alapján megállapitottuk, hogy a 2,9 ppm-nél jelentkező csucs megfelelhet egy N-metil csoportnak. Az integrálgörbe kiértékelése 5 aromás proton és egy benzil-metilén-csoport hiányára utalt. Ez megerősitette feltevésünket a benzil-csoport kihasadásáról. A spektrumból viszont nem derült ki, hogy honnan hasadhatott ki. Némi támpontot nyujtott, hogy a két CH-csoport között lévő csatolási állandó megfelelt egy 8ttagu gyürü cisz-helyzetü protonjainak. A nagyobb mennyiségben nyert anyagról bizonyossá vált, hogy tisztán N-metil származék és nem tartalmaz O-metil szennyeződést.

Az elkészitett ^{13}C-NMR spektrum /16. ábra/ részletesebb elemzésekor azonban kiderült, a szénjelek száma egy $C_6H_5-CH_2-$/benzil/csoporttal kevesebb a vártnál. Kémiai viselkedése is eltérést mutatott, igy pl. a Z-védőcsoportot nem sikerült eltávolitanunk.

A spektrum alapján felvetett kérdés megválaszolására célszerünek tartottuk anyagunk egyenértéksulyának titrálással történő meghatározását /17. ábra/.
A fogyás/pH érték egyértelmüen arra utalt, hogy a molekulán csak egyetlen savas csoport van. Az egyenértéksuly kb. 90 egységgel bizonyult alacsonyabbnak a vártnál és ez összhangban is volt egy benzil-csoport hiányával, vagyis felvetette egy benzil-csoport lehasadásának lehetőségét.
A molekulában uj, titrálható savas, vagy bázikus csoport jelenléte nem volt igazolható. Az a tény, hogy a benzil-csoport lehasadása nem járt együtt uj savas csoport megjelenésével, egyéb szerkezeti változások lehetőségét vetette fel. Infravörös spektrum felvételéből két karbonil-csoport jelenlétét lehetett kimutatni.

Az elemi analizis eredménye $C_{25}H_{23}NO_6$ összegképletü vegyület mellett szólt, ami egy C_7H_7-csoporttal kevesebb a számitottnál. A végső bizonyitékot azonban a ^{13}C NMR-rel végzett vizsgálat szolgáltatta.

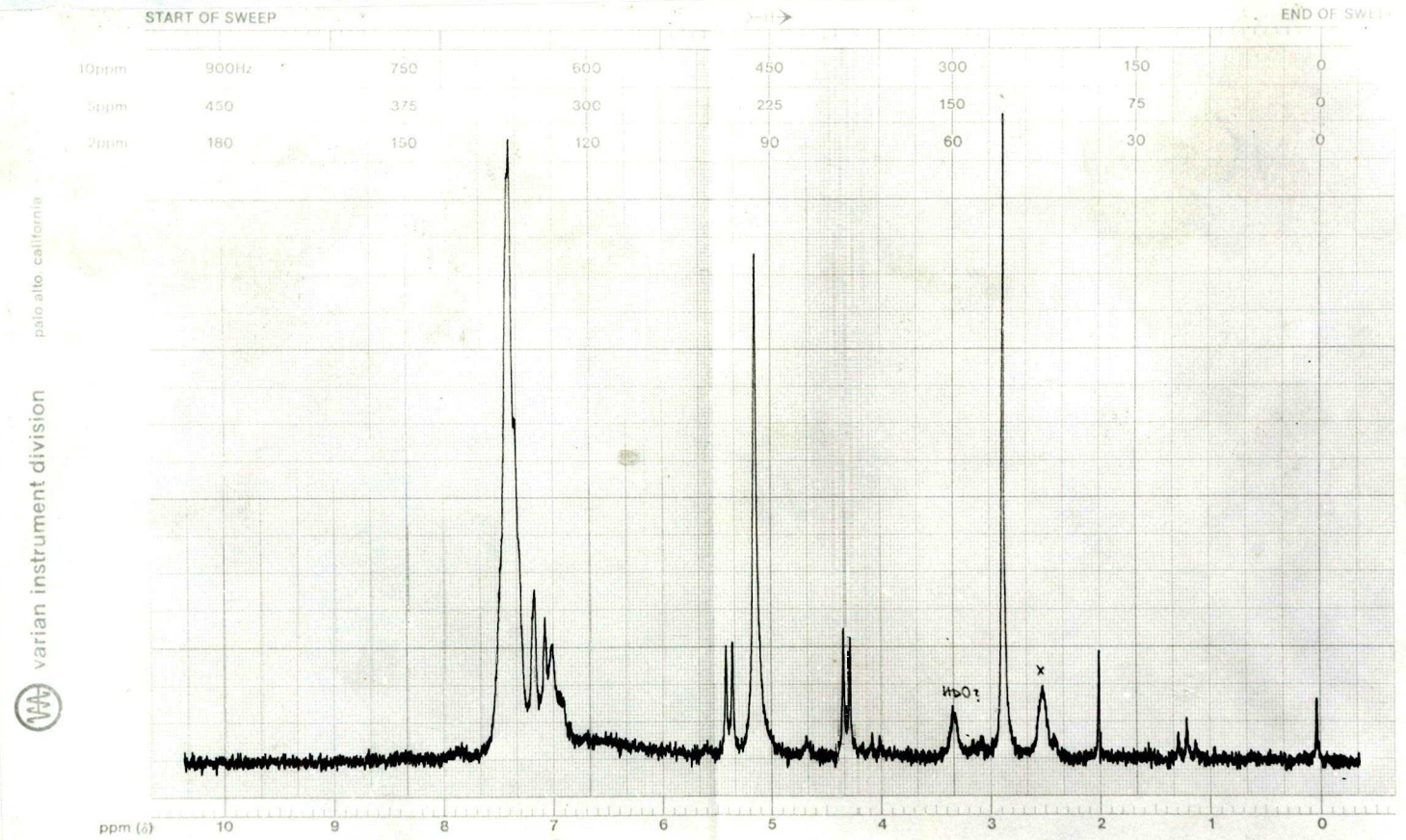
A ^{13}C spektrum értékeléséből három részletet érdemes külön kiemelni. Az első, hogy a 31,7 ppm-nél jelentkező eltolódás egyértelmüen N-metil származékra utalt, ugyanis az O-metil csoport jele 51,0 ppm-nél jelentkezett volna. Másodszor, 172,2 ppm-nél a szabad sav karbonil-szén eltolódására jellemző jelet kaptunk. Harmadik tényezőként oxazolidin-gyürübe zárt karbonil-csoportnak megfelelő eltolódást találtunk. Ezek alapján bizonyitottnak tekintettük termékünk szerkezetét /18. ábra/.

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.

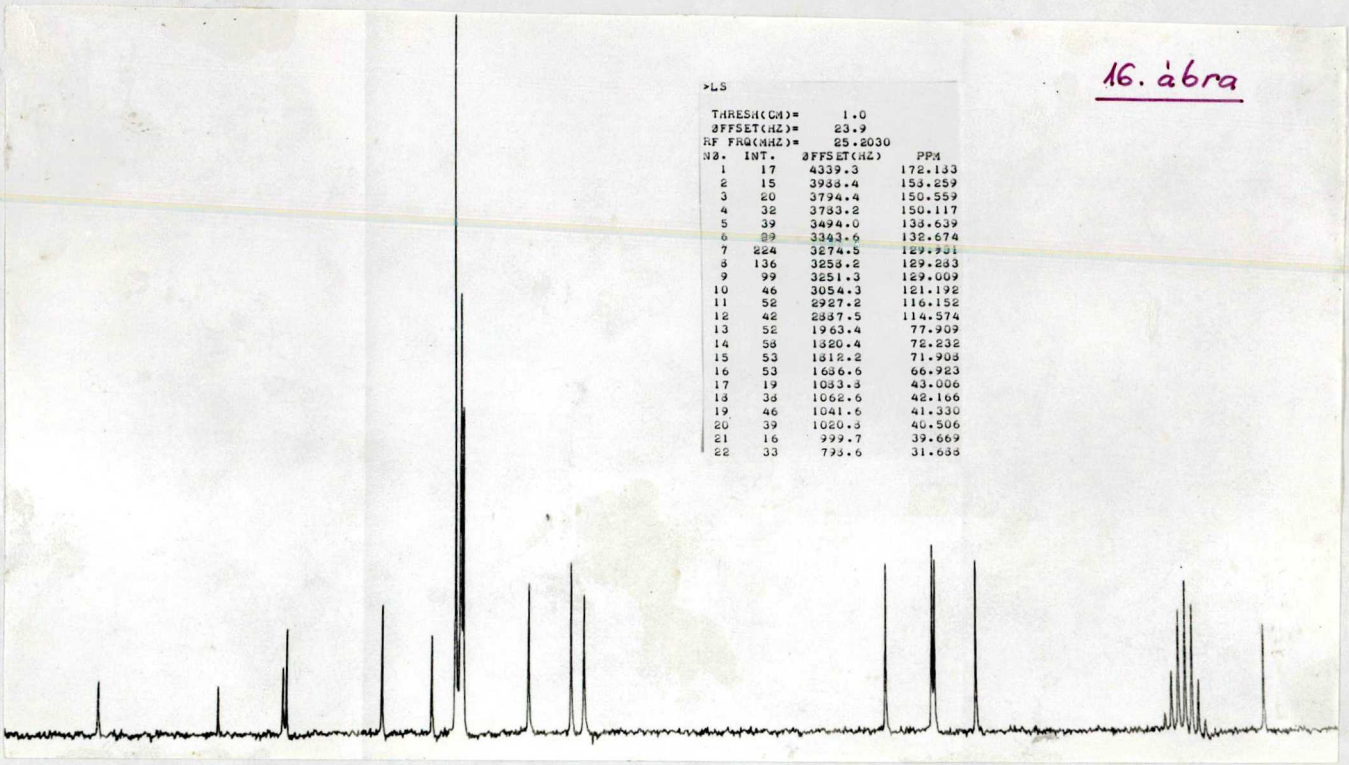
14. ábra

START OF SWEEP
END OF SWEEP
varian instrument division
EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER
ppm (δ)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
LOCK POS
LOCK POWER
DECOUPLE POS
DECOUPLING POWER
SPECTRUM AMPL.
FILTER
RF POWER
SWEEP TIME
SWEEP WIDTH
END OF SWEEP
NUCLEUS
ZERO REF.
SAMPLE TEMP.
SAMPLE:
SOLVENT:
OPERATOR
DATE
SPECTRUM NO.

15.2692


START OF SWEEP
END OF SWEEP
10ppm 900Hz 750 600 450 300 150 0
5ppm 450 375 300 225 150 75 0
2ppm 180 150 120 90 60 30 0
H2O?
x
ppm (δ) 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
varian instrument division palo alto california
EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER
LOCK POS. ppm
LOCK POWER mG
DECOUPLE POS. ppm
DECOUPLING POWER mG
SPECTRUM AMPL. 5 x 10²
FILTER .05 sec
RF POWER .1 mG
SWEEP TIME 10 min
SWEEP WIDTH 10 ppm
END OF SWEEP 0 ppm
NUCLEUS ¹H
ZERO REF. TSS
SAMPLE TEMP. room °C
SAMPLE: B.-3. N-(H₂)
SOLVENT DMSO-d₆
OPERATOR
DATE 20. feb. 25
SPECTRUM NO.

16. ábra

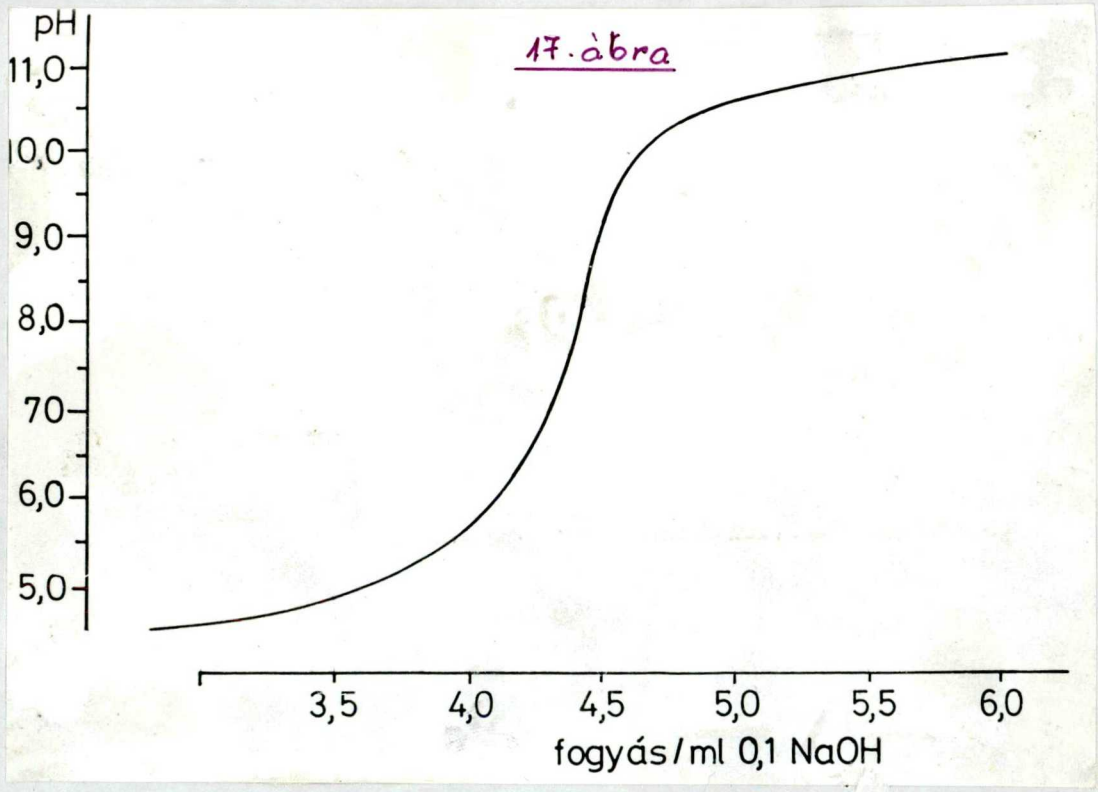


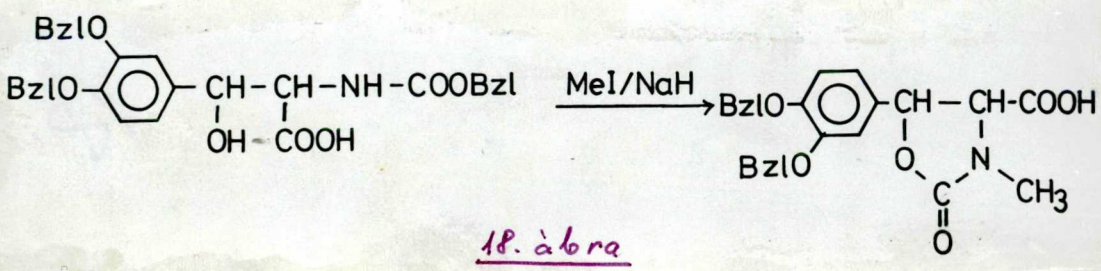
>LS

THRESH(CM)= 1.0
OFFSET(HZ)= 23.9
RF FRQ(MHZ)= 25.2030

NO.	INT.	OFFSET(HZ)	PPM
1	17	4339.3	172.133
2	15	3988.4	158.259
3	20	3794.4	150.559
4	32	3783.2	150.117
5	39	3494.0	138.639
6	89	3343.6	132.674
7	224	3274.5	129.931
8	136	3258.2	129.283
9	99	3251.3	129.009
10	46	3054.3	121.192
11	52	2927.2	116.152
12	42	2887.5	114.574
13	52	1963.4	77.909
14	58	1820.4	72.232
15	53	1812.2	71.908
16	53	1686.6	66.923
17	19	1083.3	43.006
18	38	1062.6	42.166
19	46	1041.6	41.330
20	39	1020.3	40.506
21	16	999.7	39.669
22	33	798.6	31.686

17. ábra





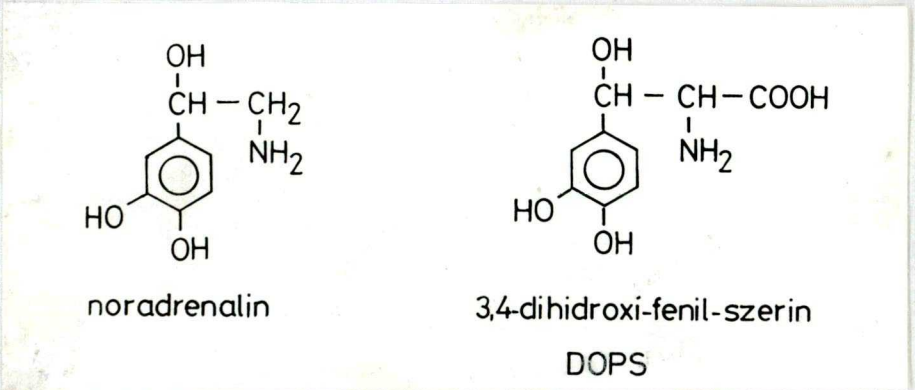
18. ábra

Érdekesnek tartottuk az eritro-módosulattal is elvégezni későbbiekben majd ezt a reakciót, mert a két eredménysor alapján várhatóan a reakció finomabb, részletesebb mechanizmusára tudunk következtetni.

Az irodalomból ismert, hogy a benziloxi-karbonil-csoport nukleofil reagensekkel támadható, miközzen karbamid, ill. hidantoin származékok képződnek.

Véleményünk szerint a szokatlan gyürüzárásnak kedvez a szabad alkoholos hidroxilcsoport jelenléte, valamint a feszülésmentes ötös gyürü kialakulási lehetősége.

2./ <u>Noradrenalin:</u> Kisérletünk célja ezuttal a noradrenalin karboxilált származékának, a 3,4-dihidroxi-fenil-szerinnek /DOPS/, ill. védett származékának az előállitása volt./1

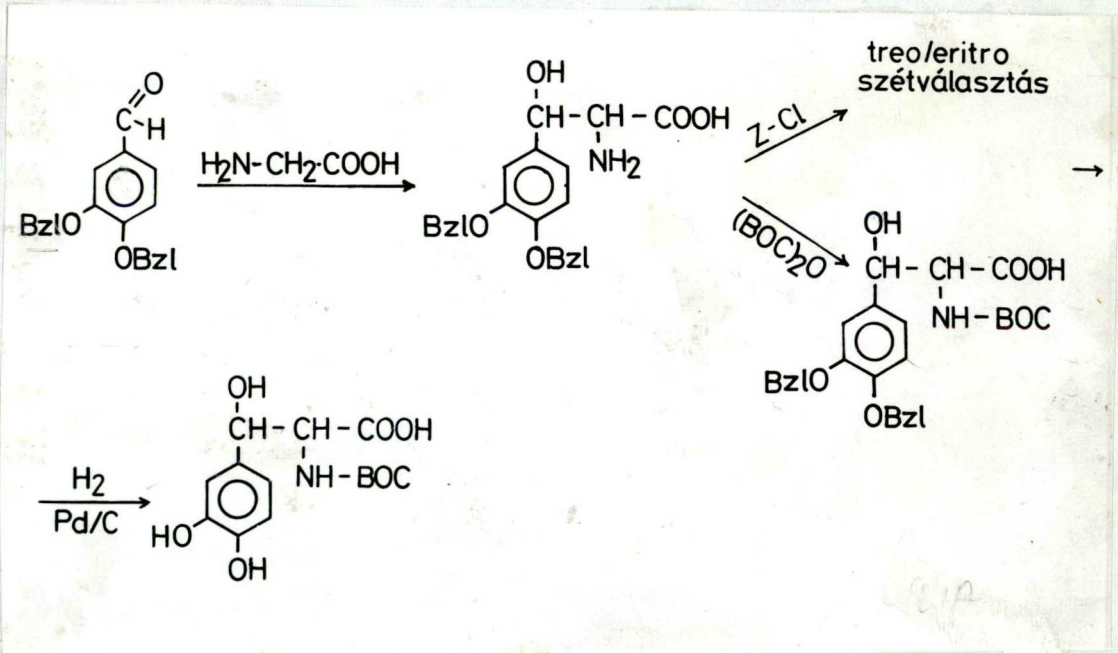


<u>19. ábra</u>

Ezuttal is számolnunk kellett oxigén- és fényérzékenységgel. Ezenkivül azonban ujabb lényeges probléma is adódott - csak néhány mg kiindulási anyag állt rendelkezésünkre és ennek következményeként a védett származék tisztitását nem sikerült megoldanunk. Ezért elhatároztuk, hogy a DOPS-t ill. annak védett származékát totál-szintézissel állitjuk elő.

