

γ -GLUTAMIL TRANSZPEPTIDÁZ BEÉPÍTÉSE LIPOSZÓMÁBA,
A KELETKEZETT MODELLRENDSZER ALKALMAZÁSAI

Doktori értekezés

Készítette: Csermely Péter
okl. vegyész

Készült: ELTE TTK Kolloidkémiai és Kolloidtechnológiai
Tanszéke; SOTE I.sz. Kémiai-Biológiai Intézete
és Biofizikai Intézete - Budapest

1983.

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Wolfram Ervin tszv. egyetemi tanárnak, a MTA lev. tagjának /ELTE TTK Kolloidkémiai és Kolloidtechnológiai Tanszéke/ és Dr. Somogyi János egyetemi tanárnak /SOTE I.sz. Kémiai-Biokémiai Intézete/ azért, hogy lehetővé tették doktori munkám elkészítését; értékes tanácsaikért, útmutatásaikért.

Köszönetemet szeretném kifejezni dr. Györgyi Sándornak és dr. Báthori Györgynek /SOTE Biofizikai Intézete/ a liposzómák elkészítésében nyújtott segítségükért, a kísérleti eredmények átgondolásának biofizikai szempontjaiért.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak, dr. Varga Vincének és Müllner Nándornak /SOTE I.sz. Kémiai-Biokémiai Intézet/ a kísérleti munkámhoz nyújtott segítségükért, tanácsaikért.

Köszönöm Dr. Röhlich Pálnak /SOTE II.sz. Anatómiai Intézete/, hogy az elektronmikroszkópos és dr. Kovács Péternek /ELTE TTK Kolloidkémiai és Kolloidtechnológiai Tanszéke/, hogy az ultracentrifugás kísérletekben az együttműködésre lehetőséget biztosítottak.

Végezetül köszönet illeti Somogyi Györgyit /SOTE Biofizikai Intézete/ a liposzómák elkészítésében nyújtott értékes technikai segítségéért.

TARTALOMJEGYZÉK:

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	
2.1. Mesterséges és természetes membránok	
2.1.1. Mesterséges membránok	3
2.1.2. Membránfehérjék izolálása	8
2.1.3. Membránfehérjék in vitro visszaépítése a membránba	10
2.1.4. Membránfehérjék membránba való beépülése in vivo	11
2.2. A γ -glutamil transzpeptidáz tulajdonságai és funkciója	
2.2.1. Definíció, az enzim által katalizált reakciók	15
2.2.2. Az enzim szerkezete	17
2.2.3. Jelenlegi ismereteink az enzim funkciójáról	19
2.3. A kainsav, mint az agybeli glutaminsav-alapú ingerületáttevődés hatékony befolyásolószere	28
2.3.1. A kainsav ingerképző, idegsejteket izgató hatása	29
2.3.2. A kainsav hatása morfológiai szinten	30
2.3.3. A kainsav hatása a metabolizmusra	31
2.3.4. A különböző ionkoncentrációk hatása az ingerületátvivő aminosavak felszabadulására és felvételére	33
2.3.5. A kainsav hatásmechanizmusáról tudottak összefoglalása	34
3. CÉLKITŰZÉSEK	40
4. KISÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	
4.1. Kísérleti anyagok	
4.1.1. A γ -glutamil transzpeptidáz izolálása, tulajdonságai	42

4.1.2. A liposzómák előállítása, tulajdonságaik	45
4.1.3. Az alkalmazott patkányagy-szinaptoszómák és patkányvese-kefeszegélymembránból álló vezikulák előállítása	50
4.1.4. Más felhasznált vegyszerek és anyagok .	51
4.2. Kísérleti módszerek	
4.2.1. Analitikai módszerek	52
4.2.2. A γ -glutamil transzpeptidáz beépítése liposzómákba	54
4.2.3. Az Arrhenius diagram felvétele	58
4.2.4. Az enzim-liposzóma komplex megbontása nagy ionerősségű közeggel	61
4.2.5. Az enzim-liposzóma komplex megbontása tenzid segítségével	62
4.2.6. A γ -glutamil transzpeptidáz orientációjának vizsgálata	63
4.2.7. Kainsavas mérések	65
5. KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	
5.1. Bizonyítékok a γ -glutamil transzpeptidáz lipidmembránba történő integráns beépülésére	68
5.2. Beépülés előzetesen elkészített liposzómába	78
5.3. A kísérleti körülmények hatása a beépülés mértékére	81
5.4. A γ -glutamil transzpeptidáz elhelyezkedése a liposzómákban	84
5.5. A kainsav hatása a γ -glutamil transzpeptidázra, az enzim esetleges szerepe az agyban	87
5.6. A munka további irányai	93
6. ÖSSZEFOGLALÁS	94
7. IRODALOMJEGYZÉK	96

1. BEVEZETÉS

Biokémiai ismereteink bővülésével párhuzamosan egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítunk a sejtet határoló, illetve a sejtben található membránoknak. A sejtben lezajló folyamatok rendjét, szervezettségét nagymértékben e membránok biztosítják.

A természetes membránok elengedhetetlenül fontos, sokszor összetételükben is döntő súlyú részét a bennük található fehérjék képezik. E fehérjék vizsgálatát sokáig hátráltatta az a tény, hogy bizonyos részük /az úgynevezett integráns membránfehérjék/ izolálásához a membrán megbontására van szükség. Tovább nehezítette a kísérleteket, hogy a membránenzimek membránkörnyezetükből eltávolítva aggregációra és az ezzel sokszor együttjáró denaturációra hajlamosak. Mindebből következően a megbontás kísérletes módszereinek kidolgozásával párhuzamosan szükségessé vált azoknak a módszereknek a kifejlesztése is, amelyekkel a membránfehérjéket eredeti környezetükhöz hasonló környezetbe /mesterséges membránokba/ visszaépítve, működésük természetes körülményeit jobban lehetett biztosítani.

Membránenzimek mesterséges membránokba történő beépítésére a hatvanas évek közepétől történtek kísérletek. A kezdeti próbálkozások után a hetvenes években születtek meg a terület első nagyobb eredményei: Ephraim Racker és munkatársai izolált fehérjékből az oxidatív foszforiláció mitochondriális rendszerét állították helyre, sikerrel jártak az endoplazmatikus retikulum fehérjeszintetizáló rendszereinek, a mikroszómális oxi-

dációnak és a fényérzékelő bakteriorodopszin visszaépítésére irányuló kísérletek is.

Az izolálási, a visszaépítési és a beépült fehérjék vizsgálati módszereinek rohamos fejlődésével párhuzamosan, a felgyűlő tapasztalatokat összegezve megszülettek az első átfogóbb elméleti eredmények is. A hetvenes évek elején publikálta Singer és Nicholson /1972/ a membránok "folyékony mozaik modelljét", amely új szemléleti alapokat adott a membránok biofizikai sajátosságainak kutatásához. Nem sokkal ezután Tanford bevezette a "hidrofób effektus" fogalmát /Tanford, 1973/, amely a membránok termodinamikai stabilitásáról, kolloidkémiai sajátosságairól alkotott képünk egyik alapjává vált. És végül a transzlokáció, az egyes membránenzimek által katalizált reakciók mechanizmusának mélyebb megismerése szolgáltatják azokat a biokémiai ismereteket, amelyek mind szükségesek ahhoz, hogy a membránenzimek membránokba való beépülésének, valamint membránbeli működésüknek, szabályozásuknak a mechanizmusát mind jobban megértsük.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Mesterséges és természetes membránok

2.1.1. Mesterséges membránok

A lipidasszociátumoknak szerkezetük szerint számos fajtáját különböztethetjük meg. Ezek szerint beszélhetünk fálmszerű monorétegekről, ún. "black-lipid-membrane" struktúrákról, illetve több, vagy "egyrétegű" liposzómákról /ld. I. táblázat; Pagano és Weinstein, 1978/.

Lipideknek a levegő-víz határfelületen alkotott filmjét /monorétegét/ leginkább a fellépő felületi nyomással tudjuk jellemezni. Amennyiben a kialakult filmhez membránfehérjét adunk, a fehérjének a lipidmolekulák rendezettségét zavaró hatása a felületi nyomás változásával nyomon követhető. A rendszer alapvető hátránya, hogy a természetben előforduló membrán kettősrétegeknek csak a "felét" modellezi, így csak a nagyobb részükben vízben oldható, hidrofil membránfehérjék vizsgálatára alkalmas.

"Black-lipid-membrane"-nak /BLM/ a kettősréteggé elvékonyodott mesterséges membránokat nevezzük /Mueller és mtsai, 1962/. Mivel ez a membrán általában igen nagy tereket választ el egymástól, a rendszer alkalmassá válik áteresztőképességi /permeabilitási/, illetve elektrokémiai /vezetőképesség, kapacitás, átütési feszültség, membránpotenciál, stb./ mérések elvégzésére. A "black-lipid-membrane" széleskörű alkalmazásának hiányát az előállításakor fellépő nehézségekben kell keresnünk. A membrán képződése, élettartama eléggé esetleges, kísérletfüggő. A membránban fellelhető szerves oldószernyomok /legtöbbször hexán, dekán/, a nagyfokú instabilitás a kísérleteket nehezen reprodukálhatóvá teszik.

I. táblázat: a mesterséges membránok fajtái, rövid jellemzésük

a mesterséges membránok elnevezése	a velük való kísérletes munka		az alkalmazható vizsgálati módszerek
	előnyei	hátrányai	
Monorétegek		nem teljes membrán	felületi nyomás mérése
"Black-lipid-membrane"	- nagy elválasztott teretek - transzportfolyamatok nyomónkövetése	- oldószernyomok - instabilitás - nehéz reprodukálhatóság	permeabilitás ill. elektrokémiai sajátságok mérése
Liposzómák	- transzportfolyamatok nyomónkövetése		UV spektrum, ESR DSC vizsgálatok
- többrétegű liposzómák /MLV/	- könnyen előállítható - stabil	- nehéz reprodukálhatóság	
- kis egyrétegű liposzómák /SUV/	- könnyen előállítható - stabil	- kis bezárt térfogat	
- nagy egyrétegű liposzómák /LUV/		- nehezen előállítható - nehéz reprodukálhatóság	

/a rövidítések magyarázatát ld. a szövegben/

A mesterséges membránok harmadik nagy osztályát a zárt, gömbalakú kettősrétegek, a liposzómák /lipid vezikulák/ alkotják. Szerkezetük és méretük szerint további három csoportra oszthatók /Montal, 1976/. A több lipid kettősrétegből felépülő, néhányszor tíz nm átmérőjű, rendszerint erősen polidiszperz rendszereket többrétegű liposzómáknak /multilammellar vesicles -MLV- vagy Bangham -1965, 1972- után bangoszómáknak/ nevezzük. A 20 nm körüli átmérővel rendelkező egyetlen lipid kettősrétegből álló liposzómák a kis, egyrétegű liposzómák /small unilammellar vesicles -SUV- vagy Huang -1969- után huangoszómák/, a 0.5--50 μ -ig terjedő átmérővel jellemezhető társaik pedig a nagy egyrétegű liposzómák /large unilammellar vesicles -LUV-/ elnevezést kapták.

A liposzómák számos előnnyel rendelkeznek: előállításuk egyszerű, stabilak, számos biokémiai illetve biofizikai vizsgálatra /pl. ultraibolya -UV- spektrum, elektronspinrezonancia -ESR- spektrum, differenciál kalorimetrikus -DSC- vizsgálatok, stb./ alkalmasak.

Az először felfedezett többrétegű liposzómák polidiszperz, nehezen jellemezhető, nehezen reprodukálható rendszert alkottak. Nagy lépést jelentett a kis, egyrétegű liposzómák előállításának kidolgozása, mert így javarészt sikerült kiküszöbölni a fenti hiányosságokat. Változatlanul megmaradt azonban egy az áteresztőképességi /transzport/ vizsgálatok és más felhasználási lehetőségek útjába jelentős akadályt gördítő tulajdonság, a kis bezárt térfogat. E kedvezőtlen tulajdonság megváltoztatása miatt volt szükség a liposzómák legújabb családjának, a nagy egyrétegű liposzómáknak a kifejlesztésére. Mindeztidáig azonban nem ismerünk olyan módszert, amellyel nagyméretű, megközelítően monodiszperz liposzómákat megbízható módon tudnánk előállítani, így jelenleg a kis, egyrétegű liposzómák szolgálhatnak legalkal-

a módszer elnevezése	előnyei	hátrányai
ultrahangos kezelés /fagyasztás-olvasztás/	gyors	nehezen reprodukál- ható /hő, oxidáció, fémnyomok/
tenzid eltávolítás	reprodukál- ható	igen lassú + tenzidnyomok
injektálós módszer	reprodukál- ható	oldószerenyomok

II. táblázat: kis, egyrétegű liposzómák elő-
állításának módszerei, rövid értékelésük

masabb vizsgálati rendszerünként.

Tekintsük át röviden a kis egyrétegű liposzómák előállításának módjait /II. táblázat; Racker és mtsai, 1975; Pagano és Weinstein, 1978/. A legrégebben és talán leggyakrabban alkalmazott módszer a többrétegű liposzómák ultrahangos kezelése -szonikálása- /Huang, 1969/. A módszer felbecsülhetetlen előnye gyorsaságában rejlik. Ugyanakkor alkalmazása során egyre több hátránya vált ismeretessé. Így az előállított liposzómák jellemzői igen erősen függenek a kísérleti feltételektől /energia-mennyiség, berendezés alakja, mérete, stb./ ezáltal a kapott rendszerek nagymértékben összehasonlíthatatlanokká és reprodukálhatatlannak válnak. A szonikáló fej közvetlen környezetében az energiasűrűség igen magas, kavitáció, aeroszolképződés léphet fel, amennyiben a kísérletet nem nitrogén, vagy argonatmoszférában végezzük, ez elősegíti a lipideg oxidációját. Nagy a lokális túlmelegedés veszélye is. A szonikáló fejből kontrolálatlan mennyiségű fémnyomok /pl. Ti/ kerülhetnek az oldatba, stb. A módszer egyik továbbfejlesztett változata a fagyasztás-olvasztásos technika /Kasahara és Hinkle, 1977/, amely monodiszperzebb rendszereket szolgál-

tat, de mivel az ultrahangos kezelést részmozzanatként tartalmazza, a fenti hibákkal terhelt.

A másik széleskörben alkalmazott technika valamely tenzid /általában Na-kolát/ lipidekkel vizes közegben képzett vegyes micellájából a tenzid fokozatos eltávolításával /dialízisével/ alakítja ki a liposzómákat. Ezt az utat követve eredményeink sokkal inkább reprodukálhatók lesznek. A módszer hátránya lassúsága /a dialízis több napot vesz igénybe/, illetve a membránban maradó tenzidnyomok zavaró hatása /Allen és mtsai, 1980/.

Kevéssé elterjedt technika az, amikor szerves oldószerben /pl. etanol/ oldott lipidet gyorsan kevertetett vizes közegbe fecskendezünk és ezáltal hozzuk létre a liposzomás szerkezetet /Batzri és Korn, 1973; Kremer és mtsai, 1977/. Ugyan a reprodukálhatóság itt is biztosított, és a módszer gyorsasága sem hagy különösebb kívánnivalót maga után, de a szerves oldószer /kb. fél-egy napot igénybevevő/ kidializálása itt sem tudja teljesen eltávolítani a membránstruktúrába beépült segédanyagot.

Látható tehát, hogy egyik módszer sem rendelkezik kizárólagos előnyökkel, így a körülmények és a követelmények ismeretében mindig az adott esetre kell mérlegelnünk, hogy melyiket választjuk.

Végezetül néhány szóban a liposzómák felhasználási lehetőségeiről. A már említett alapkutatásbeli jelentőségük mellett /lipid-fehérje, lipid-nukleinsav kölcsönhatások vizsgálata, membránenzimek működésének, szabályozásának mélyebb megismerése, transzportfolyamatok kutatása, stb./ gyógyászati alkalmazásuk is egyre ígéretesebbnek tűnik /Weinstein, 1981/. Számos kutatócsoport dolgozik annak a feladatnak a megoldásán, hogy hogyan lehetne a liposzómákba minél haté-

könnyebben beépített vegyi anyagot egy adott sejtcsoportba szelektíven bejuttatni. A jónéhány betegség /pl. enzimhiányok, nehézfém-mérgezések, ízületi gyulladás, a rák bizonyos fajtái, stb./ gyógyításában elért eredmények biztatóak.

2.1.2. Membránfehérjék izolálása

A membránfehérjéknek a lipidmembránnal való kölcsönhatásuk természete szerint alapvetően két fajtáját tudjuk megkülönböztetni. Az izolálandó fehérjének e felosztás alapján egyik vagy másik csoporthoz való tartozása izolálásának fő módszereit is meghatározza.

A membránhoz elektrosztatikus erőkkel kötődő fehérjéket perifériális membránfehérjéknek nevezzük. Eltávolításuk kelátképző anyagokkal /a kétértékű ionok megkötése/, megnövelt ionerősség, vagy pH változtatás segítségével történhet. A kölcsönhatás típusa szerinti másik csoportot a membránba hidrofób erők segítségével beépülő fehérjék, az ún. integráns membránfehérjék alkotják. E fehérjék elkülönítése csak a membrán szerkezetének megbontásával lehetséges.

A membránok megbontására és egyúttal az integráns membránfehérjék kiszabadítására a legrégebben alkalmazott módszer a különböző szerves oldószerekkel - illetve ezek keverékeivel, pl.: metanol, kloroform, fenol, stb. - való kezelés volt /Helenius és Simons, 1975/. A módszer alapvető hátránya, hogy ilyen körülmények között a membránfehérjék nagy része irreverzibilisen denaturálódik. Az úgynevezett kaotróp anyagok /jodidok, perklorátok, rodanidok, illetve Li-dijódszalicilsav, stb./ alkalmazása hasonló veszélyekkel járhat.

