ÖSSZEHASONLITÓ VIZSGÁLATOK PATKÁNY AGY ÉS MÁJ MONOAMIN OXIDÁZ ENZIMJÉVEL

Doktori értekezés

Kigyóssy Zsoltné /Torday Csilla/

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biologiai Központ, Biokémiai Intézete

6701 Szeged, Odesszai krt. 62.

Készült: 1976-ban

B1415

TARTALOMJEGYZÉK

IRODALOM . . . . . .1-18. oldal

Problémafelvetés, célkitüzések . . . . . 18-19. "

MÓDSZEREK . . . . . 20-43. "

EREDMÉNYEK . . . . . 44-62. "

EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE . . . . . 63-67. "

ÖSSZEFOGLALÁS . . . . . 68-70. "

Röviditések jegyzéke . . . . . 71. "

Irodalomjegyzék . . . . . 72-76. "

Vegyszerlista . . . . . 77. "

IRODALOM

A monoamin oxidáz /MAO/ elnevezés általánosan elfogadott 2 enzimcsoportra.

Az egyik a mitokondriális MAO, mely az un. biogén monoaminok /katekolaminok, indolaminok/ és más monoaminok oxidativ dezaminálását katalizálja és membránhoz kötött állapotban fordul elő.

A másik a plazma amin oxidáz, mely a benzilamin spermin és spermidin oxidativ dezaminálását végzi. Ez utóbbi szolubilis enzim, melyet marha plazmából kristályositottak Yamada és mtsai /1/.

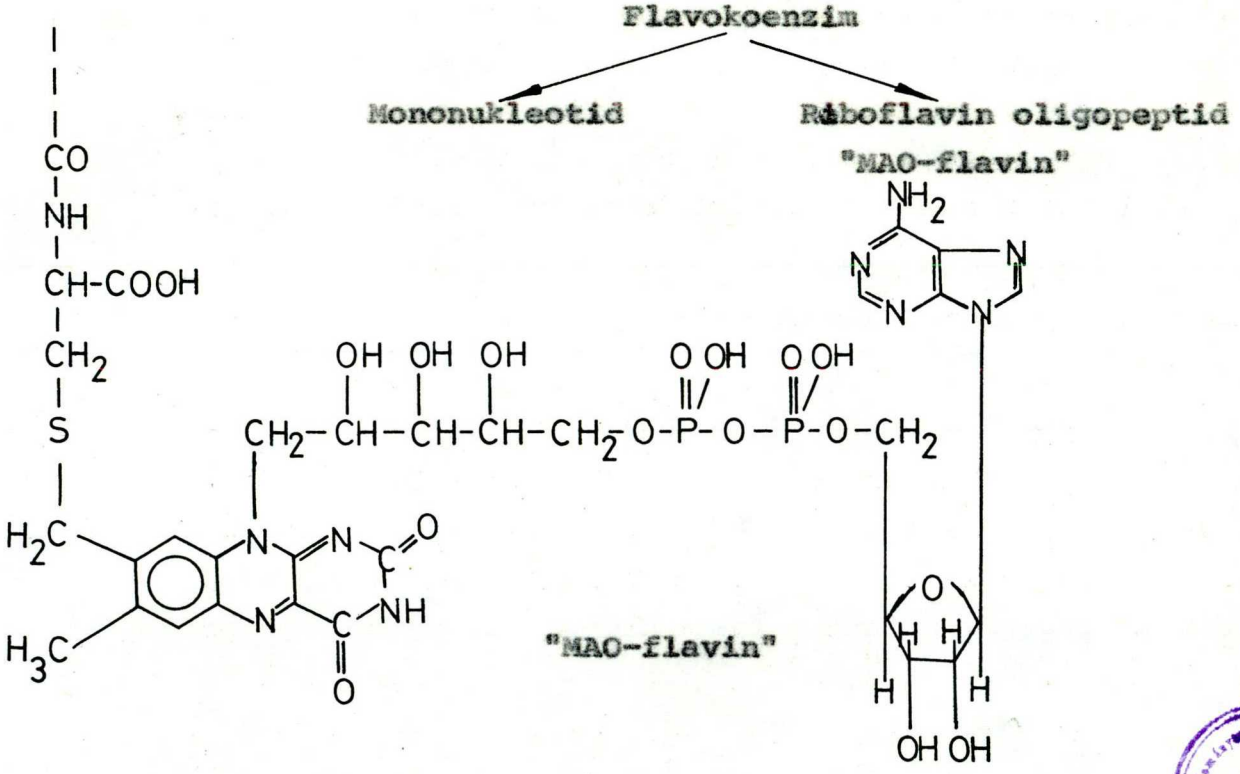
A vizsgálataim tárgyát képező mitokondriális monoamin oxidáz enzim /EC 1.4.3.4./ az agy és idegrendszer működésében fontos biogén monoaminok anyagcseréjében játszik igen jelentős szerepet, mint metabolizáló enzim. A katekolaminok, valamint indolaminok oxidativ dezaminálását végzi szövetekben, mig a másik bontó enzim a katekol-O-metil-transzferáz /COMT/ az exogén, vérben keringő katekolaminok inaktiválásában vesz részt /2/.

A központi és perifériás idegrendszerben egyaránt megtalálható. Főleg a szinaptikus idegvégződésekben fordul elő membránhoz kötött formában, a neuronok mitokondriumaiban.

Az utóbbi időben került az érdeklődés középpontjába az emóció és magatartás szabályozásában betöltött fontos szerepe folytán. Ezenkivül igen nagy jelentőségük van a MAO gátlóknak a skizofrénia, valamint különféle depressziós betegségek terápiájában.

A MAO-t először 1928-ban irták le tiramin oxidáz néven /3/. Későbbiekben tisztázták, hogy a tiramin oxidáz, noradrenalin oxidáz elnevezés egyetlen enzimet takar /4/. Zeller különböztette meg a "klasszikus" monoamin oxidáz enzimet a diamin oxidáztól szubsztrát, valamint inhibitorspecificitás alapján /5/. Az intracelluláris MAO a mitokondrium külső membránjának komponense /6/. Szolubilissá detergenskezelés /7,8,9/, ultrahangozás /10/, ismételt fagyasztás és felolvasztás /11/, valamint szerves oldószerrel történő extrahálás /12/ utján tehető. Az enzim flavoprotein és feltételezik, hogy a flavin az, ami redukálódik, illetve részben redukálódik a reakció során. Mint flavoenzim 1 mol flavin kofaktort /FAD/ tartalmaz, amely kovalens kötéssel kötődik a proteinhez.

S. Ghisla és P. Hemmerlich bizonyitotta a "MAO flavin" szerkezetét és szintetizálta 1971-ben /13/.



A peptid-lánc a flavin nukleuszhoz a 8-C atomon át kapcsolódik. A 8-C atomhoz α helyzetben tioéter kötéssel kötődő aminosav a cisztein. 8 mol SH csoportot /10^5 g fehérje/ tartalmaz az enzim. A nativ enzim molekulasulya 1-4. 10^5-ig változik a különböző fajokban és szervekben.

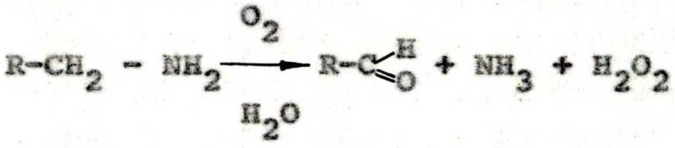
A monoamin oxidáz enzim oxidative dezaminálja a monoaminokat, a hisztamin, valamint a rövidláncu diaminok dezaminálására nem képes. Karbonil reagensekkel /hidrazin, szemikarbazid, CO/ szemben rezisztens. A mitokondriális MAO nem tesz különbséget a primer aminok és N-metilált származékok között. Mindkettő egyaránt szubsztrátja. Akkor szubsztrátja a szekunder amin a MAO-nak, ha a szekunder amino csoporton a szubsztituens metil csoport. Alifás primér aminok homológ sorában legjobb szubsztrátjai az amil ill. hexilamin. Hosszabb szénláncuaknál fellépő alacsonyabb oxidációs arány valószinü rossz szolubilizálódási készségüknek ill. micellaképzésre való hajlamuknak köszönhető.

A tipikus diamin oxidáz /DAO/ szubsztrátok /putreszcin és kadaverin/ nem szubsztrátjai a MAO-nak, ugyanakkor a heptametilén diamin már igen és a metilén csoportok számának növekedésével nemcsak az oxidáció mértéke, hanem a MAO iránti affinitásuk is megnő. Mindezek oka valószinüleg az, hogy a rövidláncu diaminok esetében az amin és az enzim kapcsolódását zavarja a második amino csoport jelenléte. A két amino csoport közti növekvő intramolekuláris távolsággal ez a zavaró effektus valószinüleg csökken és az enzim-szubsztrát komplex létrejöttéhez kedvezőbbek a feltételek.

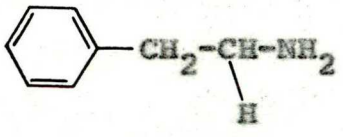
Ha az αC atomon metil csoport a szubsztituens, az amin már nem szubsztrát, hanem inhibitor. Valamint nem

szubsztrátjai az enzimnek azok az aromás aminok, melyeknél az amino csoport közvetlenül a gyürühöz kapcsolódik /pl. anilin/.

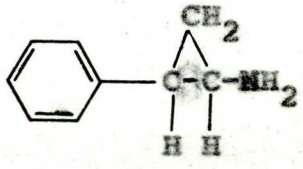
A monoamin oxidáz a következő reakciót katalizálja:



A reakció lejátszódása valószinüleg imin intermedieren keresztül történik.
Zeller /14,15/ hivta fel a figyelmet a strukturális analógiára a MAO szubsztrátok és gátlószerek között. Példaként emlithető a feniletilamin, mint az enzim egyik optimális szubsztrátja, valamint a transz-2-fenilciklopropilamin, a MAO egyik legaktivabb gátlószere között fennálló feltünő szerkezeti hasonlóság.



feniletilamin

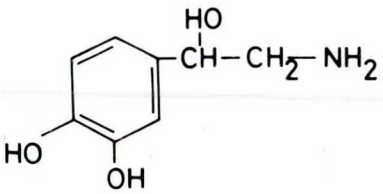


transz-2-fenilciklopropilamin
/Tranylcyprimin/

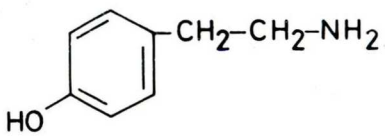
A monoamin oxidáz enzim főleg a gerincesekben, de a gerinctelenekben is megtalálható. Kimutatható a legkülönfélébb szövetekben: igy az idegrendszerben, sima izomszövetben, mirigyekben. Magas MAO aktivitást mutat a máj, agy, vese aorta, bél, az uterus és a placenta. Megtalálható az eritrocitákban, a vérplazmában és vérlemezkékben egyaránt. Jelentős MAO aktivitás mutatható ki kagylók ganglionjaiból is.

A MAO legfontosabb fiziológiásan elő-fordulő szubsztrátjai

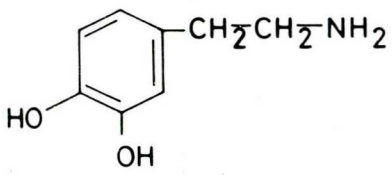
MAO Szubsztrátok



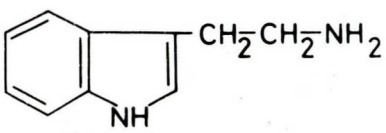
Noradrenalin



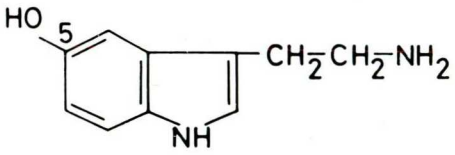
4-OH-feniletilamin
Tyramin



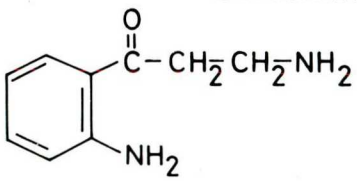
3,4-dihidroxi-feniletilamin
Dopamin



Tryptamin



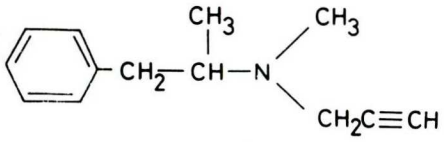
5-OH-tryptamin
Serotonin



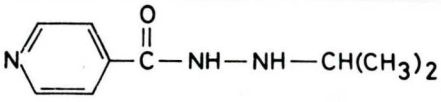
Kynuramin

MAO gátlók

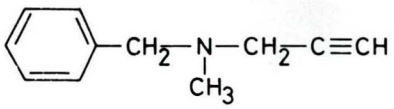
Szubsztrát szelektív



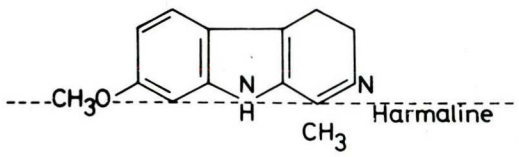
E-250 (Deprenil)



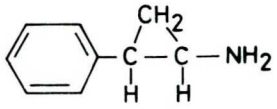
Iproniazid
(1-isonicotinyl-2-isopropylhydrazine)



Pargyline
(N-methyl-N-2-propynylbenzylamine)