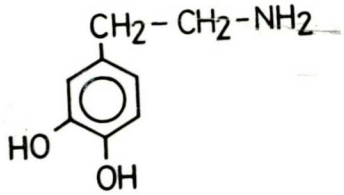
A DOPS-t Rosemund már 50 éve előállitotta. Kedvező feltételek melletti szintézisét Erlenmeyer valósitotta meg benzil-védőcsoportok alkalmazásával. A szintézisek során kapott termékek pontos sztereoviszonyait pedig Hegedüs tisztázta 1975-ben /64/.

Hegedüs és munkatársainak módszerét követtük, akik dibenziloxi-benzaldehidet reagáltattak vizes-etanolos közegben glicinnel /59/. Az irodalmi adatokkal egyezően a DOPS treo-eritro módosulatának 3:1 arányu keverékét kaptuk. A treo-eritro módosulatokat a Z-védett származékok DCHA-sóinak frakcionált kristályositásával választottuk szét. Igy jó kitermeléssel, megfelelő tisztaságu DL-treo-módosulatot tudtunk izolálni, amit a későbbi szintézisekhez használtunk fel. A BOC-védőcsoportot BOC_2O segitségével vittük fel a molekula szabad NH_2 csoportjára. Katalitikus hidrogénezéssel /Pd/C/ távolitottuk el a benzilcsoportokat és igy jó termeléssel kapcsolásra alkalmas tiszta terméket kaptunk. Anyagunk DCHA-só formájában hosszu ideig bomlás nélkül tárolható.

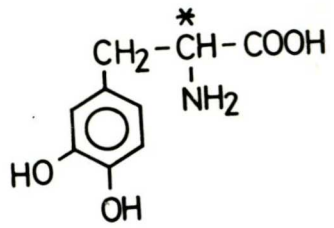


20. ábra

3./ Dopamin: Dopamin helyett karboxilált származékát, a dihidroxi-fenil-alanint /DOPA/ kívántuk hordozófehérjéhez kapcsolni.



dopamin

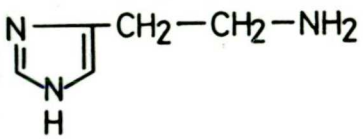


3,4-dihidroxi-fenil-alanin
(DOPA)

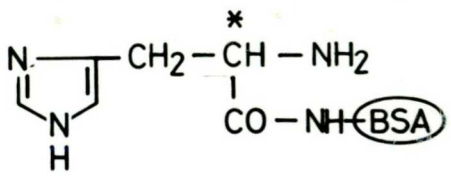
21. ábra

A DOPA is igen érzékeny oxidációra, hőre és fényre. Ezért a BOC-védőcsoport felvitelét a gyorsabb reakciót biztosító BOC_2O-tal, nitrogén atmoszférában, fénytől védve végeztük. Nyers termékünket DCHA-sóján keresztül tisztitottuk. Az irodalomban csak BOC-N_3-mal végzett védés leirásával találkoztunk /65/. Ez a megoldás a szerzők szerint is csak rossz hatásfokkal jellemezhető. Mi ezzel szemben - BOC_2O-tal - 80 %-os termelést értünk el, ami igen jónak mondható.
A D-izomerrel való szintéziseket az L-DOPA-val szemben potenciálisan fellépő keresztreakció elkerülése indokolta.

4./ Hisztamin: Az előzőekben követett elv szerint, ezuttal is a karboxilált származék antigénjét kívántuk képezni, vagyis hisztamin helyett a hisztidint választottuk kiindulási anyagunknak.



hisztamin



His-BSA
(hisztamin-antigén)

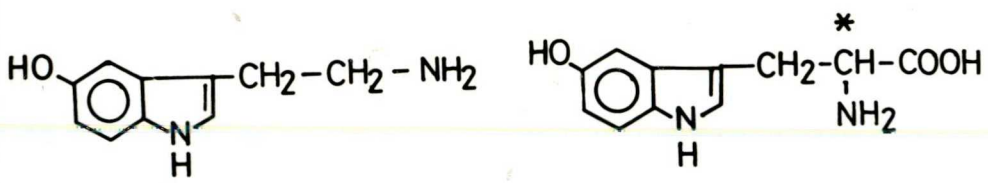
22. ábra

A hisztidin oxidációra kevésbé érzékeny, mint a katekolaminok, de reakcióiban általában számos melléktermék keletkezésével kell számolni. Erre a kedvezőtlen körülményre antigénszintéziskor is számithattunk. Kapcsoláshoz a reakciókörülményektől függően nemcsak az α-helyzetü aminocsoport védésére volt szükség, hanem - mivel nem lehetett számitáson kivül hagyni az imidazolgyürün keresztül létrejövő kapcsolódást sem - szükségessé vált az N^{α}-N^{im}-BOC-védett származék előállitása is. A BOC_2-His-OH szintézise korántsem egyszerü feladat. Az N^{im}-BOC-csoport savra és lugra egyaránt érzékeny, könnyen lehasad már a BOC-csoport bevitele közben. Ezért általában csak rossz termeléssel sikerült a BOC_2His-OH-t előállitani.

Attól függően, hogy N^{α}-BOC-His-OH-t, vagy BOC_2-His-OH-t kivántunk előállitani - alkalmasan kellett megválasztani a pH-t és a védőcsoport felvitelére használt BOC-származék mennyiségét. Az N^{α}-védett származék előállitásához BOC-azidot használtunk kétszeres feleslegben és a pH-t állandóan 10-es értéken tartottuk. A BOC_2-származék készitéséhez BOC_2O-t használtunk 4-szeres feleslegben és a reakcióelegy pH-ját ezuttal 7,5-8,0 közötti értéken kellett tartanunk azért, hogy az imidazolgyürün levő védőcsoport le ne szakadjon.

Fenti müveleteket L- és D-módosulattal egyaránt elvégeztük. A D-izomerrel végrehajtott antigénszintézist pedig ezuttal is az elvileg lehetséges keresztreakció kiküszöbölése indokolta.

5./ <u>Szerotonin:</u> A már ismertetett elv alkalmazásával - a szerotonin karboxilált származékának, az 5-OH-triptofánnak képeztük az antigénjét.



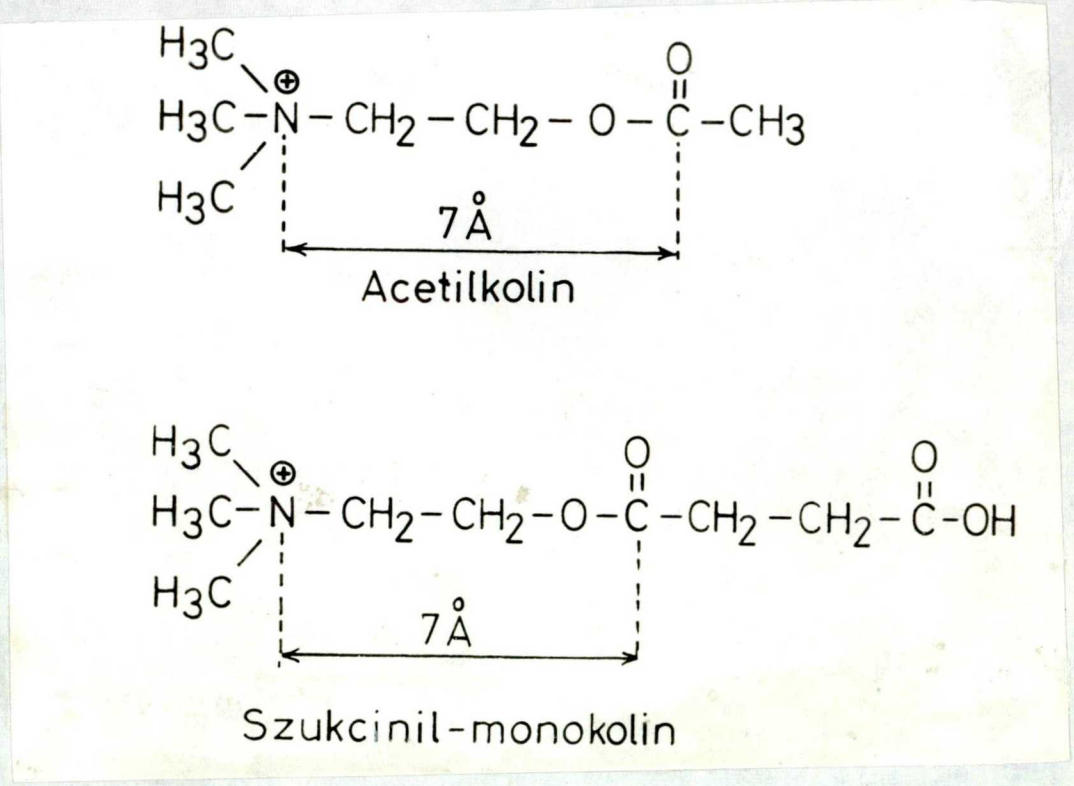
5-OH-triptamin
(Szerotonin)

5-OH-triptofán

23. ábra

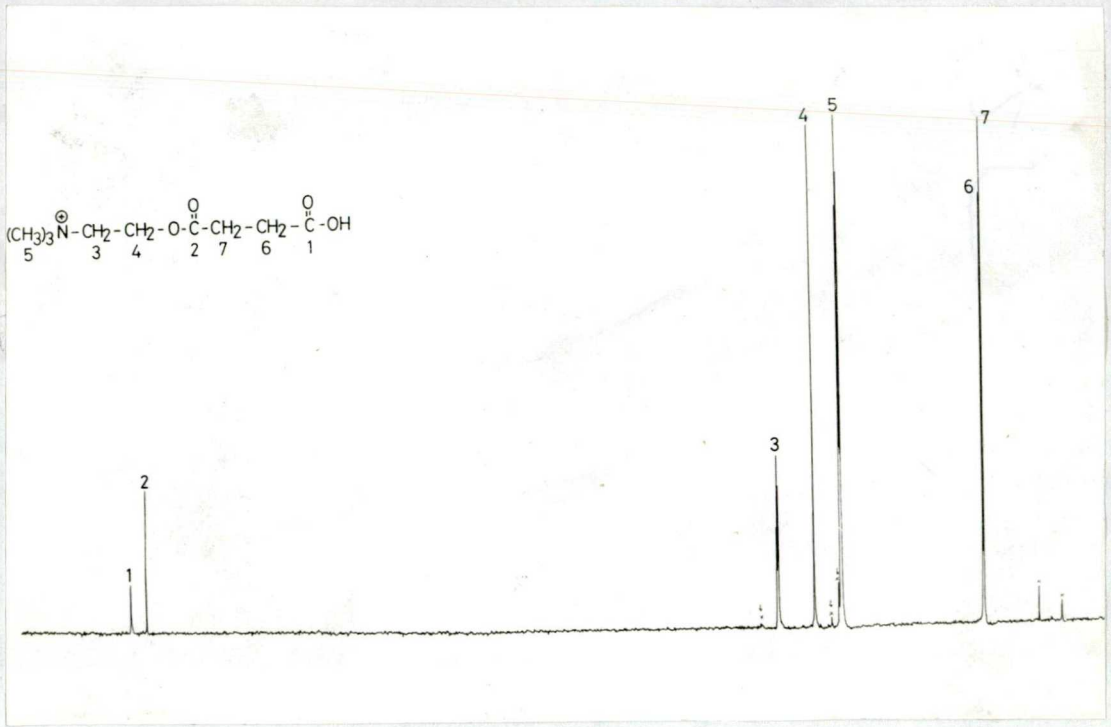
Az 5-OH-Trp aminocsoportját BOC-csoporttal védeni kellett . Mivel kiindulási anyagunk hő-, fény- és oxigénérzékeny, ezért a gyorsabb védést biztositó BOC_2O-ot használtunk a védőcsoport felviteléhez. Még igy is jelentős elszineződés kisérte a reakciót. A BOC-DL-5-OH-Trp-OH-n kivül előállitottuk a D-izomerek BOC-védett származékait is. Bár ezek szilárdak voltak, mégis célszerünek találtuk DCHA-sójuk képzését és azok átkristályositásával tisztitottuk termékeinket. A DCHA-sók felszabaditását csak közvetlenül a hordozó fehérjéhez való kapcsolás előtt hajtottuk végre.

6./ Acetilkolin: Az acetilkolin helyett a szukcinil-monokolin /SMC/ antigénjének előállitását tartottuk célszerübbnek. Elképzelésünket az motiválta, hogy ez a megoldás az antigenitás javitását szolgáló két tényező egyidejü megvalósitását is jelentette. Az acetilkolin és a szukcinil-monokolin szembetünő szerkezeti hasonlósága mellett egyuttal éppen a szerkezeti eltérések valószinüsitettek a jobb immunogenitással jellemezhető antigén keletkezését. Mivel a szukcinil-monokolin hosszabb láncu molekula, mint az acetilkolin, igyaz ismert elv szerint jobban kiemelkedik a hordozó felületéről és ezáltal jobban "felismerhető" lesz. A szabad karboxil-csoport pedig alkalmasabbá teszi a hordozóhoz való kapcsolásra. "Funkciós csoportjai" intaktak, amelyek az antigén-antitest illeszkedés szempontjából lényegesek.



24. ábra

Az SMC előállitására a kolint borostyánkősavanhidriddel észteresitettük, piridin-DMF megfelelő arányu elegyében, forralás közben. A tisztitott termék szerkezetét ^{13}C NMR spektroszkópia segitségével igazoltuk.



25. ábra

A spektrum alapján a következő értékelést olvashattuk le:

1.	176,9	ppm		-COOH
2.	174,2	"		$-CH_2OCO-$
3.	65,0	"	/t/	$-N/+/CH_2-$
4.	58,9	"		$-CH_2OCO-$
5.	54,3	"	/t/	$/CH_3/N/+/-$
6.	29,3	"		$-CH_2COOH$
7.	29,1	"		$-OC.OCH_2-$

A 3. és 5. jelek triplettre hasadnak fel a $^{13}C-^{14}N$ csatolás miatt: $J = 3,5 - 3,7$ Hz.

A 6. és 7. jelek ilyen sorrendben történő asszignálása a monometil-szukcinát spektruma analógiájára /Sadtler Standard Carbon - 13 NMR Spectra, No. 3513 C/ történt, csakugy, mint a karbonil-szenek jelei.

A csillaggal megjelölt apró jelek valószinüleg szabad kolintól származnak.

A felvétel D_2O-ban készült, a vonatkoztatási vegyület TPS.

A készülék VARIAN XL-100-12 tipusu volt.

Másik elképzelésünk szerint kedvező eredményt vártunk a Muk-β-Ala-kolin, ill. antigénjének előállitásától /26. ábra/. Azért választottuk kiindulási vegyületnek a Muk-kolint, mert a mukonsav /butadién-dikarbonsav/ két szénatommal hosszabb, mint a borostyánkősav, s egyuttal két kettős kötése miatt merev is. Ezek a szerkezeti tényezők a már ismert elvek miatt kedvezőbb antigenitás elérését segitik elő. A kolint mukonsavval közvetlenül csak rossz kitermeléssel lehet észteresiteni, s a keletkező kevés termék még bomlékony is és a melléktermékek közül csak nehezen izolálható. Ezzel szemben, ha előbb β-Ala-nal észteresitjük, akkor a β-Ala NH_2-csoportjához a mukonsav már lényegesen könnyebben kapcsolható.

A β-Ala-kolin előállitásához első kisérleteink során előbb Z-β-Ala-kloridot akartunk előállitani, de várakozásunkkal ellentétben ez a megoldás nem vált be, mert a tionilkloridos savklorid képzéskor a Z-védőcsoport lehasadt. Ilyen előzmények után a Z-β-Ala-Cl-t rendkivül nehezen és csak rossz termeléssel lehetett izolálni. Ezért Z-védőcsoport helyett az utóbbi időben elterjedten alkalmazott fluorenil-metiloxikarbonil /FMOC/-védőcsoport alkalmazása mellett döntöttünk. E védőcsoport használata kedvezőnek bizonyult, igazolta várakozásunkat. Jó kitermelés mellett könnyen megvalósitható izolálást és védőcsoport eltávolitást is lehetővé tett.

Ftalil-védőcsoport alkalmazása is felmerült, de mi a FMOC könnyebb eltávolitási lehetőségei miatt ez utóbbi mellett döntöttünk.

Ezek után a FMOC-β-Ala-Cl-dal végeztük a kolin észteresitését DMF-ben. Az észteresitést azért nem lehetett szokásos módon - lugos közegben végezni, mert a védőcsoport lugos közegben könnyen lehasad. Az igy előállitott FMOC-β-Ala-kolin fehér, nagyon higroszkópos, kristályos anyag, ezért közelebbi jellemzésre nem adott lehetőséget.