Egy igen elterjedt módszer azt a lehetőséget használja ki, hogy az integráns membránfehérjék jelentős része /pl. tripszinnel, papainnal stb. végrehajtott/ rész-

leges proteolizis hatására a membránról oldható, globuláris fehérjeként leválasztható. Az eljárás gyors és egyszerű, az esetek többségében meglepően kiméletes. További előnye, hogy alkalmazásával jól kezelhető és így az enzimológiai vizsgálatokra igen alkalmas fehérjéket kapunk. Alapvető hátránya viszont, hogy az így kapott preparátum amfipatikus sajátságait elvesztette, bármilyen lipidasszociátumba való beépülésre képtelen, és így tulajdonságai sem biztos, mindenben megegyeznek a membránkörnyezetben előforduló, ép enzimével.

Az izolálás során felmerülő problémák eddig leghatásosabb megoldását a különböző tenzidek alkalmazása jelentette. A kezdeti próbálkozások során olyan szintetikus, ionos tenzideket használtak, mint a Na-dodecilszulfát, illetve a dodecil-piridinium-klorid /Szterogenol/. Az izolált enzimeket károsító hatásuk felismerése után tértek át a sokkal kiméletesebbnek bizonyult epesavsókra /Na-kolát, Na-dezoxikolát, stb./. Az epesavsók elterjedésével párhuzamosan hódítottak tért a legkülönbözőbb nemionos tenzidek is, mint a polioxietilén-p-t-oktilfenoléterek -- pl.: TRITON X-100 --, a polioxietilén-alkoholok -- pl.: LUBROL WX -- stb.

Jelenleg a membránok megbontására szolgáló változatos eszközök sokaságából /amelyekbe a fentiekén kívül pl. az ultrahanggal történő kezelés is beletartozik/ választhatjuk ki az izolálandó fehérje természetének és más körülményeknek leginkább megfelelőit.

A membránokból eltávolított fehérjéket a szokásos elválasztási módszereken /kicsapásos frakcionálás, extrakció, kromatográfia, ioncsere, stb., stb./ kívül egyre gyakrabban vetik alá affinitáskromatográfiának is. Itt vagy az adott enzim valamely szubsztrátjával mutatott specifikus kötődését, vagy a fehérjét borító cukorrészek immobilizált lektinokkal /pl. concanavalin-A, fithemagglutin, stb./ történő asszociációját használják ki az elválasztás szempontjából.

2.1.3. Membránfehérjék in vitro visszaépítése a membránba

Attól függően, hogy a membránfehérjéket máshonnan izolált /esetleg szintetikus/ lipidbe, illetve eredeti lipidkörnyezetükbe építjük be, beszélhetünk membránfehérjék mesterséges membránba való beépítéséről, illetve visszaépítéséről /rekonstrukciójáról/. Mivel az alkalmazott technika és a lezajló folyamatok ugyanazok, a két esetet együtt tárgyalom. A 2.1.1. fejezetben ismertetett okok miatt a mesterséges membránok közül csak a kis, egyrétegű liposzómákba való beépítéssel foglalkozni.

III. táblázat: a membránfehérjék visszaépítésének módszerei, rövid értékelésük

a módszer elnevezése	előnyei	hátrányai
<u>I. párhuzamos beépítés</u> ultrahangos kezelés /fagyasztás-olvasztás/ tenzid eltávolítás		hő, denaturáció, hidrolízis tenzid inhibí- tál, denaturál
<u>II. utólagos beépítés</u> tenziddel ionos mechanizmussal	kiméletes kiméletes	orientáció meg- határozott csak savas lipi- dek esetén jó
<u>III. fúzió</u>	enzimrendsze- rek kiépítése	meghatározott li- pidösszetétel kell

/ Vö. a II. táblázattal is! /

A beépítésnek alapvetően két formája lehetséges. Vagy a már előzőleg elkészített liposzómába építjük be az utólag hozzáadott membránfehérjét, vagy a beépítés a liposzómák keletkezésével párhuzamosan történik. Mindezekből következik, hogy a membránfehérjék visszaépítésének a liposzómák előállítására szolgáló módszereken kell alapulnia /III. táblázat; Razin, 1972; Gennis és Jonas, 1976; Racker, 1979/.

A III. táblázatból látható, hogy adott módszer előnyeinek és hátrányainak megítélésakor a liposzómák készítése során figyelembevett szempontokon túl itt még a membránfehérjék érzékenységevel is számolnunk kell. Így az ultrahangos kezelés a fehérjét is károsítja, a tenzid denaturáló, adott esetben az enzimet gátló hatású lehet. Az utólagos /tehát a már korábban elkészített liposzómákat alkalmazó/ beépítési módszerek éppen a fehérjéket kímélő hatásuk miatt nagy jelentőségűek. Hátrányuk, hogy a beépült fehérjék értelemszerűen szinte kizárólag kifelé orientáltak. Bonyolultabb enzimrendszerek rekonstrukciójának egyik perspektivikus útjaként tekinthetjük az akár különböző módszerrel beépített eltérő enzimeket tartalmazó liposzómák fúzióaltatását. A módszer egyedi hátránya, hogy a liposzómák fúzióját előidéző körülmények kialakítása igen gondos munkát igényel.

A II. és a III. táblázat összehasonlítása során kitűnik, hogy az injektálós módszer membránfehérjék visszaépítésére való alkalmazása az irodalomban nem szerepel. Kísérletes munkám egyik célja ennek a módszernek a kipróbálása volt.

2.1.4. Membránfehérjék membránba való beépülése in vivo

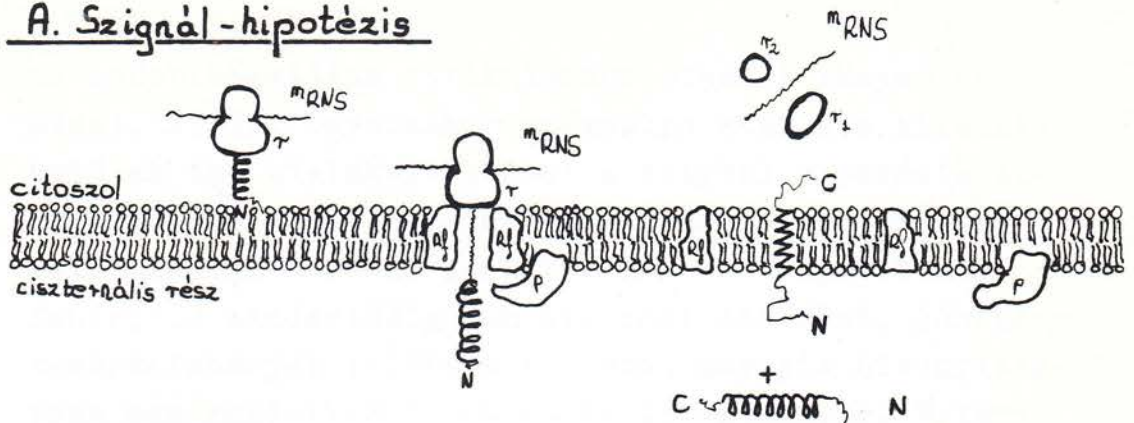
A citokémiai, immunhisztokémiai vizsgálati módszerek fejlődésével egyre inkább fény derült a membránfehérjék elhelyezkedésére a különböző sejtet határoló, illetve sejten belüli membránokban. A vizsgálatok tanulságai

szerint mind a membránfehérjék irányultsága a lipid kettősrétegen belül, mind a különböző membránok közötti megoszlásuk szigorúan meghatározott /Rothman és Lenard, 1977/. E vertikális és laterális aszimmetria kialakulásának magyarázata a sejtben lezajló szintetikus folyamatok kutatásának egyik sokat vizsgált, de mind a mai napig megnyugtatóan nem tisztázott része.

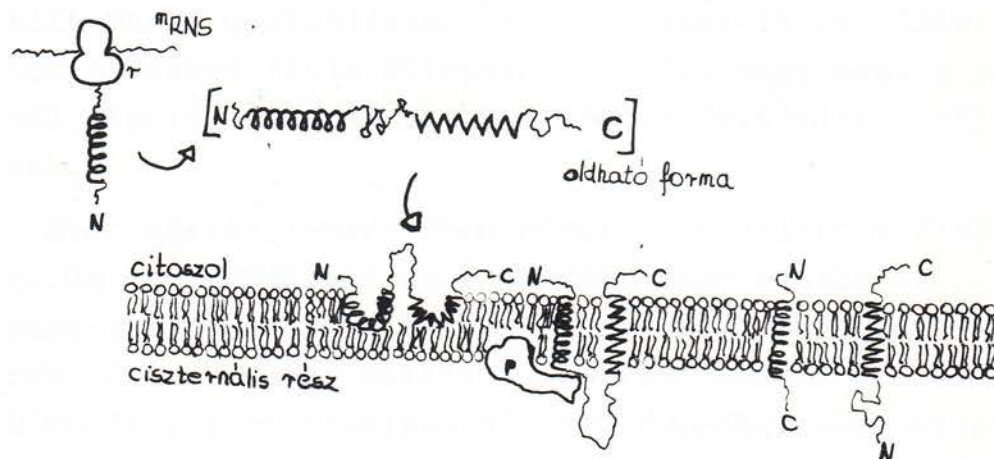
A kísérleti eredmények összegzésének első elméleti alapja a Blobel és mtsai /Blobel és Sabatini, 1971; Blobel és Dobberstein, 1975/ által felállított szignál hipotézis és ennek Rothman és Lenard /1977/ által továbbfejlesztett változata volt /ld. 1. ábra/. Az elképzelés szerint ugyanis a kiválasztásra kerülő fehérjék és a membránfehérjék jelentős részének szintézise során először egy "pre-N-terminális" részlet keletkezik a ^mRNS-en lévő, ún. "szignál" alapján. A kötőhelyet felismerve és kialakítva tulajdonképpen ez a peptid felelős a kezdetben szabad riboszómáknak az endoplazmatikus retikulumhoz való kötődéséért. A fehérjeszintézis és az endoplazmatikus retikulum membránján való keresztüljutás az elmélet szerint párhuzamosan zajlik, ezek után az endoplazmatikus retikulumon kialakult póruson keresztül a szintetizálódó fehérje mind nagyobb szakaszai kerülnek át a retikulum túlsó, ciszternális részébe. Membránfehérjék esetén végül sor kerülhet annak a C terminális, vagy ahhoz közeli hidrofób peptid darabnak a szintézisére, amely a fehérjének a membránhoz való kötődését a továbbiakban biztosítja.

Az elképzelés magyarázatot ad a membránfehérjéknek mind a kettősrétegbeli, mind /az endoplazmatikus retikulum és a Golgi rendszer membránenzimeket elkülönítő mechanizmusai feltételezésével -- Depierre és Dallner, 1975 --/ a különböző membránokbeli aszimmetrikus elhelyezkedésére. Az intenzíven folyó kutatások eredményeképpen a közelmúltban sikerült izolálni azt a 250 ezres rel. molekulatömegű savas, hidrofób fehérjekomp-

A. Szignál - hipotézis



B. Membránfelismerő - Konformáció elmélet



1. ábra. A membránfehérjék szintézisének magyarázatára kidolgozott elméletek. /A szintetizálódó fehérje vastag vonallal ábrázolt helikális részei a hidrofób szakaszokat, a vékony vonallal kihúzottak a hidrofil részeket jelölik; r -- riboszóma; r_1 és r_2 -- disszociált riboszóma; Rf -- riboforin; p -- peptidáz.//Wickner, 1980 nyomán/

lexet, amely képes a szignál felismerésére. Ugyancsak izolálták azt a 72 ezres rel. molekulatömegű fehérjét, amely az endoplazmatikus retikulum integráns részeként, afféle "horgonyként" az előbbi komplexet a riboszómával együtt elektrosztatikus kölcsönhatás segítségével

az endoplazmatikus retikulumhoz rögzíti /Meyer és mtsai, 1982/. Ugyanakkor számtalan adat nem illeszthető az így kialakult képbe: a szignál hipotézis által feltételezett riboforinokat /az endoplazmatikus retikulumban képződő pórust kialakító hipotetikus fehérjék/ mindeztidáig nem sikerült izolálni, jónéhány membránfehérjét találtak viszont, amelyik bizonyíthatóan nem rendelkezett szignál-szekvenciával, N-terminálisával kötődött a membránhoz, vagy többször fúrta át a lipid kettősréteget; membránbeépülése szignifikánsan a szintézise után következett be, illetve beépüléséhez fluid állapotú membrán, vagy más, a szignál hipotézis által meg nem jósolt feltételek kellenek.

Ezen adatok ismeretében alkotta meg Wickner /1980/ az ún. "membránfelismerő-konformáció" elméletét /membrane-triggered-folding hypothesis; ld. 1. ábra/, amelynek lényege, hogy bizonyos membránfehérjék eredetileg hidrofil, a citoszolban oldható formában szintetizálódnak, majd szubsztrátjuk, esetleg maga a membrán által elősegített átrendeződésük folytán kerül a felszínre az a hidrofób részlet, amely ezek után spontán módon rögzíti e membránenzimeket az adott membránhoz.

A spontán beépülés lehetőségével számtalan szerző foglalkozott /összefoglalás: Heinrich, 1982/. Néhányan, mint a "hurok-modell" szerzői Haleouya és Inouye /1979/ vagy Garnier és mtsai /1980/ az ismert szignálok összetételéből /a bázikus, illetve savas aminosavak a hidrofób aminosavak közötti elhelyezkedéséből/ próbáltak következtetéseket levonni a szignál, illetve a transzprotálandó fehérje elhelyezkedésére a membránon belül; mások, így von Hejne /1981/ és a "hélix-hajtú" elmélet szerzői Steitz és mtsai /1982/ a spontán beépülés lehetőségét energetikai megfontolások alapján igazolták.

Látható tehát, hogy a különböző membránenzimek membránbeépítésének vizsgálata ezen elképzelések pontosí-

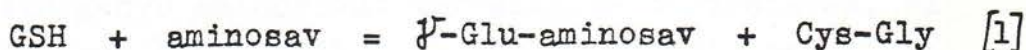
tásához is szolgálhat részletekkel.

2.2. A γ -glutamil transzpeptidáz tulajdonságai, funkciója

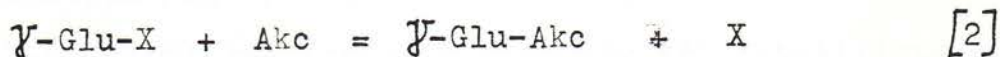
2.2.1. Definíció, az enzim által katalizált reakciók

A γ -glutamil transzpeptidáz / γ -GT, EC: 2.3.2.2./ egy olyan sejtmembránhoz kötött glikoproteid, amely a γ -glutamil vegyületek γ -glutamil csoportjának aminosavakra, peptidekre és vízre való átvitelét katalizálja.

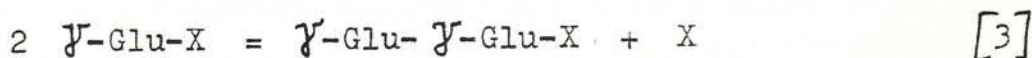
Dakin és Dudley /1913/ hetven éve mutatta ki a glutathion /GSH/ hasnyálmirigybeli degradációját. Ez a megfigyelés utalt először a transzpeptidáz léteire. Jónéhány évvel később Hanes és mtsai /1950, 1952/ bizonyították be, hogy e lebomlás kezdő lépése a következő enzimreakcióban keresendő:



Az enzim által katalizált reakciók köre azonban ennél jóval tágabb: megfelelő " γ -Glu donorról" / γ -Glu peptidek, de glutamin is/ képes a γ -Glu csoportot az "akceptorra" /aminosavakra, peptidekre, de vízre is/ transportálni /Hanes és mtsai, 1952; Tate és Meister, 1975/:



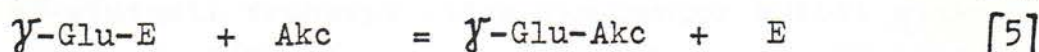
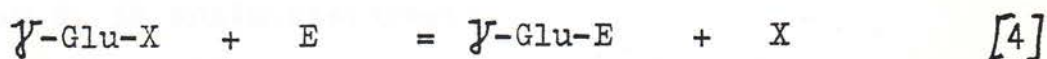
A fenti általános reakció egy speciális esete az autotranszpeptidáció, amely L-glutaminsavat tartalmazó vegyületek esetén állandó kísérője a transzpeptidáló reakciónak, sőt az aktiváló hatású akceptor hiánya esetén dominánssá is válhat /Meister és Tate, 1976; Tate és Meister, 1981/:



Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy akceptor távollétében a vegyület hidrolizise és autotranszpeptidációja zajlik le. Amennyiben a reakcióelegyben megfelelő akceptor /pl. GlyGly, amely a leghatékonyabbak egyike/ van

jelen, a reakció sebessége ugrásszerűen megnő, és fő reakcióúttá a [2] egyenlettel leírható transzpeptidáció válik.

A folyamat tipikus ping-pong kinetikát mutat /Tate és Meister, 1974/b/, amelyben glutamin esetén a [4], minden más esetben pedig az [5] egyenletbeli átalakulás a sebességmeghatározó /Thompson és Meister, 1979/:



/E = enzim/

A különböző forrásokból izolált transzpeptidázok szubsztrátspecifitása között jó egyezés található: donorként szinte bármilyen /C-terminálisként nem nagy térigényű aminosavat tartalmazó/ természetes, vagy szintetikus γ -glutamil di-, vagy tripeptid szóba jöhet, a legjobb akceptornak pedig a neutrális, nem elágazó láncú aminosavak, dipeptidek bizonyultak /Tate és Meister, 1974/b, 1981; Meister és Tate, 1976/. E specificitás-vizsgálatok nagymértékben hozzájárultak ahhoz, hogy ma a γ -GT aktiv centrumáról már egy hozzávetőleges képet alkothatunk /ld. következő fejezet/.

A γ -glutamil transzpeptidáznak még két katalitikus sajátosságát fedezték fel. Az egyik az enzim kisebb alegységének a nagyobbik alegységet lebontó tulajdonsága. E proteolitikus folyamat a γ -GT natív állapotában nem megy végbe, kizárólag az előzőleg egymástól elválasztott alegységek egymásrahatásakor tapasztalható /Gardell és Tate, 1979, 1981/.