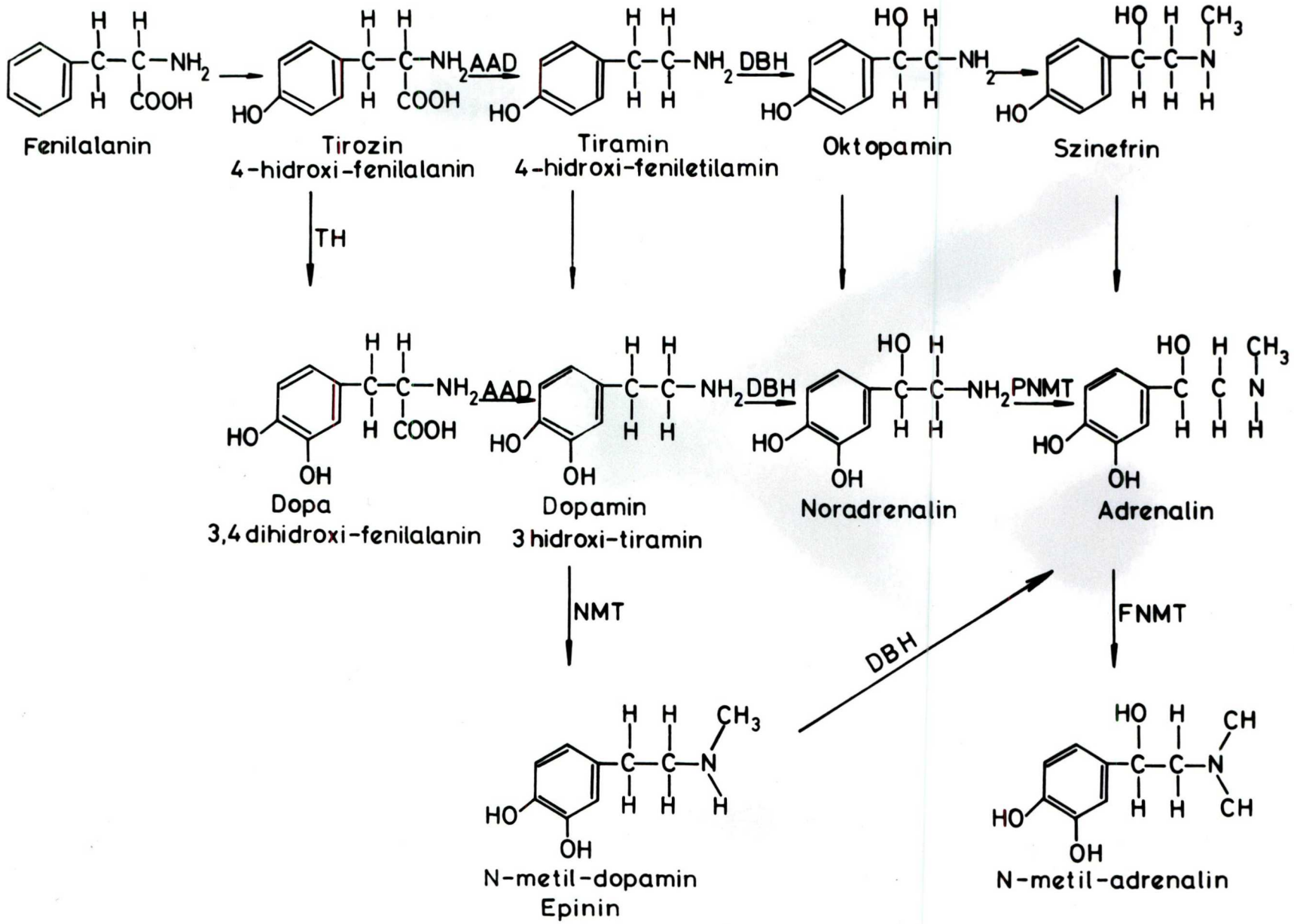


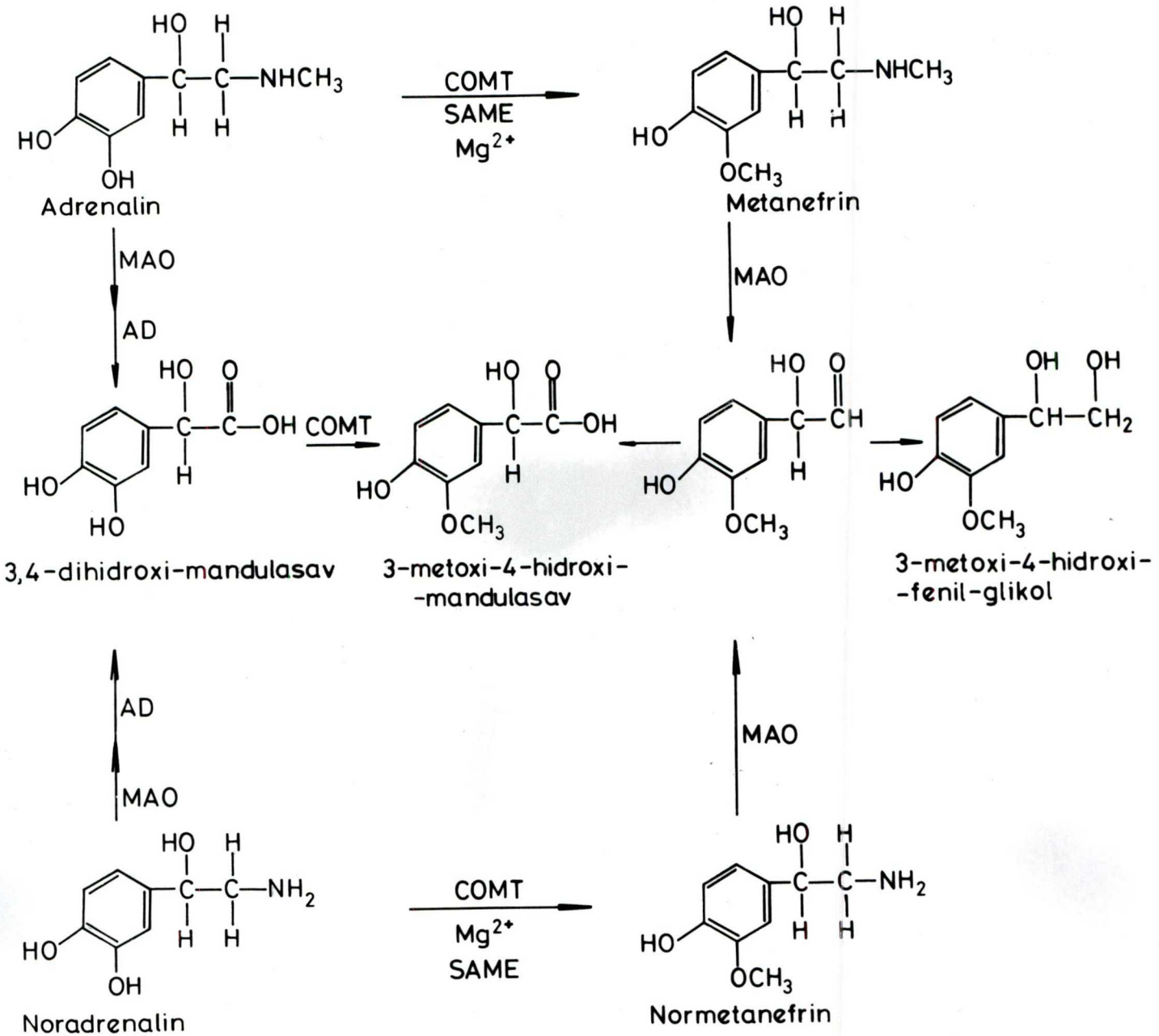
Nem szubsztrát szelektív



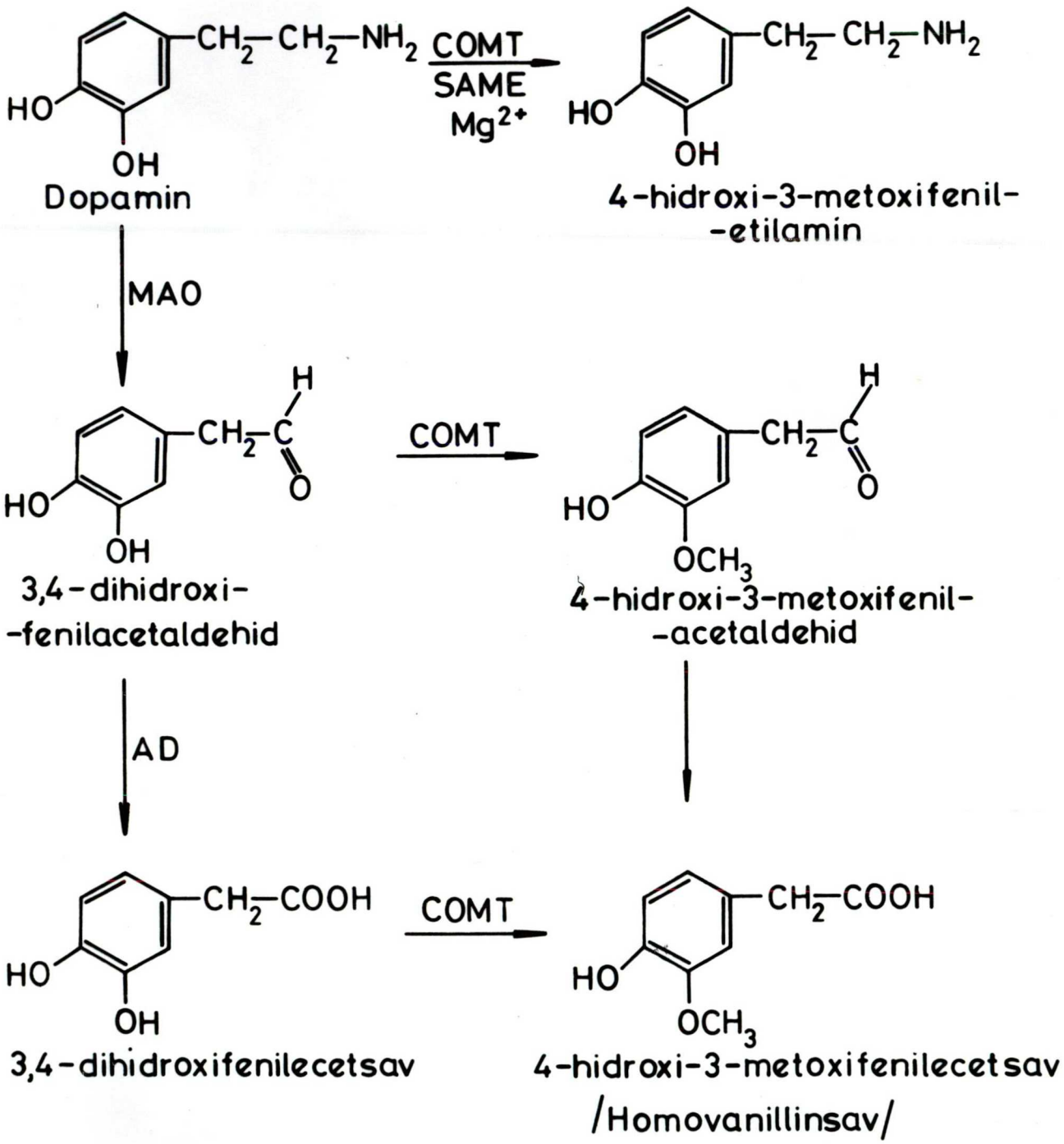
Tranylcypromine
(2-phenylcyclopropylamine)

A következő 3 oldalon összefoglaló táblázatok mutatják a MAO legfontosabb szubsztrátjai, a katekolaminok bioszintézisét és lebontását a MAO valamint egyéb, a metabolizmusban résztvevő enzimek által:


Fenilalanin
Tirozin
4-hidroxi-fenilalanin
AAD
Tiramin
4-hidroxi-feniletilamin
DBH
Oktopamin
Szinefrin
TH
Dopa
3,4 dihidroxi-fenilalanin
AAD
Dopamin
3 hidroxi-tiramin
DBH
Noradrenalin
PNMT
Adrenalin
NMT
DBH
FNMT
N-metil-dopamin
Epinin
N-metil-adrenalin


Adrenalin
COMT
SAME
Mg2+
Metanefrin
MAO
AD
3,4-dihidroxi-mandulasav
COMT
3-metoxi-4-hidroxi--mandulasav
3-metoxi-4-hidroxi--fenil-glikol
AD
MAO
MAO
Noradrenalin
COMT
Mg2+
SAME
Normetanefrin

DOPAMIN METABOLIZMUSA



A monoamin oxidáz enzim nemcsak eltérő tulajdonságokkal jelentkezik a különböző fajokban, hanem egyazon faj különböző szerveiben is más és más tulajdonságokat mutat.

1968-ban Youdim és Sandler /16/ poliakrilamid gél elektroforézissel, szolubilizált patkány máj és agy mitokondrium frakcióból MAO izoenzimeket mutattak ki, melyekről a későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy nem tekinthetők a korábbi értelemben vett izoenzimeknek. "Izoenzim" elnevezés alatt különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal /eltérő pH ill. hőmérsékletoptimum, valamint szubsztrát ill. inhibitoraffinitás/ rendelkező, ugyanazt a reakciót katalizáló különböző fehérjéket értünk. Az izoenzimek keletkezése genetikusan determinált. Gének szabályozzák az egyes enzimek spcificitását azáltal, hogy meghatározzák az enzimet felépitő polipeptid láncok primer szekvenciáját /monogénes, alléles és nem alléles izoenzimek/.

Az elsődlegesen szintetizálódott polipeptidlánc további változáson mehet keresztül: polimerizáció /különböző vagy azonos aminosav összetételü alegységek kapcsolódása folytán konformációs változás/ vagy egyéb módon történő modifikáció, pl. kismolsulyu anyagoknak /kofaktor, gátlószer/ vagy lipidnek az enzimfehérjéhez oly módon történő kapcsolódása során, amikor ez a kapcsolódás az aktiv centrumot nem érinti, valamint limitált proteolizis révén.

Korábban csak azokat a multimereket tekintették izoenzimeknek, melyek a konstituens polipeptidláncok aminosav összetételében különböztek, tehát a primer struktura genetikusan determinált változása folytán keletkeztek.

SZEGED

Ma az "izoenzim" fogalom kibővült és alkalmazása sem egységes a szakirodalomban. Véleményem szerint mind az izoenzim fogalom, mind a MAO multiplicitás terén meglevő tisztázatlan kérdések miatt helyesebb a továbbiakban a multiplex enzim kifejezést használni.

A MAO multiplex strukturáju enzim, a MAO multimereket megkülönböztették szubsztrátspecificitásuk /16, 17/, inhibitor szenzitivitásuk /18/, elektroforetikus mobilitásuk /16, 17/, termostabilitásuk /19/ és antigén tulajdonságaik /20/ alapján.

M. Sandler és M.B.H. Youdim /21/ összefoglaló cikket közölt a MAO-ról, melyben táblázat mutatja a vizsgálatok során különböző fajokban és szervekben különböző kutatócsoportok által elektroforézis utján talált MAO enzimek számát. /lásd 13. oldal/

A multiplicitás kérdését és okát vizsgálva, különböző vélemények alakultak ki. Egyes kutatók a MAO multiplicitását a tisztitási művelet műtermékeként könyvelik el /22/, mások viszont fiziológiás körülmények között meglévőnek tekintik és farmakológiai szempontból nagy jelentőséget tulajdonitanak meglétének /23/. A kérdés ma sem zárható le.

Az igen eltérő eredmények és vélemények következtében számos igen különböző konkluzióval záródó cikk született napjainkban.

Csak néhányat emlitek az utóbbi évek irodalmából:

Youdim 1973-ban megjelent cikkében arról ir, hogy a MAO multiplex formáinak élettani funkciója van, és hogy a metilált és nem metilált monoaminok dezaminációja különböző tipusu neuronokban történik. A MAO

Szolubilizált mitokondriális monoamin oxidáz enzim elektroforetikus uton különböző szerzők által kimutatott multimer formáinak száma különböző fajokban és szövetekben

Összefoglaló táblázat

/M. Sandler és M.B.H. Youdim /21/ szerint/

Szövet	Elektroforetikus csikok száma "Anódos"	"Katódos"
Patkány máj	2,3,4,7	1
agy	4,3	1
uterus	1	2
sziv	4,3	0
Emberi agy	3,2	1
máj	4	1
placenta	2	1
vérlemezkék	1	0
Disznó agy	1	0
máj	3	
Marha agy	2	
máj	1	2
mellékvese	4	1

multiplicitása nem a tisztitási folyamat müterméke /24/.

Severina /25/ különböző mértékben poláros szubsztrátok és a MAO kölcsönhatását vizsgálta ugyancsak eltérő mértékben poláros gátlószerek hatása alatt. Álláspontja szerint a nem-ionos Triton X-100 detergenssel történő szolubilizálás a különböző aminok szelektiv gátlásával társul, ami annak a következménye, hogy a detergens konformációs változásokat okoz a fehérje molekulában. Metil-etil ketonos extrahálás ugyanakkor nem befolyásolja az enzim aktiv helyét. Véleménye szerint a mitokondriális MAO aktiv centrumában legalább két szubsztrátkötő hely létezik: egy hidrofób terület és egy poláros kötőhely, melyek szoros közelségben vannak egymáshoz és amelyek különböző mértékben vesznek részt a különböző aminok megkötésében. Strukturától függően a szubsztrát kapcsolódhat egyik vagy mindkét fajta kötőhelyhez. Tehát a szubsztrátok relativ hidrofóbicitása döntő faktor a különböző szenzitivitás szempontjából.

Tipton és munkacsoportja /22/ intakt sejthez közelálló viszonyok között vizsgálva a MAO-t, mitokondrium külső membrán preparátumot használ, melyet detergens használata nélkül preparál. Az eredeti MAO aktivitás 90 %-a fellelhető készitményében. Véleménye szerint a multiplicitás onnan ered, hogy az enzim különböző mennyiségü membránhoz kötött. Eredményeik kizárják annak valószinüségét, hogy egy különböző tulajdonságu enzimpopuláció létezik egy intakt sejt vagy szerven belül. Ha a különböző szerveket tekintjük, a MAO különféle lipid környezetben funkcionál. Igy tehát különböző az enzimhez kötött lipid mennyisége is. Részlegesen tisztitott preparátumhoz kötött lipid fragmentum feltehetően befo-

lyásolja a hő és inhibitor szenzitivitást. Tipton szerint a membránkörnyezet kölcsönöz bizonyos allotróp tulajdonságokat a membránhoz kötött enzimnek. Membránnal történő kölcsönhatás módositani képes az enzim kinetikai tulajdonságait is.

Először Johnston /18/ vetette fel 1968-ban annak lehetőségét, hogy 2 különböző tipusu MAO létezik patkány aggyal in vitro körülmények között végzett gátlási kisérletek alapján. Tehát különböző szubsztrát és inhibitorspecificitás alapján bizonyitotta egy A és B tipusu MAO enzim létezését. Későbbiekben hasonló eredményre jutott Goridis és Neff /26/, emberi agy ill. Roth és Gillis /27/, nyul agyon végzett vizsgálatai során.

Az A tipusu /bizonyos terminológia szerint a neuronális forma/ specifikus szubsztrátjai a transzmitter aminok /szerotonin, noradrenalin/. Harmin és Clorgylin gátlására szenzitiv, mig a B tipusu /azaz az extraneuronális forma/ β-feniletilamint dezaminál és szelektiv módon gátolható Deprenillel. Mindkét enzimtipus közös szubsztrátja a Tiramin és Triptamin.

Külön-külön szeparálni a 2 enzimet eddig még nem sikerült, csak gátlási vizsgálatok alapján bizonyitják létezésüket.

Ma sem tisztázott, vajon a MAO multiplex formái valójában különböző enzimek, vagy csak a különböző mennyiségü ill. tipusu membrán anyag az, ami módositja egyetlen enzim specificitását /1972/. Bár az agy mitokondriumok heterogenitása bizonyitott, még nem sikerült a különböző MAO formák létezését eltérő mitokondrium populációval összefüggésbe hozni.

Monoamin oxidáz enzim tisztitása

A strukturához kötött katalitikusan aktiv fehérjék, mint a mitokondriális MAO is, elég nehezen szolubilizálhatók és tisztithatók.

Egy bizonyos fajra és szervre kidolgozott MAO tisztitási metodika nem alkalmazható azonos módon egy másik fajból, ill. szervből történő MAO tisztitásra. A szolubilizálódás mindig együttjár egy bizonyos mértékü inaktiválódással, melynek megakadályozására Akopyan és mtsai /9/ az enzim szubsztráttal való védését alkalmazták.

Ismeretes, hogy alacsony pH értéken a polianionok /beleértve a strukturához kötött fehérjéket és enzimeket/ aggregálódnak, ugyanakkor magas pH értéken dezaggregálódnak. Várható tehát, hogy erősen alkolikus közegben megnő a nem ionos detergens szolubilizáló hatása a MAO-ra.

Az enzim erősen lugos közegben történő szolubilizálása az enzim saját szubsztrátja által történő védelem mellett sikeres szolubilizálási módszernek bizonyult marha máj és agy, ill. patkány máj esetében /9/. Ideálisan volt alkalmazható védésre a benzilamin, egyrészt mint az enzim igen jó szubsztrátja, másrészt, mint erős bázis.

A MAO tisztitásakor leggyakrabban alkalmazott detergens a Triton X-100 /7/, a Nonion NS-210 /8/, OP-10 /9/.

Akopyan és mtsai /9/ Triton X-100, valamint OP-10 detergenst használtak az enzim szolubilizálására

és a tisztitás hatásfokát p-nitrofeniletilamin szubsztráttal történő ehzimaktivitás-mérési módszerrel mérték.

Oreland és kutatócsoportja /12/, valamint mások /40/ metil-etilketonnal történő extrahálást alkalmaztak, de számos kutatócsoport szolubilizálási technikaként ultrahangos kezelés /10/ vagy demyelinizációt /41/ használt, esetleg lipázos /42/ ill. tripszines /43/ emésztést, ismételt fagyasztást és felolvasztást ultrahangozással együtt /11/, illetőleg a fent emlitett módszerek kombinációját.

J.C. Shih és S. Eiduson /44/ táblázatot közölt a különböző szolubilizálási technika hatásfokát feltüntetve, melyek közül az általam alkalmazott Yasunobu és munkatársainak /7/ Triton X-100-zal történő szolubilizálási módszere bizonyult legeredményesebbnek /56-80 %-os hatásfoku/. A módszer hátránya, hogy a Triton X-100 nem ionos detergens kvantitativ eltávolitása a tisztitott fehérjepreparátumból igen nehézkés, mégis ezideig a legelterjedtebb módszerként alkalmazzák szolubilizálásra.

PROBLÉMAFELVETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A biogén monoaminok gyüjtőnév alatt 2 nagy csoportot értünk: a katekolaminokat és az indolaminokat.

Az indolaminok közé tartozó monoamin a szerotonin, részben modulálja az acetilkolin hatását, általában a központi idegrendszerben nyugtató hatásu, mig a katekolaminok leggyakrabban izgató hatásuak, de vannak gátló hatásaik is, pl. a kisagyban.

A biogén monoaminok 2 nagy csoportjának közös bontó enzimje a monoamin oxidáz /a katekolaminok bontásában a MAO mellett a COMT-nak is aktiv szerepe van/.

Minthogy a központi idegrendszerben eltérő hatásu biogén monoaminok mindkét csoportját azonos enzim, a MAO bontja, igen fontos lenne az enzimaktivitás szelektiv gátlása terápiás szempontból. Ehhez viszont olyan szelektiv gátlószereket kellene találni, mellyel irányitható lenne az enzim katalitikus aktivitása, azaz egyik vagy másik tipusu amin szelektiv bontása.

A gyakorlati probléma megoldásához szükség volna a kérdés elméleti tisztázására. Egységes enzim-e a MAO, vagy multiplex strukturáju. Ha ugyanis multiplex enzimről van szó, valószinü, hogy egy adott multimer felelős egy bizonyos amin bontásáért. Ugyanakkor fennállhat a lehetősége az aktiv helyek multiplicitásának is, vagyis, hogy ugyanaz az enzim bontja a fiziológiásan eltérő hatásu biogén monoaminokat, ezek azonban nem azonos módon és helyen kötődnek az enzimhez.

Munkám célja volt kimutatni, hogy a MAO valóban multiplex szerkezetü enzim-e; ha igen, valódi izo-

enzimekből áll-e, a különböző szövetek eltérő arányban tartalmazzák-e az adott izoenzimeket, vagy pedig a preparálás során műtermékek keletkeznek.

Célom volt tehát a multiplicitás igazolása és a multimerek esetleges szétválasztása. Mivel a MAO multimerek elkülönitése eddig egyetlen laboratóriumban sem sikerült, felmerült annak lehetősége, hogy a probléma esetleg indirekt uton szelektiv gátlás segitségével megoldható.

Szelektiv gátló hatások kimutatására alkalmas módszert kellett tehát kidolgoznom, mely alkalmas a multiplicitás kérdésének elméleti megoldásán tulmenően gyakorlati problémák /terápiás alkalmazás/ megoldására is.

Ha ugyanis sikerül szubsztrát, áll. inhibitorspecifikus izoenzimeket különválasztani, vagy bizonyitani létezésüket, akkor lehetőség van célzott /pl. szerotonin bontás/ farmakológiai gátlószer kimutatására.

Kisérleteimben, - melyet patkány agy és máj MAO enzimjével végeztem - ugyanakkor átfogó képet próbáltam nyerni különböző tisztitási lehetőségeiről, szubsztrát ill. gátlószer specificitásáról.

MÓDSZEREK

Kisérleteim egy részét az adott szervre leirt módszer segitségével preparált intakt mitokondrium frakciókon, másik részét a megfelelő mitokondrium frakcióból Triton X-100-zal szolubilizálás utján nyert preparátumokon végeztem azzal a céllal, hogy a multiplicitás szempontjából összehasonlitsam a membránhoz kötött valamint az oldott állapotban levő MAO enzimeket.

Az enzim vizsgálata során először minden esetben meghatároztam az adott méréshez kinetikai szempontból optimális körülményeket, azaz a Michaelis-Menten kinetika feltételeit szem előtt tartva minden preparátummal először meghatároztam az enzimaktivitás fehérjekoncentráció, szubsztrátkoncentráció, valamint az időtől való függését.

A Michaelis-féle állandó /K_M érték/ meghatározása a Lineweaver-Burk-féle ábrázolásmódban történt, azaz a kezdeti sebesség reciprokát ábrázolva a szubsztrátkoncentráció reciprokának függvényében.

Az adott enzimpreparátum szubsztrátspecificitásának meghatározása több szubsztrátra nézve a specifikus aktivitások összehasonlitása utján történt. Az alkalmazott szubsztrátkoncentráció mindegyik szubsztrát esetében az adott szubsztrátra megállapitott K_M érték volt, azért, hogy a különböző szubsztrátokkal mért enzimaktivitások összehasonlithatók legyenek.
Gátlási vizsgálataimat a következő módon végeztem. 15 perccel a szubsztrát adása előtt adtam a gátlószert a reakcióelegyhez. A 15 perces előinkubálás után a szubsztrát hozzáadásával inditottam a reakciót. 20' 37 C^o-on rázás közben történő inkubálás után a megfelelő módszer segitsé-

gével állitottam le a reakciöt.

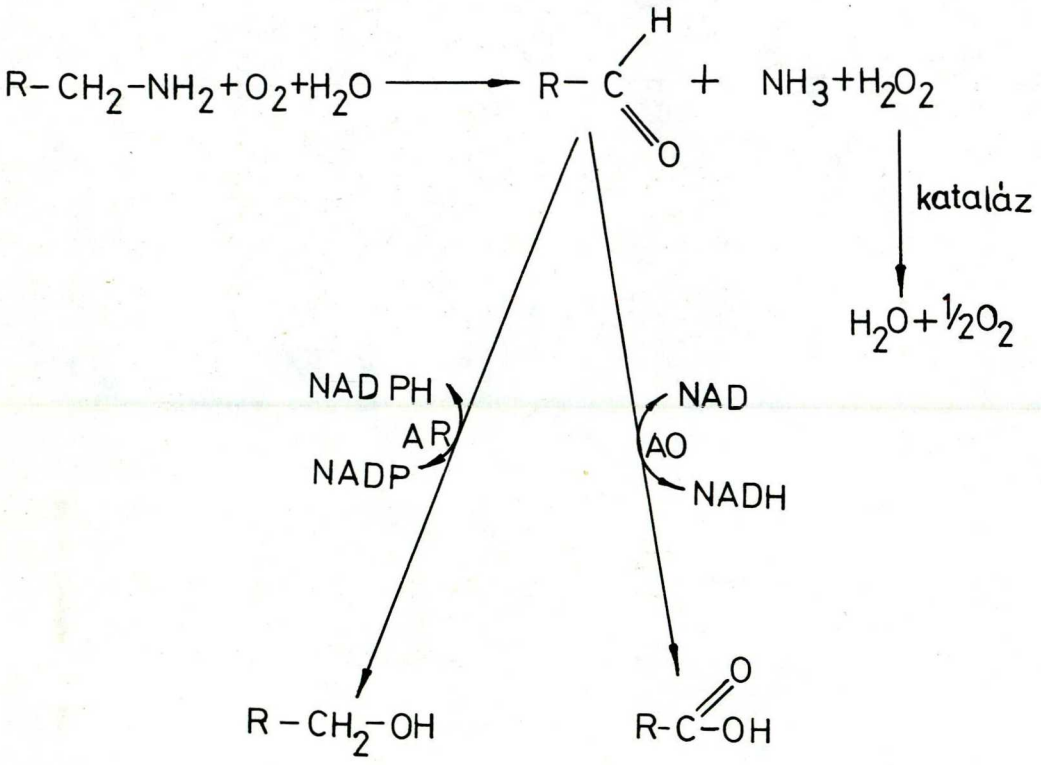
Az inhibitorkonstans /K_i/ meghatározása grafikus uton a Dixon-féle ábrázolásmódban történt, amikor is a kezdeti sebesség reciprokát a gátlószerkoncentráció függvényében vettem fel, két alkalmasan megválasztott szubsztrátkoncentrációnál, mely az adott szubsztrátra megállapitott K_M érték és annak fele volt minden esetben.

I_{50} értéket grafikus uton határoztam meg. A kontrollhoz viszonyitott százalékos gátlást ábrázoltam a gátlószer koncentráció függvényében. A szubsztrátkoncentráció minden esetben az adott szubsztrátra megállapitott K_M érték fele volt.

Vizsgálataim során fehérjekoncentrációt Lowry és munkatársai /61/ módszerével mértem 5-50 µg tartományban 750 nm hullánhossznál.

Monoamin oxidáz enzim aktivitásának mérési módszerei

A monoamin oxidáz enzim által katalizált oxidativ dezaminálás a következő reakcióegyenlet szerint játszódik le, valószinüleg imin intermedieren keresztül:



A MAO aktivitásmérési módszerek különfélék lehetnek:

1. mérhetjük a szubsztrát fogyását /27,28,29, 30/;
2. követhetjük az oxidativ dezaminálás termékének /az aldehidnek ill. savnak/ keletkezését /31-36/, vagy a melléktermékként jelentkező NH_3 /36/ ill. H_2O_2 mennyiségét /37/;
3. mérhetünk O_2 fogyást /38,11/.

A mérések pontosságát, érzékenységét és gyorsaságát tekintve legmegfelelőbbnek a keletkezett termék /aldehid ill. sav/ mennyiségének mérésén alapuló módszereket találtam /31-35/. A szubsztrátfogyás mérésén alapuló eljárások kevésbé érzékenyeknek és hosszadalmasnak bizonyultak /27-30/. Az O_2 fogyasztás mérésén alapuló monometriás /38/ ill. polarográfiás módszerek /47/ ugyan gyorsak, de nem eléggé megbizhatóak. A reakcióegyenlet szerint minden molekula szubsztrát 1 molekula oxigént abszorbeál. Az oxigén felvétel eltér az elméleti értéktől, melynek oka az, hogy az oxidáció terméke az aldehid instabil és spontán oxidálódik levegő jelenlétében. Blokkoló ágensként szemikarbazidot és cianidot alkalmaznak /cianohidrint v. nehézfém-komplexet képez/, ezek azonban gátlási reakciókban csak bizonyos fenntartással használhatók.

Az általam alkalmazott, majdnem kizárólag a termék keletkezésének mérésén alapuló módszerek között spektrofotometriás, spektrofluorimetriás, valamint izotópos metodikák egyaránt vannak. Alkalmazásuk szubsztráttól függő, mindig az adott szubsztráthoz a legmegfelelőtt módszert választottam.

Benzilamint választva szubsztrátként Tabor és munkatársai módszerével mértem aktivitást /31/.

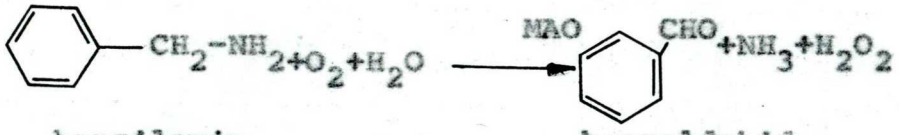
Szerotonin, Tiramin, Triptamin, Dopamin esetében az izotóp mérési technika bizonyult legmegfelelőbbnek, amikor is kirázásos, valamint oszloptechnikás megoldást egyaránt alkalmaztam. Végül is több izotóp mérési módszer kombinálásával és módositásával kialakitott ioncserélő oszloptechnikás módszer bizonyult a legmegfelelőbbnek.

Enzimtisztitáskor legjobban használható módszer volt számomra Kinuramint választani szubsztrátként és a keletkezett 4-hidroxi-kinolin mennyiségét Kraml /35/ szerint fluorimetriásan meghatározni. A módszer rendkivül gyors, érzékeny, valamint igen pontosan reprodukálható. Érzékenységét bizonyos módositással 1 nagyságrenddel sikerült megnövelnem.

Az irodalomban a MAO tisztitásakor leggyakrabban alkalmazott szubsztrát a kinuramin, valamint benzilamin, bár a multiplicitás kérdését szem előtt tartva igazán pontos képet ugy kapnánk, ha több szubsztráttal egyidejüleg mérve aktivitást, követnénk az enzimtisztitást lépésről lépésre. Ha valóban fizioló-ásan is meglévő multiplicitásról van szó, a tisztulás során a preparátum feldusulhat az egyik multiplex alakra és ugyanakkor elveszithetünk egy másikat.

Spektrofotometriás monoamin oxidáz mérési módszer benzilamin szubsztráttal Tabor és munkatársai módszere /31/ szerint

A MAO a következő reakciót katalizálja:



benzilamin benzaldehid

Az enzimatikus reakció során 250 mμ -nál fellépő abszorpciónövekedés mérésén alapszik a módszer, amikor is benzilaminból oxidativ dezaminálás folytán benzal-

SZEGED

dehid keletkezik. A keletkező benzaldehid abszorpciós maximumának megfelelő 250 mμ hullámhossznál a benzilamin szubsztrát és a benzaldehid moláris extinkciós koefficiense különböző, tehát küvettareakcióban mérhetünk enzimaktivitást anélkül, hogy az átalakulatlan szubsztrát jelenléte zavarna. Igy a fellépő abszorpciónövekedés nagyságából egyértelmüen következtethetünk a keletkező benzaldehid mennyiségére és ezáltal az enzimaktivitásra.

Az enzimaktivitást küvettában mértem szobahőmérsékleten Spektromom 203 spektrofotométeren, 250 nm hullámhossznál. A reakcióelegy 3 ml-es végtérfogatban 50 μM pH= 7.2 káliumfoszfát puffert, 10-100 μM benzilamint, valamint az adott fehérjepreparátumot tartalmazta. A reakció ilyen feltétel mellett 5'-ig volt lineáris. Az abszorpciónövekedést 3 percig követtem minden esetben.

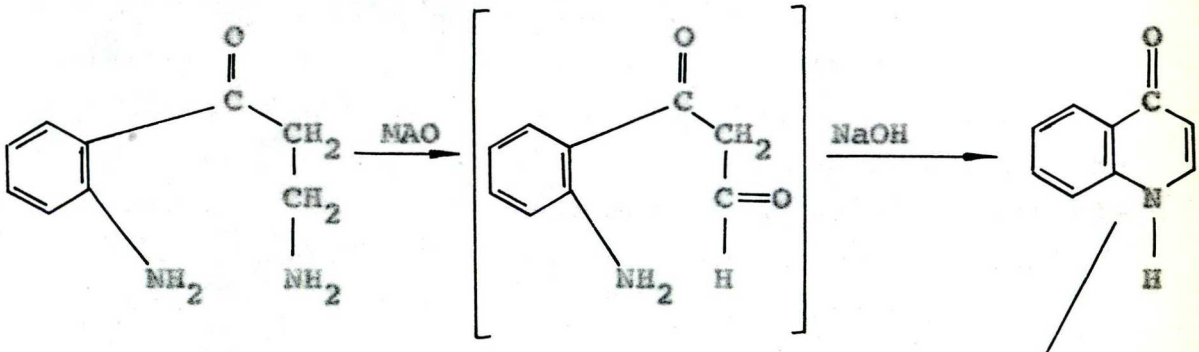
Az enzimaktivitást az 1 perc alatt szobahőmérsékleten keletkezett benzaldehid nanomolban kifejezett mennyiségében adtam meg, mg fehérjére vonatkoztatva, a benzaldehid 250 nanométer hullámhossznál meghatározott moláris abszorpciós koefficiense /E= $1.2 \times 10^{4} M^{-1} cm^{-1}$/ ismeretében.

A módszer hátránya, hogy lassu, nem elég érzékeny, valamint enzimaktivitás mérésére homogenátumból nem alkalmas. Csak igen alacsony fehérjetartalmu tisztitott preparátumok enzimaktivitását határozhatjuk meg ezzel a módszerrel.

Monoamin oxidáz enzim aktivitásának meghatározása fluorimetriás uton Kinuramin szubsztráttal

Az alkalmazott metodikák közül számomra egyik legjobb módszernek bizonyult Kraml fluorimetriás eljárása /35/, melyet módositva érzékenységét sikerült jelentősen megnövelni.

Az aktivitásmérés alapja a következő reakció:



Kinuramin

4-hidroxi-kinolin /4 HQO/

A MAO katalizálta enzimatikus reakció során kinuraminból keletkező intermedier aldehid spontán intramolekulás ciklizációval alakul 4-hidroxi-kinolinná lugos közegben, nem enzimatikus uton. Az igy keletkezett fluorimetriásan aktiv 4-hidroxi-kinolin mennyiségét mérjük.

A módszer rendkivül gyors, érzékeny és jól reprodukálható. Kitünően alkalmazható enzimtisztitás követésére. Más enzimek zavaró hatása ennél a módszernél nem jelentkezik. Homogenátumból is mérhetünk enzimaktivitást, ugyanis a reakcióidő elteltével a leállitott

reakcióelegyből a fehérjét centrifugálással minden esetben eltávolitjuk. A módszerhez alkalmazott szubsztrát a kinuramin ugyan nem fordul elő jelentékeny mennyiségben az agyban, azonban egyike a legjobb MAO szubsztrátoknak.

Az enzimaktivitás-mérés menete és a reakcióelegy összetétele a következő volt:

3 ml-es végtérfogatban az inkubációs elegy 10^{-4} - 10^{-5} M kinuramin szubsztrátot /mely koncentráció megfelelt az adott körülmények között megállapitott K_M értéknek/ 0.05 M pH = 7.4 kálium-foszfát puffert, valamint 10-200 µg fehérjét tartalmazott. A reakciót 37 C^{O}-on 20' inkubálás után 2 ml 0.5 M pH = 10-es borát pufferrel állitottam le /a reakció 30'-ig lineáris ilyen körülmények között/, majd a fehérje centrifugálással történő eltávolitása után 1 ml-es aliquotokat 2 ml 1 N Na-hidroxidhoz mérve határoztam meg az enzimaktivitást 320 mµ hullámhossznál történő gerjesztés mellett. A 4-hidroxi-kinolin emissziós maximuma 380 mµ volt. A gerjesztési rés szélességét 4 mµ, az emissziós rés szélességét 2.5 mµ értékre választottam. Általában 5 ill. 6-os érzékenységnél dolgoztam. A méréseket Hitachi Model MPF-2A Spektrofluoriméteren végeztem.

A módszer igen érzékeny. Az átalakulatlan szubsztrát jelenléte egyáltalán nem zavarja a mérés pontosságát. A reakció leállitásához általam használt borát puffernek /ill. 1 N NaOH-nak/ a mások által alkalmazott triklórecetsavval szemben kioltó hatása nincsen, fluoreszcenciás quenchet nem okoz. Sőt, a reakció leállitása, valamint az ezt követő lugos közegben végbemenő gyürüzáródás is egyidejüleg, egyetlen reagens hatására biztositott, azaz elkerülhető a reakcióelegy pH-jának

kétszeri megváltozása.