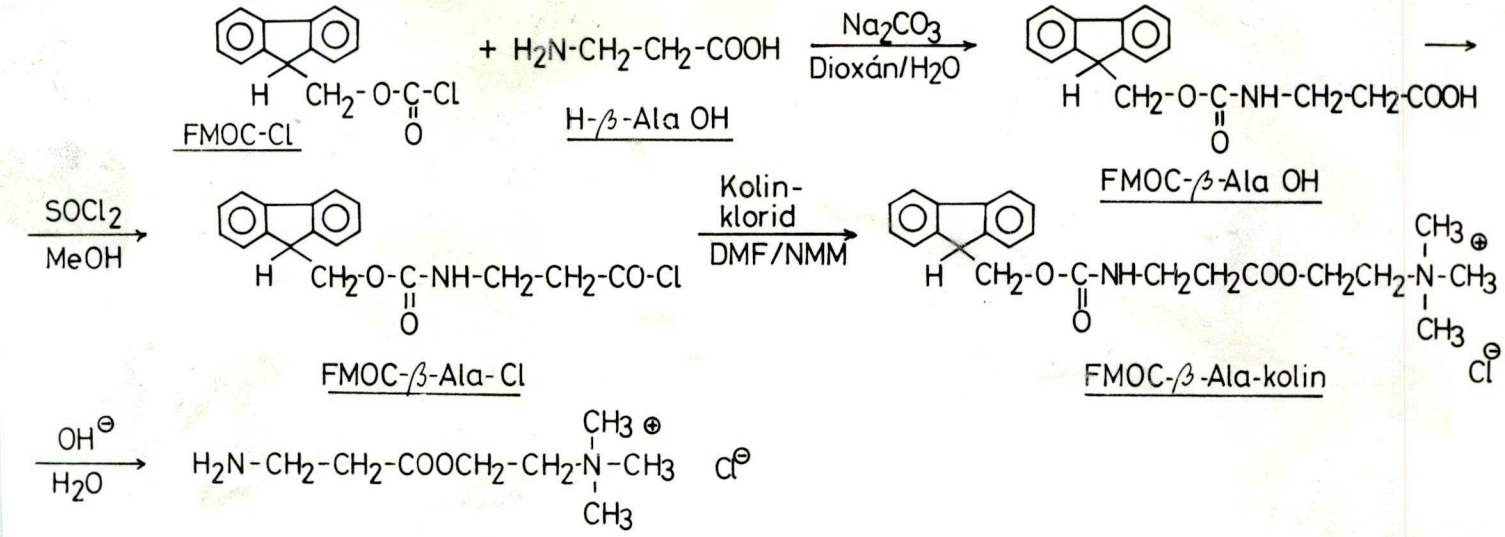
A FMOC-védőcsoportot lugos közegben távolitottuk el, s ezt követően a β-Ala-kolint preparativ vékonyrétegen tisztitottuk.

26/a. ábra

ACETILKOLIN ANTIGÉN SZINTÉZISE

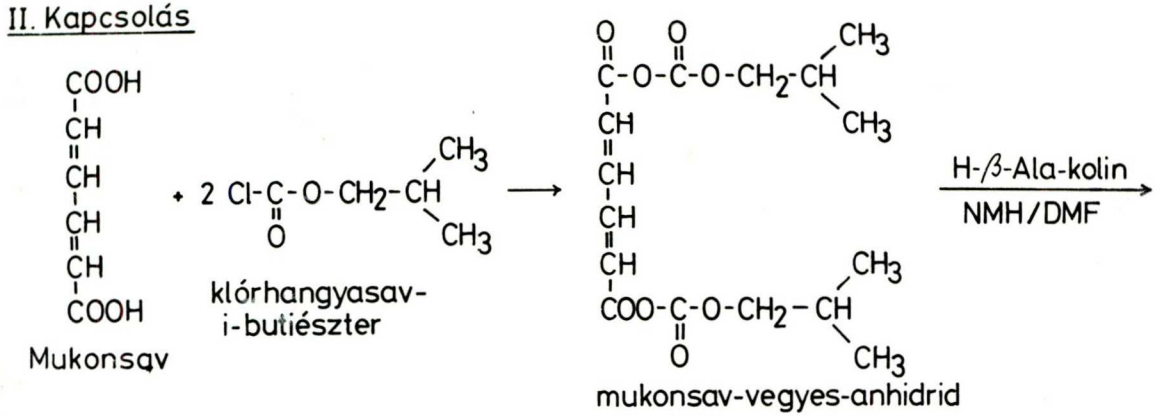
(Mukonil-β-Ala-kolin-BSA-konjugátum)

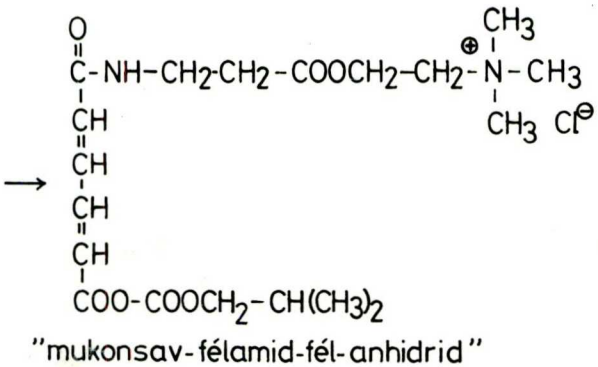
I. Haptén előállítása

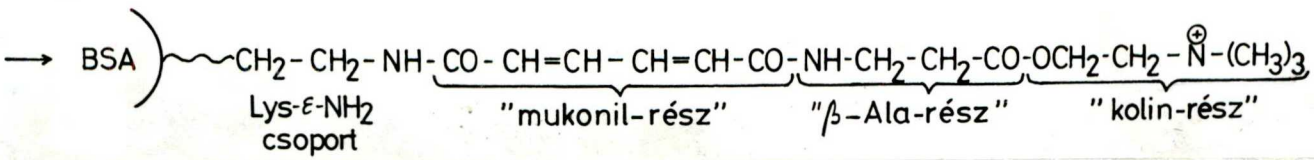


26/b. ábra

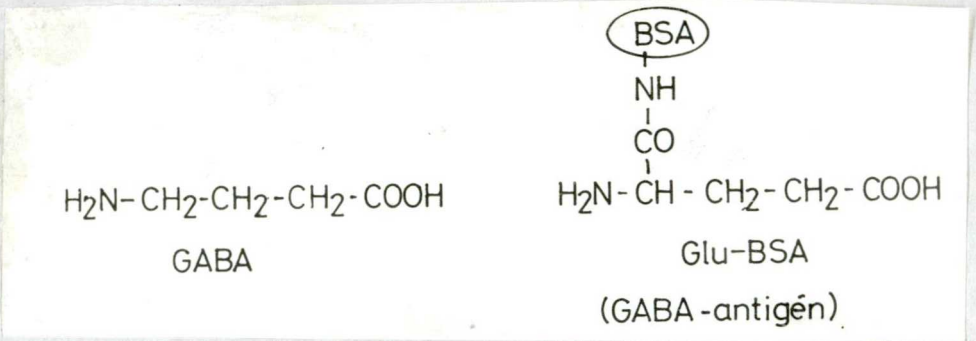
II. Kapcsolás





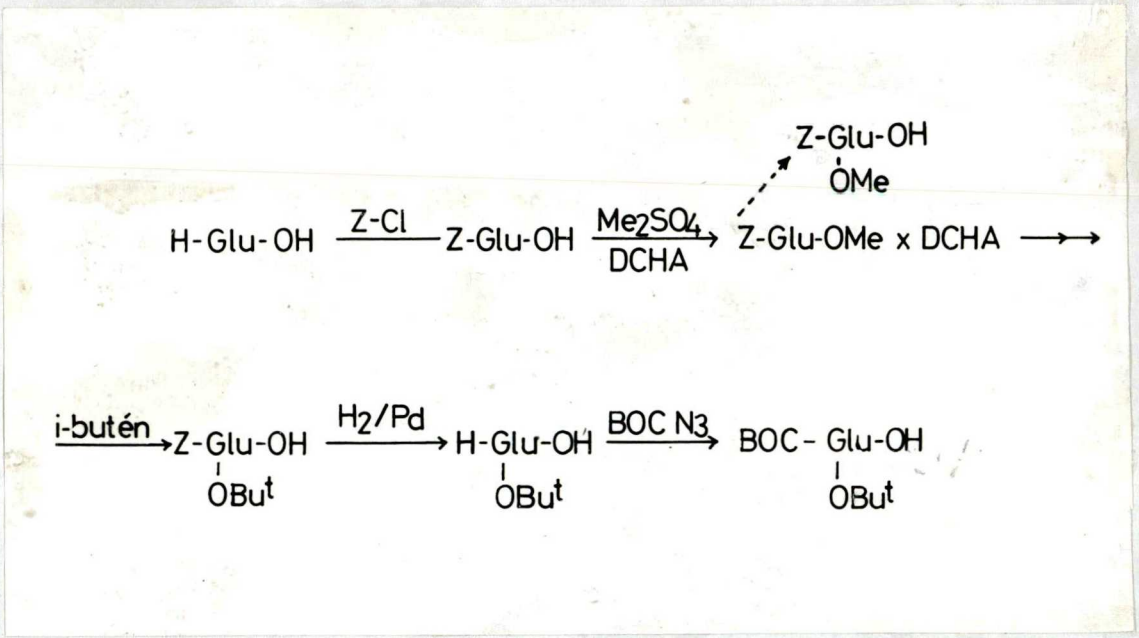


7./ γ-amino-vajsav /GABA/: A GABA-antigén előállításának nincsenek irodalmi előzményei. A GABA végeredményben dekarboxilezett glutaminsav, ezért a GABA kapcsolását BOC-L-Glu/OBu^t/-OH és BOC-D-Glu/OBu^t/-OH alakjában végeztük el.



27. ábra

A védett haptént glutaminsavból kiindulva állitottuk elő. Először vizes közegben a Glu aminocsoportját Z-Cl-dal acileztük. Ezután a Z-védett glutaminsav mono-metilészterét képeztük. Egyidejüleg kb. 60 %α- ill. 40 %γ-metilészter keletkezett, amelyeket DCHA-sóiknak frakcionált kristályositásával választottunk el. Igy csak kb. 5 %-os γ-metilészter szennyezte az anyagot, amitől vizes átkristályositással szabadultunk meg. Ezek után a γ-karboxilcsoportot szelektiven izo-buténnel reagáltatva terc-butilészterré alakitottuk. Következő reakciólépés az α-metilészter hidrolizissel való eltávolitása volt, majd ezt követően az amino-csoport Z-védőcsoportját BOC-ra kellett cserélni. Erre azért volt szükség, mert a BOC védőcsoport a hordozófehérjére kapcsolást követően az antigén károsodása nélkül távolitható el. A védőcsoport cseréjéhez először Pd/C katalizátor jelenlétében hidrálással távolitottuk el a Z-védőcsoportot, majd a szabaddá vált amino-csoportot BOC-N_3-dal acileztük.

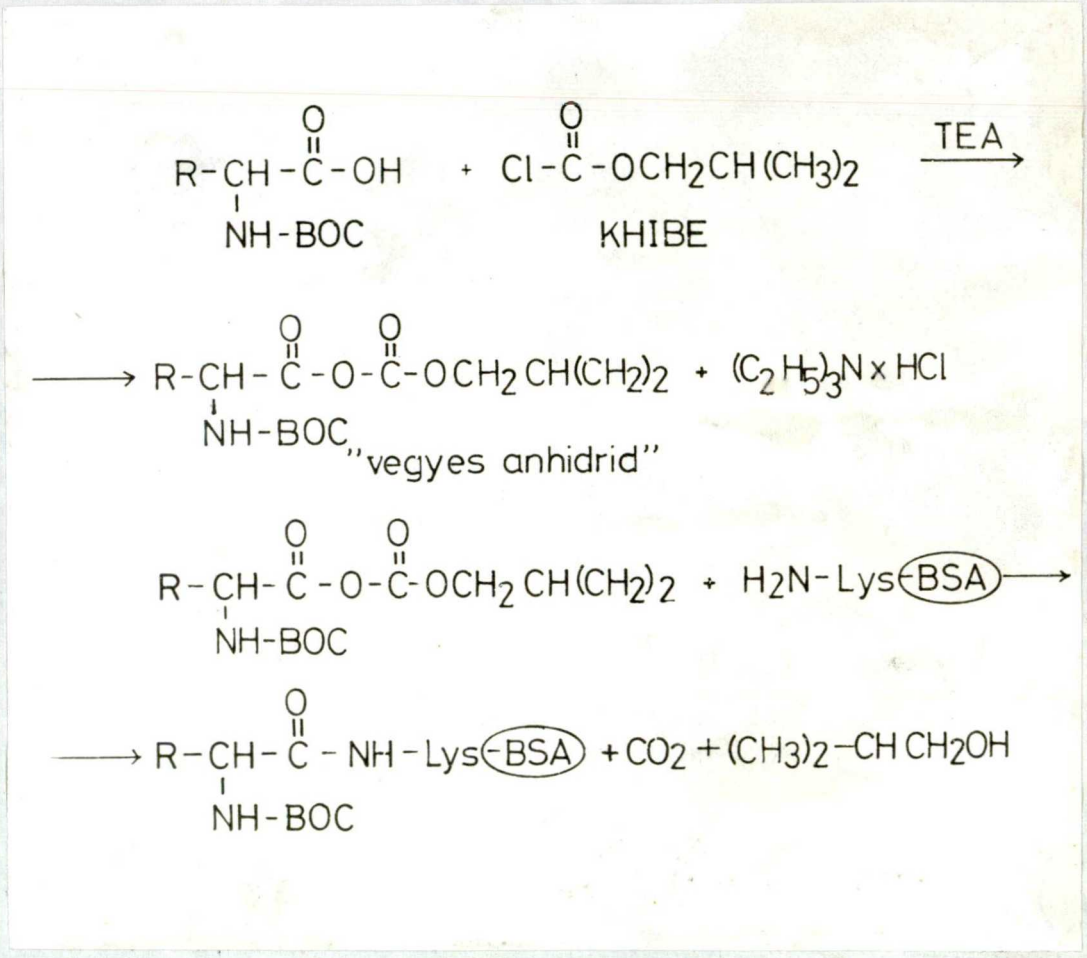


28. ábra

Az igy előállitott BOC-Glu/OBu^t/-OH hordozóra való kapcsolásra közvetlenül alkalmas volt. Ezt a kisérletsort L- és D-glutaminsavval egyaránt elvégeztük. A D-glutaminsavval végzett munkát az indokolja, hogy a glutaminsav-antigén feltehetően elsősorban GABA-ellenes antitestek termelését indukálja, de keresztreakció is felléphet, s az antiszérum a szintén neurotranszmitter glutaminsavat is megköti. Ez nagyon zavaró lenne, ezért kapcsoltunk D-glutaminsavat is BSA-hoz, hogy a képződő antitest ne ismerje fel az L-glutaminsavat, csak a GABA-t.

b./ Karboxilált neurotranszmitterek kapcsolása fehérje-hordozóhoz:

Miután a védett mediátor származékokat - az adrenalin kivételével - sikerült előállitanunk, következő lépésben fehérjéhez kapcsoltuk őket. Általában vegyes-anhidrides kapcsolást alkalmaztunk.



29. ábra

Hordozó fehérjének legtöbb esetben BSA-t használtunk, mert lizinben relative gazdag. A kapcsolás eredményességét jelző haptén/BSA hányadost többnyire UV-spektroszkópiával határoztuk meg. Amikor ez nem volt lehetséges, akkor aminosav analizissel. Ebben az esetben viszont a DOPA és a DOPS bomlékonysága hidrolizis alatt nagyfoku problémát okozott. A visszanyerés mértékét külön kisérletekben határoztuk meg. Haptén/BSA hányadosnak többnyire 10-20 közötti értékeket kaptunk. Kedvezőbb, nagyobb értékek elérése céljából a

fehérjelánc lizinkomponenseit igyekeztünk a hapténnek számára hozzáférhetőbbé tenni. Ez a megoldás azáltal teremt kedvezőbb feltételeket a kapcsolásra, hogy a fehérjemolekula összes lizin komponensét a molekula felszínére "irányitja". Ennek elérése céljából denaturáló ágensként 8 M -os karbamidot, ill. Na-dodecilszulfátot használtunk.

Ilyen körülmények között a hányadosok 20-40 közötti értékekre emelkedtek. Ez a beavatkozás nem érintette az antigének oldódási viszonyait, azok ugy, mint a közvetlen formaldehides kapcsolással nyert antigének, szintén vizoldhatók maradtak.

A konjugátumokat dializissel tisztitottuk, majd liofilizáltuk. Az analitikai vizsgálatok minden esetben liofilizátumokból történtek.

A neurotranszmitter-funkcióval rendelkező anyagok csoportján belül a katekolaminok nemcsak kémiai szerkezetüket, hanem antigénszintéziseik és azok körülményeit illetően is szembetünő hasonlóságot mutattak. A szerotonin, ill. a hisztamin-bár más-más vegyületcsoportba tartoznak - antigénjeik előállitásához a katekolaminoknál is alkalmazott módszerek és elvek is felhasználhatók voltak. Az azonosságra vonatkozó közös alapot a fehérjéhez való kapcsolásban résztvevő amino-csoportok szolgáltatták, mig az egyedi, speciális problémákat a katekolaminok esetében pl. az oxidálódási hajlam, a szerotonin és a hisztamin esetében pedig elsősorban az indolil-, ill. az imidazol-gyürü sajátságai okozták.

Elméleti és gyakorlati szempontból is fontos megismernünk bármely kapcsolási módszer esetében a ténylegesen létrejövő kapcsolási variánsok lehetőségeit és azokat a körülményeket, amelyeknek optimális megválasztásával biztosithatjuk, hogy a molekula kivánt csoportja lépjen a kapcsolási reakcióba.

Konkrét példaként említhetjük meg ezzel kapcsolatban a hisztamin antigén szintézisét. A hisztamin antigén előállításánál a hisztidin mindkét védett származékát - N^{α}-, ill. N^{α}, N^{im}-BOC-védett His-t - vegyes-anhidrides módszerrel kapcsoltuk BSA-hoz. A kapcsolást mindkét származékkal azonos módon, a szokásos kisérleti körülmények között végeztük el. Az antigének haptén/BSA aránya azonban jelentős eltérést mutatott. Aminosav analizis alapján az N^{α}, N^{im}-BOC-védett hisztamin antigén haptén/BSA értéke 10 volt és karbamid jelenlétében is közel azonos arányt tudtunk elérni. Az N^{α}-védett származékból nyert antigénre azonban már 40-es értéket kaptunk.

Az immunhisztokémiai kimutatási igények mellett, már korábban a RIA mérési technika is igényelt jó minőségü antigéneket, ill. antiszérumokat. Érdekes megemliteni, hogy - az irodalmi adatok alapján - kezdetben ugy tünt; a formaldehides kapcsolási technika pl. szerotonin esetében nem szolgáltat RIA céljára megfelelő minőségü antigéneket. A sok próbálkozásból végül kitünt, hogy gyakran nem okvetlenül az antigénszintézisben kell keresni a megoldáshoz vezető utat, hanem nagyon sokszor az immunizálási technika alkalmas megválasztására van szükség. Számos olyan kisérlet tapasztalatainak összegzéséből adódott ez a felismerés, amelyek során az előállitott antigénekkel megváltoztatott immunizálási körülmények között mégis sikerült RIA módszer kidolgozására alkalmas antiszérumot, ill. antitesteket nyerni.

Eddigiek alapján is megállapithatjuk, hogy antigének, antiszérumok, ill. antitestek előállitására általános érvényü szabályokat nem lehet felállitani. Nehéz állást foglalni, hogy melyik antigénszintézis, ill. immunizálási megoldás hoz végülis jó eredményt. Egy antigént akkor tudunk igazán eredményesen használni, ha megtaláljuk hozzá a legideálisabb immunizálási körülményeket. Mindezek azzal magyarázhatók, hogy az antigének kémiai szempontból heterogén

anyagok, másrészt pedig az immunizálásra használt kisérleti állatok sem tekinthetők immunizálási szempontból egyforma egyedeknek. Ezért, teljesen egyező antigénbeviteli körülmények ellenére az antiszérum, ill. antitest termelésben jelentős eltérések mutatkozhatnak.