A másik folyamat tulajdonképpen csak közvetve kapcsolódik az enzim működéséhez. Tate és mtsai /1979/ fedezték fel, hogy a transzpeptidáz jelenlétében a glutation glutationdiszulfiddá való oxidációja a sokszorosára gyorsul. A későbbi vizsgálatok /Griffith és Tate, 1980/

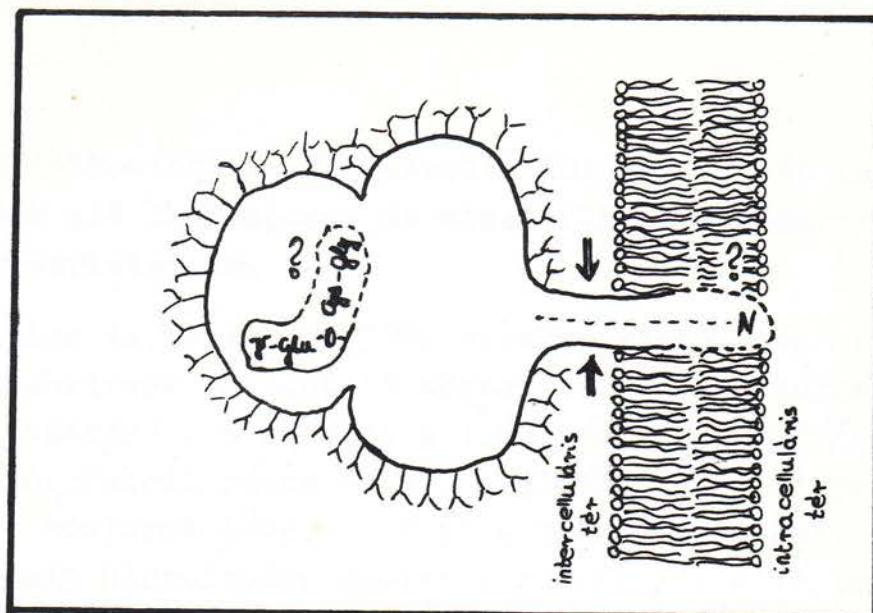
tisztázták, hogy a GSH oxidációját tulajdonképpen a transzpeptidáció során keletkező Cys-Gly katalizálja. A Cys-Gly a glutationnál jóval oxidábilisabb, így a GSH oxidációját véfsősoron egy nem enzimatis lépés, a kialakult cisztinil-bisz-glicinnel való hidrogén-csere segíti elő.

2.2.2. Az enzim szerkezete

γ -glutamil transzpeptidáz membránhoz kötött glikoproteid. Izolálhatóságának körülményei, tenzidek hiányában észlelhető aggregációja /pl. Hughey és Curthroys, 1976/ arra utal, hogy a sejtmembrán integráns részét képezi. E tulajdonságok az enzim szerkezetéből adódnak.

Jelen tudásunk szerint az enzimet két alegység alkotja, amelyből a kisebb 22, a nagyobb 46 ezres rel. molekulatömegű /patkányvese γ -GT, Tate és Meister, 1981/. A membránhoz való kötődésért felelős igen erősen hidrofób rész a nagyobbik alegységen található /ld. 2. ábra/. Ez egy 52 aminosavat tartalmazó /patkányvese γ -GT, Hughey és mtsai, 1979; Matsuda és mtsai, 1980/b; Frielle és Curthroys, 1982/ polipeptid, amely az alegység N-terminális részletét képezi és a globuláris fehérjéből kinyúlva szabadon áll. Emiatt különböző proteolitikus enzimekkel /pl.: papain, bromelain, ficin, tripszin, stb./ szelektíven hasítható. Az enzim felületét borító oligoszacharidok a további lebontást meggátolják.

Az enzim aktív centruma két részből, a donor és az akceptor kötőhelyéből áll. A donor vegyület a glutaminsav γ -karboxilján keresztül egy a kisebbik alegységen lévő hidroxilcsoportozhoz kötődik /Elce, 1980; Thompson és Meister, 1979; Tate és Meister, 1977, 1981/. Az akceptor kötőhelyét még nem sikerült megbízhatóan lokalizálni. Az aktív centrum részét képezi egy a kis alegységben található Arg és His csoport is /Iwami



2. ábra: a Y-GT szerkezetének és elhelyezkedésének sematikus ábrázolása. /A csak feltételezések alapján berajzolható részeket szaggatott vonallal és kérdőjellel jeleztem. Az "Y"-ok a glikoziláltságra utalnak, a nyilak a proteolitikus hasítás helyét jelölik./

és mtsai, 1981; Milnerowitz és mtsai, 1981/. Echeteu és Moss /1982/b/ nemrégén megjelent közleménye egy 20000 körüli relatív molekulatömegű aktív enzim megtalálásáról tudósít, ami alapján mindkét kötőhelyet a kisebbik alegység részének kellene tartanunk. Ennek a feltételezésnek ellentmondanak Ding és mtsai /1982/ vizsgálatai, akik a Y-GT radioaktív sugárzás hatására bekövetkező inaktiválódásának tanulmányozásából arra a következtetésre jutottak, hogy mindkét alegység részt vesz a katalitikus folyamatban. Az aktív centrum szerkezetéről birtokunkban lévő ismeretek hiányosságára utal Horiuchi és mtsai /1978/ közleménye is, amelyben az enzimet alegységeire szétválasztva a nagyobbik alegységet katalitikusan aktívnak találták, és ebből, valamint egy kovalensen kötődő inhibitor, a 6-diazo-5-oxo-L-norleucin ugyancsak a nagy alegységhez való kötődéséből egy második kötőhely jelenlé-

tére következtettek. Egy második kötőhely létét támasztják alá Shakespeare és mtsai /1982/ hődenaturációs kísérletei is.

Thompson és Meister /1979/ érdekes elképzelést közöltek az enzimnek /a reakció közben lezajló/ konformációváltozásáról. E szerint a donorként szereplő γ -Glu peptid megfelelő része -- pl. a glutation glicinje -- "aktív" konformációba vinné át a transzpeptidázt. Erre a glutamin hidrolizise esetén a maleát /illetve természetes vegyületként a hippursav és származékai - Thompson és Meister, 1980 - / szolgálna, amelynek téralkata a megfelelő módon elhelyezett glicin részlettel meglepő egyezést mutat.

Az enzim glikoproteid. Munkatársam vizsgálatai szerint több izomer formája létezik: ezek hexózösszetételük különböző /Varga és mtsai, 1980/. Az izomerek immobilizált Concanavalin-A-val végzett affinitív kromatográfia segítségével egymástól elválaszthatók. Az oligoszacharid láncok végét szialinsavak alkotják. Emiatt kerül az enzim izoelektromos pontja az elég erősen savas tartományba. /Izoláltak már pH 3-4 körüli izoelektromos pontú izoenzimeket is./ Legújabban Matsuda és mtsai /1980/a/ mutatták ki, hogy a γ -GT molekula e része nem olyan stabil, mint azt korábban hitték. Így az izolálás közben sok /javarészt ál-/ izozim nyerhető, amelyek szialinsavtartalma, és ebből következően izoelektromos pontja is más. A teljesen deszialilált enzim izoelektromos pontja pH 8.6 körül van.

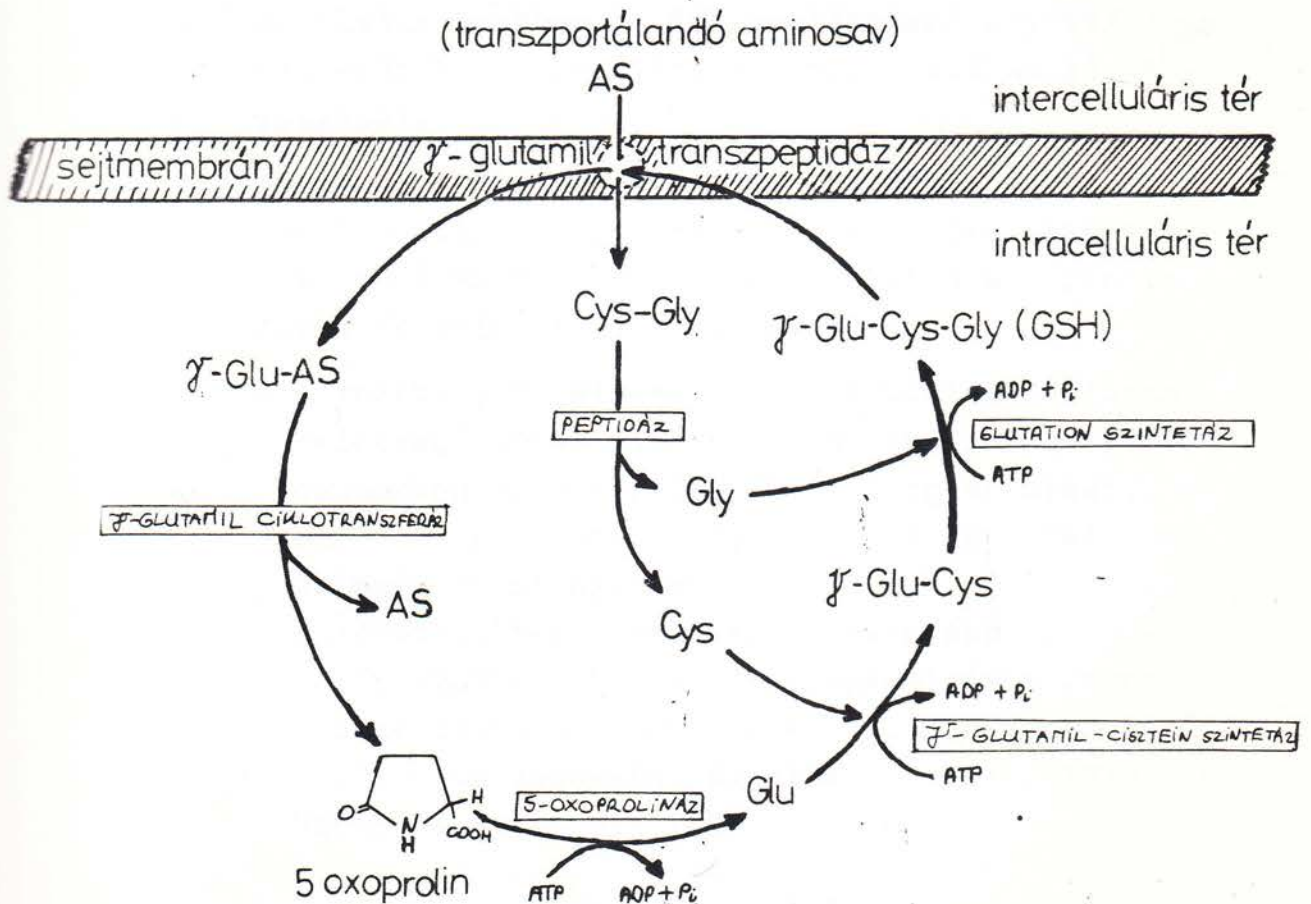
2.2.3. Jelenlegi ismereteink az enzim funkciójáról

A γ -GT celluláris funkciójával kapcsolatos vélemények ellentétesek. A transzpeptidáló reakció [2], felfedezése után Hanes úgy vélte /Hanes és mtsai, 1950, 1952/, hogy a folyamat a fehérjeszintézisben játszik szerepet.

Azonban már kortársai közül is néhányan felhívták a figyelmet arra, hogy a reakció része lehet az aminosav-transzportot szabályozó-lebonyolító folyamatoknak /Binkley, 1951/.

A glutation metabolizmusában szerepet játszó enzimek izolálása után Meister és Orlowski /Orlowski és Meister, 1970; Meister, 1973/ írta le az úgynevezett γ -glutamil ciklust /ld. 3. ábra/, amelynek kulcsenzime, a γ -GT -- a szerzők véleménye szerint -- az extracelluláris eredetű aminosavakat γ -glutamil-aminosavként át is juttatja a sejt membránján.

A 3. ábrából látható, hogy a ciklus hat enzime közül csupán egy, a γ -GT kötődik a plazmamembránhoz, a többi öt a citoplazmában mutatható ki. A γ -glutamil-aminosav-



3. ábra: a γ -glutamil ciklus

ként a membránon átjutó aminosavat a γ -glutamil ciklotranszferáz szabadítja fel a γ -glutamil kötésből. A többi négy enzim végül is a glutation regenerálásához szükséges reakciókat katalizálja. Az is kiderül az ábrából, hogy önmagában a keletkezett γ -glutamil-aminosav nem szolgál γ -glutamil donorként egy következő aminosav számára, így minden molekula aminosav transzportjára -- a glutation reszintézise miatt -- három molekula ATP terminális foszfátkötésének az energiája fordítódik. A kísérletek tanulsága szerint a két szintetáz enzim komplexet alkot, a végtermékként keletkező glutation saját képződésére reguláló hatással bír.

Számos tény szól e ciklus léte, működése mellett:

- a./ Az elmúlt években /a GSH analógokkal együtt/ csaknem száz γ -Glu peptidet izoláltak különböző szövetekből.
- b./ A transzpeptidázt -- főként hisztokémiai reakciókkal -- olyan szövetekben, szervekben lokalizálták, ahol az aminosavak transzportja a legnagyobb /Tate és Meister, 1981/. Így pl.:
 - a vesében, az elsőrendű kanyarult csatorna kefeszegélyének mikrovillusaiban, rendszerint a csúcsokon koncentrálnak /Rutenberg és mtsai, 1969; Marathe és mtsai, 1979; Szewczuk és mtsai, 1980; Shimada és mtsai, 1982/;
 - a vékonybélben /ezen belül leginkább az éhbélben/ található bolyhok kefeszegélyének mikrovillusaiban, különösen ezen kb. 2 μ hosszúságú nyúlványok csúcsain /Marathe és mtsai, 1979; Szewczuk és mtsai, 1980/;

- az agy oldalkamráiba nyúló, az agygerincvelői folyadékot termelő érfonadék /choroid plexus/ epithel sejtjeiben /Orlowski és mtsai, 1974; Okonkwo és mtsai, 1974; Reyes és Prather, 1976/; a gerincvelő középső csatornájának epitheliumában /Shirre és Haber, 1981/; az agykapillárisok a vér-agygátat képező epitheliumában /Varga és mtsai, 1977; Shirre és Haber, 1981/;
 - a szem sugártestje -- a csarnokvizet termelő -- kiemelkedéseinek epithel sejtjeiben /Ross és mtsai, 1973/;
 - a tüdőhólyagocskák epithel sejtjeinek mikrovillusaiban /Tate és Meister, 1981/;
 - számos külső és belsőelválasztású mirigy, így a tejmirigyek, a hasnyálmirigy, a májbeli epevezetők és epekapillárisok, a méhnyálkahártya, a méhkürt, a herék, a mellékherék, a prosztata, a pajzsmirigy, stb. epithel sejtjeiben /Tate és Meister, 1981/.
- c./ További közvetett bizonyítékként számos fiziológiai kísérlet támasztja alá a transzpeptidáznak az aminosavtranszportban játszott szerepét. A leggyakrabban alkalmazott módszerek közé tartozik jelzett szubsztrátok /pl. a donor glutation, akceptor aminosavak, stb./ metabolizmusának, turnoverének vizsgálata. Így pl.: aminosav túlterhelés esetén a vese glutation szintje csökken, turnovere megnő, jelezve, hogy összefüggés van az aminosav reabszorpció és a glutation vesében játszott szerepe között. A transzpeptidázt gátolva, a GSH szintje a többletként adott aminosavak jelenlétében is változatlan marad /Griffith és mtsai, 1979/. Viña és mtsai /1981/ hasonló jelenséget figyeltek meg szoptatós patkányok tejmirigyének vizsgálata során. Amennyiben a transzpeptidáz aktivitását maleát adásával a glutation hidrolízise irányába toljuk el, aminosavuria lép fel /Tate és

Meister, 1974/a/. Griffith és mtsai /1981/ a γ -glutamil transzpeptidáz enzimaktivitásának részleges hiányában szenvedő betegek vizsgálatával kimutatták, hogy a betegek vizeletében kimutatható γ -Glu-Cys képződését a γ -GT katalizálja.

Ha a ciklus egy későbbi reakciót katalizáló tagját, az 5-oxoprolináz enzimet /ld. 3. ábra/ gátoljuk, az 5-oxoprolin mennyisége megnő, aminosav adása után pedig sokkal magasabb koncentrációt ér el /Orlowski és Wilk, 1975/. Az 5-oxoprolin felhalmozódása olyan peptidek adása után is megfigyelhető, amelyek nem közvetlen szubsztrátjai az 5-oxoprolin keletkezését katalizáló γ -glutamil-ciklotranszferásznak. Átalakulásukban a γ -GT hatása az elsődleges Orlowski és Wilk, 1976/. E megfigyelések a γ -glutamil ciklus működésével jól magyarázhatóak.

A ciklust érintő enzimopátia is vezethet az 5-oxoprolin felhalmozódásához. Öröklött oxoprolinuriában szenvedő betegek vizsgálata során kiderült, hogy szervezetükben a glutation szintetáz enzim szintje igen alacsony. A ciklusban a glutation keletkezését megelőző γ -glutamil-cisztein felgyülemése megnöveli az 5-oxoprolint szintetizáló γ -glutamil-ciklotranszferáz aktivitását, amely e dipeptidet /mint egyik legjobb szubsztrátját/ 5-oxoprolinná alakítja át /Meister és Tate, 1976/.

Hasonló módszerek alkalmazásával a vese, a choroid plexus és a szem sugártestje vizsgálatával kapott kísérleti eredmények /Orlowski, 1976; Meister és Tate, 1976/ jól magyarázhatóak a γ -Glu ciklus működésének feltételezésével. Az a néhány kezdetleges élőlény /élesztő - Pennincxx és mtsai, 1980 -; hidra - Danner és mtsai, 1978 - /, amelyekben a γ -Glu ciklus léte közel bizonyított, jó kiindulási alapul szolgálhat a későbbi kísérletek számára. E vizsgá-

latok ilyen egyszerűbb, szinte modellrendszerként kezelhető alanyokon jobban megvalósíthatók.