Ily módon az eredeti módszer 1 µg-os alsó érzékenységi határát sikerült 10 nanog-ra leszoritani. Az érzékenységi tartomány felső határa 1.5 µg.

Mivel a módszer igen érzékeny, alacsony enzimaktivitásu minták /pl. tengerimalac átrium, macska ganglion/ MAO aktivitásának mérésére is alkalmas.

Monoamin oxidáz enzim aktivitásának mérése ^{14}C jelzett izotóp szubsztrátokkal

A módszer az oxidativ dezaminálás során keletkező ^{14}C-metabolitok liquidszcintillációs mérésén alapul. Elválasztásukra a kiindulási szubsztráttól, 2 egyformán jól használható eljárást dolgoztam ki és alkalmaztam. Az egyik a kirázásos metodika, a másik pedig ioncserélő oszlopon történő kromatográfiás szétválasztás.

Az izotópos technika feltétlen előnye amellett, hogy szenzitiv, egyszerü és jól reprodukálható az, hogy aldehid dehidrogenáz jelenléte nélkül is jól alkalmazható, azaz képes a reakció során egyaránt keletkező sav és aldehid együttes meghatározására.

Az enzimaktivitás szubsztrát, ill. fehérjekoncentráció, valamint idő összefüggését minden egyes szubsztrát esetében meghatároztam. Majd ennek ismeretében választottam meg az optimális reakciófeltételeket.

A reakció 5-200 µg fehérjekoncentrációt alkalmazva 30'-ig volt lineáris. A szubsztrátkoncentráció minden esetben az adott körülmények között megállapitott K_M érték volt.

A kisérletek során felhasznált ^{14}C-jelzett izotóp MAO szubsztrátok

Kivétel nélkül NEN Chemicals GmbH készitmények Izotóp higitáshoz hideg Sigma gyártmányu biogén aminokat használtam.

1. Triptamin-2-^{14}C-bisuccinát
   Spec. akt. 60 mCi/mM
2. Tiramin-1-^{14}C-hidrobromid
   Spec. akt. 13 mCi/mM
3. Noradrenalin-7-^{14}C
   Spec. akt. 44 mCi/mM
4. Szerotonin-2-^{14}C binoxalát
   Spec. akt. 22.1 mCi/mM
5. Dopamin-1-^{14}C hidrobromid
   Spec. akt. 15.5 mCi/mM

A méréseket az alábbi módon végeztem:

37 C^{o}-os vizfürdőben 20'-ig rázás közben inkubáltam a reakcióelegyet, melynek összetétele a következő volt: 500 µl-es össztérfogatban tartalmazott 5 mM pH= 7.4-es káliumfoszfát puffert, 5-200 µg fehérjepreparátumot, valamint 0.01 µCi/5.5-130 nanomol specifikus aktivitásu ^{14}C-jelzett szubsztrátot 10 µl-es térfogatban /melyhez izotópos higitással készitettem az 1 µCi/0.55-130 µmol/ml-es törzsoldatokat/. A szubsztrátot a reakcióelegy minden esetben az adott körülmények között meghatározott Michealis-konstansnak /K_M/ megfelelő

1.1×10^{-5} - 2.6×10^{-4} M koncentrációban tartalmazta. A mérések során a következő kontrollokat használtam:

1. 0'-es inkubálás /azaz a reakció a komponensek összemérése után azonnal leállitva.
2. reakcióelegy főzött fehérjepreparátummal inkubálva a mintával azonos módon.

A további müveletek során a kontrollokat a mérendő mintával azonos módon kezeltem.

A reakció leállitása kétféleképpen történt. Attól függően, hogy melyik módszert használtam az átalakulatlan szubsztrát és termék szétválasztására, a reakciót gyors hütéssel, vagy savval állitottam le, majd a fehérje centrifugálással történő eltávolitása után a reakcióelegy aliquotját ioncserélő oszlopra vittem, vagy szerves oldószeres kirázásnak vetettem alá.

A kirázásos metodikát alkalmazva, 2N HCl-dal állitottam le a reakciót, majd szubsztráttól függően toluollal /triptamin/, ill. dietiléterrel /szerotonin/ extraháltam. 500 µl-es reakcióelegyhez 5 ml szerves oldószert adtam és kirázás, majd centrifugálás után a szerves fázisból 2.5 ml-t vittem 5 ml toluolos szcintillációs koktélba.

A másik módszer az oszloptechnikás szétválasztás, mely esetén savas kationcserélő gyantából készült 0.6 x 4 cm-es kromatografáló oszlopot használtam a szeparálásra.

Az irodalomban leggyakrabban használt kationcserélő gyanták a következők: Rexyn 101 Na forma /48/, Dowex 50-X8 H^+ forma /49/, Amberlit CG-50 I Na forma /32/. Ezek közül legjobb szétválasztást biztosit bármelyik MAO szubsztráttal történő aktivitásmérés esetén

az Amberlit CG-50 I /Na forma/ gyengén savas kationcserélő gyanta. Méréseim során ezzel a gyantatipussal dolgoztam előzetes aktiválás után.

Az oszloptechnikás módszernél az 500 µl reakcióelegyből a reakcióelegy gyors lehütése, valamint a fehérje centrifugálással történő eltávolitása után 250 µl-t 0.6 x 4 cm-es, előzőleg tridesztillált vizzel mosott Amberlit CG-50 gyantából készült oszlopra vittem. A terméket 4 ml tridesztillált vizzel eluáltam. A vizes eluátum bepárlása, vagy egy aliquot kivétele után a keletkezett ^{14}C-jelzett terméket liquidszcintillációs technikával mértem Bray oldatban, Isocap/300-as liquid szcintillációs rendszerben /Nuclear Chicago/.

Méréseim során 2 ill. 3 párhuzamossal dolgoztam. A mérési eredményeket a quench-hatás figyelembe vételével minden esetben korrigáltam. Az izotóp számláló ^{14}C-re megállapitott hatásfoka 87 % volt quenchelet-len minták esetén. Az enzimaktivitásokat specifikus aktivitásban adtam meg minden esetben, azaz:

spec.akt.= nmol dezam. termék /20'/ mg fehérje

Az izotóp mérésekben használt szcintillációs koktélok összetétele a következő volt:

1. Toluolos koktél:

   1000 ml toluolban 4 g PPO
   0.3 g POPOP
   volt oldva

2. Dioxános koktél /Bray oldat/:

   6 g naftalin, 4 g PPO, 0.2 g POPOP,
   100 ml abs. metanol, 20 ml etilénglikol,
   1000 ml dioxán

Monoamin oxidáz enzim vizsgálata poliakrilamid gél elektroforézissel

Vizsgálataimat Ornstein és Davis módszerével /50/ végeztem.
Az elektroforézishez használt törzsoldatok a következők voltak:

"A" 1N HCl 48 ml
Tris-hidroximetil amino-metán 36.6 g
TEMED /N,N,N'N'-tetrametil -etilén-diamin/ 0.23 ml
Tridesztillált vizzel 100 ml-re kiegészitve
pH = 8.9

"B" Akrilamid 30 g
N,N'-metilén-bisakrilamid 0.8 g
Tridesztillált vizzel 100 ml-re kiegészitve

"C" 0.14 g $/NH_4/_2S_2O_8$
Tridesztillált vizzel 100 ml-re kiegészitve

Tartálypuffer törzsoldat:

6 g Tris
28.8 g Glicin
Tridesztillált vizzel 1000 ml-re kiegészitve
pH = 8.3
Használat előtt 10x-re higitva

5 %-os gél készitése MAO enzim preparátum elektroforézishez:

"A" oldat: 1 térfogat /4 ml/
"B" oldat: 3 térfogat /5.7 ml/
trideszt. viz: /6.3 ml/
"C" oldat: 4 térfogat /16 ml/

A komponensek összekeverése után 2-2 ml-t Parafilmmel alul lezárt csövekbe pipettáztam. Vizszintes felszin kialakulása érdekében 0.1 - 0.1 ml tridesztillált vizet rétegeztem óvatosan a még meg nem dermedt gélek felszinére. Dermedési idő körülbelül 1/2 óra. A bepolimerizálódott gélekre a viz eltávolitása után 200 - 200 µl mintát vittem fel. Jelzőfestékként brómfenolkék oldatot használtam, melyet vagy a mintával, vagy a felső tartálypufferrel kevertem össze.
Az elektroforézis kivitelezéséhez Shandon vagy Reanal gél-elektroforetikus készüléket használtam. Kezdetben 1/2 órán át 2 mA/cső áramerősségen futtattam, majd a körülbelül $1\frac{1}{2}$-2 órán át tartó elektroforézis végéig 3 mA/cső-vel.
A rétegezés megkönnyitésére mintáimhoz kristályos szacharózt kevertem.

Gélfestési módszerek:

I. Fehérje kimutatásra gélen 2 festési módszert is alkalmaztam:

1. A festékoldat 10 %-os Amido Black 10B volt 7 %-os ecetsavban oldva. A differenciálás is 7 %-os ecetsavban történt.

2. Fehérje fixálásos módszer:
   Fixáló oldat: 5 %-os triklórecetsavban /TCA/ oldott 5 % szulfoszalicilsav.
   5 percig a fixálóban állni hagytam a géleket, majd 5 csepp festékoldatot adtam hozzá, összeráztam és 24 órán át rajtahagytam.
   7 %-os ecetsav oldattal differenciáltam.

Festék oldat: 0.5 % Coomassie Brillant BlueR-t oldottam 20 %-os TCA-ban.

II. Festés MAO aktivitásra: Youdim és mtsai módszere /51/ szerint, mely Glenner és mtsai hisztokémiai módszerének /52/ továbbfejlesztése.
Az elektroforézis után az 5 %-os géleket 37 C^{o}-on 20-60'-ig inkubáltam. Inkubálás után az inkubáló oldatot leöntöttem a gélekről, majd tridesztillált vizes átmosás után 7 %-os ecetsav oldattal differenciáltam.
Az inkubációs elegy összetétele a következő volt:

4 mg monoamin szubsztrát
2 mg Na_2SO_4
4 mg p-nitrotetrazóliumkék
0.05 M pH = 7.4-es foszfát puffer — 10 ml/gél
0.1 mg fenazin metoszulfát

A MAO "izoenzimeket" szolubilizált és részlegesen tisztitott mitokondrium preparátumból vizsgáltam poliakrilamid gél elektroforézissel. A metodika c. részben ismertetett módon mitokondriumot preparáltam a megfelelő szervre leírt módszer segitségével /35 oldal/, majd 1 %-os Triton X-100 detergenssel kezelve 1 mM benzilamin védelem mellett szolubilizáltam az enzimet. Ezután 35 %-os telités ammoniumszulfáttal, majd Sephadex G-25-ön történő sómentesités után nyert részlegesen tisztitott enzimpreparátumot vizsgáltam poliakrilamid gél elektroforézissel. Az egyes multimer formák aktivitását paralel futtatott festetlen gélek szeletelése és a gélszeletek eluciója után mértem.

200 µg fehérjét vittem minden egyes gél felszinére. Brómfenolkéket alkalmaztam jelzőfestékként. Csak a tökéletesen egyformán futott gélekkel dolgoztam tovább. Két gélt minden alkalommal enzimaktivitásra festettem, a többit ezek alapján szeleteltem. Az egyes gélekből összegyüjtött szeleteket 0.5 M-os pH = 7.4-es foszfát pufferben egy éjszakán át eluáltam. 20 µg fehérje aktivitását mértem minden esetben.

Monoamin oxidáz enzim tisztitása

Enzimtisztitási kisérleteimben Akopyan és munkatársai /9/ módszerét alkalmaztam módositásokkal.
A tisztitás folyamatát kynuramin szubsztráttal történő enzimaktivitás mérés utján ellenőriztem.

Mitokondrium preparálás Hawkins /45/ módszere szerint májból izotóniás szacharóz oldatban

Az enzimpreparálást +4 C^{O}-on végeztem. A májat 0.25 M szacharóz 10 x térfogatban elhomogenizáltam először durván, majd Potter-Elvehjem homogenizátorral finoman. A homogenátumot gézen átszürtem, majd 600 g-vel 5'-ig centrifugálva eltávolitottam a fel nem tárt sejteket, sejtfragmentumokat, sejtmagokat és vörösvértesteket. A szupernatánst ezután hütött Janetzki K-24-es centrifugában 20.000 g-vel 45'-ig centrifugáltam

és a szupernatánst elöntöttem. Az együtt leült mitokondrium és mikroszóma frakciót ujraszuszpendáltam 0.25 M-os szacharózban és 8500 g-vel 10'-ig centrifugálva elválasztottam a mitokondriumot a mikroszómától. A szedimentumot 0.05 M-os pH= 7.4-es foszfát pufferben vettem fel és -20 C°-on tároltam.

Agy mitokondrium preparálás Brody és Bain /46/ módszere szerint

Az agyat 9 térfogat izotóniás /0.25 M-os szacharózban homogenizáltam az agyhártya eltávolitása után Potter-Elvehjem-féle üveghomogenizátorban. A homogenizátumot üveggyapoton átszürve 1500 g-vel 4 x 3'-ig centrifugáltam, majd mostam 0.25 M-os szacharózban és ismét 18.000 g-vel /15000 rpm/ centrifugáltam 20'-ig. A végső szedimentumot 0.05 M-os pH 2 7.4-es foszfát pufferben vettem fel és felhasználásig -20 C°-on tároltam. Az agy mitokondrium preparálásának minden lépését 0-4 C°-on végeztem.

Monoamin oxidáz enzim tisztitása marha máj mitokondriumból

A frissen vágott marha máját /150 gr/ először háztartási mixelőgépben durván, majd Potter-Elvehjem-féle teflonfejes homogenizálóban 0.05 M-os pH= 7.4 foszfát pufferben oldott 0.25 M szacharóz, 10^{-3} M 2-mercaptoetanol, ill. 10^{-4} EDTA 10x térfogatában homogenizáltam.

Mitokondriumot Hawkins /45/ módszerével preparáltam. Előzőleg a homogenizátumot gézen átszürtem. A tridesztillált vizzel mosott mitokondrium vizes szuszpenziójához /150 ml/ lassan, állandó keverés mellett 5 mM végkoncentrációban benzilamin bázist adtam, majd ugyancsak lassu keverés mellett Triton X-100 15 %-os oldatát 0.75 %-os végkoncentrációban /7.5 ml/ 4 C^{o}-on 1/2 óra állás után 100.000 g-vel 40 percig centrifugáltam. A sárgás szinü felüluszóval dolgoztam tovább.

Következő lépésként ammonium-szulfátos frakcionálást alkalmaztam. A 100.000 g-s felüluszóhoz átkristályositással tisztitott kristályos $/NH_4/_2SO_4$-t adtam 20 %-os telitéshez lassu keverés közben, a pH-t 8.2-re, 5 %-os NH_4OH adásával állitottam be. Állni hagytam -20 C^{o}-on 30'-ig és 4 C^{o}-on 90'-ig. Ezután 20.000 g-vel 10'-ig centrifugáltam, a felüluszó világosbarna csapadék tartalmazta a MAO aktivitást. Felvettem 0.1 M-os pH = 7.4 kálium-foszfát pufferban, mely 10^{-3} M 2-merkaptoetanolt, ill. 10^{-4} M EDTA-t tartalmazott, majd 24 órán át a puffer többszöri váltásával dializáltam 1 mM-os pH = 7.4-es foszfát puffer /10^{-4}/ EDTA, 10^{-3} M 2-merkaptoetanol/ 500 x-os térfogatával szemben. Ezután Triton- X-100 15 %-os oldatát adtam lassu keverés közben 0.75 %-os végkoncentrációban állandó hütés alatt, majd 25.000 g-vel 30'-ig centrifugáltam. A szupernatánssal dolgoztam tovább.

Kezelést végeztem Aluminium-hidroxid-gél Cγ -val: a szupernatánshoz hozzáadtam a gél szuszpenziót /6 mg/ml; SIGMA/ ugy, hogy a fehérje-gél /szárazsuly/ arány 3:1 legyen. 1 órán át óvatosan, hütés közben keverergettem, majd 10.000 g-vel 5 percig centrifugáltam a szuszpenziót. A szedimentumot eldobtam. Ismét

aluminium-hidroxid gél Cγ -val kezeltem a szupernatánst. 1:1 arányban adtam az enzimpreparátumhoz a 6 mg/ml koncenrációju Sigma gyártmányu gélszuszpenziót. Állni hagytam 4 C^{o}-on 1 órán át és 10.000 g-vel 5 percig hütött centrifugával centrifugáltam. A szupernatáns tartalmazta a tisztitott máj enzim preparátumot. Mindössze 3 napig volt aktiv, 2 nap alatt aktivitása az eredeti aktivitás felére csökkent -20 C^{o}-on történő tárolás mellett.

Monoamin oxidáz enzim tisztitása marha agy mitokondriumból

A preparálást mindvégig 0-4 C^{o}-on végeztem. Az enzimtisztitás céljára használt agyakat az állatok levágását követő 2-3 órán belül feldolgoztam. Az alvadt vértől, agyhártyától megtisztitott agyakat 0.9 %-os káliumklorid oldatban mostam. Háztartási mixelőgépben 0.05 M pH = 7.4 foszfát pufferben oldott 0.25 M szacharóz, 10^{-3} M 2-merkaptoetanol 10^{-4} M EDTA, 10 x térfogatban először durván elhomogenizáltam, majd végül Potter-Elvehjem féle homogenizátorban is. A homogenizátumot üveggyapoton átszürtem, majd Brody és Bain /46/ módszerével nyertem a mitokondrium frakciót. 0.05 M pH = 7.4 kálium-foszfát pufferrel mostam, majd centrifugáltam. A leült, mosott mitokondrium frakciót tridesztillált vizben szuszpendáltam / 15 mg/ml fehérje / majd állandó keverés és hütés mellett benzilamin bázist adtam hozzá lassan 10 mM végkoncentrációban. 30 perc lassu kevertetés után 40.000 g-vel Beckman J-21 -es

centrifugán centrifugáltam. A csapadékot a szuszpenzió eredeti térfogatával azonos térfogatu vizben vettem fel és 15 %-os Triton X-100-t adtam hozzá lassan, keverés közben 1.5 %-os végkoncentrációban. 30 perces keverés után ismét 40.000 g-vel centrifugáltam 30 percig. A szupernatánssal dolgoztam tovább. 24 órán át dializáltam pH = 7.4-es 0.005 M-os kálium-foszfát pufferrel szemben. Végig hütött körülmények között 10^{-3}M 2-merkaptoetanolt, ill. 10^{-4} M EDTA-t alkalmaztam.