4./ Neurotranszmitter antiszérumok és affinitás kromatográfiás tisztitására alkalmas Sepharose-származékok szintézise

Az immunizálás során nyert antiszérumok jellemzése, immunhisztológiai alkalmasságának bizonyitása hosszu és bonyolult kisérleti munkát igényel. Az antiszérumok ellenőrzése azt mutatta, hogy a radioaktivan jelzett neurotranszmitterek kötődése immunglobulinokhoz nem bizonyitja az antiszérum immunhisztológiai alkalmazhatóságát. Ez érthető is: a morfológus, aki a neurotranszmitterek szöveti lokalizációját vizsgálja, fixált szövetmetszetekkel dolgozik. Olyan antiszérum felel meg céljainak, amely a szövetben fixált neurotranszmittereket ismeri fel és nem a szabad, változatlan molekulát. A radioaktiv jelzésü neurotranszmitterek kötődése egy antitesthez csak a szabad neurotranszmitter és az immunglobulinok kötődési viszonyairól nyujt információt. Elképzelhető, hogy az immunhisztológus számára éppen az az antitest az érdekes, amely a radioaktiv neurotranszmittert nem, vagy csak igen gyengén köti, viszont nagyfoku specificitást mutat a szövetben fixált, megváltozott szerkezetü neurotranszmitter-molekulákkal szemben. Ezért olyan modellrendszert igyekeztünk találni, amelynek segitségével a szövetben és sejtben mutatott kötődési viszonyok jól tanulmányozhatók. Ilyen modellrendszernek gondoltuk a Sepharose-on megkötött neurotranszmittereket. /A Sepharose a Pharmacia által forgalmazott agaróz-gél, nagy pórusmérete miatt kiváló kromatográfiás tulajdonságu,

különösen nagy molekulatömegü fehérjék tisztitására alkalmas. A Sepharose 4B kb. 4 millió daltonig alkalmazható, ennek keresztkötésekkel stabilizált változata a Sepharose-Cl /cross linked/.

Ha a neurotranszmittert változatlan, sértetlen szerkezettel kötjük a Sepharose-gyöngyökhöz, segitségükkel a neurotranszmitterek receptorai tanulmányozhatók, ill. antiszérumokból elkülönithetők a neurotranszmittereket "felismerő" immunglobulinok. Ha a fixálás közben megváltozott szerkezetü neurotranszmittereket immobilizáljuk Sepharoseon, a kapott adszorbensek segitségével affinitás kromatográfiával izolálhatók az immunhisztológia céljára alkalmas antitestek. Ugyanezek az affinitás adszorbensek használhatók fel, mint modellrendszerek az antiszérumok immunhisztológiai alkalmasságának ellenőrzésére is. /Az affinitás kromatográfia biospecifikus adszopción alapuló elválasztástechnikai módszer, amelyet elsősorban biológiailag aktiv fehérjék tisztitására alkalmaznak. Az immobilizált antigének /affinitás adszorbens/ a specifikus adszorpció alapján antitestek tisztitására alkalmasak/.

Neurotranszmitterek immobilizálása Sepharose-on tehát több szempontból is érdekes, a tudományos kutatásban sokoldalúan felhasználható adszorbenseket eredményez:

1./ Az adszorbensek felhasználhatók affinitás kromatográfia céljára - részben a neurotranszmitterek szolubilizált receptorainak tisztitására, részben e neurotranszmitterekkel szemben nyert antiszérumok tisztitására, antitestek izolálására /66-69/.

2./ Megfelelő affinitás adszorbensek segitségével az immobilizált neurotranszmitter és receptora közötti kölcsönhatás alapján izolált élő sejtek is tisztithatók. Ha az adszorbenseket mikroszkóp tárgylemezén élő sejtek szuszpenziójával inkubálják, majd mikroszkóppal vizsgálják a sejtek kötődését az affinitás

adszorbensen, megállapitható, hogy az adott sejttipus tartalmaz-e az adott neurotranszmittert kötő receptorokat a sejtmembránon /affinitás mikroszkópia/.

3./ Adott neurotranszmitterrel szemben termelt antiszérum fajlagosságának ellenőrzésére is alkalmasak az emlitett affinitás adszorbensek. A fluoreszcencia mikroszkópiás módszer az antitest specificitásának kvalitativ és kvantitativ kiértékelését is lehetővé teszi.

A felsoroltakon kivül számos más, kisebb jelentőségü felhasználási területe is lehet a neurotranszmitterek Sepharose-gyöngyhöz kötött származékainak. Az affinitás adszorbensek gyógyászati felhasználása /autoimmun-betegségek, stb./ sem kizárt, ezek a kutatások még kezdeti stádiumban vannak.

A felsorolt módszerek csak akkor alkalmazhatók, ha a Sepharose-hoz kötött neurotranszmitter megőrzi biológiai hatását és a hatás specificitását. Nagy molekulatömegü polipeptidek, fehérjék esetén ez könnyen elérhető a Sepharose-irodalomból ismert - brómciános aktiválás utáni kapcsolással, ill. AH /amino-hexil/ Sepharose-hoz vizoldható karbodiimiddel történő kapcsolással. Az ismert és feltételezett neurotranszmitterek /acetikolin, adrenalin, noradrenalin, dopamin, szerotonin, hisztamin, γ-amino-vajsav/GABA/, glicin, stb./ esetén az eddigi módszerekkel történő kapcsolás alig ad megfelelő biológiai hatásu anyagot /70/. Ezek a molekulák annyira kicsinyek, hogy bizonyos célokra szinte valamennyi funkciós csoportjuk szükséges a biológiai hatáshoz. Az immunhisztológiában alkalmazható antitestek jellemzésére és tisztitására viszont éppen a fixálás miatt megváltozott szerkezetü neurotranszmittereket kellett Sepharose-hoz kapcsolni. Ezért két sorozat affinitás adszorbenst állitottunk elő:

A./ Változatlan szerkezetü neurotranszmittereket tartalmazó Sepharose-adszorbenseket;

B./ A fixálás miatt megváltozott szerkezetü neurotranszmittereket tartalmazó Sepharose-adszorbenseket.

A./ A neurotranszmitterek Sepharose-on változatlan szerkezettel történő immobilizálását egy uj módszerrel oldottuk meg. A módszer lényege a következő:

1./ Az antigénszintézishez hasonlóan nem magát a neurotranszmittert, hanem ennek karboxilált-származékát kapcsoltuk AH-Sepharose-hoz /noradrenalin esetén pl. dihidroxi-fenil-szerint /DOPS/, szerotonin helyett 5-hidroxi-triptofánt /5-OH-Trp/, dopamin helyett DOPA-t, GABA helyett glutaminsavat, hisztamin helyett hisztidint/. Igy a biológiai hatáshoz szükséges funkciós csoportok szabadon maradnak.

2./ Hogy a biológiai hatáshoz szükséges csoportok ne vegyenek részt a kapcsolási reakcióban, a kapcsolás idejére átmenetileg savval eltávolitható védőcsoportokkal /BOC, terc. butil /Bu^t/ / védtük a molekulát. Csak egyetlen szabad karboxil-csoportja marad a molekulának, ezt aktiválva /vegyes anhidrides, vagy karbodiimid módszerrel/ kapcsoltuk a neurotranszmittert az AH-Sepharose-hoz. Az immobilizálási reakcióban tehát az antigének szintézisénél már alkalmazott, védett, karboxilált neurotranszmittereket használtuk fel:

BOC-dihidroxi-fenil-szerin /BOC-DOPS/
BOC-dihidroxi-fenilalanin /BOC-DOPA/
BOC-5-hidroxi-triptofán /BOC-5-OH-Trp/
BOC-glutaminsav-γ-terc. butilészter /BOC-Glu/OBu^t/OH/
N^{α}, N^{im}- -BOC-hisztidin /BOC_2-His/
szukcinil-kolin

3./ Kapcsolás után a gyöngyöket dehidratáltuk /aceton/, majd a védőcsoportokat vizmentes közegben trifluor-ecetsavas acidolizissel távolitottuk el. /A poliszacharid ilyen körülmények között nem bomlik el, a gyöngyök változatlanok maradnak./ A reagens kimosása után a gyöngyöket ujra hidratáljuk, de elvileg szárazon is tárolhatók. Az trifluor-ecetsavas acidolizist mi alkalmaztuk először az irodalomban dehidratált Sepharose-oknál védőcsoport eltávolitásra.

A következő uj, az irodalomban le nem irt immobilizált neurotranszmitter-származékokat állitottuk elő:

1./ Noradrenalin-AH-Sepharose /= DOPS-AH-Sepharose/
2./ Dopamin-AH-Sepharose /= DOPA-AH-Sepharose/
3./ Szerotonin-AH-Sepharose /= 5-OH-Trp-AH-Sepharose/
4./ Acetilkolin-AH-Sepharose /= Szukcinilkolin-AH-Sepharose/
5./ GABA-AH-Sepharose /= α-Glutamil-AH-Sepharose/
6./ Hisztamin-AH-Sepharose /= Hisztidil-AH-Sepharose/

Az immobilizált neurotranszmitterek szintézisével kapcsolatban a következőket tapasztaltuk:

1./ A Sepharose-4B dehidratálása és rehidratálása meglehetősen kényes müvelet. Vigyázni kell, hogy mind a dehidrálás, mind a rehidrálás fokozatosan történjen és ne álljon hosszabb ideig szárazon a gél.

2./ A Sepharose-CL sokkal kevésbé érzékeny savas kezelésre, mint a sima Sepharose. Ennek ellenére még a keresztkötésekkel stabilizált Sepharose-gyöngyöket is csak vizmentes közegben lehet trifluor-ecetsavas acidolizisnek alávetni, ellenkező esetben a szénhidrátokra jellemző savlabilitás miatt a gyöngyök feloldódnak.

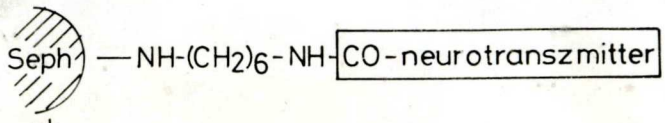
B./ A szövettani fixálás során megváltozott neurotranszmitterek kapcsolása Sepharose-hoz:

Két lépésben hajtottuk végre ezt az immobilizálást: először a szöveti fixálás módszerét alkalmazva a neurotranszmittereket formaldehiddel, vagy formaldehid-glutáraldehid keverékkel fehérjéhez /pl. BSA, ovalbumin/ kötöttük, majd az igy kapott konjugátumokat glutáraldehiddel aminohexil /AH/-Sepharose-on immobilizáltuk. Lényegében tehát az immunizálásra is alkalmas neurotranszmitter-BSA antigéneket kötöttük fel a Sepharose gyöngyökre, mivel ezekkel az antigénekkel szemben termelődött antitestek specificitását kivántuk ezekkel az affinitás adszobensekkel ellenőrizni.

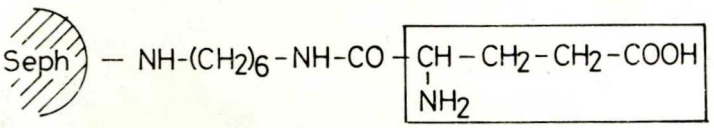
Néhány esetben közvetlenül a neurotranszmittert kapcsoltuk fehérje közvetitése nélkül formaldehiddel amino-hexil-Sepharose-hoz, de ezek nem voltak különösen sikeres kisérletek.

Affinitás adszorbenseink szerkezete a következő:

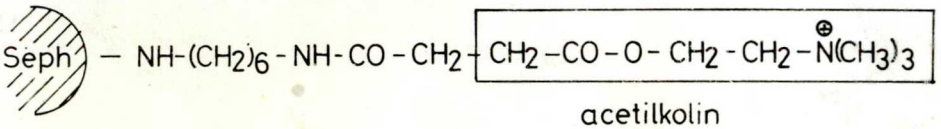
A. sorozat: a neurotranszmitterek funkciós-csoportjai szabadok:



pl:

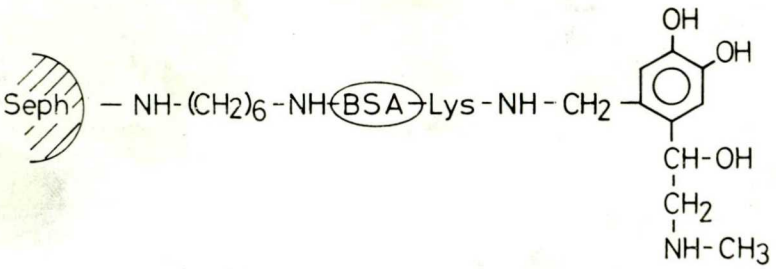


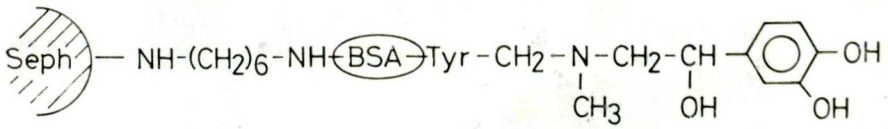
GABA



acetilkolin

B. sorozat: a fixált neurotranszmitterek kapcsolása Sepharose-hoz:





30. ábra

Ezeket az adszorbenseket alkalmazták az antigénjeinkkel szemben termelődött antiszérumok ellenőrzésére, a módszer alkalmazása és pontos leirása meghaladja ennek a dolgozatnak a célkitüzéseit.

5./ Immunizálási eredmények és a kapott antiszérumok jellemzése

Még nem záródott le valamennyi immunizálás, ezért csak vázlatosan foglaljuk össze az eddigi eredményeket.

Az adrenalin-BSA formaldehides kapcsolásával nyert antigénnel két alkalommal 5-5 nyulat immunizáltak. Mindkét esetben sikerült egy-egy állatból anti-adrenalin-antiszérumot nyerni. Az első immunizálásnál kapott antiszérum nem specifikus, az adrenalin mellett a noradrenalint is kimutatja. A második immunizálás során sikerült olyan antiszérumot előállitani, amely minimális mennyiségben mutatja csak ki a noradrenalint és dopamint, ennélfogva immunhisztológiai célra alkalmas. Egyik antiszérum sem köti meg a radioaktiv jelzett adrenalint, tehát RIA-módszer kidolgozására nem alkalmazható. /RIA-antigénhez adrenalin-karbonsavat kellene előállitani, ez eddig még nem sikerült az előzőekben közölt gyürüzárási reakció miatt./

A noradrenalin-BSA formaldehides kapcsolással nyert antigént legalább három alkalommal használták immunizálásra. Két alkalommal sikerült az immunhisztológiában alkalmazható antiszérumot nyerni. Az antiszérumok nem mutatják ki az adrenalint, viszont elég zavaró keresztreakciót adnak dopaminnal. Ezért jelenleg csak ott lehet az immuncitokémiában alkalmazni őket, ahol a noradrenalin mellett nem fordul elő dopamin. Az antiszérumok magát a noradrenalint egyáltalán nem kötik, csak a szövetben fixált formáját ismerik fel, ezért RIA-meghatározás kidolgozására alkalmatlanok.

A DOPS-BSA antigénnel szemben eddig még nem sikerült olyan ellenanyagot termelni, amely a noradrenalin RIA-meghatározására, vagy immuncitokémiai kimutatására alkalmas volna.

A dopamin-BSA formaldehides kapcsolással nyert antigénnel szemben eddig csak olyan antiszérumot sikerült előállitani, amelyik egyaránt köti a noradrenalint és dopamint, immuncitokémiai vizsgálatok alapján.

A DOPA-BSA antigénnel szemben nem termelődött még olyan antiszérum, amely a dopamin RIA-meghatározását lehetővé tenné.

A szerotonin-BSA formaldehides kapcsolással nyert antigénnel szemben sikerült olyan antiszérumot nyerni, amely specifikusan köti szöveti metszetekben a szerotonin fixált származékát. Az antiszérum alkalmas tehát szerotonin közvetlen kimutatására szöveti metszetekben. Ez az antitest sem köti meg a radioaktiv szerotonint, a RIA-meghatározásra ennélfogva nem használható. Az 5-OH-Trp-BSA-antigénnel szemben sem sikerült eddig RIA-használható antiszérumot nyerni.

Hisztamin-BSA /formaldehiddel készült/ konjugátumokkal szemben még nincsenek lezárva az immunizálások. A hisztidin-BSA antigénnel szemben termelődött antiszérum alkalmas a hisztamin szöveti metszetben történő kimutatására, viszont keresztreakciót ad hisztidinnel és N-terminálisukon hisztidint tartalmazó peptidekkel, ezért csak korlátozottan alkalmazható immunhisztológiai célokra.

A szukcinilkolin-BSA és a mukonil-kolin-BSA antigénekkel szemben jelenleg folynak az immunizálások. Magának az acetilkolinnak a szöveti fixálása nagyfoku vizoldékonysága miatt annyira megoldatlan, hogy komoly problémát jelent az antiszérum immuncitokémiai alkalmasságának bizonyitása. Itt az affinitás adszorbensekkel folyó kisérletek igérnek eredményt.

A GABA-BSA formaldehiddel kapcsolt antigénnel most kezdődtek meg az immunizálások.

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.

III. KISÉRLETI RÉSZ

Általános megjegyzések:

Az olvadáspontok mérése Koffler-készülékkel történt. Az optikai forgatóképességet Zeiss asztali polariméteren mértük, a vékonyrétegkromatogrammokat Kieselgél G /Merck/ adszorbensen fejlesztettük ki.

A felhasznált futtatószer elegyek a következők voltak:

1	Etilacetát - /metanol: jégecet: viz 75:10:24/	98:2
2	Etilacetát - /metanol: jégecet: viz 75:10:24/	95:5
3	Etilacetát - /metanol: jégecet: viz 75:10:24/	90:10
4	Etilacetát - /metanol: jégecet: viz 75:10:24/	80:20
5	Etilacetát - /piridin: jégecet: viz 20: 6:11/	98:2
6	Etilacetát - /piridin: jégecet: viz 20: 6:11/	95:5
7	Etilacetát - /piridin: jégecet: viz 20: 6:11/	90:10
8	Etilacetát - /piridin: jégecet: viz 20: 6:11/	80:20
9	Etilacetát - /piridin: jégecet: viz 20: 6:11/	60:40
10	Butanol: jégecet: viz	5:4:1
11	Kloroform: metanol: viz	2:8:1
12	Butanol: piridin: ecetsav: viz	30:20:6:24
13	Butanol: jégecet: viz	4:1:1
14	Butanol: jégecet: viz /felső fázis/	8:5:4

Az R_f értékeknél felső indexben jelöltük meg, hogy melyik futtatószerre vonatkoznak.

A kromatogrammok előhivására ninhidrin-oldatot használtunk. A permetezést követően a lapokat kb. 6 percig infralámpa alatt tartottuk, majd néhány másodpercre klórgázba helyeztük és szellőztetés után o-toluidin-KI oldattal hivtuk elő. A vékonyrétegkromatogrammokat esetenként UV -abszorpció alapján is értékeltük.

A haptén/BSA mólarányok meghatározását UV-spektrofotometriás módszerrel, "Spektromom 204" tipusu készüléken végeztük. A fényelnyelést - néhány kivételtől eltekintve - 280 nm-en mértük. Néhány esetben aminosavanalizis alapján - AAA 881 Automatikus Aminosav Analizátor Mikrotechna tipusu készülékkel történt a meghatározás.