- d./ Bár az in vivo körülményeket kevésbé megközelítő, de jóval egyszerűbb és így definiálhatóbb modellként mesterséges membránok /pl. liposzómák/ is alkalmazhatók a ciklus működésének vizsgálatára. Ezt felhasználva Sikka és Kalra /1980/ szolgáltatatta az aminosavtranszport eddigi legközvetlenebb bizonyítékát. Az amerikai kutatók a transzpeptidázt foszfolipid vezikulába építve bizonyították a radioaktív glutaminsav transzportját. Kísérleteik szerint az intravezikuláris glutationból és a kívülre adagolt jelzett glutaminsavból γ -Glu-Glu keletkezik.

Bár ezen indirekt bizonyítékok erősen alátámasztják a γ -Glu ciklus létét, a ciklus működéséről vallott vélemények erősen megoszlanak. Ugyanez elmondható az egyes enzimek /de különösen a kulcsszerepet játszó γ -GT/ az aminosavtranszportban játszott szerepének értékeléséről is. Nem célom az utóbbi években kibontakozott szakmai vita részletes ismertetése, de néhány fontos ellenvetésre szeretném felhívni a figyelmet:

- a./ Számos cikk jelent meg, amely mind az in vivo rendszerekben /Hughey és mtsai, 1979; Sikka és Kalra, 1980/, mind az in vivo kísérletekben /pl. Inoue és mtsai, 1977/a; Tsao és Curthroys, 1980/ bebizonyította, hogy a γ -GT aktiv centrumával a membrán külső oldala felé fordulva helyezkedik el. Ez a tény ellentmond a γ -Glu ciklusról kialakított korábbi képnek /ld. 2-3. ábra/.
- b./ A γ -GT által katalizált reakciók ismertetésekor említettem, hogy donorként glutamin, akceptorként a víz is szerepelhet. A reakciót maleát jelenléte erőteljesen stimulálja. E tényre -- amelyet másképpen úgy is fogalmazhatunk, hogy a foszfáttól füg-

getlen glutamináz aktivitás a γ -GT katalitikus funkciója -- először Tate és Meister /1975/ hívták fel a figyelmet. Mivel a vese kefeszegélymembránja mentén lokálisan jelentkező pH és koncentrációviszonyokról praktikusán semmilyen információnk nincsen, a γ -GT transzpeptidáló és hidrolizáló sajátosságának in vivo arányára az irodalomban elég szélsőséges becslések találhatók. Reakciókinetikai megfontolások alapján Allison és Meister /1981/ bizonyították véli a γ -GT in vivo transzpeptidáló sajátosságát. McIntyre és Curthroys /1979/, Elce és Broxmeyer /1976/ valamint Welbourne és mtsai /1980/ más körülmények között végzett hasonló kísérletek alapján arra a következtetésre jutnak, hogy a γ -GT fő funkciója a transzpeptidáció helyett az extracelluláris glutation hidrolizise. A leközölt vélekedések másik végletének tekinthetjük Bregar és Mtsai /1980/ eredményeit, amelyek alapján a transzpeptidáló aktivitást a glutamin-szintetáz enzim nem fiziológiás mellékreakciójának tartják.

- c./ A helyzetet tovább bonyolítja az enzim vesében való elhelyezkedéséről szóló cikkek ellentmondásossága: Mamelok és mtsai /1980/ új módszerek alkalmazásával a kefeszegély membránjaira jellemző többi transzportáló rendszertől elkülönítették a γ -GT aktivitását. Heinle és Wendel /1977/ a vesecsatornácskák /nefronok/ igen kis részleteit vizsgálva a γ -Glu ciklus enzimeit leginkább a Henle kacsban találták meg, amely köztudomásúan csekély szerepet játszik az aminosavak reabszorpciójában. Az enzimek a különböző részekben mind abszolút módon, mind egymáshoz viszonyítottan más mennyiségben fordultak elő. /Ez eléggé meglepő egy integrált egészként elképzelt rendszer tagjaitól./ Velük ellentétben Sochov és mtsai /1980/ a vesetestecskékhez kötötten is számottevő

γ -GT aktivitást mutattak ki. /A glomerulusbeli enzimaktivitás mértéke az összaktivitás 15 %-a volt./

d./ Élettani kísérletek és klinikai megfigyelések is szólnak a korábbi feltételezések ellen. Schulmann és mtsai /1975/ olyan betegről számoltak be, aki szinte teljes γ -GT hiányban szenvedett. Ennek ellenére vizeletében az aminosavak normális koncentrációjával szemben az ürített glutation mennyisége volt kórosan magas. További kísérletek is /Inoue és mtsai, 1977/a-b; Pellefigue és mtsai, 1976/ az aminosav anyagcsere a γ -Glu ciklus egy vagy több enzimének blokkolása melletti zavartalanságáról számolnak be.

1977-től napjainkig számos elképzelés született ezen el-
lentmondások feloldására, azonban kielégítő magyarázatot adni mindezekig nem sikerült.

A γ -glutamil transzpeptidáznak az élő szervezetben betöltött szerepéről alkotott képünket tovább gazdagítják és egyben bonyolítják a következő megfigyelések, feltételezések.

Legújabban a Meister és mtsai által kapott kísérleti eredmények nyomán az enzinek a glutation körforgalmában játszott szerepe került az érdeklődés középpontjába /Griffith és Meister, 1979, 1980; Griffith és mtsai, 1980; Anderson és mtsai, 1980/. A kísérletek tanulsága, valamint a belőlük levont következtetések szerint a glutationnak a sejt körüli térbe való kijuttatása a sejtek általános tulajdonsága. A vér alacsony glutation koncentrációját a szervezet bizonyos pontjain, pl. a vesében felhalmozott γ -GT állítja be. E szervek közötti körfolyamat célja még nem tisztázott: detoxikáló, illetve a sejtmembránokat regeneráló szerepet tulajdonítanak neki.

A transzpeptidáz döntően a plazmamembránhoz kötött enzim. Az enzimet számottevő mennyiségben mutatták ki a

lépben és a limfocitákon való lokalizációja is sikerrel járt /Marathe és mtsai, 1980; Novgorodsky és mtsai, 1976/. Felmerült annak a lehetősége is, hogy a transzpeptidáz a testfolyadékba kiválasztott és hatását ott kifejtő enzimként, vagy esetleg immunoglobulinként viselkedhetne /Binkley és Wiesemann, 1975/. De Bault igen szép és meggyőző kísérletekkel bizonyította, hogy az agybeli transzpeptidáz aktivitás alapvetően a glia sejtekre jellemző és pl. az agykapillárisok endothel sejtjei csak a velük való érintkezés után mutatnak számottevő γ -GT aktivitást /De Bault és Canvillla, 1980; De Bault, 1981/. Ezek az eredmények elképzelhetővé teszik, hogy az enzimnek van valamilyen szerepe a sejtközzötti folyamatokban.

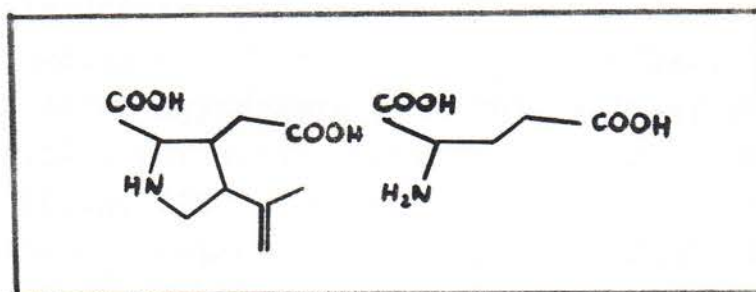
A γ -glutamil transzpeptidáz egyre nagyobb szerepet kap a farmakológiai kutatásokban is. Anderson és mtsai /1982/ kezdtek el foglalkozni a transzpeptidáz szerepével a leukotriének átalakulásában. Kutatásaik kiterjesztésével a prosztata glandinok biokémiájának egy esetleges új fejezetére derülhet fény.

A γ -glutamil transzpeptidáz aktivitásának meghatározását elterjedt diagnosztizáló módszerként alkalmazzák a klinikai gyakorlatban. A különböző sejtközzötti, illetve kiválasztott nedvek, pl.: vér, vizelet, hasnyál, epe, ízületi nedv, stb. megnövekedett γ -GT aktivitása alapján a megfelelő szervek betegségére lehet következtetni. Ezzel kapcsolatos, egyelőre csak elvi jelentőségű ötletet irtak le Magnan és mtsai /1982/ nemrég megjelent cikkükben: a fenti betegségek gyógyítására alkalmas, de egyébként toxikus szerek γ -glutamil vegyülatként történő "maszkírozásával" a "pro-drug"-ok egy új családját lehetne kifejleszteni. A világ számos pontján folynak intenzív vizsgálatok a transzpeptidáz krónikus alkoholizmusban és különböző rákos meg-

betegedésekben mutatott aktivitásváltozásának részletesebb megismerésére.

2.3. A kainsav, mint az agybeli glutaminsav-alapú ingerületáttevődés hatékony befolyásolószere

A kainsavat /azaz a 2-karboxi-4/l-metil-etenil/-3=pirrolidinecetsavat, ld. 4. ábra/, amelyet leggazdaságosabban tengeri moszatokból /pl. *Digenea Simplex*/ lehet kinyerni, kezdetben féreghajtóként /pl. ascaricidként/ használták. A vegyület a glutaminsav adott konformációját rögzítő analógjának tekinthető /ld. 4. ábra/.



4. ábra: a kainsav és a glutaminsav szerkezete

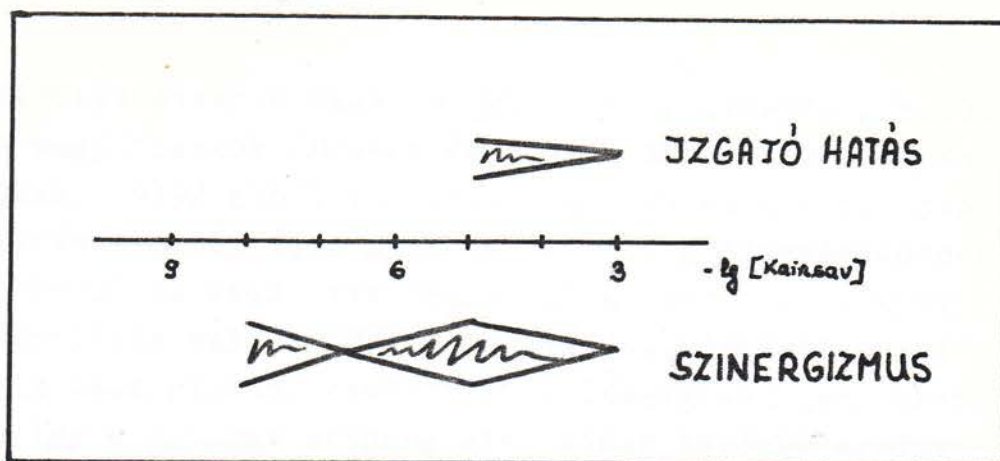
Shinozaki és Konishi /1970/ irták le először ennek az aminosavszármazéknak az idegrendszerre gyakorolt hatását. Az azóta elvégzett vizsgálatok sokasága számtalan részlettel gazdagította a kainsav hatásának leírását, így napjainkra világossá vált, hogy önálló receptorán /receptorain/ mutatott hatásán kívül valószínűleg a szinaptikus részbe kijutó glutaminsav felvételét is gátolni képes.

2.3.1. A kainsav ingerképző, idegsejteket izgató hatása

Az "alapvegyület", a glutaminsav idegsejteket izgató hatását már a hatvanas évek elején leírták /Curtis és Watkins, 1963/. A kainsav hatása gerinctelenek és gerincesek esetében alapvetően különbözőnek tűnik, ugyanis gerinctelenek esetén csak a glutaminsav által kiváltott izgalmi állapotot fokozza, gerinceseken alkalmazva viszont önmaga is képes izgató hatást kifejteni /Shinozaki és Shibuya, 1974; Takeuchi és Onodera, 1975; Constanti és Nistri, 1976/.

A hatás jellege hasonló az epilepsziás helyi görcsöknél megfigyelhetőhöz, tulajdonképpen "folyamatos, elnyújtott epilepsziás állapot"-nak is tekinthető /Nadler és Cuthbertson, 1980; Nadler, 1981/. Az élő állat agykérgére juttatott kainsav kiterjedt epileptikus görcsöket /"grand mal"/ okoz /Guldin és Markovitsch, 1982/. Az epileptikus görcsök eddigi legteljesebb leírását Cavalheiro és mtsai /1982/ adták. Észleléseik szerint a kezdeti, 1-2 napos akut fázis után néhány napos nyugalmi szakasz következik, amely több hétig tartó napi 1-2 spontán rohammal jellemezhető szakaszba megy át.

A kainsav glutaminsav-szinergista, illetve önállóan izgató hatásának koncentrációfüggése érdekes szélsőértékeket mutat /ld. 5. ábra; Constanti és Nistri, 1976; Walker, 1976/. A glutaminsav izgató hatását a kainsav 10^{-8} és 10^{-5} M körüli koncentrációban jól, 10^{-6} és 10^{-3} M koncentrációban gyengén erősíti. Saját izgató hatása is a 10^{-5} M körüli koncentráció környékén erős, a milimólos koncentráció-tartományban viszont gyenge. Mindez arra utal, hogy az eredő hatás kialakulásában számos, egymással el-



5. ábra: a kainsav hatásainak koncentrációfüggése

lentétes hatású komponens vehet részt.

2.3.2. A kainsav hatása morfológiai szinten

A kainsav idegsejteket roncsoló, neurotoxikus hatását korán, a neuroaktiváló hatással párhuzamosan fedezték fel /Coyle, 1978; Mason és Fibiger, 1979/. A hatás jellegzetessége, hogy az átfutó idegrostok többnyire épségben maradnak, csak a bejuttatott kainsav körüli helyen lévő idegsejtek roncsolása tapasztalható. A roncsolás által okozott tünetcsoport megfelel a tartós vitustánc /Huntington chorea/ jelenségének. A hatás tüzetesebb vizsgálata során kiderült, hogy a glutaminsav és aszparaginsav analógok /így a kainsav/ idegsejteket izgató és roncsoló hatása párhuzamosan változik, így amennyiben az analóg által kiváltott tartós izgató hatást sikerül meggátolni /pl. feleslegben alkalmazott glutaminsavval, ill. más eszközökkel/ az idegsejtroncsolás is elmarad /Schwarz és mtsai, 1978; Montigny és Tardif, 1981/.

Érdekes és sok vitára alkalmat adó megfigyelés volt, hogy a kainsav roncsoló hatása a kéregtől a csikolt testhez /corpus striatum/ vezető afferens

pályákat átvágva nagymértékben csökkenthető. A kezdeti magyarázatok /McGeer és mtsai, 1978; Johnston és mtsai, 1979/ abból indultak ki, hogy az elvágás után egyrészt a térségbe nyúló glutaminerg idegvégződések többségének szelektív irtásával az izgalmi állapot létrejötte valószínűtlenebbé válik, másrészt a csikolt test glutaminsavfelvétele lényegesen lecsökken és így a kainsav szinergista hatása kevésbé érvényesül. A később részletesebb vizsgálatok /Nadler és Cutbertson, 1980; Montigny és Tardif, 1981/ tanulsága szerint a pályák átvágásának hatásgyengítése nem magyarázható kizárólag a glutaminerg végződések roncsolásával, hiszen más neurotranszmittererg pályák kiiktatása is hasonló eredményre vezet; amennyiben a kainsavat az átvágás után nem az agykamrákba, hanem lokálisan adjuk, hatáscsökkenés nem tapasztalható, valamint közismerten glutaminerg pályák szelektív átvágásával a hatáscsökkenés nem reprodukálható /McLennan, 1980/.

2.3.3. A kainsav hatása a metabolizmusra

A kainsav a neurotranszmitterekre általában kiürítő hatást fejt ki /Schwarz és mtsai, 1978; Mason és Fibiger, 1979; Nicklas és mtsai, 1979/a/. A hatás az acetilkolin esetén elhanyagolható, a glutaminsav, aszparaginsav, katekolaminok, szerotonin sorrendben folyamatosan, a GABA esetén ugrásszerűen megnő /Foster és Roberts, 1978; Friedle és mtsai, 1978/. A kainsavnak a γ -amino-vajsav metabolizmusára gyakorolt jelentős hatását /a felvétel több mint 70 %-os gátlása, stb; Nicklas és mtsai, 1979/b; Tran és Snyder, 1979; Tapia és Arias, 1982/ sok szerző figyelmen kívül hagyja, amikor hatásmódját élesen szembeállítja a sztrichninével, amely köztudomásúan gátló neuronok bénításával fejt ki görcsképző hatását.

Érthető módon az irodalomban a glutamin, a glutaminsav és az aszparaginsav kainsav jelenlétében bekövetkező koncentrációváltozásáról publikálták a legtöbb eredményt /Lakshmanan és Padmanaban, 1974; Simon és mtsai, 1976; Friedle és mtsai, 1978; Ferkany és mtsai, 1982/. Ezek szerint mintegy 50-150 mM NaCl jelenlétében a kainsav a glutaminsav kötését nagymértékben gátolja, különösen az aminosav-felvétel /akár 70 %-ot is elérő/ csökkentésével. Radioaktív nyomjelzéses technikával tisztázható volt, hogy a kiáramló glutaminsav javarészt az újonnan szintetizálódott, és hogy jelentős része a glia sejtekből származik /McGeer és mtsai, 1978; Nicklas és mtsai, 1980; Krespan és mtsai, 1982/. Ezen utóbbi következtetést támasztja alá a veratridinnel elérhető, célzottan az idegvégződésekből történő glutaminsav-kiáramlás mértékének a kainsav által okozottával való összehasonlítása is; kainsav esetén a kiáramlás mértéke hatszoros, amelyet a gliasejtekben található glutaminsav-készletek mobilizálódásával jól magyarázhatunk.

Az irodalomban vizsgált két egyértékű kation, a Na^+ és a K^+ koncentrációváltozásai közül a nátriuméra egyértelmű adatokat találhatunk /Biziere és Coyle, 1978; Krespan és mtsai, 1982/. A kainsav már 10^{-7} M koncentrációban is jelentősen megnöveli a sejtmembrán permeabilitását Na^+ ionokra és így Na^+ beáramlást idéz elő. K^+ esetén a kainsav hatása koncentrációfüggően bifázisos lehet /Biziere és Coyle, 1978/, így értelmezhetők a K^+ eloszlás változatlan voltát /Krespan és mtsai, 1982/ és a nagymértékű K^+ kiáramlást /Friedle és mtsai, 1978/ jelentő cikkek ellentmondásai.