Ezután a preparátumot Aluminium-hidroxid gél C γ-val /6 mg/ml/ kezeltem. A gélszuszpenziót a dializált szupernatánshoz adtam keverés közben 1:2 = fehérje-gél /száraz suly/ arányban. 30 perc lassu kevertetés után 10.000 g-vel 5'-ig centrifugáltam.

A következő lépésként $/NH_4/_2SO_4$-dal csaptam ki a fehérjét, azaz 35 %-os telitéshez átkristályositott szilárd $/NH_4/_2SO_4$-ot adtam, lassan, keverés közben a szupernatánshoz. 4 C^O-on 30'-ig állni hagytam, majd 10 percig 20.000 g-vel centrifugáltam. A folyadék felszinén uszó sárga szinü precipitátum tartalmazta a MAO aktivitást. Felvettem 0.01 M-os pH = 7.4-es kálium foszfát pufferben, melyben az enzim védelmére 10^{-3} M merkaptoetanolt és 10^{-4}M EDTA volt adva. 5 mM-os pH = 7.4-es kálium-foszfát puffer 100 x-os térfogatával szemben 24 órán át dializáltam, többször cserélve a dializáló oldatot.

Ismét kezeltem Triton X-100 detergenssel. A detergens 15 %-os oldatát adtam az anyaghoz 0.75 %-os végkoncentrációban, lassan, óvatos kevertetés közben. 30 perc állás után 40.000 g-vel 30 percig centrifugáltam. A szupernatáns tartalmazta a MAO aktivitást.

Ujból kezeltem Aluminium-hidroxid gél C_γ - val. A gélszuszpenziót 1:1 = fehérje: gél arányban adtam a halványsárga szupernatánshoz. 20 percig kevertettem, majd 15 percig 10.000 g-vel centrifugáltam. Végül az anyagot Sephadex G-25-ös oszlopon töményitettem és szabaditottam meg a még ki nem dializálódott NH_4^+ ionoktól. A tisztitott készitmény mindössze 2-3 napig volt aktiv, 1 nap alatt aktivitása a felére csökkent -20 C^o-on történő tárolás mellett is.

Monoamin oxidáz enzim tisztitása patkány máj mitokondriumból

Éteres narkózis alatt a patkányokat dekapitáltam, májukat / 4-5 gr/patkány / eltávolitottam és 0.9 %-os KCl oldatban mostam. 50 gr májat először durván, mixerben, hideg 0.05 M pH = 7.4 foszfát pufferben oldott 0.25 M szacharóz, 10^{-3} M 2-merkaptoetanol, ill. 10^{-4} M EDTA 10x térfogatban homogenizáltam, majd teflonos Potter-Elvehjem-féle homogenizátorban. A homogenizátumot gézen átszürtem, majd Hawkins /45/ módszerével mitokondriumot preparáltam. A leült mitokondriumot az inaktiv fehérjék eltávolitására 0.05 M-os pH = 7.4-es kálium-foszfát pufferben szuszpendáltam és 25.000 g-vel 15'-ig centrifugáltam. A szedimentumot 150 ml tridesztillált vizben szuszpendáltam. Ehhez a mitokondriális membrán-szuszpenzióhoz adtam lassan, keverés közben benzilamin bázist 1 mM-os végkoncentrációban. A pH = 10-es szuszpenziót 30'-ig 4 C^o-on állni hagytam, majd

45.000 g-vel 45'-ig Beckman J-21-es centrifugán centrifugáltam. A szedimentumot hideg tridesztillált vizben szuszpendáltam, majd Triton X-100 10 %-os oldatát adtam hozzá keverés közben, lassan, 1 %-os végtérfogatban. A szuszpenziót 60'-ig 4 C^{o}-on tartottam, majd 45.000 g-vel 45'-ig centrifugáltam. Az üledéket eldobtam, a szupernatánshoz Aluminium-hidroxid gél C γ-t adtam / 6 mg/ml, Sigma / fehérje:gél /száraz sulyra számitott/ = 1:2 arányban keverés közben. 15' után a keveréket 3000 g-vel 5'-ig centrifugáltam. A szupernatáns tartalmazta a MAO aktivitást. Ezután a szupernatáns pH-ját 5 %-os ammoniumklorid lassu adagolásával pH= 8.0-ra állitottam be és átkristályositott szilárd $/NH_4/_2SO_4$-ot adtam hozzá lassan, keverés közben 25 %-os telitéshez. A pH-t végig pH = 7.4-en tartottam. 4 C^{o}-on 60'-ig állni hagytam, majd 25.000 g-vel 20'-ig centrifugáltam. Az üledéket kristályos $/NH_4/_2SO_4$-ot 35 %-os telitéshez 4 C^{o}-on 15 órán át állni hagytam, majd 25.000 g-vel 30'-ig centrifugáltam. A felüluszó csapadékot, mely a MAO aktivitást tartalmazta, 20 ml 0.05 M-os pH = 7.4-es foszfát pufferben felszuszpendáltam, majd 1000 x-es térfogat 0.01 M-os pH = 7.4-es foszfát pufferrel szemben /5 x cserélve a puffert/ 48 órán át dializáltam. A keletkezett csapadékot 45.000 g-n 20'-ig történő centrifugálással távolitottam el. Utolsó lépésként hidroxilapatitos kezelést alkalmaztam 1:100 = fehérje:adszorbens arány mellett. 30' keverés után centrifugáltam, a szupernatánst ismét hasonló módon kezeltem, majd a végső szupernatánst mint tisztitott preparátumot -20 C^{o}-on tároltam. Az enzim védelmére 10^{-3} M ditiotreitolt, ill. 2-merkaptoetanolt, valamint 10^{-4}M EDTA-t alkalmaztam.

A tisztitott preparátum 5 nap után enzimaktivitásának 50 %-át elveszti, 2 hetes tárolás alatt majdnem teljesen inaktiválódik.

Monoamin oxidáz enzim tisztitása patkány agyból

Az enzim preparálást és tisztitását 0-4 C^{o}-on végeztem. A patkány agyakat /50gr/ 9 térfogat 0.25 M szacharózt, 10^{-3}M EDTA-t tartalmazó 0.05 M pH= 7.4 foszfát pufferben elhomogenizáltam, 0.9 %-os KCl-ban történő mosás után. 1500 g-vel 2 x 5 percig centrifugáltam, majd a szupernatánst 18.000 g-vel 20'-ig. A mitokondrium frakció leült. Felvettem az eredeti agyszövet sulyának kétszerese térfogatu 0.05 M-os pH= 7.4-es K-foszfát pufferben, ismét centrifugáltam 18.000 g-vel 20'-ig. A leült és mosott mitokondrium frakciót felszuszpendáltam 3 térfogat 0.01 M-os pH = 7.4 foszfát pufferben, és 1 mM végkoncentrációban benzilamint adtam hozzá, keverés közben, majd 15 %-os Triton X-100 detergenst, 1.5 %-os végkoncentrációban. 30' állás után hütött centrifugával centrifugáltam, majd 20 %-os telitás közben lassan, tisztitott kristályos $/NH_4/_2SO_4$-t adtam hozzá. 2o.000 g-vel 30'-ig centrifugáltam, majd a világossárga szupernatánshoz ismét adtam $/NH_4/_2SO_4$-ot 40 %-os telitéshez. A csapadékot 0.05 M pH = 7.4-es foszfát pufferben vettem fel, 24 órán át dializáltam

0.001 M pH = 7.4-es foszfát puffer 500 x térfogatával szemben. Dializis után 20'-ig 20.000 g-vel centrifugáltam. A majdnem viztiszta szupernatánssal dolgoztam tovább.

Aluminium-hidroxid gél Cγ-val próbáltam tisztitani tovább a preparátumot. 1:5 = fehérje:gél arányt alkalmaztam. A szupernatánshoz hozzáadtam a megfelelő mennyiségü gélt és 1/2 órán át kevertettem a szuszpenziót hidegszobában. Centrifugálás után a szupernatánst Calcium-foszfát géllel kezeltem. 1:1 = fehérje:gél arányt alkalmaztam. A hidegszobában végrehajtott 1 órás kevertetés után a szuszpenziót 8000 g-vel centrifugáltam, majd az üledéket tridesztillált vizzel mostam. Ezután 0.1 % Triton X-100-t tartalmazó 0.05 M pH = 7.4-es foszfát pufferral kevertettem és a szupernatánst félretettem. Kétszeri ismétlés után a kombinált szupernatánsokat kristályos $/NH_4/_2SO_4$-tal 45 %-ra telitettem. 1 óra keverés után 20.000 g-vel 30'-ig centrifugáltam, majd a keletkező csapadékot 0.05 M pH = 7.4-es foszfát pufferben vettem fel és 0.001 M pH = 7.4 foszfát puffer 500 x térfogatával szemben 24 órát dializáltam a pufferoldat többszöri cserélése mellett. A tisztitás során használt foszfát puffer minden esetben tartalmazott az enzim védelmére 10^{-3} M 2-mercaptoetanolt, ill. 10^{-4} M EDTA-t.
A további tisztitási kisérlet hatására az enzim teljesen inaktiválódott.
Tisztitott formájában mindössze 2 napig volt aktiv, -20 C^{o}-on tárolva.

E R E D M É N Y E K

Összehasonlító vizsgálatokat végeztem patkány, ill. marha máj, valamint agyszövetben kimutatható és izolálható monoamino osidáz enzimekkel.

Első lépésként tisztitottam az enzimet. Számos, különféle módszer kipróbálása után a legeredményesebbnek bizonyult eljárással marha máj enzimá esetén 204 x-es tisztulást, az agy enzim esetén 31,5 x-es tisztulást sikerült elérni, a MAO irodalomból ismert eddig legeredményesebb 254, ill. 61x-es tisztitással szemben. Patkány májból 105 x-es tisztitást sikerült felmutatnom.

Legproblematikusabb feladat volt a patkány agy MAO enzimjének tisztitása, mely már a tisztitás kezdeti stádiumában váratlanul inaktiválódott. Az eredeti homogenátumhoz képest mindössze 10 x-es tisztitást sikerült elérni. A patkány agy enzim tisztitásával a MAO irodalom nem foglalkozik, jobb tisztitási hatásfokot eddig elérni még nem sikerült.

A tisztitás menetét és az eredményeket a tisztitás folyamán a következő táblázatok mutatják:

I. táblázat

MAO tisztitás marha májból

	Térfogat /ml/	Aktivitás µg 4HOQ/ml	Összaktivitás µg 4HOQ	Fehérje mg/ml	Spec. akt. µg 4HOQ/mg feh.	Tisztitás X
1. Homogenátum	1500	10.2	15.300	25	0.404	1
2. Mitokondrium	150	39.2	5.880	20	1.961	4.85
3. Szolibilizálás Triton X-100-zal	150	35.7	5.255	16	2.23	5
4. Frakcionálás $/NH_4/_2SO_4$-el	120	23.2	2.784	5.19	4.47	11.08
5. Kezelés Al-hidroxid gél Cγ-val	120	21.0	2.520	2.0	15.00	37.12
6. $/NH_4/_2SO_4$-os kicsapás	20	19.3	386	0.7	27.57	69.24
7. II. kezelés Al-hidroxid gél Cγ-val	15	18.2	273	0.22	82.7	204.7

MAO tisztitás marha agyból

2. Táblázat

	Térfogat /ml/	Aktivitás µg 4HOQ/ml	Összaktivitás µg 4HOQ	Fehérje mg/ml	Spec. akt. µg 4HOQ/mg fehérje	Tisztitás X
Homogenátum	700	5.2	3640	5.5	0.945	1
Mitokondrium	35	59.0	2065	14.8	3.98	4.3
Szolubilizálás Triton X-100-zal	70	10.6	742.0	2.2	4.82	5.1
I. Al gél C↑-s kezelés	70	5.9	413.0	0.5	11.80	12.5
$/NH_4/_2SO_4$-os kezelés	16	21.9	350.4	1.34	16.34	17.3
Kezelés Triton X-100-zal	10	13.6	136.0	0.62	21.93	23.2
II. Al gél C↑-s kezelés	10	12.0	120.0	0.45	26.73	28.3
Tisztitott enzim Sephadex G-25	3	17.8	53.4	0.60	29.67	31.4

MAO tisztitás patkány májból

3. Táblázat

	V /ml/	Akt. µg 4HOQ/ml	Total akt. ug 4HOQ	Fehérje mg/ml	Spec. akt. µg/mg fehérje	Kitermelés %	Tisztitás /x/
1. Homogenátum	500	204.0	102.000	17	12.0	100	1
2. Mitokondrium	50	907.2	45.360	27	33.6	44.4	2.8
3. Mit. membrán	150	301.6	45.240	5.8	52.0	44.3	5.0
4. Szolubilizáció	148	276.0	40.848	2.5	110.4	40.0	9.2
5. AlC_γ-s kezelés	146	182.04	26.578	0.82	222.0	26.0	18.5
6. $/NH_4/_2SO_4$-os frakcionálás	20	765.0	15.530	0.75	1020.0	14.2	85.0
7. Hydroxylapatitos kezelés	12	107.1	1.285	0.085	1260.0	1.25	105.0

MAO tisztitás patkány agyból

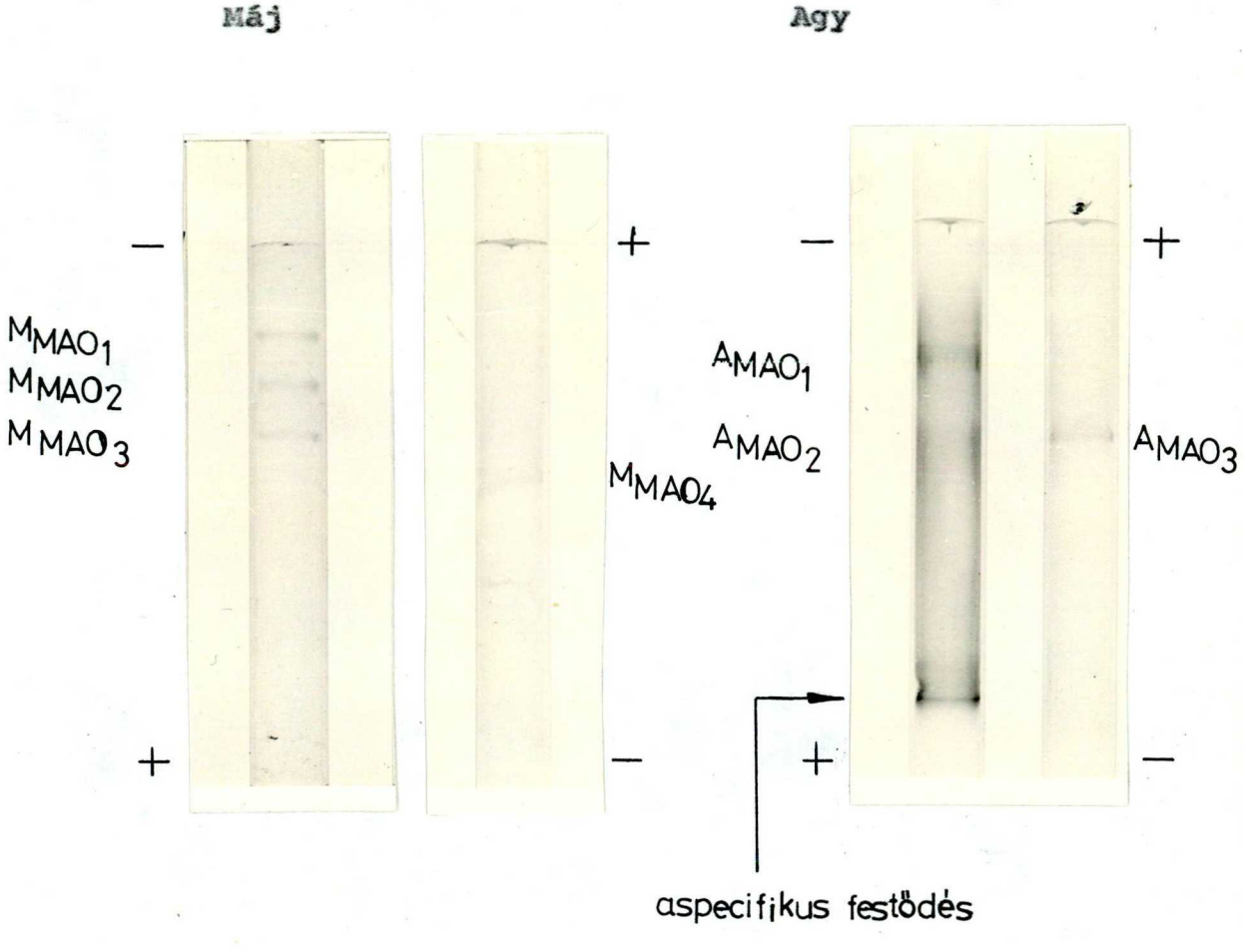
4. Táblázat

	V /ml/	Aktivitás µg 4HOQ/ml	Total akt. µg 4HOQ	Fehérje mg/ml	Spec. akt. µg 4HOQ/mg fehérje	Kitermelés %	Tisztitás X
Homogenizátum	450	87.15	39.217	8.3	10.5	100	1
Mitokondrium	150	232.7	34.903	10.4	22.3	88.9	2.10
Szolubilizálás Triton X-100-zal	145	110.7	16.051	4.1	27.0	40.7	2.57
I $/NH_4/_2SO_4$-os kezelés	132	78.0	10.296	1.5	52.0	26.2	5.0
II $/NH_4/_2SO_4$-os kicsapás	50	46.75	2 337	0.85	55.0	5.2	5.2
Al C γ-os kezelés	50	38.60	1 930	0.62	61.0	4.9	6.5
Adszorpció $Ca_3/PO_4/_2$ gélen	25	70.30	1 757	0.96	73.3	4.4	7.7
II. $/NH_4/_2SO_4$-os kicsapás	5	306.6	1 533	3.50	87.6	3.8	9.2

Az enzim kinetikai, valamint elektroforetikus tulajdonságait részlegesen tisztitott /szolubilizált, 35 %-os /NH_4/ SO_4 kezelésnek alávetett, végül detergens, ill. sómentesitett/, valamint az előállitott legtisztább preparátumokon vizsgáltam.