A végterméket liofilizálással izoláltuk. A felhasznált liofilizátor WKF L 05 tipusu volt.

Az UV-spektrumok Specord UV-Vis, az IR-spektrumok Unicam SP 200, az ^{1}H-NMR-spektrumok pedig JEOL 60 tipusu készüléken, tetrametilszilán belső standard alkalmazásával készültek.

A biológiai aktivitásméréseket az intézettel együttmüködő hollandiai Nijmegeni Anatómiai Intézetben végezték.

Formaldehides kapcsolással előállitott antigének:

Adrenalin-formaldehid-BSA konjugátum előállitása:

133 mg /0,40 mM/ adrenalin-bitartarátot és 40 mg /0,22 mM/ L-aszkorbinsavat 2 ml desztilláltvizben oldottunk. Az oldathoz 2 ml desztilláltvizben oldott 100 mg /1,47 µM/ BSA-t, majd 1,33 ml 3 M-os nátriumacetát-puffert és 1,33 ml 7,5 %-os formaldehidet adtunk. Az egyesitett elegy pH-ja 6,0-6,8 közötti érték volt. 20 órát N_2-atm. alatt és fénytől védve szobahőn kevertettük. Az oldat mindvégig szintelen maradt.

1 %-os oxigénmentesitett L-aszkorbinsavval szemben 72 óráig dializáltuk, majd a dializálást desztilláltvizzel szemben + 4 °C-on N_2-atm. alatt folytattuk további 24 óráig. Oldatunk ezuttal is szintelen maradt. Ezután liofilizáltuk.

A liofilizátum sulya 110 mg volt.

Anyagunkat UV-spektrofotometriás méréssel ellenőriztük. 5 mg liofilizátumot 10 ml desztillált vizben oldottunk és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük a konjugátum extincióját; E = 0,415. Ez alapján az analizis eredményeként

haptén/BSA értékként 21-et kaptunk. A haptén E^{o} értékét /E^{o} 2900/ külön kisérletben határoztuk meg.

Noradrenalin-formaldehid-BSA:

100 mg /0,29 mM/ noradrenalin-bitartarátot és 100 mg /0,57 mM/ L-aszkorbinsavat 5 ml desztillált vizben oldottuk. Ezután 300 mg /4,4 µM/ BSA-t oldottunk 13 ml desztillált vizben, majd 2 ml 3 M-os nátriumacetátot és 4 ml 7,5 %-os formaldehidet adtunk hozzá. A két elegyet összeöntöttük és N_2-atm. alatt, fénytől védve szobahőn 3-4 órán át állni hagytuk. Az elegy 1 óra elteltével világossárga lett.

A tisztitást az adrenalin-formaldehid-BSA-nál előzőekben leirtak szerint végeztük és a további müveletek is ugyanazok voltak. A liofilizátum sulya 270 mg volt. Az analizist UV-spektrofotometriai módszerrel, 280 nm-en, 1 cm-es küvettában, 3,5 mg liofilizátum 10 ml desztillált vizes oldatával végeztük /5×10^{-6} M/l/. A mért extinció 0,497 volt, az E^{o} 2900. A haptén/BSA értéke: 36.

Dopamin-formaldehid-BSA:

100 mg /0,53 mM/ dopamin x HCl-t és 100 mg /0,57 mM/ L-aszkorbinsavat 5 ml d.v.-ben szuszpendáltunk, majd 13 ml d.v.-ben 300 mg /4,4 µM/ BSA-t oldottunk és 2 ml 3 M-os nátriumacetátot és 4 ml 7,5 %-os formaldehidet adtunk hozzá. A két elegyet egyesitettük és argon-atmoszférában fénytől védve, szobahőn 3-4 órán át állni hagytuk.

A tisztitást előzőekben leirtak szerint végeztük. A liofilizátum sulya 280 mg volt. Az analizis ezuttal is UV-spektrofotometriás méréssel történt. 4,5 mg liofilizátumot oldottunk 10 ml d.v.-ben és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extinciót. E = 0,748, E^{o} 2900.
Ezek alapján a haptén/BSA 40 volt.

Noradrenalin-formaldehid-BSA-karbamid konjugátum előállitása:

100 mg /1,47 μM/ BSA-t 1 ml d.v.-ben oldottunk és hozzáadtunk 4 ml 10 M-os karbamidot. Külön edényben 100 mg /0,31 mM/ noradrenalin-bitartarátot, 1,35 g nátriumacetátot és 100 mg /0,57 mM/ L-aszkorbinsavat oldottunk 5 ml d.v.-ben, majd a két oldatot elegyitettük. A reakcióelegy pH-ja 6,5-6,8 közötti érték volt. Ezután hozzáadtunk 1,24 ml 7,5 % formaldehidet tartalmazó 8 M-os karbamidot és a pH-t továbbiakban is a fenti értéktartományra állitottuk be. A reakcióelegyet 10 órán át N_2-atm.-ban, szobahőn, fénytől védve állni hagytuk.

A tisztitás és az analizis körülményei az előzőekben leirtakkal egyeztek meg. A liofilizátum sulya 35 mg volt. 5,0 mg liofilizátumot oldottunk 10 ml d.v.-ben és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extinciót. E = 0,625.

A haptén/BSA hányados értéke 21 volt.

Adrenalin-formaldehid-BSA-karbamid:

A noradrenalin-formaldehid-BSA-karbamid antigénszintézissel egyező módon végeztük a kisérletet, de haptén/BSA hányados alapján kapcsolást nem sikerült elérni. A liofilizátumot nem is tekintettük antigénnek.

Dopamin-formaldehid-BSA-karbamid:

Az antigént a noradrenalin-formaldehid-BSA-karbamid konjugátum előállitásával teljesen azonos módon állitottuk elő. A kisérlethez az alábbi anyagmennyiségeket használtuk: 100 mg /1,47 μM/ BSA 1 ml d.v.-ben oldva, hozzáadtunk 4 ml 10 M-os karbamidot. 70 mg /0,37 mM/ dopamin x HCl-t, 1,35 g nátriumacetátot , 100 mg /0,57 mM/ L-aszkorbinsavat oldottunk 5 ml d.v.-ben. A két oldat egyesitése után hozzáadtunk 1,24 ml

7,5 % formaldehidet tartalmazó 8 M-os karbamidot, miközben a pH 6,5-6,8 közötti volt. A pH-t továbbiakban is ezen az értéken tartottuk.

A tisztitás és analizis körülményei azonosak voltak. 60 mg liofilizátum keletkezett.

Az UV-analizishez 4,0 mg liofilizátumot oldottunk 10 ml d.v.-ben és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extincióját. E = 0,435 volt.

Haptén/BSA értéknek 16-ot kaptunk.

Adrenalin-formaldehid-BSA-0,1 % SDS:

A kapcsolást 0,1 %-os SDS-t tartalmazó 3 M-os nátrium-acetát pufferben végeztük. Először 10 ml pufferben oldottunk 100 mg /1,47 µM/ BSA-t, ill. 1,5 ml d.v.-ben 50 mg /0,27 mM/ adrenalint és 100 mg /0,57 mM/ L-aszkorbinsavat. A két oldatot egyesitettük, a pH-t 6,5-6,8 közötti értéken tartottuk és 1,2 ml 7,5 %-os formaldehidet adtunk hozzá. Fénytől védve, N_2-atm. alatt, szobahőn 24 órát állni hagytuk.

A tisztitás és analizis körülményei előzőekben leirtakkal egyeztek meg. A liofilizátum sulya 95 mg volt. Az analizishez 3,0 mg-ot oldottunk 10 ml d.v.-ben és az extincióját 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük. E = 0,265 volt, ez alapján a haptén/BSA értéke 10 volt.

Adrenalin-formaldehid-BSA-0,2 % SDS:

A hányados alacsony értéke miatt az előbbi kapcsolást 0,2 % SDS-tartalom mellett megismételtük. Az összes többi anyag mennyisége változatlan volt. A pH-t 9,0-re állitottuk ezuttal és 120 óráig hagytuk lejátszódni a kapcsolási reakciót. Teljesen azonos tisztitás után a liofilizátum sulya 91 mg volt.

Az analizishez 5,5 mg liofilizátumot oldottunk 10 ml d.v.-ben és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extin-

cióját, amely 0,755 volt.

A haptén/BSA értéke kb. 25 volt.

BOC-adrenalin-formaldehid-BSA:

87,5 mg /1,28 µM/ BSA-t 3,5 ml d.v.-ben oldottunk, majd 0,7 ml 3 M-os nátriumacetátot és 2,8 ml 7,5 %-os formaldehidet adtunk hozzá. 200 mg /0,7 mM/ BOC-L-adrenalin 3 ml dioxános oldatát elkészitettük és a fenti elegyhez öntöttük, majd 20 mg /0,11 mM/ L-aszkorbinsavat adtunk hozzá. A reakcióelegy pH-ját 8,5-9,0 közötti értéken tartottuk. 26 órán át fénytől védve, szobahőn, N_2-atm.-ban állni hagytuk.

Áramló csapvizzel szemben 1-2 napig dializáltuk, majd ezt követően sürün váltott d.v.-zel szemben folytattuk a dializist. Liofilizáltuk, 80 mg liofilizátum keletkezett.

A védőcsoport eltávolitásához a 80 mg liofilizátumot 2,5 ml 0 °C-ra hütött 85 %-os hangyasavban oldottuk és 1 órán át szobahőn állni hagytuk.

Előbbi módon ismét dializáltuk, ellenőriztük a mosófolyadék pH-ját, mig semleges nem lett. Ismét liofilizáltuk az anyagot, 72 mg liofilizátumot kaptunk.

UV-analizist végeztünk, 5,0 mg liofilizátumot oldottunk 10 ml d.v.-ben és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extincióját. A számitások alapján haptén/BSA értéke 11 volt.

BOC-noradrenalin-formaldehid-BSA-karbamid:

100 mg /1,47 µM/ BSA-t 2 ml d.v.-ben oldottunk, majd 2,4 g karbamidot adtunk hozzá és d.v.-zel 4 ml-re egészitettük ki. Ezután 1,35 g nátriumacetátot adtunk az oldathoz és a pH-t 6,5-6,8-ra állitottuk.

Külön edényben 100 mg /0,39 mM/ BOC-noradrenalint oldottunk 4 ml DMF-ben, 0 °C-ra hütöttük és az első oldathoz öntöttük hütés közben, majd 1,4 ml 7,5 %-os formaldehidet

tartalmazó 8 M-os karbamidot adtunk hozzá. Kezdeti zavarosodásig állni hagytuk - N_2-atm. alatt, fénytől védve - majd a keletkezett pelyhes csapadékot 10.000 g-vel 15 percig centrifugáltuk.

A felülúszó részt liofilizáltuk, 110 mg liofilizátum keletkezett. Az előzőekben leirtak szerint BOC-eltávolitást végeztünk, dializáltuk, mig a mosófolyadék semleges nem lett, majd ismét liofilizáltuk. 70 mg liofilizátum keletkezett.

UV-analizishez 4,6 mg-ot oldottunk 10 ml d.v.-ben és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extinciót. E = 0,276 volt. A haptén/BSA értéke 6,5.

BOC-dopamin-formaldehid-BSA-karbamid:

Az előző kapcsolással teljesen egyező körülmények között az alábbi a anyagmennyiségekkel dolgoztunk: 100 mg /1,47 µM/ BSA, 1,35 g nátriumacetát, 100 mg /0,42 mM/ BOC-dopamin, 4 ml DMF és 1,4 ml 7,5 % formaldehid 8 M-os karbamidban.

A dializist, liofilizálást és a BOC-eltávolitást is ugyanugy végeztük, végül 72 mg liofilizátumot kaptunk. Az UV-analizishez 3,7 mg-ot oldottunk 10 ml d.v.-ben és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extinciót. E = 0,87. A haptén/BSA értéke 8 volt.

BOC-noradrenalin-formaldehid-BSA-0,3 % SDS:

100 mg /1,47 µM/ BSA-t oldottunk 10 ml 3 M-os nátriumacetát pufferben, majd 1 ml 3,5 %-os SDS-t és 50 mg /0,28 mM/ L-aszkorbinsavat adtunk hozzá.

Külön edényben 100 mg /0,39 mM/ BOC-noradrenalin-t oldottunk 4 ml dioxánban és hütés után a két oldatot egyesitettük, a pH-t 6,5-6,8 közötti értéken tartottuk és 1,4 ml 7,5 %-os formaldehidet adtunk hozzá.

A dializálást előbbiek szerint végeztük, szintelen oldatot kaptunk. Ezután liofilizáltuk, ismertetett módon, majd védőcsoport eltávolitást végeztünk és ujabb dializis és liofilizálás után 74 mg liofilizátumot kaptunk.

,, Az UV-analizishez 4 mg-ot oldottunk 5 ml d.v.-ben és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extinciót. E = 0,610 volt, a <u>haptén/BSA 7.</u>

<u>BOC-dopamin-formaldehid-BSA-0,3 % SDS:</u>

Az előbb leirtak szerint végeztük a kapcsolást. Az alábbi anyagmennyiségekkel dolgoztunk: 100 mg /1,47 μM/ BSA, 10 ml 3 M-os nátriumacetát-pufferben, 1 ml 3,5 %-os SDS, 50 mg /0,28 mM/ L-aszkorbinsav. 100 mg /0,42 mM/ BOC-dopamin 4 ml dioxánban, 1,4 ml 7,5 %-os formaldehid. A pH 6,5-6,8 között volt.

Dializiskor szintelen oldatot kaptunk. Liofilizálás után 90 mg liofilizátum keletkezett.

UV-analizishez 4 mg-ot oldottunk 5 ml d.v.-ben és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extincióját. E = 0,580. <u>A haptén/BSA értéke 6 volt.</u>

<u>Hisztamin-formaldehid-BSA:</u>

300 mg /4,4 μM/ BSA-t 26 ml d.v.-ben oldottunk és 2 ml 3 M-os nátriumacetátot és 4 ml 7,5 %-os formaldehid oldatot adtunk hozzá. Külön edényben 100 mg /0,68 mM/ hisztamin-hidrokloridot oldottunk 5 ml d.v.-ben. A két oldatot egyesitettük és 4 órát állni hagytuk. Ekkor a kezdeti zavarosodás miatt leállitottuk a reakciót. Korábbiakban leirtak szerint dializáltuk, majd 10 000 g-vel 15 percig centrifugáltuk az anyagot,majd a felül uszót liofilizáltuk. A liofilizátum sulya 240 mg volt.

Az UV-analizishez 0,5 mg-ot oldottunk 1 ml d.v.-ben és ezuttal 220 nm-en és 0,1 cm-es küvettában mértük az extinciót. E = 0,488, E^{0} = 9 000.

Ezután 0,5 mg BSA-t oldottunk 1 ml d.v.-ben és ugyanugy megmértük az extincióját. E = 0,448, $E^{o} = 6,09x10^{5}$. Az extinció különbség alapján a hisztamin többlet 6,1 molekula volt BSA molekulánként.

Szerotonin-formaldehid-BSA:

200 mg /2,94 µM/ BSA-t 28 ml 3 M-os nátriumacetátban oldottunk, az oldat pH-ja 6,7 volt. 32 mg /0,08 mM/ szerotonin-kreatinin-szulfátot és 40 mg /0,22 mM/ L-aszkorbinsavat oldottunk 2 ml d.v.-ben és a két oldatot elegyitettük, majd 2,6 ml 7,5 %-os formaldehidet adtunk hozzá. Fénytől védve 22 órát szobahőn állni hagytuk. A reakcióelegy enyhén zavaros és világossárga lett. Kezdetben 0,1 n HCl-val, majd d.v.-zel szemben dializáltuk.

Az UV-analizist 877 mg/l koncentrációju oldattal, 280 nm-en, 1 cm-es küvettában végeztük, az extinció 0,720 volt. $E^{o} = 5\ 500$. A haptén/BSA értéke 12 volt.

Szerotonin-formaldehid-BSA-karbamid:

100 mg /1,47 µM/ BSA-t 1 ml d.v.-ben oldottunk és hozzáadtunk 4 ml 10 M-os karbamidot és 1,35 g nátriumacetátot. Ezután 130 mg /0,34 mM/ szerotonin-kreatin-szulfátot oldottunk 2 ml d.v.-ben és 100 mg /0,57 mM/ L-aszkorbinsavat adtunk hozzá. A két oldatot egyesitettük, a pH-t 6,5-6,8 közötti értéken tartottuk, majd 1,24 ml 7,5 %-os formaldehidtartalmu 8 M-os karbamidot adtunk hozzá. A pH-t állandóan ellenőriztük. Előzőekben leirtak szerint dializáltuk, majd 10 000 g-vel 15 percig centrifugáltuk és az oldatot liofilizáltuk, a liofilizátum sulya 24 mg volt.

Az UV-analizishez 4,7 mg-ot oldottunk 10 ml d.v.-ben és 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extinciót. E = 0,470 volt és ez alapján a haptén/BSA értéke 5,3.

Karboxilált-neurotranszmitter származékok előállitása és kapcsolása marhaszérum albuminhoz:

Z-N/Me/-Bzl_2-DOPS előállitása:

527 mg /1 mM/ Z-Bzl_2-DOPS-t oldottunk 3 ml abs. THF-ben és 0,5 ml /8 mM/ metiljodidot adtunk hozzá és a reakcióelegyet 0 °C-ra hütöttük. Ezután 0,132 g /3 mM, 55 %-os/ nátriumhidrid-szuszpenziót adagoltunk hozzá óvatosan keverés mellett, majd 24 óráig szobahőn kevertettük. Utána 5 ml etilacetátot adtunk hozzá és szárazra pároltuk, majd 2 ml éterben és 10 ml vizben vettük fel és $NaHCO_3$-tal mostuk. 5n HCl-val pH=2-re savanyitottuk és 3x5 ml etilacetáttal extraháltuk. Nátriumtioszulfáttal, majd d.v.-vel mostuk, nátriumszulfáton száritottuk, megszürtük. Sárgás-fehér kristályok váltak ki, a kristályokat kiszürtük /95 mg/, etilacetátban felvettük és 1 n HCl-val extraháltuk, majd d.v-es mosás után bepároltuk, nátriumszulfáton száritottuk. Ez a kristályfrakció bizonyult az OMe-származéknak.

Termelés: 80 mg /15 %/ $R_f^5 = 0,25$ $R_f^6 = 0,30$

Op: 195-196 °C $R_f^8 = 0,95$

Az OMe-származék kiszürése utáni etilacetátos fázist bepároltuk és ebből is sárgásfehér kristályok váltak ki. Éterből átkristályositottuk, az anyag sulya 360 mg, Op = 154-158 °C volt. DCHA-só képzéssel tisztitottuk.

360 mg /0,66 mM/ Z-N/Me/-Bzl_2-DOPS-ot 4-5 ml 40 °C-os etilacetát és 3 ml THF elegyében oldottunk, majd 1 ekvivalens; 130 µl /0,66 mM/ DCHA-t adtunk hozzá és hülni hagytuk. Éterből és n-hexánból kristályositottuk -20 °C-on. 2 n H_2SO_4-val DCHA-só felszabaditást végeztünk, majd éterből ismét átkristályositottuk az anyagot. Az igy nyert N-Me-származék adatai a következők voltak:

Termelés: 325 mg /60 %/ R_f^6 : 0,10 R_f^8 : 0,60

Op: 175-177 °C

Mindkét anyagról NMR-spektrum készült.