Az idegsejtek ATP készlete felére csökken kainsav hatására /Nicklas és mtsai, 1980; Biziere és Coyle, 1978/. A csökkenés oka a szintézis gátlásán és az

ATP kiszabadulásán kívül leginkább a sejt izgalmi állapotából következő fokozott felhasználásban kere-sendő /Retz és Coyle, 1982/. A jelenség az epilepszi-ás rohamokból jól ismert és tartós fennállása esetén az ionkoncentráció-változásokkal együtt nagymértékben oka lehet az idegsejtek elhalásának.

2.3.4. A különböző ionkoncentrációk hatása az ingerü- letátvivő aminosavak felszabadulására és felvé- telére

Az ionkoncentrációk meghatározását, diszkutálását mind az *in vitro*, mind az *in vivo* kísérletekben szá-mos szerző mellőzi, noha jónéhány kísérleti tény mu-tatja, hogy az ionkörnyezet még a folyamatok irányát is meghatározó tényező lehet. Ezért érdemes külön is foglalkozni a legfontosabb kationoknak a neurotransz-mitter aminosavak felszabadulására és felvételére gyakorolt hatásával.

Az irodalmi hivatkozások egy része szerint a kain-sav csak Na^+ ionokkal együtt képes hatásának kifejté-sére /Constantí és Nistri, 1976; Walker, 1976/. Ké-sőbbi közlemények a nátrium jelenlétét csak a gluta-minsav felvételének gátlása szempontjából tartják nélkülözhetetlennek, bár megjegyzik, hogy ez a felve-vő rendszer pl. a GABÁ-énál kevésbé érzékeny a Na^+ ion koncentrációjára /Balcar és Johnston, 1972; Johnston és mtsai, 1979; Baudry, 1979/. A glutamin-sav felvételekor, illetve a kainsav hatásakor szere-pet játszó Na-csatornák az elektrogén Na-csatornák-tól különbözőek. Erre az a megfigyelés utal, hogy a glutaminsav felvételt és kiáramlást a tetrodotoxin alkalmazása nem befolyásolja /London és Coyle, 1979/. Az 50 milimóllal megnövelt K^+ koncentráció a gluta-minsav jelentős felszabadulásához vezet /Minchin, 1977; Hamberger és mtsai, 1979/.

Ca^{2+} mentes közegben, illetve Ca^{2+} ionok koncentrációját a fiziológiás érték fölé emelve ugyancsak jelentős mennyiségű aminosav áramlik ki a sejtközötti térbe /Hamberger és mtsai, 1979/a/. A Ca^{2+} elvonás hatása a Mg^{2+} koncentráció emelésével elősegíthető /Potashner, 1978/.

2.3.5. A kainsav hatásmechanizmusairól tudottak összefoglalása

A kutatások kezdeti szakaszában a kainsavnak a glutaminsavval mutatott szerkezeti analógiája alapján /ld. 4. ábra/ természetes módon merült fel az az elképzelés, hogy a kainsav a glutaminsav receptorához tartósan kötődve az idegsejtet állandó izgalmi állapotba juttatja. Később számos tény bizonyította ennek az elképzelésnek a tarthatatlanságát: nagy feleslegű jelzetlen kainsav hatására a receptorhoz kötött jelzett glutaminsav nem vált szabaddá és nem sikerült a jelzett kainsavnak a glutaminsavval történő leszorítása sem /Foster és Roberts, 1978; Michaelis és mtsai, 1980/. Na-kolát segítségével a receptorhoz kötött, jelzett kainsavat az ugyancsak receptorhoz kötött, de más módon jelzett glutaminsav mellől szolubilizálni lehetett /Michaelis és mtsai, 1980/. Végül számos olyan idegsejtet izoláltak, amely a két aminosavra 70-3000-szeres érzékenységbeli különbséget mutatott /Montigny és Tardif, 1981/.

Ezek a kísérletek nyilvánvalóvá tették, hogy van olyan glutaminsav-kötőhely, amelyhez kainsav nem köt /ami nem meglepő, ha figyelembe vesszük az eddig leírt glutaminsav kötőhelyek nagy számát és változatosságát, ld. IV. táblázat/ és fordítva: elképzelhető a kainsavnak önálló receptora is. A helyzetet tovább bonyolította a kainsav hatásmódjának a gerincteleneknél és a gerinceseknél tapasztalt, korábban már emli-

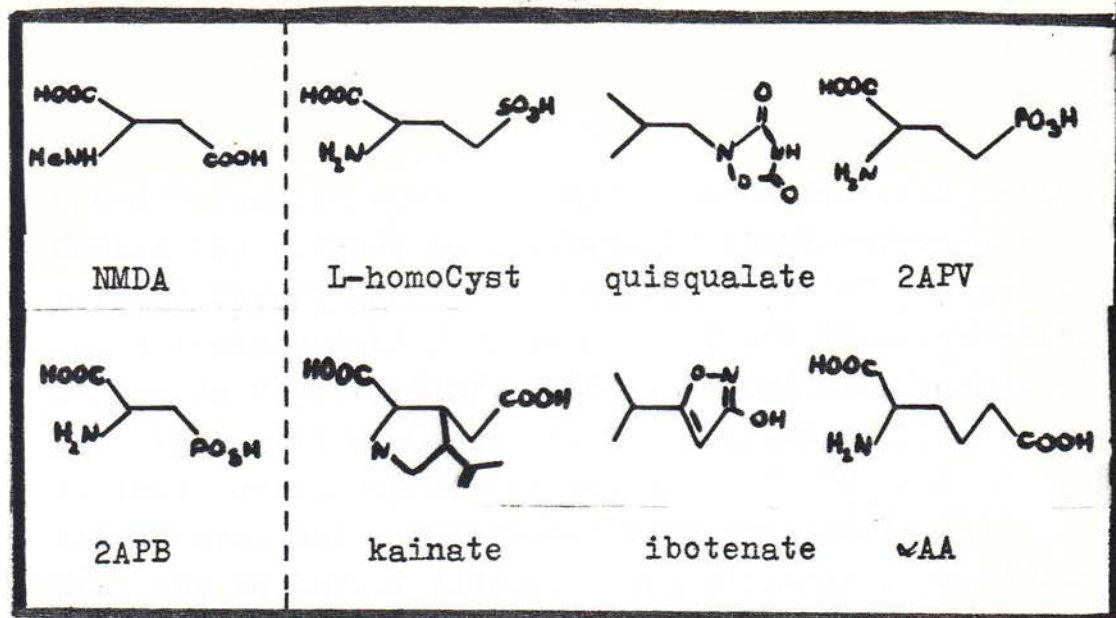
IV. táblázat: a patkányagyban leírt glutaminsav kötőhelyek

Előfordulás	Szám	K_D / μ M/	b_{max} /nM/mg/	Irodalmi hivatkozás
agykéreg	2	4.0	0.2	Roberts, 1974 Foster és Roberts, 1978
	1	8.0	0.03	
		0.7	0.07	
striatum	1	0.2	0.006	Baudry és Lynch, 1979
szinapszis	4	0.2	0.002	Michaelis és mtsai, 1974
		0.2	4.4	
		2.0	-	
	1	4.0	0.009	Roberts, 1974
		8.0	0.03	
glikoproteidek	1	0.8	66.0	Michaelis, 1975
proteolipidek	3	0.3	0.5	De Robertis és Fiszler de Plazas, 1976
		5.0	32.0	
		55.0	166.0	

tett különbözősége, nevezetesen, hogy gerinctelenek esetén a kainsav csak a glutaminsav hatását képes erősíteni, ezzel szemben gerinceseknél a kainsav által kiváltott hatás összetettebb: a szinergizmus mellett önálló neuroaktivátorként is szerepelhet.

További információkat jelentettek a kainsav illetve a glutaminsav adásának különböző módjai esetén megfigyelt hatásbeli különbségek: a kainsav csak abban az esetben erősítette a glutaminsav hatását, ha mindkettőt a közeghez adták. Akármelyiket iontoforetikus, közvetlenül a szinaptikus részbe juttatva a szinergista hatás /gerincteleneknél az egyetlen hatás/ elmaradt /Shinozaki és Shibuya, 1974; Takeuchi és Onodera, 1975; Walker, 1976/. E jelenségre kétféle magyarázat adható: az egyik arra a kísérleti tényre épít, hogy a kainsav a glutaminsav ún. "nagy affinitású" felvételének /uptake-jának/ jó inhibitora / $IC_{50} = 200-300 \mu M$; maximális inhibíció: 60-70 %; Lakshmanan és Padmanaban, 1974; Frielles és mtsai, 1978; Johnston és mtsai, 1979/. Ezek alapján a szinaptikus rész mellett jelenlévő kainsav meggátolja a glutaminsav felvételét, amely így nagyobb koncentrációban erőteljesebb hatást képes kifejteni. A másik féle magyarázatot Walker /1976/ alapozta meg, amikor kétféle /szinaptikus és szinapszison kívüli/ receptort feltételezve a kainsav szerepét a szinapszison kívüli, Na^+ ionok jelenlétét igénylő, aszparaginsavra is érzékeny receptor aktiválásában jelölte meg.

Később újabb aszparaginsav és glutaminsav analógok, antagonisták alkalmazásával három receptort különböztettek meg /ld. 6/a-b. ábra; Davies és mtsai, 1979; Davies és Watkins, 1981; Honoré és mtsai, 1981/, amelyekből az egyik inkább aszparaginsav, a másik inkább glutaminsav receptorként viselkedett, míg a kain-



6/a. ábra: a különböző aszparaginsav és glutaminsav analógok

agonista endogén ligand	NMDA, 2APV L-Asp	GDEE, α AA L-Glu	γ DGG, 2APB ?
ibotenate			
L-Asp			
L-homoCyst			
L-Glu			
quisqualate			
kainate			
Izgató hatás			

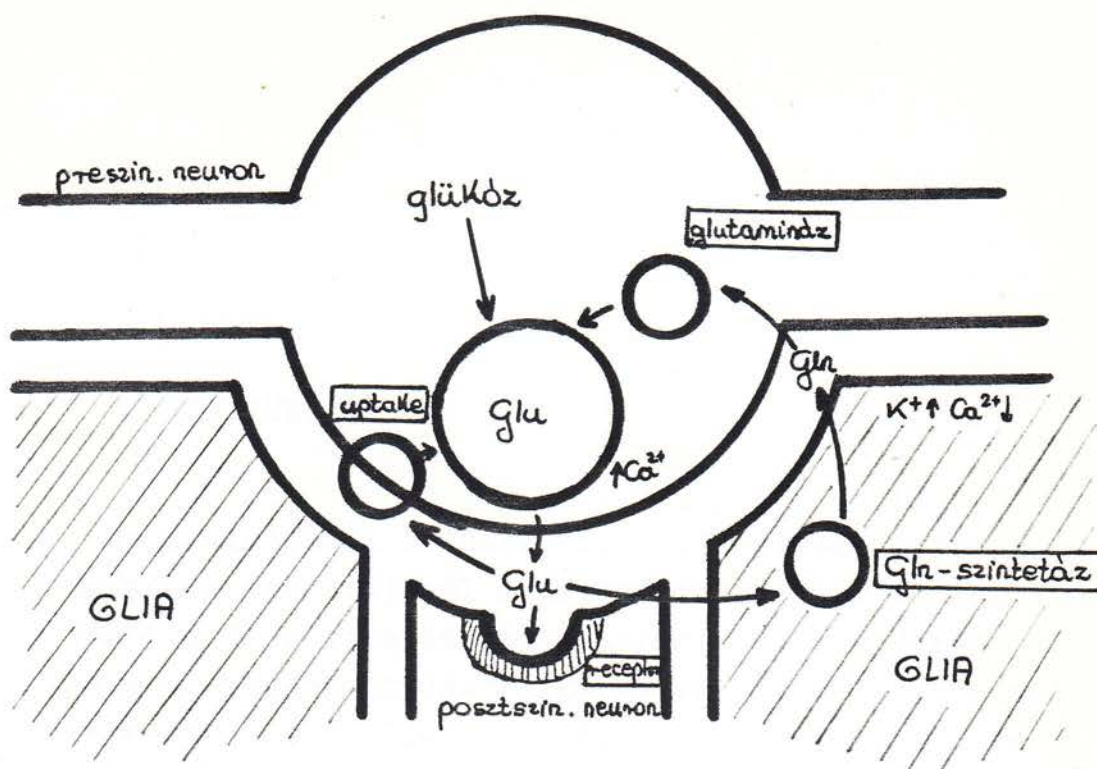
6/b. ábra: különböző vegyületek antagonista hatása a feltételezett három /aszparaginsav, glutaminsav, "kainsav"/ receptoron

RÖVIDÍTÉSEK: α AA = α -amino-adipinsav; 2APB = DL-2-amino-4-foszfobutirát; 2APV = DL-2-amino-5-foszfonovalerát; γ DGG = γ -D-glutamil-glicin; GDEE = L-glutaminsavdiethylészter; L-homoCyst = L-homociszteinsav; NMDA = N-metil-D-aszparaginsav

sav a harmadik receptorra gyakorolt számottevő hatást. Közben más szerzők is részletesen tanulmányozták a kainsav receptorának /receptorainak/ tulajdonságait, így e receptor/ok/ léte mára már vitán felülivé vált. London és Coyle /1979/ kötődési vizsgálatok alapján két receptort: egy magas és egy alacsony affinitásút /kötési konstansok rendre kb. 10 és 50 nM/ különböztetnek meg. Ami a receptorok elhelyezkedését illeti Montigny és Tardif /1981/ néhány gerinces piramidális idegsejt vizsgálata során arra a következtetésre jutott, hogy a kainsav saját receptorát is az idegsejt központi részén kell keresni.

Johnston és mtsai /1979/ kísérleti eredményeik alapján összehasonlították a kainsav receptorához, illetve a glutaminsav felvevőhelyhez való kötődését. Azt találták, hogy a kainsav négy nagyságrenddel jobban kötődik receptorához, mint a glutaminsav felvevőhelyéhez /kötési konstansok rendre 60 nM, ill. 600 μ M/. Ez a különbség különösen Na^+ ionok hiányában jelentős. A kainsav tartós hatását az teszi lehetővé, hogy az idegsejtek felvételére /és így eliminációjára/ képtelenek /Coyle, 1978; Montigny és Tardif, 1981/.

Ugyanakkor kiderült, hogy a kainsav izopropenil oldallánca /ld. 4. ábra/ szükséges a receptoraktiváláshoz, ennek hiányában a dihidrokainsav /a p-klór-merkuri-fenilszulfonáthoz hasonlóan/ csak jóval nagyobb koncentrációban, a glutaminsav szinergistájaként /feltehetően a glutaminsavfelvétel kompetitív inhibítlásával/ működik, neurotoxikus hatás nélkül /Ferkany és mtsai, 1982/. London és Coyle /1979/ valamint Honoré és mtsai /1981/ a kötődés Hill koeficiensét meghatározva a kainsav és glutaminsav között negatív kooperativitást találtak, ami a glutaminsavnak a kainsav receptoron történő allosztérikus hatására utal.



7. ábra: a glutaminsav metabolizmusa

A kutatások egy másik iránya a glia sejtek szerepét bizonyította be és kezdte tisztázni a kainsav hatásmechanizmusában. Hamberger és mtsai /1979/a-b/ leírták a glia sejtek részvételét a glutaminsav metabolizmusában /ld. 7. ábra/. Nicklas és mtsai /1979/ valamint Krespan és mtsai /1982/ abból a felismerésből kiindulva, hogy az acetát alapú metabolizmus elsősorban a glia-, míg a glükóz alapú elsősorban az idegsejtekre jellemző, elkülönítve tudták vizsgálni az egyes glutamin, illetve glutaminsav kompartmentumok változásait kainsav hatására. A kísérletek tanulsága szerint a kainsav elsősorban a glia sejtekből szabadithatja fel a glutaminsavat, huzamosabb alkalmazása esetén pedig a glia sejteket kevésbé roncsolja el.

3. CÉLKITÜZÉSEK

Az eddigiekből látható, hogy a γ -glutamil transz-peptidáz funkciójáról alkotott vélemények eléggé eltérőek. Ez a tisztázatlan helyzet tette szükségessé, hogy a transzpeptidázt a korábbiaktól különböző módszerekkel vizsgáljam. Munkám alapvető célkitűzése volt tehát egy olyan modellrendszer kidolgozása, amelyben biokémiai és biofizikai vizsgálati módszerek együttes alkalmazásával közelebb kerülhetünk az irodalomban kibontakozott vita által felvetett kérdések megválaszolásához.

A 2.1.1. fejezetben leírtak alapján legalkalmasabb rendszernek a γ -GT kisméretű, "egyrétegű" liposzómákkal alkotott komplexe látszott.

Feladatomban volt egy az irodalomban eddig még le nem írt beépítési módszer, az injektálósos technika kipróbálása, vizsgálata. Tisztázni kívántam néhány alapvető kísérleti körülménynek a beépülésre gyakorolt hatását. Céлом volt az előállított rendszer stabilitásának feltérképezése is.

Munkám második felében az előállított modellrendszer segítségével két kérdésre kerestem választ: az egyik a γ -glutamil transzpeptidáz membránbeli elhelyezkedésére, a másik az enzim agybeli szerepére vonatkozott. Az első kérdés kapcsán a γ -GT integráns membránbeépülésének vizsgálatával és elektronmikrosz-

kópos kísérletekkel, a második kérdés esetén a kálsav, az agybeli glutaminsav-alapú ingerületátvitel hatékony befolyásolószere az enzimre gyakorolt hatásának a feltérképezésével próbáltam meg közelebb jutni a válaszadáshoz.

4. KISÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti anyagok

4.1.1. A γ -glutamil transzpeptidáz izolálása, tulajdonságai

A γ -glutamil transzpeptidáz membránból való elkülönítésének, szolubilizálásának alapvetően két módja ismeretes. Az egyik azt a tényt használja ki, hogy az enzimet egy viszonylag kicsi, 52 aminosavat tartalmazó hidrofób peptidrészlet rögzíti a membránhoz, amely pl. papainnal szelektíven emészthető. A másik módszerrel tenzidek, legtöbbször Na-dezoxikolat segítségével a membránt egészében szolubilizáljuk. Én ezen utóbbi utat követtem, hiszen az enzim mesterséges membránba való építéséhez szükségem volt a hidrofób peptidrészletre is.

A γ -GT-t patkányveséből és patkányagyból izoláltam, a Tate és Meister /1975/ által leírt módszer egy módosított változatát követve. Az izolálás főbb lépései a következők voltak:

- a./ vesehomogenát készítése
- b./ differenciálcentrifugálás /100 000 g, 1h/
- c./ TRITON X-100-as kezelés /0.1 %/
- d./ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os frakcionálás /30 és 70 %-os telítettség között/
- e./ Na-dezoxikolátos szolubilizálás /1 %/
- f./ acetonos kicsapás
- g./ TRITON X-100-as szolubilizálás /1 %/
- h./ Concanavalin-A Sepharose 4B oszlopon történő affinitív kromatográfia

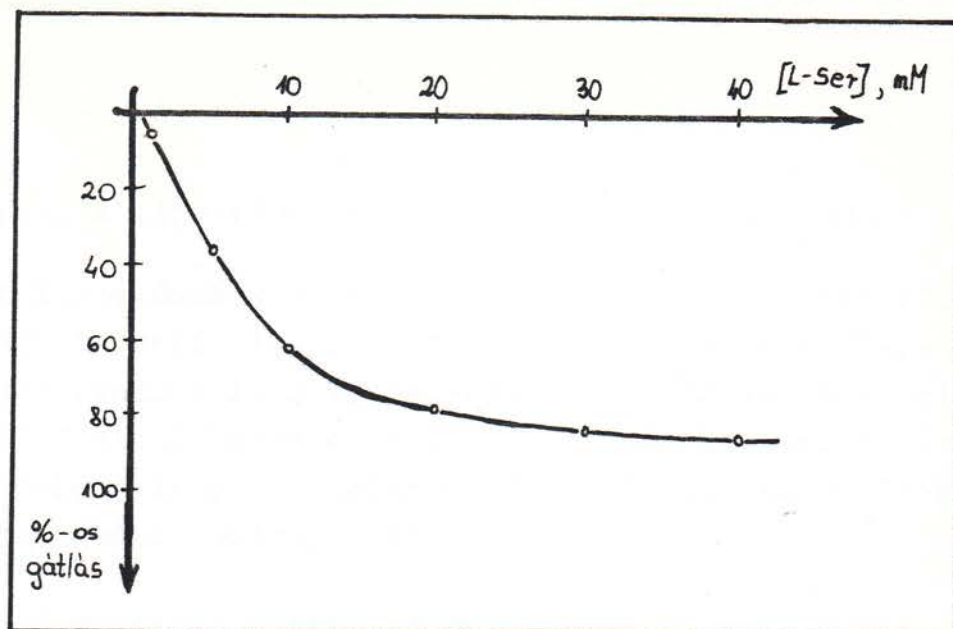
Látható, hogy az izolálás során tulajdonképpen kicsapási és szolubilizációs lépések követik egymást. Ezek alkalmas sorrendjével /közéjük hosszabb-rövidebb dialíziseket beiktatva/ a membránfrakcióknak a γ -GT aktivitást magában foglaló részét lehet továbbvinni. A végső elválasztási lépés a transzpeptidáz glikoprotein jellegét használja ki. További vizsgálataimhoz a Concanavalin-A-t tartalmazó oszlopról a 20 mg/ml-es α -metil-D-glükózid koncentrációnál eluálódó kidializált enzimfrakciót használtam fel.

A kapott γ -glutamil transzpeptidáz specifikus enzimaktivitása patkányvese γ -GT esetén 6.27 ± 0.26 M, patkányagy γ -GT esetén 0.083 ± 0.001 M elbontott γ -glutamil-p-nitroanilid/ h x mg fehérje volt. /A kísérleti körülmények a 4.2.1. fejezetben megadottak voltak./Az enzim Na-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel homogénnek mutatkozott. Az enzim szubsztrátspecifitása az irodalomban /Tate és Meister, 1974/ közölt értékekkel jó egyezést mutat /ld. V. táblázat/.

V. táblázat: az egyes akceptorok aktiváló hatása a GlyGly-hez viszonyítva /patkányvese γ -GT/

Akceptor	izolált enzim	irodalmi adat
GlyGly	/100/	/100/
Gln	25	30
Glu	20	20
-Leu	18	15

Revell és Ball /1959/ mutattak rá először, hogy pH 8.5. tájékán 20 mM L-szerin 20 mM Na-boráttal a γ -GT igen hatásos gátlószereként viselkedik. A szerin-boráttal mért gátlás mértékét a szerinkoncentráció függvényében a 8. ábrán tüntettem fel. Az elérhető maximális gát-



8. ábra: az L-szerin gátlóhatása pH 8.5-ön
20 mM Na-borát jelenlétében

lás 80-85 %-osnak mutatkozott. 50 mM GlyGly jelenlétében az enzimaktivitás 95 %-os gátlását sikerült elérni. Mindez összhangban van a Tate és Meister /1978/ által közölt adatokkal. Új megfigyelés viszont, hogy 10 mM $MgCl_2$ hozzáadásakor a szerin-borát elegy gátló hatása a GlyGly gátlásnöveléséhez hasonlóan ugyancsak közel a teljes gátlásig nő.

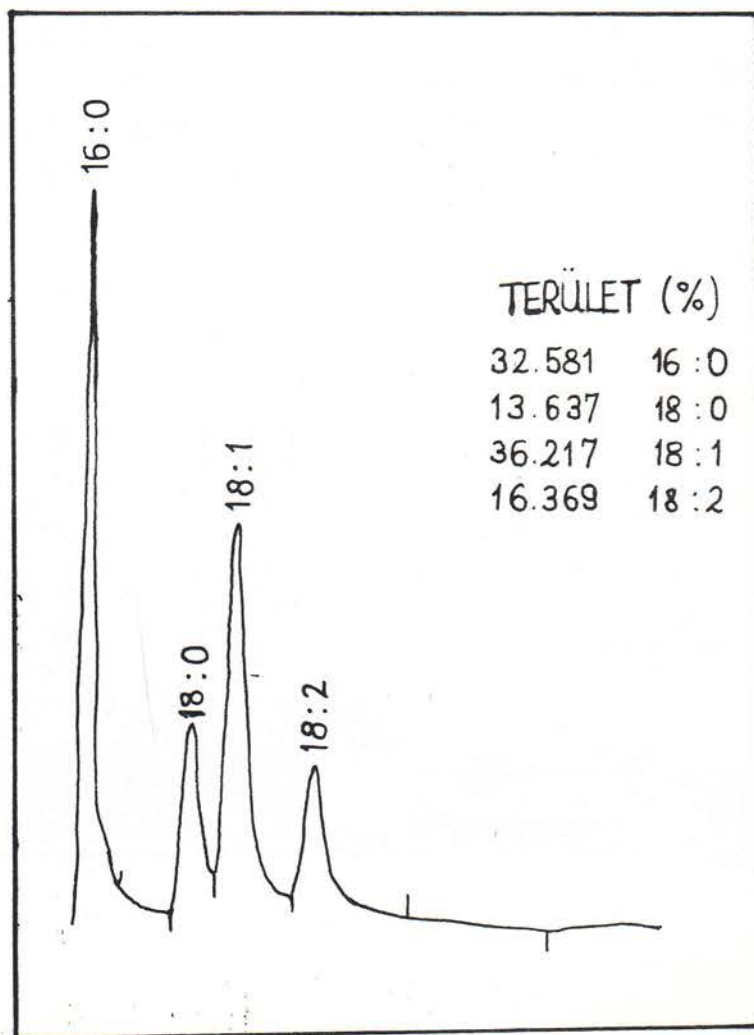
Az enzim 8.0 és 8.5 közötti pH optimumot mutat /ld. 17. ábra/ az irodalmi adatoknak megfelelően /Tate és Meister, 1981/. A γ -glutamil-p-nitroanilidre mért k_M érték 1.65 mM-nak adódott.

Az enzim stabilitását tekintve tipikus membránenzimként viselkedett: desztillált vízzel hígítva számottevő mértékben denaturálódott. A korábban leírt megfigyelésekkel összhangban /Gardell és Tate, 1979; Shakespeare és mtsai, 1982/ amennyiben az enzimet 10 mM merkaptóetanollal hosszabb ideig állni hagyjuk, jelentős mértékű aktivitáscsökkenést tapasztalhatunk. Ezzel szemben 3 mM NaN_3 az enzim aktivitását szinte teljes egészében megőrzi.

4.1.2. A liposzómák előállítása, tulajdonságaik

A liposzómák készítéséhez szintetikus lipidet /dimirisztoilfoszfátidilkolint, DMPC, Merck/ és tojáslecitint használtunk fel. A tojáslecitint a Shingleton és mtsai /1965/ által leírt módszer alapján izoláltuk. A kapott tojáslecitin gázkromatográfiás analízisének eredményeit a 9. ábrán tüntetem fel.

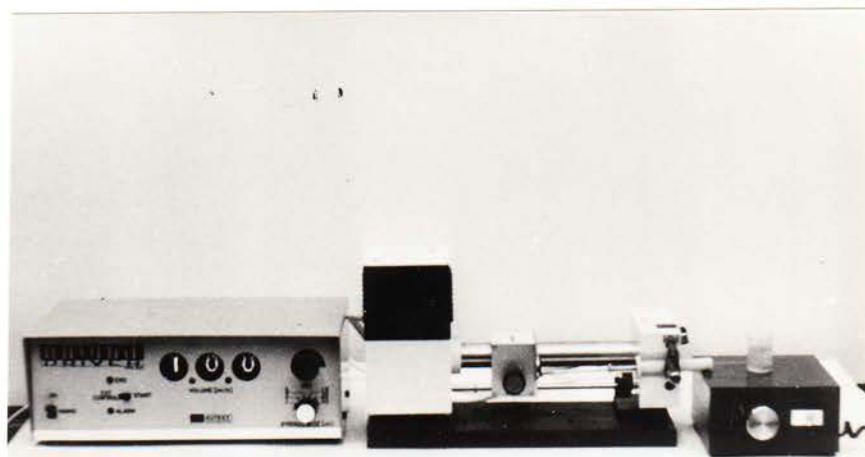
9. ábra: a liposzómák készítéséhez használt tojáslecitin gázkromatográfiás analízise



Látható, hogy az izolált lipid palmitinsav és sztearinsav, valamint egyszeresen illetve kétszeresen telítetlen sztearinsavszármazékok vegyes észtere. A lipidek oxidációjának mértékét az oxidációs termékeknek a lipidek kloroformos oldatban mutatott ultraibolya abszorpciójának /spektrum 200 és 300 nm között, illetve abszorbancia 233 nm-en/ nyomonkövetésével ellenőriztük.

A liposzómákat a Kremer és mtsai /1979/ által leírt módszer módosításával állítottuk elő /Báthori és mtsai, 1981/. Esetenként 1 illetve 4 ml szobahőmérsékletű, gyorsan kevertetett és pufferolt vizes közegbe fecskendeztük be a különböző tojáslecitin koncentrációjú etanolos oldatot. Az injektálás állandó sebességét egy automata injektáló eszközzel /Infumat, MTA KUTESz/ biztosítottuk. /A berendezés összeállítását ld. a 10. ábrán./ Az enzimbeépítésnél is alkalmazott vizes puffer 0.15 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.1 M TRIS.HCl /pH 8.5/ és 3 mM NaN_3

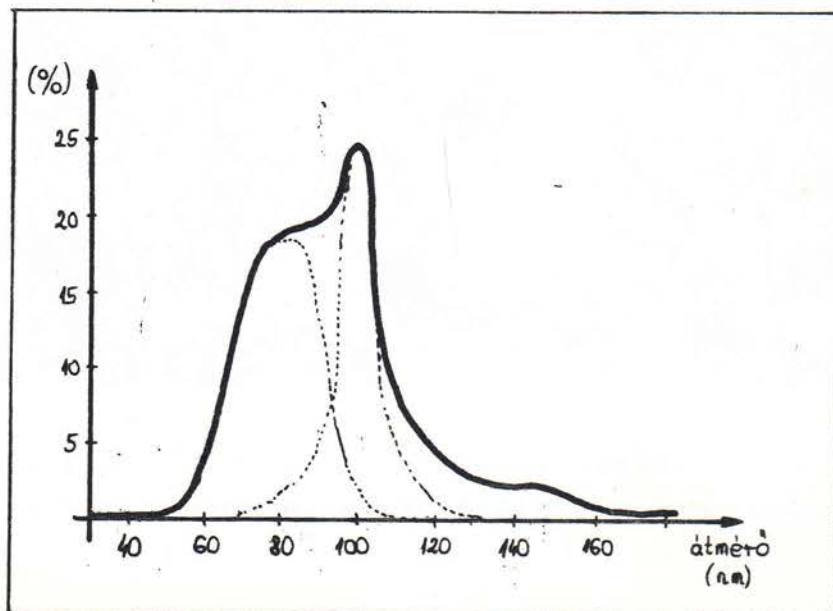
10. ábra: a liposzómák előállítására szolgáló kísérleti berendezés

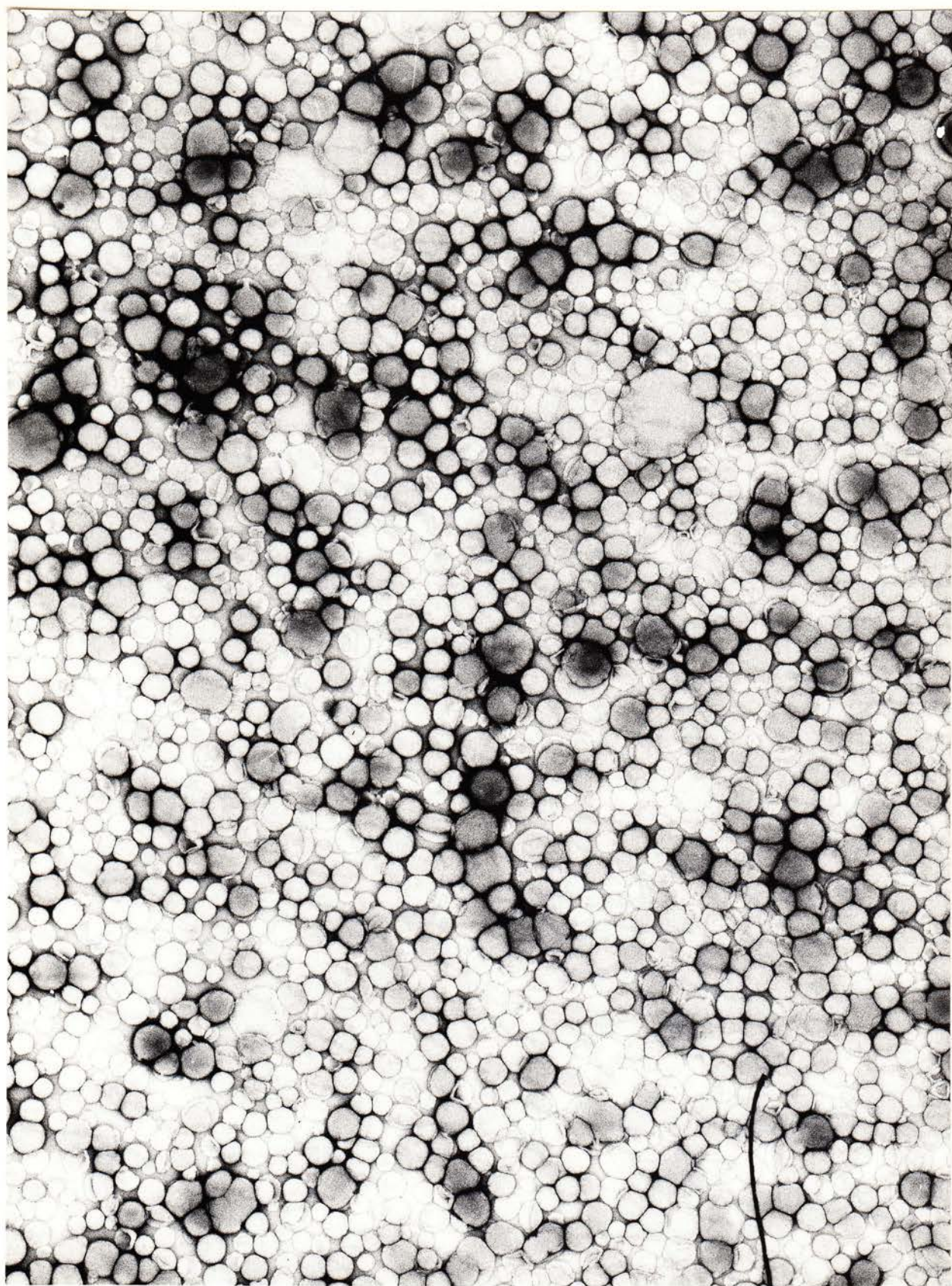


tartalmú volt. A rendszerbe került etanolt 8-12 órás, 5 x 250 ml ugyanilyen összetételű puffer ellenében történő dialízissel távolítottuk el. A korábbi kísérletek tanulsága szerint a keletkezett rendszerben legfeljebb nyomnyi mennyiségű etanol marad /Báthori és mtsai, 1981/. A dimirisztoilfoszfatidilkolinból készült liposzómák előállításánál a kevertetett puffer hőmérsékletét 32-33 °C-on, tehát kb. 10 fokkal a fázisátalakulási pont -- 23 °C -- felett tartottuk. Minden más kísérleti körülmény a tojáslecitin liposzómák előállításánál alkalmazottakkal azonos volt.