Elektroforetikus uton 5 %-os poliakrilamid gélen elkülönitettem az adott szervből izolált MAO enzim multimer formáit. Ilyen körülmények között patkány májból 4, agyból 3, marha májból 2, agyból 1 multimert formát mutattam ki, melyet az alábbi gélelektroforetikus fénykép felvételek mutatnak:

Patkány májból és agyból enzimspecifikus festéssel kimutatott MAO multimerek elektroforetikus képe



Brómfenolkéket alkalmazva indikátorként a festék jelenlétét jelző csik MAO specifikusnak tünik és igy zavaró. Ezért ezt az egy esetet kivéve, brómfenolkékkel történő indikálást csak olyan formában alkalmaztam, hogy a többivel párhuzamosan, 2 gélen csak az elektroforézis frontját jelző brómfenolkéket futtattam.

Gélelektroforetikus vizsgálataimat 5 %-os poliakrilamid gélen végeztem a módszerekben ismertetett módon. 200 µg fehérjét vittem minden esetben a gélek felszinére.

Enzimaktivitásra triptamin szubsztráttal történt enzimspecifikus festés a szemléltetett fotók esetében. Kivétel az agyból kimutatott MAO_4 vagyis az anód felé vándorló forma, amely esetén enzimaktivitás festéssel csak dopamin szubsztrátot alkalmazva volt kimutatható.

Gélelektroforetikus uton mindössze az enzimaktivitást jelentő csikok szinintenzitásának különbözőségéből lehetett a szubsztrátspecificitásra következtetni, ugyanis bármelyik szubsztrátot alkalmazva MAO aktivitás minden esetben kimutatható volt festéssel, kivételt képeztek az elektroforézis során anód felé vándorló MAO multimer formák, melyek mint azt a következő szubsztrátspecificitási táblázatok is mutatják, bizonyos szubsztráttal szemben mérhető, ill. festéssel kimutathaó aktivitást nem mutattak. Ezt az eredményt a kvantitativ mérések is alátámasztják /lásd a következő 2 táblázatot/.

Az elektroforetikus uton poliakrilamid gélen elválasztott MAO enzimek szubsztrátspecificitását gélen történő specifikus MAO festéssel, valamint festetlen és szeletelt gélekről történő eluáció után, az eluált enzimek aktivitásának izotópos technikával történő mérésével vizsgáltam, ill. határoztam meg, melyet az alábbi 2 táblázat mutat.

5. Táblázat

Patkány máj mitokondriumból szolubilizált és elektroforézissel szétválasztott MAO multimerek szubsztrátspecificitása

	Spec. aktivitás /nanomol dezam. termék/20 min/mg fehérje/			
	M_{MAO_1}	M_{MAO_2}	M_{MAO_3}	M_{MAO_4}
Tiramin	17.40	10.43	2.10	1.05
Triptamin	39.40	0.20	3.61	2.10
Kinuramin	8.50	8.20	8.60	1.22
Benzilamin	13.45	6.30	2.90	0
Szerotonin	7.20	6.30	15.40	0.6
Dopamin	12.30	7.20	10.10	0.2
Noradrenalin	2.60	2.90	5.80	0

Patkány máj mitokondrium frakcióból részlegesen tisztitott /azaz Triton X-100 nem ionos detergenssel szolubilizált és ammoniumszulfáttal kezelt/ preparátumból 5 %-os poliakrilamid gélen disc elektroforézissel elkülönitettem az enzim multimer formáit, gélről eluáltam az egyes enzimeket és enzimaktivitást mértem a módszerekben ismertetett módon. Az adott szubsztráttal meghatározott specifikus aktivitásokat az adott körülmények között megállapitott K_M értéknek megfelelő szubsztrátkoncentrációnál hasonlitottam össze.

6. Táblázat

Patkány agy mitokondrium frakcióból szolubilizált és elektroforézissel szétválasztott MAO multimer formák szubsztrátspecificitása

Szubsztrát	Spec. akt. /nanomol dezam.termék/20 min/mg fehérje/		
	A_{MAO_1}	A_{MAO_2}	A_{MAO_3}
Tiramin	60.05	33.20	0.20
Triptamin	8.70	2.o2	13.80
Kinuramin	11.30	6.30	7.60
Benzilamin	6.65	0.29	0
Szerotonin	3.10	13.40	0.80
Dopamin	2.10	3.20	10.10
Noradrenalin	2.30	4.70	0

/ Az enzimpreparálási és enzimaktivitás mérési módszerek azonosak az előző táblázatnál ismertetett módszerekkel./

A kapott eredményekről megállapitható a következő:

Az elektroforetikus uton szétválasztott MAO multimer formák között meglévő szubsztrátspecificitásbeli különbségek azonnal látszanak a táblázatokból. Elég jelentős különbségek vannak az egyes MAO enzimek különböző szubsztrátokkal szemben /az adott K_M értéknek megfelelő szubsztrát koncentrációnál/ meghatározott specifikus aktivitásban. A különböző MAO enzimek eltérő aktivitást mutatnak a különféle szubsztrátokkal szemben két különböző szervet tekintve, de egy adott szerven belül is.

Mind a máj, mind az agy esetében legjobb szubsztrát a tiramin és triptamin, ugyanakkor a legalacsonyabb volt az enzimaktivitás, ha noradrenalint és benzilamint választottam a MAO enzim szubsztrátjaként.

Külön-külön vizsgálva az egyes MAO enzimeket egy adott szerven belül, legérdekesebb az elektroforézis során az anód felé vándorló forma viselkedése a különféle szubsztrátokkal szemben, patkány agy preparátumot vizsgálva.

Az elektroforetikusan a katód felé vándorló patkány agy mitokondriumból szolubilizált MAO enzimek tiramin szubsztrátra kapott igen nagy aktivitásával szemben az anód felé vándorló forma szinte alig mérhető aktivitást mutat tiramin iránt, valamint benzilamin, noradrenalin és szerotonin szubsztrátokkal is alig vagy egyáltalán nem kaptam aktivitást.

Ugyanakkor magas enzimaktivitást mértem triptamin szubsztráttal. Legfeltünőbb mégis a dopaminnal mért nagy aktivitás, ellentétben a patkány májból

elektroforetikusan kimutatott anód felé vándorló forma dopaminnal alig mérhető aktivitásával.

Nemcsak egy adott szerven belül, az egyes MAO enzimek különböző szubsztrátokkal mért aktivitásában van éles különbség, hanem a két különböző szerv enzimjeinek viselkedésében is a különböző szubsztrátok iránt. Az egyértelmüen látszik az eredményekből, hogy a tiramin, valamint triptamin egyaránt jó szubsztrátja mindkét enzimpopulációnak. A többi szubsztrátot tekintve már nem ilyen egyértelmü a helyzet, bár a különbségek nem mondhatók nagynak. Viszont igen éles a differencia a két enzimpopuláció dopamin szubsztráttal mért enzimaktivitásában. Érdemes lenne külön foglalkozni az egyes MAO enzimek és a dopamin, mint szubsztrát kapcsolatával, különös tekintettel a patkány agyból elektroforetikus uton szeparált "anódos" enzimre.

Kinetikai vizsgálataim során minden esetben először meghatároztam az enzimaktivitás változását, az idő, a fehérjekoncentráció, valamint a szubsztrátkoncentráció függvényében, és ennek birtokában választottam meg a Michaelis-Menten kinetikának megfelelő reakciókörülményeket.

Meghatároztam a részlegesen tisztitott, valamint a legtisztább enzimpreparátum Michaelis konstansait /K_M/, valamint a maximális sebességet különböző MAO szubsztrátokra, melyet az alábbi táblázat ismertet:

7. Táblázat

Michaelis-konstansok
/Összefoglaló táblázat/

	Szolubilizált és részlegesen tisztitott MAO enzim			Tisztitott MAO	
	Szubsztrát	K_M /M/	V_{max} /nmol/mg/ fehérje/ perc	K_M /M/	V_{max} nmol/mg/ min
Patkány agy	Szerotonin	$6.5.10^{-5}$	1.23	$5.3.10^{-5}$	9.30
	Tiramin	$1.5.10^{-5}$	5.0		
	Kinuramin	$5.0.10^{-5}$	2.4		
	Noradrenalin	$2.3.10^{-4}$	0.5		
	Dopamin	$1.3.10^{-4}$	0.8		
Patkány máj	Szerotonin	$2.4.10^{-4}$	2.95	$3.4.10^{-5}$	10.12
	Tiramin	$1.3.10^{-5}$	3.10		
	Kinuramin	$3.2.10^{-5}$	2.65		
	Noradrenalin	$2.8.10^{-4}$	2.30		
	Dopamin	$2.1.10^{-4}$	2.96		
Marha agy	Szerotonin	$4.2.10^{-5}$	0.95	$6.7.10^{-5}$	8.9
	Tiramin	$2.3.10^{-4}$	2.9		
	Kinuramin	$6.2.10^{-5}$	2.4		
	Noradrenalin	$4.4.10^{-5}$	0.8		
	Dopamin	$2.5.10^{-5}$	1.3		

A K_M érték meghatározása 4 ill. 5 szubsztrátkoncentráció mellett a Lineweaver-Burk féle ábrázolásban történt, az abszcisszán ábrázolva, a szubsztrátkoncentráció, az ordinátán pedig a kezdeti sebesség reciprokát.

Gátlási kisérletek monoamin oxidáz enzimmel

Kísérleti munkám nagyobbik részét a gátlási vizsgálatok képezték.

In vitro körülmények között mértem a monoamin oxidáz enzim gátolhatóságát különböző szubsztrátokkal mérve enzimaktivitást.

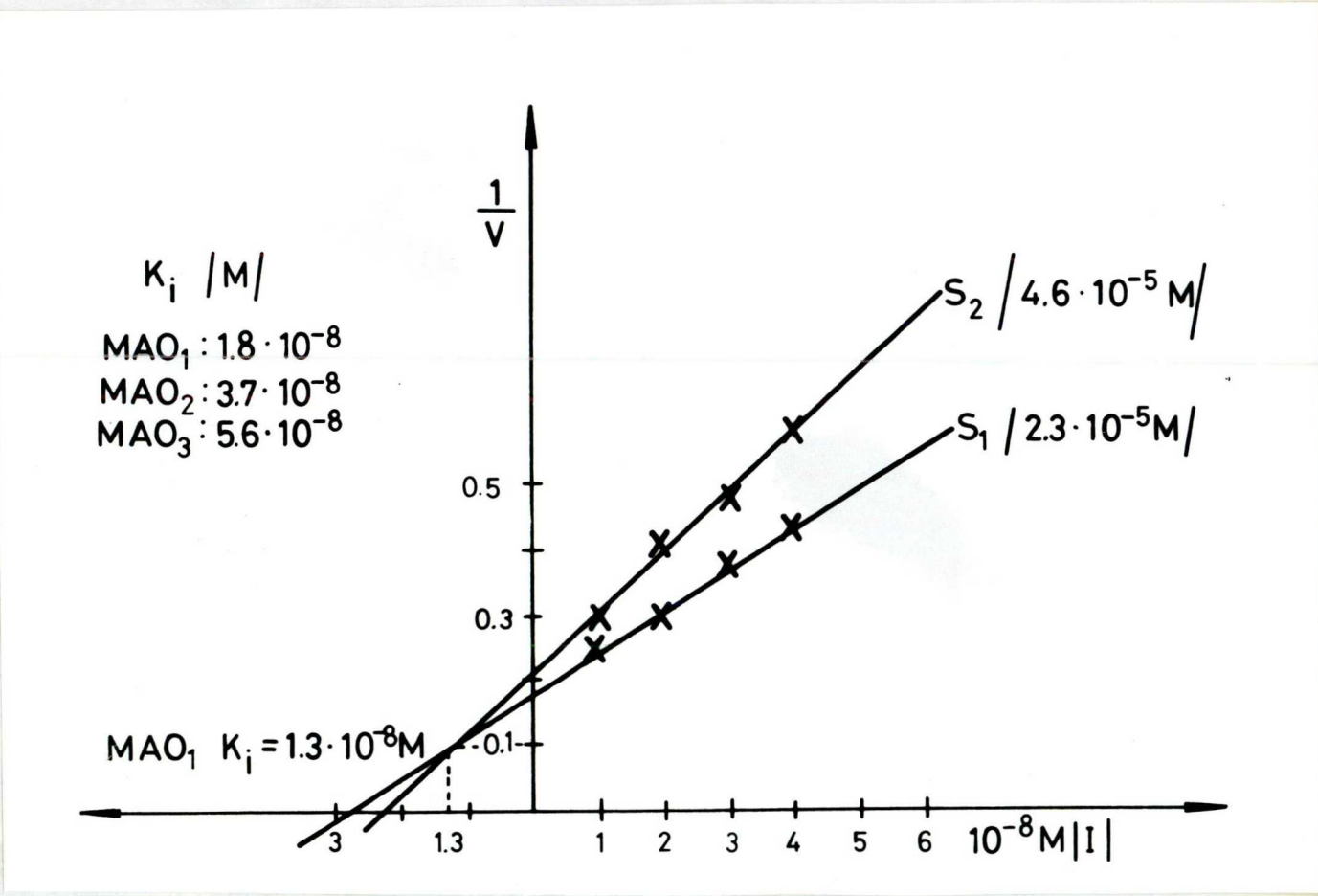
Különböző gátlószerek /szubsztrát szelektiv, ill. nem szelektiv/ hatását vizsgáltam mindkét szerv esetében.

Az in vitro gátlási vizsgálatokat a módszerekben leirt módon végeztem és a kapott eredmények kiértékelése grafikus uton történt a Dixon-féle ábrázolásmódot követve, kivéve, amikor a gátlás mértékét százalékosan tüntettem fel a kontrollhoz viszonyitva, ill. amikor I_{50} értéket határoztam meg.

A gátlások tipusa minden esetben kompetitiv volt és az alkalmazott gátlószerek reverzibilis módon gátoltak az általam vizsgált esetekben.

Az inhibitorkonstansok /K_i érték/ grafikus uton történő meghatározását szemlélteti a következő kiragadott példa Pargylin gátlóval patkány agyból izolált MAO_1-re, mely elektroforetikusan a legkisebb mobilitásu forma:

Patkány agy mitokondriumból szolubilizált MAO enzim aktivitásának in vitro gátlása Pargylinnal Kinuramin szubsztrát jelenlétében.



A következő táblázat kinuramin szubsztrátot alkalmazva 3 MAO gátlószer /Pargylin, Harmalin, Iproniazid/ hatását mutatja be a MAO egyes multimer formáira K_i értékekben feltüntetve. A K_i értékek M koncentrációban vannak megadva.

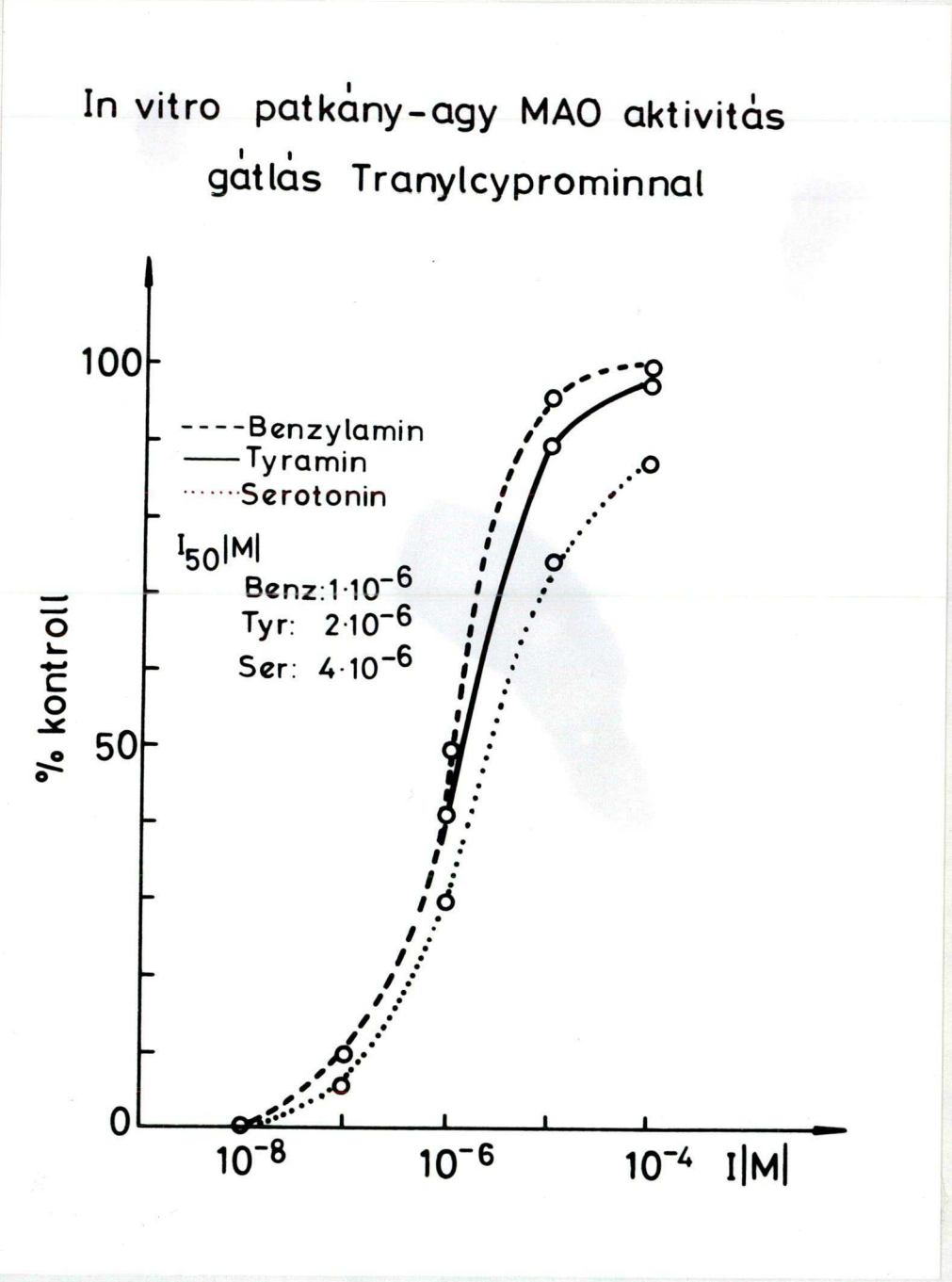
8.Táblázat

In vitro patkány máj MAO aktivitás gátlás

K_i/μM/	Kynuramin			
	MAO_1	MAO_2	MAO_3	MAO_4
Pargylin	0.07	0.04	0.04	0.02
Iproniazid	9.20	1.0	1.3	4.0
Harmalin	230	170	120	670

Az inhibitorkonstansok meghatározása a Dixon plotból történt, azaz az 1/v-t ábrázolva az inhibitorkoncentráció függvényeként két szubsztrátkoncentrációnál, amely sz. koncentrációk megfeleltek az adott körülmények között megállapitott K_M értéknek, illetve a K_M érték felének. Az alkalmazott fehérjekoncentráció minden esetben 20 μg volt. Az egyes MAO enzimeket gélről történő eluációval poliakrilamid gélelektroforézis után nyertem. A gátlószerrel történő 15' előinkubálás után a reakciót a szubsztrát reakcióelegyhez történő adásával inditottam. Az alkalmazott gátlószerkoncentráció 1.10^{-8} - 1.10^{-4} M volt szubsztráttól függően. A táblázatból látható, hogy Kinuramin szubsztrátra nézve a Pargylin mutatkozik a legjobb gátlószernek. Az egyes gátlószerek /Pargylin, Harmalin, Iproniazid/ gátló hatása az adott multimerek aktivitására jelentősen eltér egymástól.