Bzl_2-DOPS előállitása:

40,8 g /128 mM/ 3,4-dibenzioxi-benzaldehidet oldottunk 166 ml abs. etanolban és ehhez 6,42 g /0,160 mM/ NaOH és 4,8 g /84 mM/ glicin 21 ml-nyi vizes oldatát adtuk. Keverés mellett 30 perc alatt emeltük a hőmérsékletet 72 °C-ra, majd további keverés mellett hagytuk 40 °C-ra hülni. Ezután 20 perc alatt 150 ml 2n HCl-t csepegtettünk hozzá, de a hőmérsékletet nem engedtük 45 °C fölé emelkedni. Az elegyet 3 órát kevertettük, majd szürtük és 10 ml 3n HCl-val és 10 ml etanollal mostuk. A szürlethez 23 g nátriumacetát vizes oldatát adtuk, illetve a pH-t 5,0-6,0 közötti értékre állitottuk. 3 órára hütőbe tettük. Fehér kristályok váltak ki, szürés után etanol: viz: HCl 30:20:1 arányu elegyéből csontszenezéssel tisztitottuk.

Termelés: 40,3 g /80 %/ R_f^4 : 0,50

Op: 139-155 °C M_s : 393,38

Z-Bzl_2-DOPS előállitása:

9,5 g /24 mM/ Bzl_2-DOPS-ot és 0,966 g /24 mM/ NaOH-t kb. 220 ml vizben oldottunk, majd lassan 4,59 g /26 mM/ Z-Cl-t csepegtettünk hozzá ugy, hogy a pH 9,0 maradt, amit 3n NaOH hozzáadásával értünk el. A pH csökkenésének megszüntétől számitott 2 órát kevertettük még. A lugos reakcióelegyet éterrel kiráztuk, majd a pH-t 2,0-ra állitottuk és

etilacetáttal extraháltunk. Az etilacetátos fázist semlegesre mostuk és nátriumszulfáton szárítottuk, bepárlás után n-hexán-ból kristályositottuk.

Termelés: 11,2 g /88 %/ R_f^2 : 0,70

Op: 73-85 °C M_s : 529,63

Z-Bzl_2-treo-DOPS x DCHA-só előállitása:

9,3 g /17,5 mM/ Z-Bzl_2-DOPS-t 108 ml meleg acetonitrilben oldottunk és 3,4 g /3,708 ml, 19 mM/ frissen desztillált DCHA-t adtunk hozzá. Egy éjszakát szobahőn állni hagytuk, a kivált kristályokat szürtük, éterrel mostuk.

Termelés: 6,5 g /52 %/ Op: 144-145 °C

Az acetonitrilből szobahőn nem vált ki anyag, hütésre viszont kb. 100 mg fehér kristály vált ki. Kromatogramm szerint /4-es futtatószerben/ ez Bzl_2-DOPS x DCHA szennyeződés volt. Az acetonitrilt bepároltuk, barnás olajos maradék keletkezett, amit etilacetátban felvettünk és éterrel kristályositottunk hütés közben. 2 600 mg /Op: 132-140 °C/, kromatogramm alapján Z-Bzl_2-DOPS x DCHA vált ki. Állás közben további 3 800 mg /Op: 132-140 °C/ anyag vált ki. A maradékból petroléterrel 4 700 mg 97-110 °C olvadáspontu anyagot kristályositottunk ki. A két 132-140 °C olvadáspontu kristályfrakciót egyesitettük és DCHA-só felszabaditást végeztünk, majd Hegedüs szerint ismét DCHA-sót képeztünk acetonitrilből. 72 óra után 4,7 g, 140-145 °C olvadáspontu anyag keletkezett.

DCHA-só felszabaditást /2n H_2SO_4-val/ követően n-hexánból fehér kristályokat nyertünk.

Termelés: 2,9 g /83 %/ R_f^2: 0,70

Op: 115-125 °C

BOC-/3,4-treo/-Bzl_2-DOPS előállitása:

1 072 mg /2,5 mM/ 3,4-treo-Bzl_2-DOPS-t oldottunk 15 ml dioxán-viz 2:1 arányu elegyében, 2,5 ml 1n NaOH-t adtunk hozzá, majd 700 mg /3 mM/ BOC_2O-t. Szobahőn kevertettük, a pH-t 8-as értéken tartottuk. Az anyag lassan beoldódott.

pH = 3-ig savanyitottunk, majd etilacetáttal háromszor extraháltunk, nátriumszulfáton száritottuk az egyesitett fázisokat és bepárlás után n-hexánból átkristályositottuk.

Termelés: 900 mg /73 %/ R_f^2 : 0,40 R_f^4 : 0,80

Op: 132-134 °C $[\alpha]_D^{20}$: + 73,3 °

Ms: 494,51 /c = 1, MeOH/

DL-treo-BOC-DOPS előállitása:

495 mg /1 mM/ Bzl_2-BOC-DOPS-t abs. metanolban hidráltunk, Pd/C katalizátor jelenlétében kb. 7 órát. Szürtük, bepároltuk, a bepárlási maradékot 5 ml abs. éterben felvettük, 190 µl /1 mM/ DCHA-t adtunk hozzá és hütőszekrényben kristályositottuk. Fehér kristályok váltak ki.

Termelés: 422 mg /81 %/ R_f^2 : 0,15 R_f^3 : 0,50

Op: 130-132 °C Ms: 314,23 /szabad sav/

BOC-DL-DOPS-BSA előállitása:

A kapcsolást vegyes anhidrides módszerrel végeztük.

A karboxilcsoport aktiválása /vegyes anhidridképzés/:

A./ reakcióelegy: 30 mg /0,1 mM/ BOC-DL-DOPS-t 1 ml abs. DMF-ben oldottunk, majd -10 °C-ra hütöttük és 14 µl /0,10 mM/ fém-Na-ról desztillált trietilamint /TEA/ és 13 µl /0,10 mM/ klórhangyasav-izo-butilésztert /KHIBE/ adtunk hozzá. Légmentesen lezárva 5 percig 0 °C-on állni hagytuk.

B./ reakcióelegy: 120 mg /1,75 μM/ BSA-t 6 ml dioxán: viz 1:2 arányu elegyében oldottunk és a pH-t 1n NaOH-dal 7,5-8,0-re állitottuk. Az oldatot 0 °C-ra hütöttük és keverés közben az előzőekben elkészitett A./ vegyes-anhidridet hozzácsepegtettük.

Ezután a pH-t többször ellenőriztük, 7,5-8,0 között tartottuk. A reakcióelegyet + 4 °C-on 4 órán át állni hagytuk. Ezt követően több napon keresztül áramló csapvizzel, majd sürün váltott d.v.-zel szemben dializáltuk. Dializálás után fagyasztva szárítottuk.

A liofilizátum sulya 135 mg volt.

BOC-védőcsoport eltávolitása: A liofilizátumot 0 °C-ra hütött, nitrogénnel átbuborékoltatott 15 ml 85 %-os hangyasavban oldottuk és 2 órán át szobahőn állni hagytuk. A hangyasavat a fent leirt módon dializissel távolitottuk el és ismételten fagyasztva szárítottuk.

A liofilizátum sulya 127 mg volt és továbbra is vizoldható maradt.

A haptén/BSA mólarányt UV-analizissel 280 nm-en, 1 cm-es küvettában határoztuk meg: értéke 29 volt.

BOC-L-DOPA, ill. BOC-D-DOPA előállitása:

A két izomer védett származékának előállitása azonos kiindulási anyagmennyiségekkel és körülmények között párhuzamosan történt.

1 050 mg /5,25 mM/ L-DOPA-t /ill. D-DOPA-t/ 15 ml dioxán: :viz 1:1 arányu elegyében oldottuk, majd 5,25 ml 1n NaOH-t és 1 mM/1 ml koncentrációju BOC_2O dioxános oldatából 10,5 ml-t /10,5 mM/ és 200 mg /0,57 mM/ L-aszkorbinsavat adtunk hozzá keverés közben. 20 óra után még az oldat homogén volt; 0,5 ml 1n NaOH-t és további 1 ml /1 mM/ BOC_2O-t adtunk hozzá. 12 óra elteltével a dioxánt nagy vákuumban alacsony hőfokon bepároltuk, majd a vizes oldatrészt 0 °C-ra hütöttük és 5 %-os $NaHSO_4$-tal a pH-t 3-ra állitottuk. Etilacetáttal háromszor

extraháltuk, majd az egyesitett szerves fázisokat d.v.-zel savmentesre mostuk, nátriumszulfáton szárítottuk. Bepárlás után narancssárga olajat kaptunk, ami motorvákuumban felhabozva megszilárdult.

Termelés: 1 900 mg /76 %/ R_f^6 : 0,42 R_f^8 : 0,88

DCHA-só képzés: Az anyagokat 25-25 ml abs. éterben felvettük és 980 µl /5 mM/ DCHA-t adtunk hozzá. Hütőszekrényben egy éjjel állni hagytuk. A kivált kristályokat szürtük, éterrel mostuk.

BOC-L-DOPA x DCHA :

Termelés: 2 600 mg /85 %/ $[\alpha]_D^{20}$ =+26,3 °

Op: 101-110 °C /c = 1 , MeOH/

BOC-D-DOPA x DCHA :

Termelés: 2 540 mg /83 %/ $[\alpha]_D^{20}$ = - 25,3 °

Op: 143-145 °C /c = 1 , MeOH/

BOC-L-DOPA x DCHA átkristályositása:

2 600 mg BOC-L-DOPA x DCHA-t 15 ml MeOH-ban 40 °C-on oldottunk, majd étert adtunk hozzá kezdeti zavarosodásig. A kivált kristályokat szürtük.

Termelés: 1 900 mg /73 %/ $[\alpha]_D^{20}$ = + 25,4 °

Op: 142-144 °C /c = 1 , MeOH/

BOC-D-DOPA-BSA előállitása:

A korábbiakban leirtak szerint vegyes anhidrides módszerrel végeztük a kapcsolást az alábbi anyagmennyiségekkel:

A./ reakcióelegy: 300 mg /1 mM/ BOC-D-DOPA-t oldottunk 5 ml abs. dioxánban 0 °C-on, majd 130 µl /1 mM/ KHIBE-t és 140 ul /1 mM/ TEA-t adtunk hozzá.

B./ reakcióelegy: 600 mg /8,8 µM/ BSA-t oldottunk 30 ml dioxán-viz 1:1 arányu elegyében.

A vegyes-anhidridet keverés közben a B./ oldathoz csepegtettük, 4 órát 0 °C-on állni hagytuk.

Korábbiak szerint dializáltuk, majd liofilizáltuk. A liofilizátum sulya 578 mg volt.

A BOC-védőcsoport eltávolitását 5 ml N_2-nel átbuborékoltatott 85 %-os hangyasavval végeztük. 2 óra elteltével a hangyasavat dializálással távolitottuk el, ismét liofilizáltuk az anyagot, sulya 480 mg volt.

UV-analizist végeztünk; 280 nm-en, 1 cm-es küvettában mértük az extinciót. A haptén/BSA érték 12 volt.

BOC-L-DOPA-BSA /karbamidban/ előállitása:

A kapcsolás az előzőekben leirt vegyes-anhidrides módszerrel történt.

A./ reakcióelegy: 200 mg /2,9 µM/ BSA-t 10 ml 8 M karbamid-acetonitril 1:1 arányu elegyében oldottunk.

B./ reakcióelegy: 170 mg /0,3 mM/ BOC-L-DOPA x DCHA-sóból közvetlenül kapcsolás előtt szabaditottuk fel a BOC-L-DOPA-t, a szokásos eljárási körülmények között és bepárlás után 1 ml abs. dioxánban oldottuk. + 5 °C-ra hütve 43 µl /0,28 mM/ KHIBE-t és 46 µl /0,33 mM/ TEA-t adtunk hozzá, 10 percig állni hagytuk.

A két reakcióelegyet egyesitettük, + 4 °C-on 1 óra 20 percig kevertettük. Szokott módon dializáltuk, 5 000 fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk. Liofilizáltuk, sulya 227 mg volt.

BOC-eltávolitás - 15 ml 85 %-os hangyasavval, 2 óráig, szobahőn - után, dializáltuk, majd liofilizáltuk. A liofilizátum sulya 170 mg volt. Vizben nehezen, de oldódott.

UV-analizist 280 nm-en, 1 cm-es küvettában végeztük; az E = 520, $c_{BSA} = 5{,}43 \times 10^{-6}$ M, $c_{haptén} = 1{,}86 \times 10^{-4}$.

A haptén/BSA hányados értéke 24,5 volt.

N^{α}-BOC-His-OH előállitása:

7,5 g /50 mM/ szabad hisztidinbázist 70 ml dioxán-viz 1:1 arányu elegyében, 10-es pH-n oldottuk, majd 20 °C-on kevertetés közben 14,5 g /100 mM/ BOC-N_3-et adtunk hozzá. A pH-t állandóan 10-es értéken tartottuk, 24 órát kevertettük. A pH-t $NaHSO_4$-tal 5,6-ra állitottuk és a reakcióelegyet vákuumban szárazra pároltuk. A terméket etanollal extraháltuk, annak lepárlása után a párlási maradékot - 20 °C-on állni hagytuk. Fehér kristályok váltak ki.

Termelés: 7,1 g /57 %/ R_f^8 : 0,65 R_f^9 : 0,82

Op: 188-191 °C

N^{α}-BOC-hisztamin-BSA előállitása:

Az ismert vegyes-anhidrides módszerrel végeztük a kapcsolást:

A./ reakcióelegy: 60 mg /0,23 mM/ N^{α}-BOC-His-OH-t 1 ml abs. DMF-ben oldottunk, majd -10 °C-ra hütöttük, ezután 30 µl /0,23 mM/ KHIBE-t és 30 µl /0,22 mM/ TEA-t adtunk hozzá.

B./ reakcióelegy: 120 mg /1,76 µM/ BSA-t 10 ml dioxán-víz 1:1 arányu elegyében oldottunk.

A két oldatot hütés és keverés mellett óvatosan egyesitettük és 1 éjszakát állni hagytuk. Dializáltuk, liofilizáltuk, majd 20 ml vizes oldatból 100 ml 85 %-os hangyasavval távolitottuk el a BOC-védőcsoportot /3 óra, szobahő/. 20 órás dializálás után liofilizáltuk, a liofilizátum sulya 150 mg volt.

Aminosav analizis alapján /187/1979/ a haptén/BSA értéke 40 volt.

N^{α}-, N^{im}-BOC-L-His-OH előállitása:

74 mg /50 mM/ L-His-OH x 2HCl-t oldottunk 100 ml dioxán-víz 1:1 arányu elegyében és 3 g /75 mM/ NaOH-t adtunk hozzá. A pH 7,5-8,0 közötti értékét a reakció során többször ellenőriztük, illetve beállitottuk, ezután 43,6 g /200 mM/ BOC_2O-t adtunk hozzá. Addig kevertettük /24 óra/, mig az oldat homogén nem lett. Ezután a pH-t 3-ra állitottuk és etilacetáttal háromszor extraháltunk, az egyesitett szerves fázisokat $NaHSO_4$-tal, majd d.v.-zel mostuk, nátriumszulfáton száritottuk. Bepároltuk, 2 450 mg sárgás olaj keletkezett.
R_f^6 : 0,18.

N^{α}-, N^{im}-BOC-D-His-BSA előállitása:

A már ismertetett vegyes-anhidrides módszerrel végeztük a kapcsolást.

A./ reakcióelegy: 200 mg /0,56 mM/ N^{α}-, N^{im}-BOC-D-His-OH-t 1 ml abs. dioxánban oldottunk, majd 73 µl /0,56 mM/ KHIBE-t és 78 µl /0,56 mM/ TEA-t adtunk hozzá. 5 °C-on 10 percig állni hagytuk.

B./ reakcióelegy: 600 mg /8,82 µM/ BSA-t 30 ml bioxán-víz 1:1-ben oldottunk. A pH-t 7,5-8,0-ra állitottuk.

A két oldatot keverés és hütés közben lassan egyesitettük és 4 órát 0 °C-on állni hagytuk. Halványsárga homogén oldat keletkezett. Dializáltuk, liofilizáltuk: 667 mg liofilizátum keletkezett.

A védőcsoport eltávolitását 50 ml 85 %-os hangyasavval 2 óra 30 percig szobahőn végeztük. Dializáltuk, liofilizáltuk: 580 mg liofilizátum keletkezett.

Aminosav analizis alapján /542/1979/ a haptén/BSA értéke 10 volt.

N^{α}-, N^{im}-BOC-D-His-BSA-karbamid előállitása:

Vegyes-anhidrides módszerrel állitottuk elő.

A./ reakcióelegy: 225 mg /0,67 mM/ N^{α}-, N^{im}-HIS-OH-t 1 ml abs.dioxánban oldottunk. 5 °C-on 86 µl /0,66 mM/ KHIBE-t és 93 µl /0,66 mM/ TEA-t adtunk hozzá. 5 percig állni hagytuk.

B./ reakcióelegy: 350 mg /515 µM/ BSA-t 2 ml d.v.-ben oldottunk, majd 20 ml 8 M-os karbamidot adtunk hozzá. A pH-t 8-ra állitottuk.

A két oldatot egyesitettük és pH ellenőrzés mellett 2 órát, 4 °C-on, majd szobahőn kevertettük.

Dializáltuk, liofilizáltuk: 380 mg liofilizátum keletkezett.

A védőcsoport eltávolitást 20 ml 85 %-os hangyasavval, 20 °C-on 2 óráig végeztük. Ujra dializáltuk, liofilizáltuk: 330 mg vizoldékony liofilizátum keletkezett.

Aminosav analizis /620/1980/ alapján a haptén/BSA értéke 13 volt.

BOC-D-5-OH-Trp-OH előállitása:

220 mg /1 mM/ D-5-OH-Trp-OH-t 2,5 ml dioxán-viz 1:1 arányu elegyében oldunk, majd 1 ml 1n NaOH-t és kevés

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED

dioxánban oldott 250 mg /1,1 mM/ BOC_2O-t adtunk az elegyhez. Fénytől védve, szobahőn 5 órán át kevertettük, miközben a pH-t 10-es értéken tartottuk. A reakció lefutását vékonyrétegkromatográfiával ellenőriztük. A reakcióelegyet ezután d.v.-zel kétszeresére higitottuk és háromszor extraháltuk éterrel. A vizes fázist 0 °C-ra hütöttük, és hütött 5 %-os $NaHSO_4$-tal pH 3-ig savanyitottuk. Háromszor etilacetáttal extraháltuk és az egyesitett szerves fázist d.v.-zel semlegesre mostuk, nátriumszulfáton szárítottuk. Bepárlás után barnás, olajos kristályok keletkeztek /350 mg./ R_f^2 : 0,55

DCHA-só képzés: 4 ml abs. etilacetátban felvettük az anyagot és 180 µl /< 1 mM/ DCHA-t adtunk hozzá, hütés és állás után fehér kristályok váltak ki.