A keletkezett liposzómák méretét elektronmikroszkópos és ultracentrifugás analízissel ellenőriztük. A lipid vezikulák negatív festéssel készült elektronmikroszkópos képe látható a 12. ábrán /nagyítás 36800-szoros/. A kép alapján megállapítható eloszlás diagramot a 11. ábrán ábrázoltam. Leolvasható, hogy a képződött veziku-

11. ábra: a liposzómák méreteloszlása
/az értékek 15 %-kal kisebbítettek a negatív festés okozta "ellaposodás" korrekciója miatt/





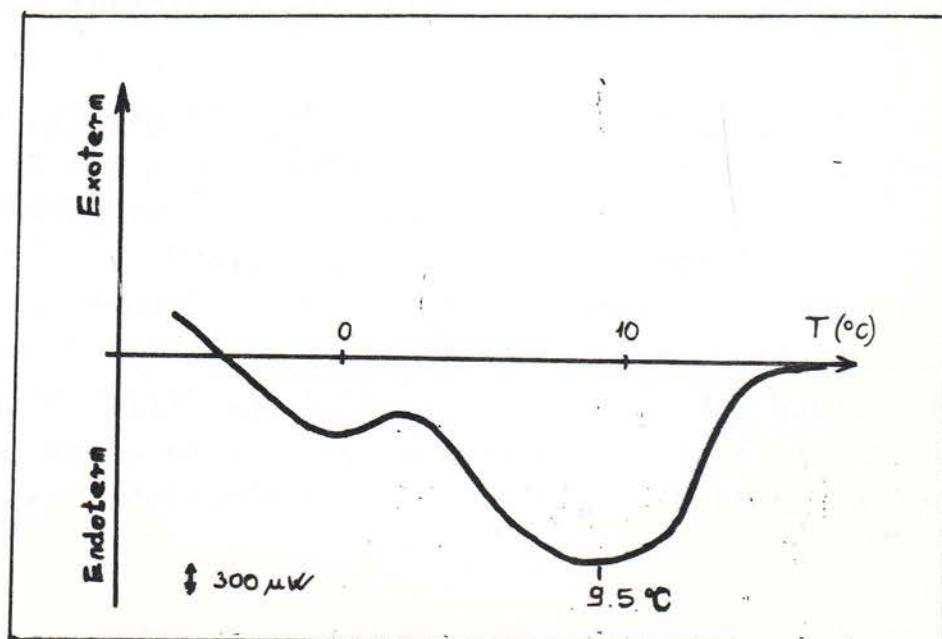
12. ábra: a lipid vezikulák negatív festéses képe /a nagyítás 36800-szoros, az ábrázolt szakasz hossza 100 nm-nek felel meg/

lák mérete alapvetően két érték /kb. 80 nm és kb. 100 nm/ körüli szórást mutat.

A kapott értékek elég jó egyezésben vannak az ultracentrifugás analizissel kapott eredményekkel. Az analitikai ultracentrifugán végzett kísérletek során az esetek többségében egy kb. 3.5 S és egy 11.0 S szedimentációs állandójú részecske ülepedését figyeltem meg. A kapott szedimentációs állandókat a Stokes egyenletbe behelyettesítve 65 nm és 110 nm adódott a részecskék Stokes-átmérőjére.

Az alkalmazott tojáslecitin fázisátalakulási pontját, tehát azt a pontot, amely leginkább jellemző a lipid kettősréteg szmektikus B fázisból /"rigid", "szilárd" szerkezet/ szmektikus A fázisba /"fluid" szerkezet/ való átmenetére DSC vizsgálatokkal határoztuk meg. A DuPont-990-es készülékkel felvett DSC diagramból kitűnik /ld.13. ábra/, hogy a kb. 0 °C-nál tapasztalható pre-transition után a fázisátalakulási hőmérséklettartó-

13. ábra: a tojáslecitin DuPont 990-es készülékkel felvett DSC diagramja



mány kb. 10 °C körül észlelhető. /Az átalakulás a lecitin "keverékjellege" miatt nyúlik el./

4.1.3. Az alkalmazott patkányagy-szinaptoszómák és patkányvese-kefeszegélymembránból álló vezikulák előállítása

A szinaptoszómák izolálását a Hajós /1975/ által leírt módszer alapján végeztem. Egyszerre 6 kb. 300 g-os patkány agyából készítettem 10 %-os homogenizátumot potterezéssel. A homogenizáló puffer 0.32 M szacharóz, 5 mM TRIS.HCl --pH 7.4-- és 1 mM EDTA tartalmú volt. A homogenizátumot 1500 x g-val 10 percig centrifugáltam, majd a kapott felülúszót 9000 x g-n 20 perces centrifugálásnak vetettem alá. A csapadékot 15 ml fenti pufferrel homogenizáltam, majd a kapott elegy 5-5 ml-ét 20-20 ml 0.8 M szacharóz, 5 mM TRIS.HCl --pH 7.4--, 1 mM EDTA pufferre rétegeztem. 9000 x g-n történő 30 perces centrifugálás után az alsó réteget elkülönítettem és desztillált vízzel eredeti térfogatának 2.5-szeresére hígítottam. Az újbóli 9000 x g-n történő 30 perces centrifugálás után kapott csapadékot 2 ml 50 mM TRIS.HCl --pH 8.6--, 0.15 M NaCl pufferben vettem fel.

A kapott preparátumok fajlagos enzimaktivitása 0.1 U/ml, specifikus aktivitása 0.05 U/mg fehérje körül mozgott.

A kefeszegélymembrán-vezikulák előállítása a Booth és Kenny /1974/ által leírt módszer alapján történt. A kötőszövegtől és a vesemedencétől megtisztított vesékből 10 mM mannit, 2 mM TRIS.HCl --pH 7.4-- pufferrel 10 %-os homogenizátumot készítettem potterral. A magfrakciót 200 x g-n történő 4 perces centrifugálással távolítottam el. A felülúszót szilárd $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ -dal Mg-ra nézve 10 mM koncentrációjára állítottam be 15 perc jégfürdőn történő kevertetés közben. Az 1500

x g-n történő 12 perces centrifugálás után kapott felülúszót 15000 x g-n 15 percig centrifugáltam, majd a csapadékot 10 mM mannit, 2 mM TRIS.HCl --pH 7.4--, 10 mM $MgCl_2$ pufferrel homogenizáltam. A vezikulákat egy 2200 x g-n 12 percen át történő centrifugálás felülúszójának 15000 x g-n 15 percig való centrifugálásával kaptam meg. A képződött csapadékot szoros illeszkedésű potterrel 100 mM mannit, 20 mM TRIS.HCl --pH 7.4-- pufferben homogenizáltam.

Az izolált kefeszegélymembrán-vezikulák fajlagos γ -GT aktivitása 385 ± 56 U/ml, specifikus aktivitásuk 44.5 ± 6.9 U/mg fehérje volt.

4.1.4. Más felhasznált vegyszerek és anyagok

A kísérletekben felhasznált főbb anyagok és forrásaik:

Sepharose 4B és Concanavalin-A Sepharose 4B: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala;

foszfolipáz A_2 : Boehringer, Mannheim;

γ -glutamil-p-nitroanilid, α -metil-D-glükózid, EGTA /etilénglikol-bis/3-aminoetiléter/-N,N'-tetraecetsav/, kainsav: Sigma, München;

TRITON X-100: LOBA Chemie, Wien;

NaN_3 : Schuchardt GmbH and Co., München;

glutathion, glicil-glicin: Reanal, Budapest;

minden más vegyszer Reanal gyártmányú volt. A kísérletekhez HERCO-335 tölteten ioncserélt, majd üvegedényzeten ledesztillált vizet használtam fel.

4.2. Kísérleti módszerek

4.2.1. Analitikai módszerek

A γ -glutamil transzpeptidáz aktivitásának mérése

Az enzim a transzpeptidáló reakciót természetesen szintetikus γ -glutamil donorok jelenlétében is katalizálja. Ezt kihasználva a hatvanas évek elejétől különböző kromofor csoportok beépítésével egyszerűsíteni lehetett az enzim ektivitásának meghatározását /Goldberg és mtsai, 1960; Orlowski és Meister, 1963/. A leggyakrabban alkalmazott reagens a γ -glutamil-p-nitroanilid. A meghatározás során a felszabaduló p-nitroanilin mennyiségét mérjük fotometriásan.

A mérésekhez használt reakcióelegy végtérfogata 1 ml volt, az egyes komponensek végkoncentrációi: 0.15 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.1 M TRIS.HCl /pH 8.2/, 50 mM GlyGly és 4 mM γ -glutamil-p-nitroanilid. Az aktivitásmérések során az inkubálási idő 37 °C-on 30 perc volt. A reakciót 0.5 ml triklórecetsavval állítottam le, majd a mintákat egy Janetzki K 23-as centrifugán 4000 rpm-mel /2500 g/ 10 percig centrifugáltam. Végül 1 ml 1 M TRIS oldattal állítottam vissza a 8 körüli pH-t. A felszabaduló p-nitroanilin mennyiségét Spektromom 201-es készüléken a szokásos 405 nm-en mértem.

Egységnyi aktivitásúnak tekintettem a γ -GT azon mennyiségét, amely az adott reakciókörülmények között 1 μ M szubsztrátot bontott el másodpercenként.

A liposzómák látszólagos abszorpcióját a kísérlet jellegétől függően a reakcióelegyhez, vagy a pH visszaállításához használt 1 ml 1 M TRIS oldathoz adott 50 μ l 10 %-os TRITON X-100-zal küszöböltem ki.

A fehérjetartalom meghatározása

A szokásos Lowry féle módszer /Lowry és mtsai, 1951/ membránfehérjékre a fehérjék aggregatív hajlama és erős glikoziláltsága miatt eléggé megbízhatatlan eredményeket ad, ezért Markwell és mtsai /1978/ által módosított változatát használtam. A kalibrálógrafikon felvétele során marha szérumalbumint használtam standardként.

Foszfolipáz A₂ enzimaktivitásának meghatározása

A foszfolipáz A₂ enzimaktivitásának mértékét leggyakrabban az általa katalizált reakcióban keletkező lizolecitin meghatározására szokás visszavezetni /Neumann és Habermann, 1954/. A lizolecitin mennyiségével arányosan eritrociták lizisét okozza, ami a kiszabaduló hemoglobin fotometriás mérésével nyomonkövethető. Lényegesen egyszerűbb a lecitinek bomlása során bekövetkező pH változás mérése, amelyre az általam is alkalmazott Boehringer-féle meghatározás is épül.

A mérésekhez használt reakcióelegy végtérfogata 3 ml volt. Az egyes komponensek végkoncentrációi: 10 mM GlyGly /pH 9.5/, 6.7 mg/ml lecitin, 20 μ l/ml TRITON X-100, 14 μ g/ml krezolvörös, 2.5 mM CaCl₂. A reakciót 5 perces szobahőmérsékletű inkubálás után 75 μ M EGTA adásával állítottam le. Az oldatoknak a foszfolipáz hatására bekövetkezett abszorpcióváltozását 578 nm-en fotometriásan követtem. Egységnyi aktivitásúnak tekintetem az adott körülmények között 0.11 abszorbanciaváltozást okozó enzim mennyiséget.

4.2.2. A γ -glutamil transzpeptidáz beépítése liposzómákba

Kísérleteim megkezdése előtt tanulmányoztam az enzim alkohol hatására bekövetkező denaturációját. Tapasztalataim szerint a transzpeptidáz a közegváltást megfelelően jól viseli: kb. 25 %-os alkoholkoncentráció esetén is az eredeti aktivitás 90 %-a marad meg. A 25 %-os érték a kísérlet során tartósabban fellépő 10 %-os koncentrációnak több, mint kétszerese. A feltűnő stabilitás valószínűleg az enzim erős glikoziláltságának köszönhető. Azt, hogy a transzpeptidáz aktivitása a beépítés során rövid ideig jelenlévő alkohol hatása miatt számottevően nem változik meg, a kísérletek mellett az is bizonyítja, hogy az összaktivitás a beépítés előtt és után kb. azonos.

A γ -glutamil transzpeptidázt alapvetően két módszerrel építettem be a liposzómákba. Az egyik szerint a liposzómák előállítására a 4.1.2. fejezetben leírtakat követve az 1 illetve 4 ml pufferhez adtam a kb. egységszámú /20 μ g/ enzimet. Ebben az esetben a liposzómák kialakulása és az enzim beépülése egymással párhuzamosan zajlott le. A beépítés másik módját alkalmazva a már korábban elkészített liposzómákhoz utólag /dializálás után/ adtam a hasonló mennyiségű transzpeptidázt.

Az irodalmi adatok tanulsága szerint a γ -glutamil transzpeptidázt az itt közölt kísérleteken kívül két munkacsoport /Hughey és mtsai, 1979; Sikka és Kalra, 1980/ épített be liposzómákba. Mind a hárman a beépítés

más útját választottuk. A különböző módszerekkel kapott enzim-liposzóma komplex, illetve a beépítés néhány jellemzőjét foglaltam össze a VI. táblázatban. Látható, hogy az általam alkalmazott módszer a Hughey és mtsai által elért előnyöket /pl. a többrétegű liposzómák arányának viisszaszorítása/ egyesíti a Sikka és Kalra által kapott készítmény előnyös vonásaival /nagyobb liposzómaátmérő/. Az injektálásos módszer egyetlen hátránya a beépítés viszonylag rossz hatásfoka. Ennek a ténynek a bővebb magyarázatára az 5.3. fejezetben még visszatérek.

Az enzim beépülésének mértékét egy 1.5 x 40 cm-es Sepharose 4B oszlopon történő elválasztással vizsgáltam. /Az egyes frakciók kb. 1 ml-esek voltak./ A transzpeptidáz detektálására a 4.2.1. fejezetben leírt aktivitásmérés szolgált, a liposzómák közelítő mennyiségét 530 nm-en végzett fényszóródásméréssel mértem.

A beépülés mértékének sorozatban elvégzett vizsgálata során összehasonlító adatként /a felvitt enzim összaktivitásának ismeretében/ a Sepharose 4B oszlopról a kizárt térfogatban eluálódó, a liposzómákba beépült enzimaktivitás %-os mértékét választottam. Ez a származtatott mennyiség azért választható a transzpeptidáz liposzóma-beépülésének mértékéül, mivel az alkalmazott enzim-mennyiség összaktivitása a beépülés során változatlan maradt. A beépítéseknel használt kevertetett pufferek összetételét az 57. oldalon adom meg.

VI. táblázat: a különböző módszerekkel kapott γ -GT-liposzóma komplexek tulajdonságainak összehasonlítása

Tulajdonság	Hughey és mtsai /1979/	Sikka és Kalra /1980/	Saját
Módszer	kolátos szolubilizálás, Sephadex G-50 elválasztás	kolátos szolubilizálás + szonikálás, Sepharose 4B elválasztás	injektálós techn. + dialízis
Liposzóma méret /nm/	200	90	75 ill. 100
Többrétegű liposzómák aránya /%/	10	40	0
Lipid/fehérje arány /mg/ug/	1 : 12.5	1 : 2.1	1 : 0.4
Az enzim hány %-a épült be	100	?	30 [†]
Az enzim hány %-ban kifele orientált	95	75-85	94

Megjegyzések: o a molekulásúlyból visszaszámolva
+ nem közölt adat
† az adat 1:25 lipid fehérje aránynál is ugyanez maradt

- a./ "kontroll" - 0.1 M TRIS.HCl /pH 8.5/, 0.15 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 3 mM NaN₃ 1 ml-ében kb. 20 µg γ-GT;
- b./ "kontroll + 0.001 % TRITON X-100" - a fenti pufferbe az etanolos lipid befecskendezése előtt 0.001 % TRITON X-100-at is tettem;
- c./ "kontroll + 10 mM MgCl₂" - e kísérletek során az a. pontbeli puffert használtam, azzal a különbséggel, hogy a MgCl₂ koncentrációját 20 mM-ra állítottam be;
- d./ "kontroll + 40 mM glutathion" - az e kísérlethez tartozó egyik fajta mintában a 40 mM-os glutathion koncentrációt az etanolos lipid befecskendezése előtt, a másik fajta -- kontrollként szolgáló -- mintában a liposzómák kialakulása után, de a dialízis előtt állítottam be; az első fajta minta esetén az enzimet szubsztrátjával előzőleg 10 percen át 37°C-on inkubáltam;
- e./ "0.1, 0.01, 0.005 M TRIS" - a kb. 20 µg γ-GT-t rendre 1 ml 0.1, 0.01, illetve 0.005 M TRIS.HCl /pH 8.5/ pufferben oldottam;
- f./ "maradékbeépítés" - a γ-GT beépítése során be nem épült, kb. 5 µg-nyi enzim az a. pontbeli puffer 1 ml-ében; a beépítést a be nem épült enzim 10 mg/ml illetve 10 µg/ml Na-dezoxikoláttal való 15 perces 37°C-on történő inkubálása, majd 2-szer 500 ml a. pontbeli pufferrel szembeni 4 napon át tartó dialízise után is elvégeztem.

A kialakult enzim-liposzóma komplex a kísérleti körül-

mények között igen stabilnak mutatkozott: a Sepharose 4B gélszűrés segítségével a be nem épült enzim mennyiség-től elválasztott enzim-liposzóma komplexről több napos szobahőmérsékleten, illetve több hetes 4°C-on történő tárolás után sem vált le számottevő enzim mennyiség az újbóli gélszűrés tanulsága szerint. /A liposzómákkal együtt eluálódó enzim aktivitása pedig a kezdeti értékkel közel azonos maradt./

4.2.3. Az Arrhenius diagram felvétele

A kémiai reakciók sebességi állandójának a hőmérséklettel való váltizását az empirikus Arrhenius egyenlet írja le:

$$k = A e^{-E^+/RT} \quad [6]$$

Az egyenletben szereplő "A" a preexponenciális faktor, "E⁺" a kísérletesen meghatározott aktiválási energia, "R" az egyetemes gázállandó és "T" az abszolút hőmérséklet Kelvin fokokban. Amennyiben adott enzimreakciósorozat esetén a kísérleti körülményeket /a hőmérséklet kivételével/ szigorúan változatlanul tartjuk, az egyenletbeli "k" helyére adott idő alatt mért koncentráció /abszorbanancia/ változást helyettesíthetünk be. /Természetesen ekkor a preexponenciális faktor eredeti jelentését elveszti./ E koncentrációváltozás logaritmusát 1/T függvényében ábrázolva kapjuk az ún. Arrhenius diagramot, ahol a szereplő egyenesek meredekségéből az adott enzimreakció aktiválási energiája számolható.