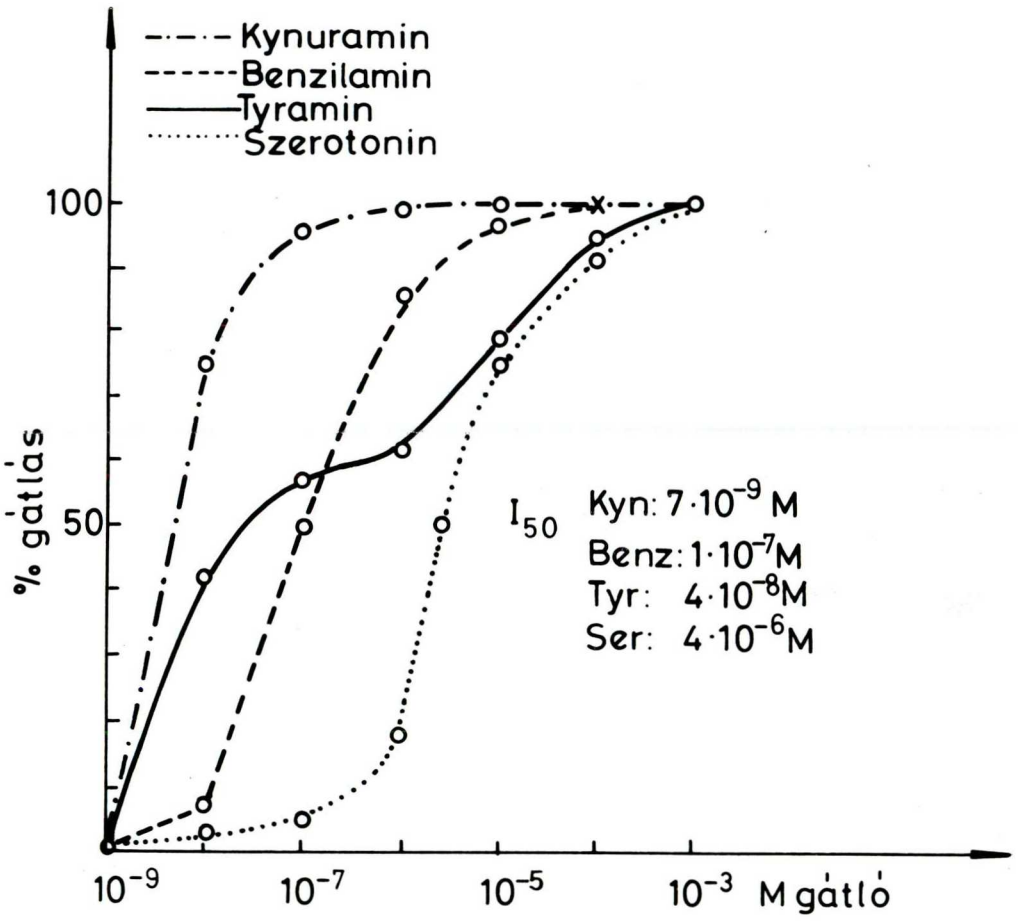
A következőkben egy szubsztrát szelektiv /Deprenil, Chinoin/ és egy nem szelektiv gátlószer /Tranylcypromine/ hatását vizsgáltam patkány agy és máj MAO enzimjére in vitro körülmények között.



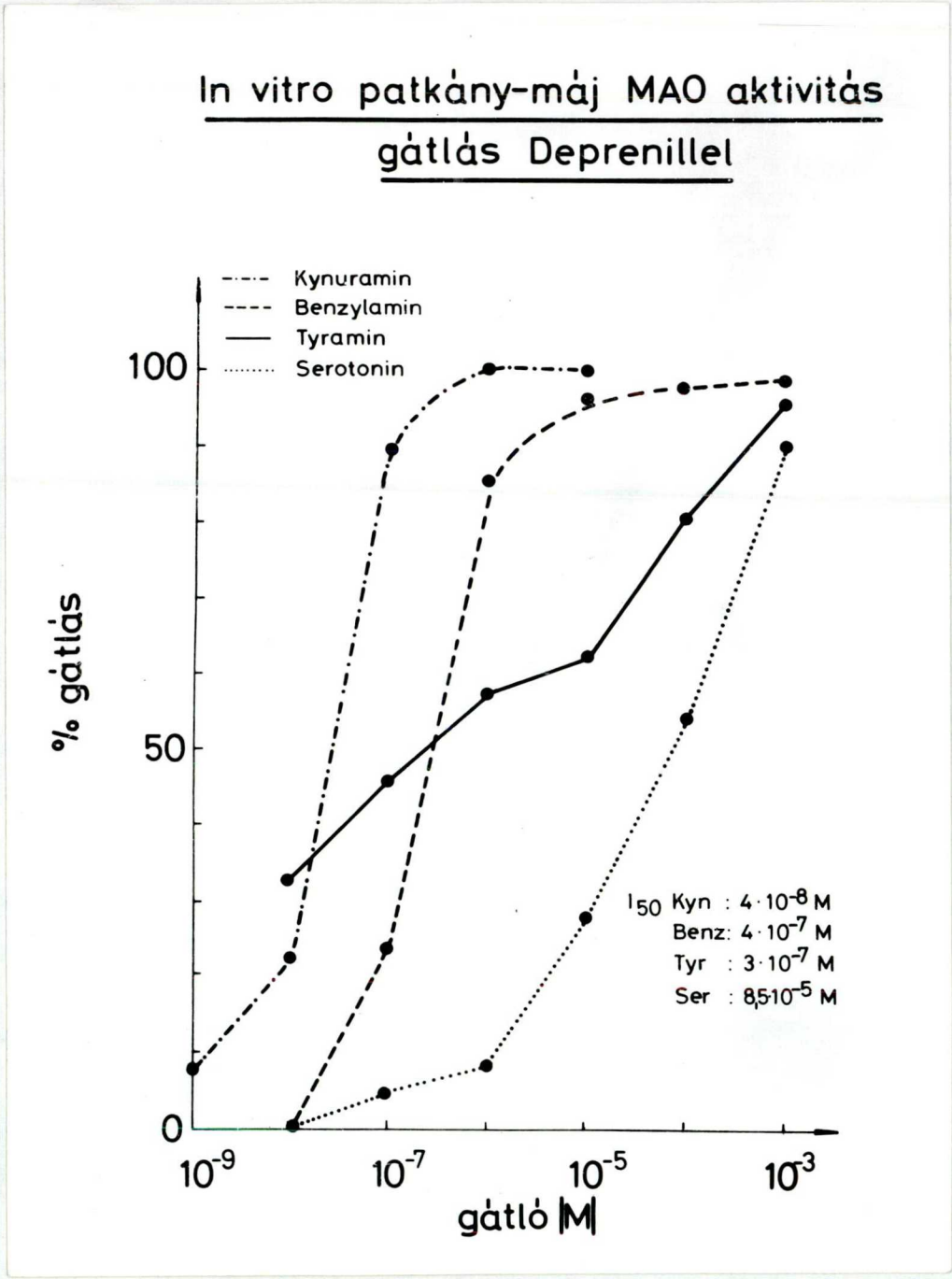
Gátlási vizsgálataimat intakt mitokondrium frakción végeztem. Mitokondriumot a módszerekben ismertetett módon preparáltam. Az ábrán a kontrollhoz viszonyitott százalékos gátlást ábrázoltam az inhibitorkoncentráció függvényében. Az alkalmazott szubsztrátkoncentráció mindegyik szubsztrát esetén az adott szubsztrátra megállapitott K_M érték fele volt. Az alkalmazott fehérjekoncentráció minden esetben 100 µg volt. A gátlószerrel történő 15'-es előinkubálás után a reakciót a szubsztrát adásával inditottam és 20' után a módszerekben ismertetett módon állitottam le, majd a szubsztrátnak megfelelő módszer segitségével mértem az enzimaktivitást.

In vitro patkány-agy MAO aktivitás gátlás

Deprenillel



Gátlási vizsgálataimat intakt mitokondrium frakción végeztem. Mitokondriumot a módszerben ismertetett módon preparáltam. Az ábrán a kontrollhoz viszonyitott százalékos gátlást ábrázoltam az inhibitorkoncentráció függvényében. Az alkalmazott szubsztrátkoncentráció mindegyik szubsztrát esetén az adott szubsztrátra megállapitott K_M érték fele volt. Az alkalmazott fehérjekoncentráció minden esetben 100 µg volt. A gátlószerrel történő 15'-es előinkubálás után a reakciót a szubsztrát adásával inditottam és 20' után a módszerekben ismertetett módon állitottam le, majd a szubsztrátnak megfelelő módszer segitségével mértem az enzimaktivitást.



/ A módszerek azonosak a patkány agy Deprenillel történő gátlásakor alkalmazott módszerekkel./

Azonnal szembetünő a különbség a szubsztrát szelektiv és nem szelektiv gátlószerek hatását tekintve, figyelembe véve a görbék lefutását. Jelentős eltérések vannak az egyes szubsztrátokra megállapitott I_{50} értékekben, a szubsztrát szelektiv gátlószer hatását vizsgálva agyon, ill. májon.

Kisérleteimben hatásos és szubsztrátszelektiv gátlószernek bizonyult a Deprenil *in vitro* körülmények között, mind a májból mind az agyból izolált enzimekre.

Legjobban volt gátolható az enzimaktivitás Deprenillel, abban az esetben, ha Kinuramin és Benzilamin volt a szubsztrát.

Meglehetősen gyenge gátlószernek bizonyult a Deprenil Szerotonin szubsztrát esetén.

A két szervet tekintve I_{50} értékben legnagyobb különbséget Deprenillel történő gátláskor tiramin szubsztrát esetén mértünk. Az in vitro kisérlet során agy mitokondriumból és máj mitokondriumból izolált MAO enzim jóval rezisztensebbnek bizonyult Deprenillel szemben, mint májból preparált enzim.

Érdekes az enzimgátlás görbéje tiramin szubsztrát esetén. Kettős szigmoid görbét kaptam mindkét szervet vizsgálva, ami arra utal, hogy valószinüleg két enzim van jelen, melynek különböző a deprenillel szembeni érzékenysége. Miért csak tiramin esetén kaptuk ezt, a többitől eltérő lefutásu görbét? Kisérleti eredményeink alátámasztják más szerzők Clorgylin, ill. Deprenil gátlóval kapcsolatos eredményeit és feltételezéseit, miszerint 2 MAO enzim létezik az agyban és májban eltérő szubsztrátspecificitással, azaz a két enzim preferenciális szubsztrátja különböző /benzilamin, ill. szerotonin/, közös szubsztrátjukként tekinthetjük viszont a tiramint, valamint más szerzők szerint a dopamint és triptamint.

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Kisérleteinkben különböző szervek MAO enzimjének szubsztrát, valamint inhibitorspecificitását, tisztitási lehetőségeit vizsgáltuk.

Patkány, valamint marha agy és májból MAO enzimet tisztitottam, mely tisztitások az adott szövetet tekintve jónak mondhatóak az irodalomból ismert adatokhoz mérten. Az eredményes enzimtisztitás egyik döntő feltételének mutatkozott az enzim védelme szolubilizáláskor, saját szubsztrátja által. Patkány májból az enzimtisztitás hatásfoka 105 x, patkány agyból 9 x, marha májból 205 x, marha agyból 31 x volt. Ugyanakkor az irodalomban az eddig legsikeresebb tisztitás patkány májból 136 x /9/ ill. 200 x /64/, marha májból 205 x /9/, marha agyból 60 x /9/ volt.

4 tisztitásból 3 leirt módszerek kombinálása és módositása. A patkány agyból történő enzimtisztitás hatásfoka mindössze 9-szeres, azonban ebből a szervből eredményes MAO enzim-tisztitással még nem találkoztam. Az enzim ebben a szervben rendkivül labilisnak mutatkozik, még a legkiméletesebb módszerekét is alkalmazva, aktivitásának döntő hányadát már a tisztitás első fázisaiban elveszti. Az általam alkalmazott tisztitási módszerek jól reprodukálható és egyszerü eszközökkel kivitelezhető eljárások, különösebb müszerezettséget nem igényelnek, mind a négy különböző vizsgálati anyag esetében apró változtatásoktól eltekintve azonosak, tehát a kapott eredmények jól összehasonlithatók.

Poliakrilamid-gél elektroforézissel elkülönitetten az enzim különböző formáit. Patkány agyból 3, májból 4 elektroforetikusan eltérő viselkedésü alakot

mutattam ki a szolubilizált "részlegesen tisztitott" preparátumokból, szemben a tisztitott preparátummal, amikor is agyból 1, májból 2 MAO enzimet mutattam ki elektroforetikus uton. A különböző szerzők által elektroforetikus uton kimutatott MAO enzimek eltérő számát a 13. oldalon táblázat mutatja.

Ugyanakkor gátlási vizsgálataim nem szolubilizált intakt mitokondrium frakciókon szubsztrátspecifikus Deprenil gátlószerrel, mind a májban, mind az agyban 2 MAO enzim létét bizonyitják. Hasonló eredményre jutottak Deprenil gátlószert alkalmazva J. Knoll és munkatársai /65/ valamint Clorgylin gátló hatását vizsgálva Johnston és munkatársai /18/, H.Y.T. Yang és N.H. Neff /66/, M.O. Housley és K.F. Tipton /67/, J.A. Roth és C.N. Gillis /27/ patkány agy, patkány máj ill. nyul agy preparátumokon.

Bár a multimerek számát illetően a két módszer /elektroforézis, gátlási vizsgálatok/ eltérő eredményt adott, mindkettő a multiplicitás mellett szól. Feltételezhetően az elektroforetikus uton kimutatott enzimek közül kettő azonos az indirekt uton, tehát Deprenil gátlószerrel kimutatott enzimekkel.

Dolgozatom 1971-73 között végzett munka eredménye. A kisérletek lezárását követő 2 évben megjelent közleményekben a MAO multiplicitását illetően egységes állásfoglalás mindmáig nem alakult ki. A kapott kisérleti eredmények döntő bizonyitékot nem szolgáltattak a MAO multiplicitásának ill. homogenitásának kérdésében.

Nem alakult ki egyöntetü vélemény sem az azonos, sem a különböző módszerekkel meghatározott multimerek számát, sem a multiplicitás okát illetően.

Napjainkig nem sikerült minden kétséget kizáró módon bizonyitani, hogy a különböző módszerekkel

in vitro kimutatott multiplicitás fiziológiás körülmények között is fennáll, vagy sem, csak feltételezésekkel találkozhatunk a közleményekben /68/.

Talán a mikrokörnyezet hatása az egyetlen faktor, melynek a szerzők egyöntetüen nagy jelentőséget tulajdonitanak, sőt a közlemények döntő többségében a szerzők a membrán foszfolipideket teszik egyedül felelőssé a multiplicitás létrejöttéért /69/.

Határozottan alig néhány szerző állitja, hogy a multiplicitás kizárólag in vitro létezik, tehát műtermék /70/, de azt is kevesen merik kijelenteni, hogy a multiplicitás minden kétséget kizárólag in vivo is fennáll, azaz különböző tulajdonságu enzimpopuláció van jelen egy adott szerven vagy intakt sejten belül /71/. A szerzők nagy része tehát egyetért abban, hogy a multiplicitás létrejöttében nagy szerepe van az enzimhez kötött foszfolipid mennyiségének, ami in vivo összefügghet egy különböző MAO aktivitásu heterogén mitokondrium populáció létezésével, valamint annak valószinüségével, hogy szolubilizálás során az intakt szövettől eltérő enzimpopuláció jön létre azáltal, hogy az adott enzimhez eltérő mennyiségü membrán fragmentum marad kötve.