Termelés: 317 mg /68 %,DCHA-sóra/

Op: 200-205 °C

BOC-D-5-OH-Trp-BSA előállitása:

A kapcsolást vegyes-anhidrides módszerrel végeztük.

A./ reakcióelegy: 60 mg /0,20 mM/ BOC-5-OH-Trp-OH-t /100 mg /21 mM/ DCHA-sójából felszabaditva/ 1 ml abs. DMF-ben oldottunk, 26 µl /0,20 mM/ KHIBE-t és 28 µl /0,20 mM/ TEA-t adtunk hozzá és 0 °C-on 10 percig állni hagytuk.

B./ reakcióelegy: 120 mg /1,76 µM/ BSA-t 10 ml dioxán-viz 1:1 arányu elegyében oldottunk, a pH-t 7,5-8,0 között tartottuk.

A két reakcióelegyet egyesitettük és 4 órát 0 °C-on kevertettük. Dializáltuk, az oldat szintelen volt. Liofilizálás után is vizoldható maradt.

A védőcsoportot előzőek szerint /85 %-os hangyasavval/ távolitottuk el.

Az UV-analizist 280 nm-en, 1 cm-es küvettában végeztük. Bemérés: 2,2 mg/5 ml volt, E = 0,835; hapténBSA mólarányra 37-t kaptunk.

BOC-D,L-5-OH-Trp-OH előállitása:

Az előző kapcsolás müveletei /BOC-védett D-izomer/ szerint az alábbi anyagmennyiségekkel végeztük:

480 mg /2,18 mM/ DL-5-OH-Trp-OH-t 5 ml dioxán-viz 1:1 arányu elegyében oldottuk, 2 ml 1n NaOH és kevés dioxánban oldott 2 g /9,2 mM/ BOC_2O-t adtunk hozzá. Fénytől védve 10-es pH-n kevertettük. Éteres extrakció után 3-as pH-ra savanyitottuk a reakcióelegyet, etilacetáttal háromszor extraháltuk, az egyesitett szerves fázist d.v.-zel mostuk, nátriumszulfáton szárítottuk, bepároltuk. Halványsárga kristályokat kaptunk.

Termelés: 560 mg /80 %/ R_f^7 : 0,52

Op: 177-182 °C M_s : 321,33

BOC-D,L-5-OH-Trp-BSA előállitása:

Előzőekben már ismertetett vegyes-anhidrides módszerrel végeztük a kapcsolást.

A./ reakcióelegy: 100 mg /0,33 mM/ BOC-D,L-5-OH-Trp-OH-t 1 ml abs. DMF-ben oldottuk, - 10 °C-ra hütöttük és 46 µl /0,33 mM/ TEA-t és 43 µl /0,33 mM/ KHIBE-t adtunk hozzá. Légmentesen lezárva 10 percig - 10 °C-on állni hagytuk.

B./ reakcióelegy: 116 mg /1,70 µM/ BSA-t d.v.-ben oldottunk, a pH-t 7,5-8,0-ra állitottuk, lassu keverés közben 5 ml dioxánt csepegtettünk hozzá. 0 °C-ra hütöttük és a A./ vegyesanhidridet keverés és hütés közben lassan adtuk hozzá. A pH-t fenti értéken tartottuk. További 4 órát kevertettük 0 °C-on. Dializáltuk, liofilizáltuk: 138 mg.

A védőcsoportot 10 ml 85 %-os, 0 °C-os hangyasavval távolitottuk el, miután 1,5 órán át szobahőn állni hagytuk. Dializáltuk, majd liofilizáltuk. 126 mg vizoldható liofilizátum keletkezett.

UV-analizist 280 nm-en, 1 cm-es küvettában végeztük; a hapténBSA érték 26 volt.

^{14}C-szukcinil-monokolin előállitása:

1 000 µl ^{14}C-kolin-kloridot /~3 Mio cpm/ és 576 mg /2 mM/ kolin-kloridot 5 ml abs. DMF és 6 ml abs. piridin elegyében oldottunk. 400 mg /2 ekv./ borostyánkősavanhidridet adtunk hozzá és N_2 atm. alatt 20 percig 100 °C-on tartottuk, majd 24 órát szobahőn kevertettük. További 600 mg /3 ekv./ borostyánkősavanhidridet tettünk hozzá és ismét 100 °C-ra melegitettük, lehülés után 24 órát kevertettük.

A kivált kristályokat kiszürtük, etanolból átkristályositottuk.

Termelés: 800 mg /100 %/ R_f^{10} : 0,45

Aktivitás mérés: 1 370 cpm /89 % ESR/

^{14}C-szukcinil-monokolin-BSA előállitása:

Vegyes-anhidrides módszerrel végeztük a kapcsolást.

A./ reakcióelegy: 50 mg /0,21 mM/ ^{14}C-szukcinil-monokolint 1 ml abs. DMF-ben szuszpendáltunk és 28 µl /0,21 mM/ KHIBE-t, 30 µl /0,21 mM/ TEA-t, majd 48 µl /0,21 mM/ tributilamint /TBA/ adtunk hozzá. 0 °C-on 2 percig állni hagytuk.

B./ reakcióelegy: 225 mg /3,3 µM/ BSA-t 10 ml dioxán-viz 1:1 arányu elegyében, 0,22 ml 1n NaOH hozzáadása után oldottunk.

A két elegyet egyesitettük és 4 órát 0 °C-on tartottuk. Dializáltuk, liofilizáltuk.

A hapténBSA hányadost aktivitás méréssel határoztuk meg; értéke 10 volt.

^{14}C-szukcinil-monokolin-BSA-0,4 % SDS előállitása:

Vegyes-anhidrides kapcsolást alkalmaztunk.

A./ reakcióelegy: 96 mg /0,4 mM/ ^{14}C-szukcinil-monokolint 8 ml abs. DMF-ben szuszpendáltunk és 90 µl /0,4 mM/ TBA-t, 52 µl /0,4 mM/ KHIBE-t adtunk hozzá. 0 °C-on tartottuk, mig oldatba nem ment.

B./ reakcióelegy: 150 mg /2,2 µM/ BSA-t oldottunk 10 ml d.v. és 1 ml 5 %-os SDS elegyében, majd 4 ml dioxánt adtunk hozzá.

A két reakcióelegy egyesitése után + 4 °C-on 4 órát állni hagytuk. Dializáltuk, kevés csapadék keletkezett, amelyet 5 000-s fordulatszámon 10 percig való centrifugálással különitettünk el. Liofilizáltuk; 90 mg liofilizátum keletkezett.

A hapténBSA értékét aktivitás méréssel határoztuk meg; eredményül 42-t kaptunk.

FMOC-β-Ala-OH előállitása:

4,45 g /50 mM/ H-β-Ala-OH-t 95 ml 10 %-os Na_2CO_3-ban oldottuk, majd 40 ml dioxánt adtunk hozzá és 0 °C-ra hütöttük. 1 óra alatt 11,5 g FMOC-Cl 80 ml dioxános oldatát csepegtettük hozzá. 1 órát 0 °C-on, majd 24 órát szobahőn kevertettük. Ezután 1 500 ml jeges vizre öntöttük, majd kétszer 250 ml éterrel extraháltuk. A vizes fázist 0 °C-ra hütöttük, a pH-t 2n H_2SO_4-gyel 2-re állitottuk, majd etilacetáttal háromszor extraháltuk. Az egyesitett szerves fázisokat d.v.-zel mostuk, nátriumszulfáton szárítottuk. A dioxánt lepároltuk, háromszor éterrel extraháltuk, majd

0 °C-ra hütve cc. HCl-val pH 2-re savanyitottuk. Fehér kristályok váltak ki, szürtük és savmentesre mostuk, majd száritottuk az anyagot.

Termelés: 12,4 g /79 %/ R_f^{11}: 0,90 R_f^{12}: 0,54

Op: 129-130 °C

FMOC-β-Ala-kolin előállitása:

10 g /30 mM/ FMOC-β-Ala-Cl-ot 20 ml abs. DMF-ben oldottunk és 1,85 g /13 mM/ kolin-kloridot adtunk hozzá. A pH-t TBA segitségével 6,0-6,5-re állitottuk. Pár óra alatt a kolin-klorid nagy része oldatba ment. 36 órát kevertettük szobahőn. Vákuumban bepároltuk, kloroformban felvettük és d.v.-zel extraháltuk. A vizes fázist kloroformmal extraháltuk, majd oktilalkohollal. Az oktilalkoholt vizzel, majd a vizes fázist ismét oktilalkohollal. A bepárlást követően igen higroszkópos anyagot kaptunk, ezért jellemzésre nem adott lehetőséget.

R_f^{11} : 0,10 R_f^{13}: 0,56 R_f^{14} : 0,47

H-β-Ala-kolin előállitása:

250 mg /55 mM/ FMOC-β-Ala-kolint 2,5 ml abs. metanolban oldottunk és 62 µl 4n NaOH-t adtunk hozzá. Egy éjszaka állni hagytuk. 12 óra elteltével - kromatogramm alapján - további 238 µl 4n NaOH-t adtunk még hozzá. 20 perc alatt a reakció lezajlott. A pH-t 7-re állitottuk, bepárlás után 2x2-szer éterrel, etilacetáttal, kloroformmal és abs. etanollal kifőztük. 58 mg NaCl-t tudtunk kiszürni. Az anyag tisztitását preparativ lapon végeztük.

Termelés: 204 mg R_f^{11} : 0,17 R_f^{12} : 0,22

Op: > 260 °C R_f^{13} : 0,08 R_f^{14} : 0,38

BSA-Muk-β-Ala-kolin előállitása:

Vegyes-anhidrides módszerrel végeztük a kapcsolást.

A./ reakcióelegy: 28,4 mg /0,2 mM/ mukonsavat 0,5 ml abs. DMF-ben oldottunk és 52 µl /0,4 mM/ KHIBE-t, 95 µl /0,4mM/ TBA-t adtunk hozzá és 10 percig légmentesen lezárva - 20 °C-on állni hagytuk.

B./ reakcióelegy: 47,7 mg /0,2 mM/ H-β-Ala-kolinhoz 47,5 µl /0,2 mM/ TBA-t adtunk, majd a fenti reakcióelegyhez csepegtettük. 60 percig - 20 °C-on állni hagytuk.

C./ reakcióelegy: 120 mg /1,76 µM/ BSA-t oldottunk 3 ml pufferben és 2 ml dioxánt adtunk hozzá.

Ezután A + B reakcióelegyet C-hez adtuk és 4 órát 0 °C-on tartottuk. Dializáltuk, liofilizáltuk.

Az UV-analizissel a mukonsav tartalmat mértük, ehhez 2 mg liofilizátumot oldottunk 5 ml d.v.-ben. A mérést 280 nm-en, 1 cm-es küvettában végeztük. Haptén/BSA 11 volt.

Aminosav analizissel a β-Ala-tartalmat mérve a haptén/BSA 9-10 volt.

Z-D-Glu-OH előállitása:

50 g /330 mM/ D-Glu-OH-hoz 350 ml 2n NaOH-t adtunk, majd keverés közben 0 °C-on egyszerre további 90 ml 4n NaOH-t és 50 ml /343 mM/ Z-Cl-ot csepegtettünk hozzá. 2 órát szobahőn kevertettük. Az oldat pH-ja 9 volt. Éterrel a feleslegben maradt Z-Cl-t kiextraháltuk, majd cc.HCl-vel a pH-t 2-re állitottuk és az oldatot etilacetáttal háromszor extraháltuk. D.v.-zel semlegesre mostuk, nátriumszulfáton szárítottuk, majd bepároltuk, n-hexánnal kristályositottuk.

Termelés: 50 g /49 %/ R_f^2 : 0,76

Op: 120-121 °C

Z-D-Glu/OH/-OMe x DCHA előállitása:

19,6 ml /140 mM/ abs. TEA és 250 ml abs. kloroform elegyéhez 38,7 g /140 mM/ Z-D-Glu-OH-t, majd 14,7 ml /158 mM/ dimetil-szulfátot adtunk. Szobahőn kálciumkloridos - cső védelme alatt egy éjjel állni hagytuk. Utána bepároltuk, a maradékot etilacetátban vettük fel, d.v.-zel mostuk, nátrium-szulfáton szárítottuk, majd fele térfogatra pároltuk és ekvivalens mennyiségü /27,5 ml, 140 mM/ DCHA-t adtunk hozzá. A kivált kristályokat szürtük.

Termelés: 47,2 g /73 %/ R_f^2 : 0,76

Op: 156-157 °C

γ-metilészter szennyezés eltávolitásához 900 ml vizből átkristályositottuk. A kivált anyagunk sulya: 29,7 g volt. Op: 170-171 °C.

Z-D-Glu/OH/-OMe előállitása:

DCHA-sójának felszabaditásával állitottuk elő. 14,5 g /31,6 mM/ Z-D-Glu/OH/-OMe x DCHA-t 60 ml d.v.-ben felszuszpendáltattunk és 40 ml 2n H_2SO_4-t adtunk hozzá és négyszer 70 ml etilacetáttal extraháltuk. Az egyesitett szerves fázist kétszer 15 ml 2n H_2SO_4-gyel kiráztuk, d.v.-zel semlegesre mostuk, nátriumszulfáton szárítottuk és vákuumban bepároltuk.

Termelés: 9,3 g /90 %/ R_f^2 : 0,76

Z-D-Glu/OBu^t/-OMe előállitása:

14 g /0,50 mM/ Z-Glu/OH/-OMe-t 100 ml abs. kloroformban oldottunk és 0,75 ml cc. H_2SO_4-et adtunk hozzá, majd - 10 °C-on 100 ml izobutént öntöttünk rá és légmentesen lezártuk. Három napig állná hagytuk. Utána bepároltuk a reakcióelegyet,

a maradékot 150 ml etilacetátban felvettük és négyszer 20 ml $NaHCO_3$-tal kiráztuk. D.V.-zel semlegesre mostuk, bepároltuk. Szintelen olajat kaptunk.

Termelés: 15,2 g /90 %/ R_f^1 : 0,92

Z-D-Glu/OBu^t/-OH előállitása:

10 g /30 mM/ Z-D-Glu/OBu^t/-OMe-t 50 ml dioxán-viz 1:1 arányu elegyében oldottunk és 33 ml /1,1 ekv./ 1n NaOH-ot adtunk hozzá. 1,5 óra mulva cc. HCl-lel a pH-t 7,0-re állitottuk. A dioxánt lepároltuk és a maradék pH-ját cc. HCl-val 1-esre állitottuk. Etilacetáttal extraháltuk, d.v.-zel semlegesre mostuk, nátriumszulfáton szárítottuk és bepároltuk. Nehezen kristályosodó olajat kaptunk.

Termelés: 9,3 g /95 %/ Op: 80-84 °C

DCHA-sóját képeztük: Op: 140-142 °C

H-D-Glu/OBu^t/-OH előállitása:

8,5 g /26,4 mM/ Z-Glu/OBu^t/-OH-t 100 ml abs. metanolban oldottunk, 0,5 g Pd/C katalizátort adtunk hozzá és hidrogént buborékoltattunk át rajta. Ezt 8 órán át végeztük, a katalizátort kiszürtük, a maradékot bepároltuk. A kapott kristályokat 30 ml forró metanolban oldottuk és kezdeti zavarosodásig etilacetátot adtunk hozzá. Egy éjszakára hütőbe tettük és utána a kivált kristályokat kiszürtük.

Termelés: 4,1 g /84 %/ R_f^4 : 0,11

Op: 183-185 °C

BOC-D-Glu/OBu^t/-OH előállitása:

2,2 g /12 mM/ H-D-Glu/OBu^t/-OH-t oldottunk 20 ml dioxán-viz 1:1 arányu elegyében, majd 10 ml 1n NaOH-t és 11 ml /11 mM/ BOC_2O-t. A pH-t 8-as értéken tartottuk és szobahőn egy éjjel kevertettük. Utána 0 °C-on pH 3-ra savanyitottuk és háromszor etilacetáttal extraháltuk, d.v.-zel mostuk, nátriumszulfáton száritottuk, bepároltuk.
3 g olaj keletkezett. R_f^1 : 0,48

DCHA-só képzés: a 3,0 g olajat 30 ml abs. éterben felvettük és 1960 µl DCHA-t adtunk hozzá. Hütőszekrényben fehér kristályok váltak ki.

Termelés: 4,1 g /72 %/ Op: 106-108 °C

DCHA-só felszabaditás: 2n H_2SO_4-val a már ismertetett módon. Fehér kristályok keletkeztek.

Termelés: 2,5 g /90 %/ R_f^1 : 0,85

Op: 102-103 °C

BOC-D-Glu/OBu^t/-BSA előállitása:

A már korábbiakban leirt módon, vegyes-anhidrides módszerrel végeztük a kapcsolást.

A./ reakcióelegy: 110 mg /33 mM/ BOC-D-Glu/OBu^t/-OH-t 1 ml abs. DMF-ben oldottunk, majd az oldatot - 5 °C-ra hütöttük és 46 µl /0,33 mM/ TEA-t, valamint 43 µl /0,33 mM/ KHIBE-t adtunk hozzá. 5 percre légmentesen - 10 °C-on állni hagytuk.

B./ reakcióelegy: 116 mg /1,70 µM/ BSA-t 5 ml d.v.-ben oldottunk, majd a pH-t 1n NaOH-dal 7,5-8,0-ra állitottuk.
A vegyesanhidridet 0 °C-on keverés közben B./ oldatba csepegtettük, 4 órát állni hagytuk.
Dializáltuk, finom pelyhes csapadék keletkezett, ezért 5 000-es fordulatszámon 15 percig centrifugáltuk, majd a felüluszót liofilizáltuk.

A BOC-védőcsoportot 1 óráig 75 %-os TFA-val távolitottuk el. Dializáltuk, majd liofilizáltuk: 90 mg anyagot kaptunk.

Aminosav-analizis eredménye alapján 50 glutaminsav kapcsolódott fel BSA-molekulánként.

BOC-D-Glu/OBu^t/-BSA-karbamid előállitása:

Vegyes-anhidrides kapcsolással állitottuk elő.

A./ reakcióelegy: 320 mg /1,1 mM/ BOC-D-Glu/OBu^t/-OH-t 1 ml abs. dioxánban oldottunk, hozzáadtunk 130 µl /1 mM/ KHIBE-t és 140 µl /1 mM/ TEA-t. 0 °C-on 5 percig állni hagytuk.

B./ reakcióelegy: 600 mg /8,8 µM/ BSA-t 4 ml d.v.-ben oldottunk, a pH-t 8-ra állitottuk és 35 ml 8 M-os karbamidot /viz; metanol 1:1/ adtunk hozzá. A pH-t ellenőriztük és a két reakcióelegyet lassan egyesitettük. Két órát + 4 °C-on, majd szobahőn kevertettük. Dializáltuk, liofilizáltuk, 680 mg liofilizátum keletkezett.

Védőcsoport eltávolitást 85 %-os TFA-ban, 2 óráig 20 °C-on végeztük. Ismét dializáltuk, liofilizáltuk. 500 mg vizoldékony anyagot kaptunk.

Aminosavanalizis alapján a haptén/BSA hányados értéke 30 volt.

1./ Karboxilált neurotranszmitterek kapcsolása AH-Sepharose-hoz:

Az AH-Sepharose-t irodalmi előirat alapján készitettük: Sepharose-4B brómciános aktiválásával 1,6-diamino-hexánt kapcsoltunk a hordozóhoz /C.Lowe, G.Dean; Affinity Chromatography/. 1 mmól BOC-védett neurotranszmitter-karbonsavat /BOC-DOPS, BOC-DOPA, BOC_2-His, BOC-Glu/OBu^t/-OH, stb./ kb. 4 ml DMF-ben oldunk, 0 °C-on hozzáadtunk 0,14 ml /1 mM/ trietilamint és 0,14 ml /1 mM/ klórszénsav-izobutilésztert. 3 perc keverés után a vegyes anhidrid oldatát 20 ml Sepharose-hoz öntöttük, amely 20 ml DMF-aceton-viz 2:2:1 arányu elegyben volt szuszpendálva. 1 napig + 4 °C-on rázattuk a szuszpenziót, az adszorbenset a fenti eleggyel, majd vizzel alaposan mostuk.

Ezzel a módszerrel átlagosan $\sim 10^{-3}$ M/kg koncentrációban tudtunk neurotranszmittereket a hordozóra kapcsolni.

A védőcsoport eltávolitás előtt a Sepharose-gyöngyöket viz-aceton, majd aceton-CH_2Cl_2 gradienssel dehidratáltuk. /Mosás 20 %, 50 %, 80 % acetont tartalmazó viz-aceton eleggyel, vizzel, majd 20-50-80 % CH_2Cl_2-t tartalmazó aceton-CH_2Cl_2 eleggyel, végül CH_2Cl_2-vel.

A kiszáritott Sepharose-gyöngyöket 30 ml trifluorecetsavban szuszpendáltuk, 1 óra mulva a savat üvegszürőn leszivattuk és a gyöngyöket az előbbivel ellentétes oldószergradienssel rehidráltuk. /CH_2Cl_2, majd aceton, végül viz./ A Sepharose-neurotranszmitter konjugátumokat pH = 4,5-ön 0,1 M acetát pufferben + 4 °C-on tároltuk, a baktériumos lebomlást 0,02 % Na-azid hozzáadásával akadályoztuk meg.

2./ BSA-neurotranszmitter konjugátumok kapcsolása AH-Sepharose-hoz /általános előirat/

10 g nuccsszárazra leszivatott AH-Sepharose gyöngyöt 10 ml pH = 7,4-es 0,1 M-os foszfát pufferben szuszpendáltuk, hozzáadtunk 1-2 ml pufferben oldott 50 mg BSA-neurotranszmitter konjugátumot, amelyek az antigénszintézisek mintájára formaldehides kondenzációval készültek. Ez után 1,0 ml 0,25 %-os vizes glutáraldehid oldatot adtunk a szuszpenzióhoz és 20 °C-on 24 órán át rázattuk. A Sepharose-gyöngyöket kiszürtük, először pufferrel, majd d.v.-zel mostuk, végül pH= 4,5-ön 0,1 M-os acetát pufferben tároltuk az adszorbenseket, amely 0,02 % Na-azidot is tartalmazott.

Fenti módszerrel a következő affinitás adszorbenseket állitottuk elő - 10-10 g-os mennyiségben:

Adrenalin-BSA-AH-Sepharose
Noradrenalin-BSA-AH-Sepharose
Dopamin-BSA-AH-Sepharose
Szerotonin-BSA-AH-Sepharose
Hisztamin-BSA-AH-Sepharose
Szukcinilkolin-BSA-AH-Sepharose

Valamennyi adszorbens kb. 10^{-3}-10^{-2} M/l koncentrációban tartalmazta az analitikai mérések szerint a neurotranszmittereket.

3./ Analitikai ellenőrzési módszerek

A neurotranszmitterek koncentrációját a hordozón a következő módszerekkel határoztuk meg:

a./ Aminosav analizis

200 mg nuccsszárez Sepharose-neurotranszmittert szuszpendáltunk 1 ml merkapto-etán-szulfonsav /MES/ 3 M-os vizes oldatában és 50 Hg μ vákuumban leforrasztottuk a szuszpenziót, majd 24 óráig 110 °C-on hidrolizáltuk az anyagot.

A hidrolizátumot közömbösités után közvetlenül felvittük az aminosav analizátor ioncserélő oszlopára és meghatároztuk az aminosavak, ill. karboxilált neurotranszmitterek koncentrációját.

b./ Ultraibolya spektrofotometria

1 mm-es kvarcküvettában mértük 270, ill. 280 nm-nél a neurotranszmitter-Sepharose konjugátumok fényabszorpcióját ülepitett gélnél a kiindulási Sepharose-ra vonatkoztatva. Az extinció értékéből a moláris extinciós koefficiens ismeretében a koncentráció kiszámitható.

AH-Sepharose-on immobilizált neurotranszmitterek jellemzése

Neurotranszmitter, ill. származéka	Koncentráció a hordozón		Mérési módszer
A./ sorozat:			
DOPS	$3{,}30\times10^{-2}$	M/l	UV
D-DOPA	$3{,}80\times10^{-3}$	M/l	UV
L-DOPA	$3{,}30\times10^{-3}$	M/l	UV
D-Hisztamin	$2{,}20\times10^{-3}$	M/kg	AA*
DL-5-OH-Trp	$1{,}10\times10^{-2}$	M/l	UV
D-Glu/OBu^t/-OH	$2{,}85\times10^{-3}$	M/kg	AA*
L-Glu/OBu^t/-OH	$2{,}35\times10^{-3}$	M/kg	AA*
^{14}C-SMC	$2{,}10\times10^{-3}$	M/l	radioaktivitás mérés
B./ sorozat:			
Adrenalin-formaldehid-BSA	$7{,}25\times10^{-4}$	M/l	UV
Noradrenalin-formaldehid-BSA	$1{,}97\times10^{-5}$	M/l	UV
Dopamin-formaldehid-BSA	$1{,}87\times10^{-5}$	M/l	UV
Hisztamin-formaldehid-BSA	$1{,}50\times10^{-4}$	M/l	UV
Formaldehiddel kezelt BSA	$1{,}42\times10^{-4}$	M/l	UV

Megjegyzés:

M/l ülepített gélre vonatkozik

M/kg nucscszáraz gél sulyára vonatkozik

AA* aminosav analizis

IV. ÖSSZEFOGLALÁS

A neurotranszmitter funkcióval rendelkező anyagok élő szervezeten, szöveteken belüli lokalizációjának, ill. koncentrációjának meghatározásához alkalmas immunhisztokémiai és RIA módszerekhez neurotranszmitter antigéneket állitottunk elő. Affinitás kromatográfiához /antiszérumok tisztitása/ a neurotranszmittereket Sepharose-gyöngyökhöz kapcsoltuk. Az igy nyert immobilizált származékok egyéb célokra, igy pl. affinitás mikroszkópiához és az antiszérumok fajlagosságának ellenőrzéséhez is alkalmasak lehetnek.

Eredeti elképzeléseinkkel szemben a RIA, ill. immunhisztokémiai vizsgálatokhoz más és más antigénekre volt szükség. A formaldehides kapcsolással előállitott katekolamin antigének immunfluoreszcencia-mikroszkópos vizsgálatokhoz kiválóan megfeleltek, de RIA céljára más szempontok figyelembe vételével kellett az antigéneket szintetizálni.

Formaldehides kapcsolással előállitottuk az adrenalin, noradrenalin, dopamin, hisztamin és szerotonin BSA-hoz kapcsolt konjugátumát.

A haptén/BSA mólarányt karbamid és SDS segitségével növelni tudtuk, ami várhatóan az antigén sajátságok javitását eredményezi.

RIA-hoz, ill. kedvezőbb tulajdonságu antigének előállitásához szintetizáltuk a neurotranszmitterek karboxilált származékait.

Az "adrenalin-karbonsav" előállitása egy váratlan gyürüzárási reakció miatt nem járt sikerrel. Előállitottuk a DOPS-t, /ill. Bzl_2-DOPS-t/, a noradrenalin karboxilált származékait. Acetilkolin helyett a szukcinil-monokolint /ill. ^{14}C-SMC-t/ kapcsoltuk BSA-hoz, mivel hosszabb láncu és karboxilcsoportja miatt jobb kapcsolási lehetőséget és jobb antigén sajátságokat igért.

A karboxilcsoportot tartalmazó neurotranszmitter-származékokat kapcsoltuk vegyes-anhidrides módszerrel BSA-hoz. Kapcsolás előtt - a SMC kivételével - szükség volt a haptén aminocsoportjának védésére.

Elvégeztük az antigénszintéziseket az L-izomereken kívül a jobb antigenitást igérő D-módosulatokkal is.

A noradrenalin helyett a DOPS-t, dopamin helyett a DOPA-t, szerotonin helyett az 5-OH-triptofánt, hisztamin helyett a hisztidint, γ-amino-vajsav helyett glutaminsavat és acetilkolin helyett SMC-t, ill. mukonil-kolint kapcsoltunk BSA-hoz. Az immobilizált származékok előállitásakor ugyanezekkel a helyettesitésekkel dolgoztunk.

Az eddigi tapasztalatok szerint immunhisztokémiai kimutatási célokra a formaldehides kapcsolással előállitott antigének közül az adrenalin-, noradrenalin- és a szerotonin antigén jól, a hisztamin antigén pedig korlátozottan alkalmazható.

V. IRODALOM

1. KNOLL J.
Gyógyszertan, Medicina /1976/

2. VIZI SZ.
A biológia ujabb eredményei 12. kötet

3. PASSON P.G., PENLER J.D.
A simplified radiometric assay for plasma norepinephrine and epinephrine
Anal. Biochem. 51, 618-631 /1973/

4. DA PRADA, ZÜRCHER G.
Life. Sci. 19, 1164-1174 /1976/

5. ENDERT E.
Clin. Chim. Acta 96, 233-239 /1979/

6. HJEMDAHL P., DALESKOG M., KAHÁN T.
Life. Sci. 25, 131-138 /1979/

7. YOSHIKI Y.
Anal. Biochem. 108, 11-15 /1980/

8. COHEN E., GOLDENBERG M.,
J. Neurochem. 2, 71-80 /1957/

9. ANTON H.A., SHYRE W.F.
J. Pharm. Exp. Ther. 138, 360-375 /1962/

10. VALORI C., BRUNORI C.H., RENZINI V., COREA
Anal. Biochem. 33, 138-167 /1970/

11. FALCK B.
Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method
Acta Physiol. Scand. 56, Suppl. 197, 1-25 /1962/

12. FALCK B., HILLARP N.A., THIEME G., TORP A.
Fluorescence of catecholamines and related compounds with formaldehyde
J. Histochem. Cytochem. 10, 348-354 /1962/

13. COONS A.H.
Fluorescent antibody methods
In: General Cytochemical Methods
Academic Press, New York 1958

14. GEFFEN L.B., LIVETT D.G., RUSH R.A.
Immunohistochemical localization of protein components of catecholamine storage vesicles
J. Physiol. /Lond./ 204, 593-605 /1969/

15. HÖKFELT T., FUXE K., GOLDSTEIN M., JOH T.H.
Immunohistochemical studies of three catecholamine synthesizing enzymes: aspects on methodology
Histochemie 33, 231-254 /1973/

16. GERVAIS A.G.
Localization of transplantation antigens in tissue preparations other than frozen sections
Experientia /Basel/ 28, 342-343 /1972/

17. MIDGLAY A.R., NISWENDER G.E.
Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Phisiology
E. Diczfalusy, Ed., Botrykstiet Forum,
Copenhagen, 1970, 320.

18. NITECKI D.E., WOODS V., GOODMAN J.W.
Advances in experimental medicine 86/B,
Ed: M. Friedman, "Protein crosslinking" 139-148

19. WENT S., KESZTYÜS L.
Naunyn-Schmiedeberge Arch. 193, 609-614 /1939/

20. FRANKEL-CONRAT H., COOPER M., OLCOTT H.S.
J. Am. Chem. Soc. 67, 950 /1945/

21. WORMELL R.L., KAYE M.A.G.
J. Soc. Chem. Ind. 64, 75 /1945/

22. FRANKEL-CONRAT H., OLCOTT H.S.
J. Biol. Chem. 174, /1948/

23. SWAIN A.P., KOKES E.L., HIPP N.J., WOOD J.L., JACKSON R.W.
Ind. and Enq. Chem. 40, 465 /1948/

24. FRANKEL-CONRAT H., BRANDON B.A., OLCOTT H.S.
J. Biol. Chem. 168, 99 /1947/

25. DEWAR M.K., JOHNS R.B., KELLY D.P., YATES J.F.
Aust. J. Chem. 28, 917-924 /1975/

26. TOME D., NAULET N.
Int. J. Peptide Protein Res. 17, 501-507 /1981/

27. GROTA L., BROWN G.M.
Endocrinology 98, 615 /1976/

28. MIWA A., YOSHIOKA M., SHIRAHATA A., NAKAGAWA Y., TAMURA Z.
Chem. Pharm. Bull. 24, /6/ 1422-1424 /1976/

29. DOTY J.
Anal. Chem. 20, 1166 /1948/

30. MIWA A. YOSHIOKA M., SHIRAHATA A., TAMURA Z.
Chem. Pharm. Bull. 25, /8/ 1904-1910 /1977/

31. MIWA A., YOSHIOKA M., TAMURA Z.
Chem. Pharm. Bull. 26, /11/ 3347-3352 /1978/

32. SPECTOR S., COSTA E., GREENGARD P.
Advances in biochem. Psychopharmacology /1969/
Raven press.

33. SPECTOR S.
U.S. Patent, 3704282, Nov. 28. 1972. 1-8.

34. SPECTOR S., DALTON C., FELIX A.M.
Frontiers in Catecholamine 1973. pp. 345-349.
Pergamon Press. Printed in Great Britain

35. RICHARDSON J.B., BOUCHARD I., BOYD G.N.
Can. J. Physiol. Pharmacol 55, 895-903 /1977/

36. CHENG L.T., KIM S.Y., CHUNG A., CASTRO A.
Febs Letters 36, 3. 339-342 /1973/

37. GROSS S.J.
U.S. Patent, 3940475, Feb. 24. 1976. 42-46.

38. FARAJ B.A., CAMP V.M., PRUITT A.W., ISAACS J.W., ALI F.M.
J. Nucl. Med. 18, 1025-1031, 1977.

39. KEETON T.K., KRUTZSCH H., LOVENBERG W.
Science 211, 586-588. 6. Febr. /1981/

40. FELL N., RODNEY G., MARSCHALL D.E.
J. Immunol. 47, 237 /1943/

41. COHEN M.B., FRIEDMAN H.J.
J. Allergy 18, 7-12, /1947/

42. RODNEY G., FELL N.
J. Immunol. 47, 251-259 /1943/

43. FELL N.H.
U.S. Patent 2372066 Mar. 20. 1945.

44. DAVIS T.R.A., MEADE K.M.
Nature, 226, 360, 25. Apr. 1970.

45. MARTIN C.J., LAM D.P., MARINI M.A.
Bioorganic Chemistry 4, 22-29 /1975/

46. KOVÁCS P., CSABA GY.
Acta histochem. 66, 50-58 /1980/

47. FILIPP G., SCHEIDER H.
Acta Allergologica XIX, 216-228 /1964/

48. RANADIVE N.S., SEHON A.H.
Canadien Journal of Biochem. 45, 1681-1689 /1967/

49. SPECTOR S., BERKOVITZ B., FLYNN E.J., PESKAR B.
Pharmacological Reviews 25, 281-291 /1973/

50. PESKAR B., SPECTOR S.
Science 179, 1340-1341 /1973/

51. RANADIVE N.S., SEHON A.H.
Can. J. Biochem. 45, 1701-1710 /1967/

52. LEMAITRE B.J., OLLIER-HARTMANN M.P., HUSSON H.P., HARTMANN L.
C.R. Soc. Biol. 174, 661-675 /1980/

53. STEINBUSCH H.W.M., VERHOFSTAD A.A.J., JOOSTEN H.W.J.
Neuroscience 3, 811-819 /1978/

54. BUFFA R., CRIVELLI O., LAVARINI C., SESSA F., VERME G., SOLCIA E.
Histochemistry 68, 9-15 /1980/

55. KELLUM J.M., JARFE B.M.
Gastroenterology 70, 516-522 /1976/

56. DELAAGE M.A., PUIZILLOUT J.J.
J. Physiol., Paris 77, 339-347 /1981/
Symposium The Serotoninergic Neuron, C.N.R.S., Marseille, July 9-11 /1980/

57. SPECTOR S., FELIX A., SEMENUK G., FINBERG J.P.M.
Neurochemistry, 30, 685-689 /1978/

58. KAWASHIMA K., ISHIKAWA H., MOCHIZUKI M.
J. Phsm. Met. 3, 115-123 /1980/

59. HEGEDÜS B., KRASSÓ A.F., NOACK K., ZELLER P.
Helv. Chem. Acta 58, 147 /1975/

60. OLSEN
J. Org. Chem. 35, /6/ 1912 /1970/

61. HRUBY
J. Org. Chem. 35,/1970/ 1690

62. SCHRÖDER E.
Justus Liebigs' Ann. Chem 670, 127 /1963/

63. COGGINS
Can. J. Chem., 49, 1968 /1971/, 51, 1915 /1973/

64. HEGEDÜS B.
Helv. Chem. Acta 58, 157 /1975/

65. BODOR N., SLOAN K.B., HIGUCHI T., SASAHARA K.
J. Medicin. Chem., 20, 1435 /1977/

66. CUATRECASAS P.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 450-457 /1969/

67. CUATRECASAS P., PARIKH J.
Methods in Enzymology 34, 657-660 /1975/

68. SELINGER R., CIVEN M.
Biochem. biophys. Res. Commun. 43 /1971/

69. HURWITZ E., DIETRICH F., SELA M.
European J. Biochem. 17, 273 /1970/

70. LOWE C.R.
"An introduction to affinity chromatography"
North Holland Publ. Co., Amsterdam-NY.-Oxford
380-395 /1979/

71. ROTMAN A.
Brain Research 146, 141-144 /1978/

1970
82

Köszönetet mondok Dr. Kovács Kálmán professzornak, a kémiai tudományok doktorának, az intézet vezetőjének, hogy disszertációm elkészitését intézetében lehetővé tette és munkámat figyelemmel kisérte.

Megköszönöm témavezetőmnek, Dr. Penke Botondnak, a kémiai tudományok kandidátusának a témaválasztásban, valamint kisérleti munkám során nyujtott sokirányu segitségét, továbbá a disszertáció megirásához adott tanácsait, utmutatásait.

Köszönöm Dr. Varga János egyetemi tanársegédnek kisérleti munkám során nyujtott folyamatos segitségét és egyéb irányu hasznos tanácsait.

Az aminosavanalizisek és az ábrák elkészitését Ferenczi Richardnak köszönöm meg. Az NMR spektrumok elkészitését Pelczer Istvánnak és Dombi Györgynek, az UV és IR spektrumokat pedig Kiss Jánosnak köszönöm meg.

Szeretnék köszönetet mondani az intézet minden dolgozójának - köztük Dr. Zarándi Mártának és Dr. Tóth Gábornak - akik segitséget nyujtottak munkámhoz.