Ma már tekintélyes azoknak a közleményeknek a száma, melyek aktiv helyek multiplicitása mellett foglal állást szubsztrátkonpeticiós vizsgálatok alapján. Az aktiv helyek számát és helyét illetően is igen megoszlanak a vélemények /72,73,75/.

Egyelőre nyitott kérdés marad, vajon a különböző aktiv helyek egy adott enzimen helyezkednek-e el, vagy különböző multimerekhez tartoznak.

Akár az aktiv helyek multiplicitását állitjuk /72,73,25/, akár multiplex enzimrendszerről beszélünk /18,74,22, 23/, az első, amit el kell döntenünk; fiziológiás-e vagy sem.

Véleményem szerint a MAO multiplicitása feltétlenül fiziológiás jelenség kell hogy legyen, ugyanis a központi idegrendszerben eltérő hatásu biogén monoaminok mindkét csoportját /indolaminok, katekolaminok/ azonos enzim, a MAO bontja /természetesen a COMT mellett/.

A szövet ill. fajspecifikus szubsztrátszelektivitás és inhibitorszenzitivitás kérdését feltétlenül fiziológiás szempontból fontos jelenségnek kell tekintenünk.

Reálisnak látszik az az elképzelés, miszerint a MAO multimerek intakt sejten belül eltérő lipid környezetben funkcionáló egyetlen enzimfajtát képviselnek /22/.

A mikrokörnyezet heterogenitását számos adat igazolja. Bizonyos vizsgálatok szerint számos enzim aktivitása változik a különböző mitokondrium populációval, beleértve a Johnston által identifikált A és B tipusu MAO-t is, mely enzimfajták másként oszlanak meg a különböző mitokondrium frakciókban /66/. Pl. az A tipus jelen van a szinaptikus neuronokban, de bizonyos posztszinaptikus helyekről teljesen hiányzik.

A glia sejtekhez tartozó mitokondriumok és a neuronok mitokondriumai eltérő denzitásuak /76/. H.Y.T. Yang és N.H. Neff kimutatták, hogy nagyobb MAO B aktivitás társul a magasabb denzitásu mitokondriumokhoz, mint az alacsony denzitásuakhoz.

Nem vitatható tahát a környezet ill. a membrán döntő szerepe az enzim szubsztrát ill. inhibitorspecifi-

citásának alakulásában, azonban nem tekinthető egyedüli faktornak. Az eltérő lipid környezet mellett még valószinü, hogy különböző szubsztrátkötőhelyek vannak egy adott enzimmolekulán a különböző kémiai karakterü szubsztrátok számára. Az adott szubsztrát tehát kémiai karakterétől függően kapcsolódhat egyik vagy másik vagy mindkét szubsztrátkötőhelyhez /69,25/.

Mivel a membránkomponensek feltétlenül befolyásolják az enzim aktivitását és specificitását, nem nagy valószinüsége van annak, hogy a 2 ill. több MAO enzimtipusra utaló enzimaktivitások fizikai eszközökkel szétválaszthatók legyenek.

Vizsgálataim kimutatták,a MAO multiplicitását, valamint eltérő szubsztrát ill. inhibitorspecificitását a különböző szervekben.

Célkitüzéseim között szerepelt egy olyan teszt, melynek segitségével a MAO multiplicitását lehet bizonyitani, valamint, ha valóban szó van multiplicitásról, akkor a multimerek eltérő szubsztrát ill. inhibitorspecificitását kimutatni.

Deprenil szubsztrát ill. inhibitorspecifikus gátlószer segitségével a MAO multiplicitását egy másik oldalról, nem szolubilizált mitokondrium frakción is sikerült alátámasztanom, vizsgálataim során.

Ezek a módszerek a gyakorlatban is hasznosithatók, ugyanis, ha valóban létezik dopamin, szerotonin, ill. noradrenalin specifikus MAO, akkor ezek szelektiv gátlása farmakológiai szempontból nagy jelentőségü volna.

ÖSSZEFOGLALÁS

In vitro kisérleteimet patkány agyszövet ill. máj mitokondrium frakcióból detergenssel szolubilizált, valamint egyszeri ammonium-szulfátos kezelésnek alávetett "részlegesen tisztitott preparátumokon" végeztem.

A patkány májszövetből "részlegesen tisztitott" preparátumból 4, agyszövetből 3 MAO enzimet mutattam ki korong-elektroforézissel 5 %-os poliakrilamid gélen.

Monoamin oxidáz enzimet tisztitottam marha máj /205 x/ és agyból /31 x/ valamint patkány májból /105 x/ és patkány agyból /9 x/. A legmagasabb specifikus aktivitásu legtisztább preparátumokból májból /105 x/ 2, agyból / 9 -szeres tisztitás/ pedig 1 MAO enzimet tudtam kimutatni a részlegesen tisztitott preparátumhoz képest poliakrilamid-gél elektroforézissel.

A különböző szubsztrátokra /tiramin, triptamin, szerotonin, dopamin, kinuramin, benzilamin/ különböző érzékenységü aktivitásmérési módszereket állitottam be /fluorimetriás, fotometriás, izotópos/.

Meghatároztam az egyes multimerek szubsztrát, valamint inhibitorspecificitását, a Michaelis konstansokat /7. táblázat/, valamint a K_i értékeket /8, táblázat/.

Megvizsgáltam a májból és agyból elektroforézissel szeparált MAO enzimek 7 különböző MAO szubsztráttal mért enzimaktivitását. Kimutattam az egyes MAO multimer alakok egy adott szerven belüli, ill. a különböző szervek MAO multiplex alakjainak eltérő szubsztrát ill. inhibitorspecificitását /5,6,8. táblázat/.

Az egyes elektroforetikusan eltérő tulajdonságu alakok szubsztrátspecificitásában meglévő különbségek szignifikánsak. Legérdekesebbnek létszó különbséget kaptam

a két szervből poliakrilamid gél elektroforézissel elkülönitett MAO multimerek dopamin szubsztráttal mért enzimaktivitásában /6. táblázat/, melyből egy dopamint preferenciálisan bontó un. "dopamin specifikus MAO" jelenlétére következtethetünk az agyban.

5 MAO gátlószer hatását /Pargylin, Harmalin, Iprohiazid, Deprenil, Tranylcypromine/ vizsgáltam in vitro kisérletben a MAO enzim aktivitására. Gátlási kisérleteket végeztem az adott szerekből preparált mitokondrium frakciókon, valamint az adott mitokondriumokból szolubilizált és részlegesen tisztitott, poliakrilamid gél elektroforézissel elkülönitett MAO multimer formákkal is.

Az in vitro gátlási kisérletek során igen éles volt a különbség az inhibitorok /Harmalin, Iproniazid, Pargylin/ K_i értékekben kifejezett gátló hatásában egy adott MAO enzim formát tekintve, de a különböző multimerek egyazon gátlószerrel szembeni viselkedésében is /8. táblázat/. Legfeltünőbb volt a különbség Harmalin és Pargylin gátló hatásában /5 nagyságrend eltérés a K_i értékben/, kinuramint választva szubsztrátként patkány máj MAO enzim in vitro gátlási vizsgálatánál. Ebben az esetben Pargylin mutatkozott a legerősebb gátlószernek a három közül.

Összehasonlitottam egy szubsztrátspecifikus /Deprenil/ ill. nem specifikus gátlószer /Tranylcypromine/ hatását a különböző szervekből preparált mitokondrium frakcióban levő nem szolubilizált MAO enzim enzimaktivitására. A különböző szubsztrátokkal szemben mért enzimaktivitások gátlásában szignifikáns különbséget kaptam. Érdekes lefutásu kettős szigmoid gátlási görbét kaptam tiramin szubsztrát esetén a szubsztrátspecifikus Deprenil gátlószer hatására, mely indirekt uton két MAO multimer

alak létét bizonyitja mind az agyban mind a májban, melynek közös szubsztrátja a tiramin.

Kisérleteim során egy adott szerven belül a MAO szubsztrát ill. gátlószer specificitásában kimutatott szignifikáns különbségek a későbbiek során lehetőséget nyujtanak célzott /egy adott szubsztrát bontására ható/ farmakonok terápiás alkalmazására.

Rövidítések jegyzéke

MAO	monoamin oxidáz
DAO	diamin oxidáz
FNMT	feniletilamin-N-metil-transzferáz
DβH	dopamin-β-hidroxiláz
COMT	katekol-O-metil-transzferáz
SAME	S-adenozil-metionin
AAO	aromás aminosav dekarboxiláz
4HOQ	4-hidroxi-kinolin
AR	aldehid reduktáz
AD	aldehid dehidrogenáz
PH	fenilalanin hidroxiláz

IRODALOMJEGYZÉK

1. Yamada, H. and Yasunobu, K.T.:
J. Biol. Chem. 237, 1511, 1962.
2. Axelrod, J.: Science, 126, 400, 1957.
3. Hare, M.L.C.: Biochem. J. 22. 968, 1928.
4. Zeller, E.A.: Pharmac. Rev. 11, 387, 1959.
5. Zeller, E.A.:et al.: Experientia, 8, 349, 1959.
6. Schnaitman, C., Envin, V.G. and Greenwalt, J.W.:
J. Cell Biol. 32, 719, 1967.
7. Yasunobu, K.T., Igau, J. and Gomes, B.:
Adv. Pharmac. 6A, 43, 1968.
8. Harada, M., Mirutani, K. and Nagatsu, T.:
J. Neurochem. 18, 559, 1971.
9. Akopyan, Zh.I., Veryovkina, J.V., Levjant, M.J.,
Moskvitina, T.A., Gorkin, V.Z. and Orekhovich, N.V.:
Int. J. Protein Research III, 121, 1971.
10. Shih, J.C. and Eiduson, S.:
Nature, Lond. 224, 1309, 1969.
11. Tipton, K.F.: Eur. J. Biochem. 4, 103, 1968a.
12. Oreland, L.: Arch. Biochem. and Biophys. 146, 2, 1971.
13. Ghisla, S. and Hemmerich, P.:
FEBS Letters, 16 /4/, 229, 1971.
14. Zeller, E.A.: Biochem. J. 76, 45P, 1960.
15. Zeller, E.A.: Experientia, 16, 399, 1960.
16. Collins, G.G.S., Youdim, M.B.H. and Sadler, M.:
FEBS Letters, 1 /4/, 215, 1968.
17. Kim, H.C. and D'Iorio, A.:
Can. J. Biochem. 46, 295, 1968.
18. Johnston, J.P.: Biochem. Pharmac. 7, 1285, 1968.
19. Squires, R.F.: In monoamine oxidase: New Vistas,
Ed. by E. Costa and M. Sandler, Raven Press,
New York, 1972.

20. Hartman, B.H. and Udenfriend, S.:
In monoamine Oxidases: New Vistas, Ed. by E. Costa, and M. Sandler, Raven Press, New York, 1972.
21. Sandler, M. and Youdim, M.B.H.:
Pharm. Reviews, 24 /2/, 331, 1972.
22. Miles, D., Houslay and Keith, F. Tipton:
Biochem. J. 135, 173, 1973.
23. Squires, R.F.: Biochem. Pharmac. 17, 1401, 1968.
24. Youdim, M.B.H.: Biochemical Society Transactions, 540th Meeting, Oxford.
25. Severina, J.: Eur. J. Biochem. 38, 239, 1973.
26. Gorides, C. and Neff, H.N.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 573, 1972.
27. Jerome, A., Roth and Gillis, C.N.:
Mol. Pharmac. 11, 28, 1974.
28. Udenfriend, S. and Cooper, J.R.:
J. Biol. Chem. 196, 227, 1952b.
29. Shore, P.A. and Olin, J.S.:
J. Pharmacol. Exp. Ther. 122, 295, 1958.
30. Weissbach, H., Smith, T.E., Daly, J.W., Witkop, B. and Udenfriend, S.: J. Biol. Chem. 235, 1160, 1960.
31. Tabor, C.W., Tabor, H. and Rosenthal, S.M.:
J. Biol. Chem. 208, 645, 1954.
32. Southgate, J. and Collins, G.G.S.:
Biochem. Pharmacol. 18, 2285, 1969.
33. Donald, S. Robinson, Lovenberg, W., Keiser, H. and Sjverdsma: Biochem. Pharmac. 17, 109, 1968.
34. Parvez, H. and Parvez, S.:
Clinica Chimica Acta, 46, 85, 1973.
35. Kraml, M.: Biochem. Pharmac. 14, 1683, 1965.
36. Snyder, S.H. and Hendley, E.D.:
J. Pharmac. Exp. Therap. 163, 386, 1968.

37. Nagatsu, T. and Yagi, K.:
J. Biochem. 60, 219, 1966.
38. Creasey, N.H.: Biochem. J. 64, 178, 1956.
39. Tripton, K.F. and Daroson, A.P.:
Biochem. J. 108, 95, 1968.
40. Hollunger, G. and Oreland, L.:
Arch. Biochem. Biophys. 139, 320,
41. Horrosks, L.A.: J. Neurochem. 15, 483, 1968.
42. Mac Farlane, M.G. and Knightm B.S.:
Biochem. J. 35, 884, 1941.
43. Petrack, F., Sheppy, F. and Feltner, V.:
J. Biol. Chem. 243, 743, 1968.
44. Shih, J.C. and Eiduson, S.:
J. Neurochem. 21, 41, 1973.
45. Hawkins, J.: Biochemistry, 50, 37, 1952.
46. Brody, T.M. and Bain, J.A.:
J. Biol. Chem. 195, 685, 1952.
47. Tipton, K.F. and Dawson, A.P.:
Biochem. J. 108, 95, 1968.
48. Coridis, C., Meek, J.L. and Neff, N.H.:
Life Sciences, 11, /I/ 861, 1972.
49. Izumi, F., Oka, M.: Life Sciences, 6, 2333, 1967.
50. Ornstein, L. and Davis, B.J.:
Annales of the New York Academy of Sciences,
121, 305, 1964.
51. Wilkinson, J.H.: Isoenzymes
52. Glenner, G.C., Burtner, H.J. and Brown, G.W.:
J. Histochem. Cytochem. 5, 591, 1957.
53. Youdim, M.B.H., Collins, G.G.S. and Snadler, S.:
FEBS Symposium, 18, 281, 1970.
54. Southgate, J.: Biochem. Pharmac. 17, 721, 1968.
55. Collins, G.G.S., Southgate, J.:
Biochem. J., 117, 38P, 1970.

56. Collins, G.G.S. et al.:
Nature, 226 /5246/ 642, 1970.
57. Cavanaugh, M.J.,and Zeller, E.A.:
Fed. Proc. 26, 814, 1970.
58. Kamberi, I.A. and Kobayashi, Y.:
J. Neurochem. 17, 260, 1970.
59. Holzbauer, M. and Youdim, M.B.H.:
Br.J. Pharmac. 44, 355, 1972.
60. Holzbauer, M., Youdim, M.B.H.:
J. Pharmac. 48 /4/, 600, 1973.
61. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and
Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265, 1971.
62. Kim, H.C. and D'Iosio, A.:
Can. J. Biochem. 46, 295, 1968.
63. Shih, J.H.C. and Eiduson, G.:
J. Neurochem. 18, 1221, 1971.
64. Youdim, M.B.H. and Sourkers, T.L.:
Canad. J. Biochem. 44, 1397, 1966.
65. Knoll, J. and Magyar, K.:
Advances in Biochem. Pharmacol. 5, 394, 1975.
66. Yang, H.Y.T. and Neff, N.H.:
J. Pharmac. and Exp. Therapeutics, 187 /2/ 1973, 365
189 /3/ 1974.
67. Houslay, M.D. and Tipton, K.F.:
Biochem. J. 139, 645, 1974.
68. Collins, G.G.S. and Youdim, M.B.H.:
Biochem. Pharmac. 24, 703, 1975.
69. Houslay, M.D. and Tipton, K.F.:
Biochem. J. 139, 645, 1974.
70. Jain, M.L. and Sands, F.L.:
J. Neurochem. 23, 1291, 1974.
71. Youdim, M.B.H. and Holman, B.:
J. Neural Transmission, 37, 11, 1975.

72. White, H.L. and Wu, J.C.:
J. Neurochem. 25, 21, 1975.
73. Huszti, Z.: Molecular Pharmac. 8, 835, 1972.
74. Willians, D. et al.: Brain Research, 100, 231, 1975.
75. Kopin, J. and Axelrod, J.:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 107, 848, 1963.
76. Hamberger, A. et al.:
J. Cell Biol. 45, 221, 1972.

MUNKÁM SORÁN ALKALMAZOTT VEGYSZEREK

Akrilamid	Reanal
Amberlite CG-50 I	Serva Feinbiochemica
Amido Black 10B	Edward Gurr Ltd, London
Albumin /bovine/	Sigma
Brómfenolkék	Reanal
Benzilamin	Reanal
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva
Dopamin hydrochloride	Sigma
Deprenil /E-250/	Chinoin
Hydroxylapatite	Sigma
4-Hydroxyquinoline	Sigma
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	Sigma
Harmaline Hydrochloride	Sigma
Iproniazid phosphate	Sigma
Kynuramin dihydrobromide	Sigma
N,N'-Methylen-bis-acrylamide	Fluka AG
Nitro Blue Tetrazolium	Sigma
Noradrenaline hydrochloride	Sigma
Pargyline hydrochloride	Sigma
Phemazine Methosulfate	Sigma
Serotonin bitartarate	Sigma
Tyramin hydrochlorid	Sigma
Tryptamin hydrochlorid	Sigma
Triton X-100	Serva
TEMED /N,N,N'N'-Tetramethyl--acetylendiamine	Fluka AG

Köszönetnyilvánitás

Az alábbiakban szeretném megköszönni Dr. Straub F. Brunónak, az SZBK főigazgatójának, hogy munkámat Intézetében lehetővé tette; valamint Dr. Wollemann Mária tudományos főmunkatársnak, A Biokémiai Intézet megbizott igazgatójának értékes segitségét és tanácsait, melyekkel kutatásaimat segitette és támogatta. Ugyanakkor köszönetet mondok Görög Ágnes asszisztensnek lelkiismeretes munkájáért.

Szeged. 1977. január 26.

SZTE