Az Arrhenius diagram felvétele során 5°C-tól 40°C-ig terjedő hőmérséklettartományban dolgoztam átlag 2-3 fokonként végezve az egyes méréseket. Az adott enzim /liposzóma/ minta és a reakcióelegy hőmérsékletét kísérletenként 10 perces előzetes inkubálással állítottam be a megfelelő értékre. Az egyes mérések során a hőmérséklet ingadozása a 0.3 fokot nem haladta meg. Az en-

zimaktivitás mérését a 4.2.1. fejezetben leírtak alapján végeztem, az eredményeket a legkisebb négyzetek módszerével értékeltem ki. A γ -glutamil-p-nitroanilid spontán bomlását hőmérsékletenkénti párhuzamos kontrollal vettem figyelembe. Az egyes vizsgált minták a következők voltak:

- a./ " γ -GT" - az enzim a liposzómák elkészítéséhez is használt közegben /0.1 M TRIS.HCl -pH 8.5-, 0.15 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 3 mM NaN_3 /;
- b./ " γ -GT + 1 % TRITON X-100" - az előinkubált enzim és a reakcióelegy egyaránt 1 %-nyi TRITON X-100 tenzidet tartalmazott;
- c./ " γ -GT liposzóma" /kontroll/ - a be nem épült enzimmennyiségtől elkülönített enzim-liposzóma komplex az a. pontbeli közegben;
- d./ " γ -GT liposzóma sómentes közegben" - a be nem épült enzimmennyiségtől elkülönített enzim-liposzóma komplex 0.1 M TRIS.HCl -pH 8.5- pufferben /az aktivitásmérő elegyből ilyen esetben a 0.15 M NaCl és a 10 mM $MgCl_2$ szintén hiányzott/;
- e./ " γ -GT liposzóma + foszfolipáz A_2 " - a be nem épült enzimmennyiségtől elkülönített enzim-liposzóma komplexet az enzimaktivitás meghatározása előtt mintánként /az egyes minták lecitintartalma kb. 2 mg volt/ 4 μ g /0.1 egységnyi aktivitású/

foszfolipáz A₂-vel kezeltem; a foszfolipázos inkubálás időtartama 1/4, 2, illetve 5 perc volt. Az inkubálást szobahőmérsékleten végeztem. A foszfolipáz számára kedvező reakciókörülményeket mintánként 0.45 μ M CaCl₂ hozzáadásával biztosítottam. Az emésztést 4.5 μ M EGTA adásával állítottam le. /A γ -GT aktivitását mérő elegyből -- a foszfolipáz reaktiválásának elkerülése miatt -- a 10 mM MgCl₂-ot kihagytam a kísérletek során./

f./ " γ -GT liposzóma + 1 % TRITON X-100" - a be nem épült enzim mennyiségétől elkülönített enzim-liposzóma komplexhez -- az enzimaktivitás mérése előtt -- 1 % TRITON X-100-at adtam /a reakcióelegy TRITON X-100 tartalma ugyancsak 1 % volt/.

Az esetleges zavaró mellékhatások figyelembevételére céljából ellenőriztem a transzpeptidáz aktivitásának mérésére szolgáló reakcióelegy pH-jának hőmérsékletfüggését, meghatároztam az enzim pH optimumát, illetve a γ -glutamil-p-nitroanilidre mutatott közelítő Michaelis konstansát /k_M/ két szélső hőmérsékleten, 4°C-on és 37°C-on.

Az egyes pH-kat Radelkis OP-213 digitális pH-mérő készülékkel mértem. A pH optimum meghatározásához az egyes reakcióelegyek pH-ját 6.5-től 9.5-ig 0.2-es pH

egységenként állítottam be. A kísérletek közbeni hőmérsékletingadozás a 0.3 fokot itt sem lépte túl. A k_M meghatározásánál a γ -glutamil-p-nitroanilid koncentrációját 0.1 és 4.0 mM között változtattam, az inkubálási idő 5 perc volt.

4.2.4. Az enzim-liposzóma komplex megbontása nagy ionerősségű közeg segítségével

E kísérleteimben alapvetően arra kerestem választ, hogy a γ -GT leválik-e a korábban már a be nem épült enzimtől elválasztott liposzómákról nagy ionerősségű környezetben. Ezért a levált enzimet a liposzómáktól, ill. a liposzómákon kötötten maradt enzimtől megbízhatóan elválasztó módszert kellett keresnem.

Kezdeti kísérleteim során a 0.6, illetve 1.1 mólos NaCl elegyet 1 órás 37°C-on történő állás után 1 mólos cukoroldatra rétegeztem, majd 30 percen át 75000 g-vel lecentrifugáltam /Beckman L2-75-B-G ultracentrifuga, SW 60 rotor, 35000 rpm, 15°C/. A centrifugálás során mind a fordulatszám, mind a hőmérséklet körülbelüli betartására ügyelni kellett, ugyanis 45000 rpm felett és 10°C alatt --fázisátalakulási pont!-- az elválás kifejezetten rosszabb. A centrifugálás után a liposzóma zöme az 1 mólos szacharóz oldat határfelületén helyezkedett el. A felülúszóban megmaradó enzimaktivitást lemérve a levált és /a felhasznált összaktivitás ismeretében/ a liposzómához kötötten maradt enzim aránya meghatározható volt.

Mivel a tömény oldatok miatt az ultracentrifugás elválasztás eléggé megbízhatatlan eredményeket szolgáltatott, további kísérleteim során a "kétféle enzimet" egy Sepharose 4B oszlopon /méretei: 0.5 x 10 cm/ történő géliszűrés segítségével választottam el egymástól. Az adott oszlopméret az elválasztás viszonylagos gyorsasága mellett kellő elkülönülést biztosít. Az egyes frak-

ciók 0.25 ml-esek voltak. Az oszlopra felvitt minták ionerősségét NaCl-dal állítottam be 0.25-től 2.00-ig. /E két szélső érték az enzim beépítésénél használt puffer, illetve további 2 M NaCl ionerőssége./ A liposzóma-enzim komplexet az adott ionerősségű közegben 1 órán keresztül 37°C-on, illetve további 5 napon át 4°C-on hagytam állni.

A gélszűrés során két enzimfrakciót kaptam: a kötve maradt transzpeptidáz a kizárt térfogatban, a levált enzimmennyiség pedig a 8. frakció tájékán eluálódott. A két frakcióban megjelenő enzimaktivitás arányából következtettem a levált enzimmennyiség %-os mértékére.

4.2.5. Az enzim-liposzóma komplex megbontása tenzid segítségével

Az előző kísérletsorozattal ellentétben biztosan le kell, hogy váljon a γ -GT a liposzómákról, ha a liposzóma membránszerkezetét tenzid segítségével egyre inkább megbontjuk. A dezintegrálódásnak és az enzim leválásának párhuzamos nyomonkövetése a beépülés jellegére is adhat közvetett információkat.

E kísérleteim során a liposzómák degradációját fény-szóródásméréssel vizsgáltam. A méréseket Spektromom 201 készüléken 530 nm-es hullámhosszú zöld fénnel végeztem. Mivel a vizsgált oldatok lipidkoncentrációja elég kicsi -- 0.8 mg/ml -- volt, a liposzómák higitásával e tartományban a fényszóróképeség közel lineárisan változik.

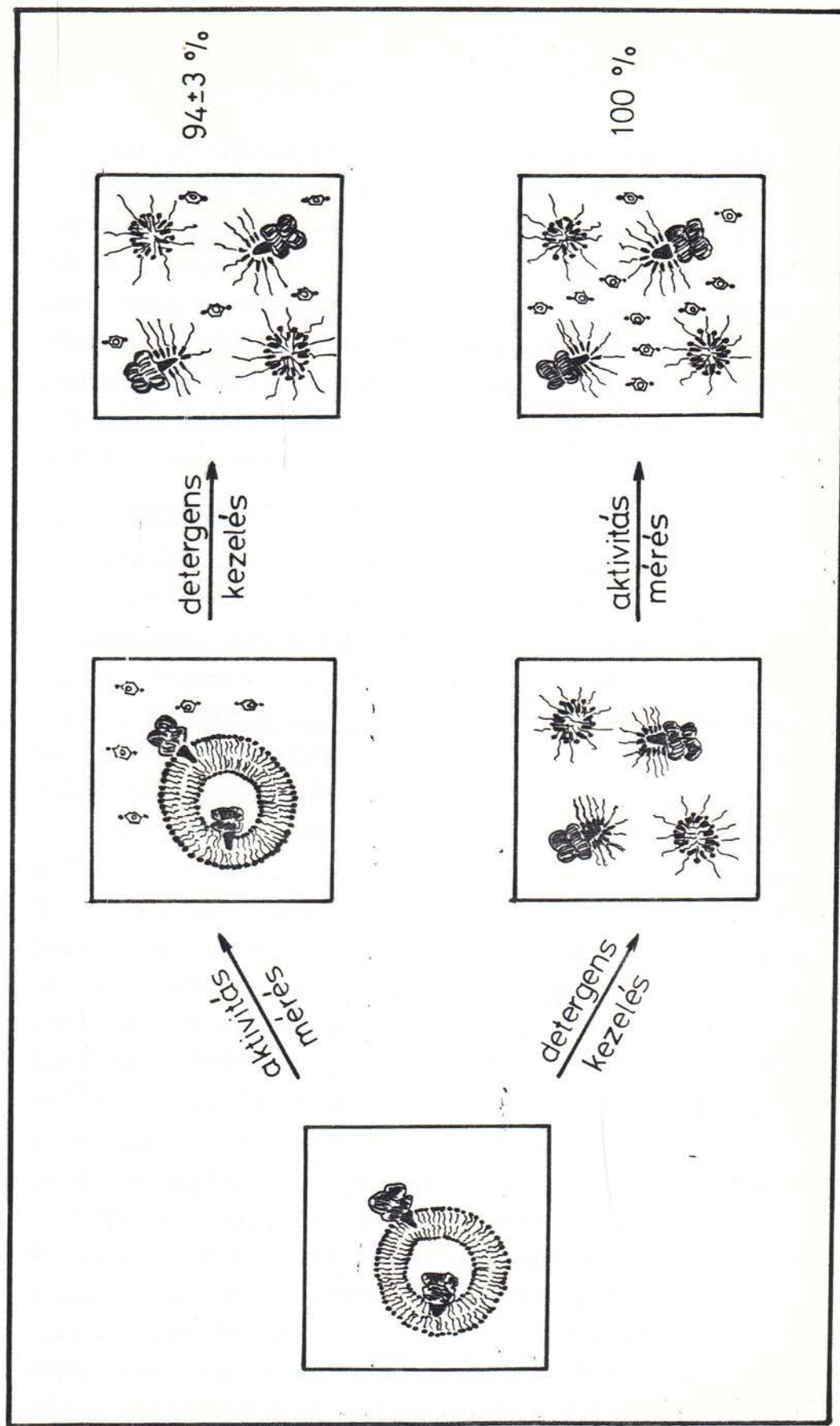
A liposzómák megbontásához TRITON X-100 tenzidet használtam fel. A tenzid koncentrációját 0.01-től 0.12 %-ig növeltem. A különböző koncentrációjú TRITON X-100-at tartalmazó liposzóma szuszpenziót a fényszórás értékének meghatározása után a 4.2.4. fejezetben leírt ultracentrifugás elválasztásnak vetettem alá. Az itt alkalmazott higabb oldatok miatt a liposzómáknak az 1 mólos

cukoroldat határfelületére való leülepedése itt teljes mértékű és jól definiált volt. A felülúszóban megjelenő "felszabadult" enzim aktivitásának mérésével az összes enzimaktivitás ismeretében következtetni tudtam a liposzómában kötötten maradt enzim aktivitására.

2.4.6. A γ -glutamil transzpeptidáz orientációjának vizsgálata

Az enzim orientációját lipidmembránban a tenzid nélkül és annak jelenlétében végzett aktivitásmérés összehasonlítása alapján tanulmányoztam. A vizsgálat alapja az a kísérleti tény, hogy a lipid kettősréteg a vizoldékony szubsztrátok számára átjárhatatlan. Saját kísérleteinkben radioaktív foszfát, triciált GDP és szukcinát felhasználásával bizonyítottuk be, hogy az általunk készített liposzómák inpermeábilisak e vegyületekre.

Ha a γ -GT aktivitásának mérését sértetlen liposzómákkal végezzük, az aktiv centrumukkal a lipidmembrán belső oldala felé forduló enzim molekulák inaktívak maradnak. E kísérletben a reakció leállítása után bontottam meg a lipid vezikulákat, hogy az abszorbancia meghatározásánál ne zavarjanak /ld. 4.2.1. fejezet/. A másik típusú mérésnél az inkubálás előtt 0.5 %-os végkoncentrációjú TRITON X-100-zal tettem szabaddá a liposzómáktól az összes enzimet. Mivel a TRITON X-100 aktiváló hatása elhanyagolható /2 %/, a két típusú mérés közötti különbség az aktiv centrumot tekintve a szubsztrát számára elérhetetlen /tehát "befelé", "keresztbe" álló, vagy bezárt/ enzim mennyiségét adja meg /ld. 14. ábra/.



14. ábra: a γ -glutamil transzpeptidáz orientációjának vizsgálata

4.2.7. Kainsavas mérések

Annak a vizsgálatához, hogy hogyan hat a kainsav a γ -glutamil transzpeptidázra az előzetes irodalmi tájékozódás után, az enzim tulajdonságainak ismeretében a következő kísérleti körülmények megtervezésére volt szükség: pH, pufferkapacitás, ionkoncentrációk, enzimkoncentráció, donorkoncentráció, akceptorkoncentráció, a kainsav vizsgált koncentrációtartománya, az enzimnek a kainsavval történő előzetes inkubálása, ennek időtartama, reakcióidő.

A kainsav hatása különböző koncentrációkban

A kísérletek megtervezése során igyekeztem optimális feltételeket biztosítani az enzimreakció lezajlásához, így a pH-t 8.2-re állítottam be /ld. 4.1.1. fejezet/ 0.1 M TRIS.HCl puffer alkalmazásával. A pufferkapacitást amiatt kellett ilyen magasra beállítani, mivel a donorként alkalmazott γ -glutamil-p-nitroanilid csak 0.1 M HCl-ban oldható /ld. 4.2.1. fejezet/. Mivel a szervezetben leggyakrabban előforduló kationok, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} a kainsav hatását ellentétesen befolyásolják /ld. 2.3.4. fejezet/ szükséges volt hatásuk egyenkénti vizsgálata. A kísérletek során az ionkoncentrációkat az optimális /és egyben a fiziológias koncentrációt megközelítő/ értékekre, így rendre Na^+ : 150; K^+ : 200; Mg^{2+} : 10; Ca^{2+} : 20 mM-ra állítottam be. A donorként alkalmazott γ -glutamil-p-nitroanilid koncentrációja 4, az akceptor GlyGly-é 50 mM volt. A kainsav hatását a 2.3.1. fejezetben leírtak alapján 1 nM és 10 mM között, tízszeres koncentrációugrásonként vizsgáltam. Az előkísérletek során kitűnt, hogy nincs szignifikáns különbség aközött, hogy^{az} adott mennyiségű kainsavat a reakcióelegyhez, vagy előzőleg a vizsgálandó enzimmintához adom. Ugyanigy

nem okozott számottevő eltérést az előzetes inkubálás időtartama /37 °C hőmérsékleten való 30 perces inkubálás volt a leghosszabb vizsgált periódus/ és az sem, ha a kainsavval inkubált transzpeptidázt ultraibolya besugárzásnak tettem ki aktivitásmérés előtt /ez a kainsavban található kettős-kötés esetleges gerjesztése miatt okozhatott volna számottevő hatást/. Mivel a párhuzamos kísérletek szórása így valamivel kisebbnek adódott, kísérleteim során mindig 10 perces 37 °C-on történő előinkubálást alkalmaztam. A reakcióidőt és a felhasznált enzimnyiségét úgy állítottam be, hogy jól mérhető /0.4 körüli/ abszorbanciát kapjak, így a reakcióidő általában 30 perc, az alkalmazott enzim aktivitása akceptorral 5, akceptor nélkül 15 mU volt.

A kainsav hatása az optimum alatti /összemérhető/
akceptorkoncentrációk esetén

Második lépésként a kainsav hatását az ingerületátvitelben szerepet játszó akceptorok /Glu, Gln/ jelenlétében vizsgáltam. Az előkísérletek során kimértem a két aminosav enzimaktiváló hatásának koncentrációfüggését. A vese és az agy γ -GT vizsgálatakor kapott két-két görbe azonos lefutású volt, a telítés mind Glu, mind Gln esetén 50 mM körül következett be, a telítési aktiválás értéke kb. 100 % volt.

Ezen adatok figyelembevételével az alkalmazott 0.1 mM kainsavkoncentráció hatását 0, 0.1, 5 és 50 mM glutaminsav, illetve glutamin jelenlétében vizsgáltam. A reakcióelegy többi komponensének koncentrációja a 4.2.1. fejezetben ismerttetett adatokkal egyezett.

A kainsav hatása optimum alatti donorkoncentrációk
esetén, a γ -glutamil-p-nitroanilid látszólagos k_M
értékének meghatározása

A γ -glutamil-p-nitroanilidre mért látszólagos k_M értéket a kainsav /mint feltételezett inhibitor/ 0, 50, illetve 500 μ M-os és az akceptorként szereplő glutaminsav 0, 0.1 és 25 mM-os koncentrációja mellett mértem meg. A mérések során a γ -glutamil-p-nitroanilid koncentrációját 0.2 mM-tól 4 mM-ig változtattam. A mérés egyébként a 4.2.1. fejezetben leírtak szerint történt.

5. KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Bizonyítékok a γ -glutamil transzpeptidáz membránba történő integráns beépülésére

A γ -GT liposzómákba való építésével eddig két munkacsoport foglalkozott. Hughey és mtsai /1979/ a következő bizonyítékokat sorolták fel az integráns beépülés mellett:

- együttmozgás Sepharose 4B oszlopon
lin. cukorgradiensben
- töréspont az enzim Arrhenius diagramjában a dipalmitoillecitin fázisátalakulási pontjánál.

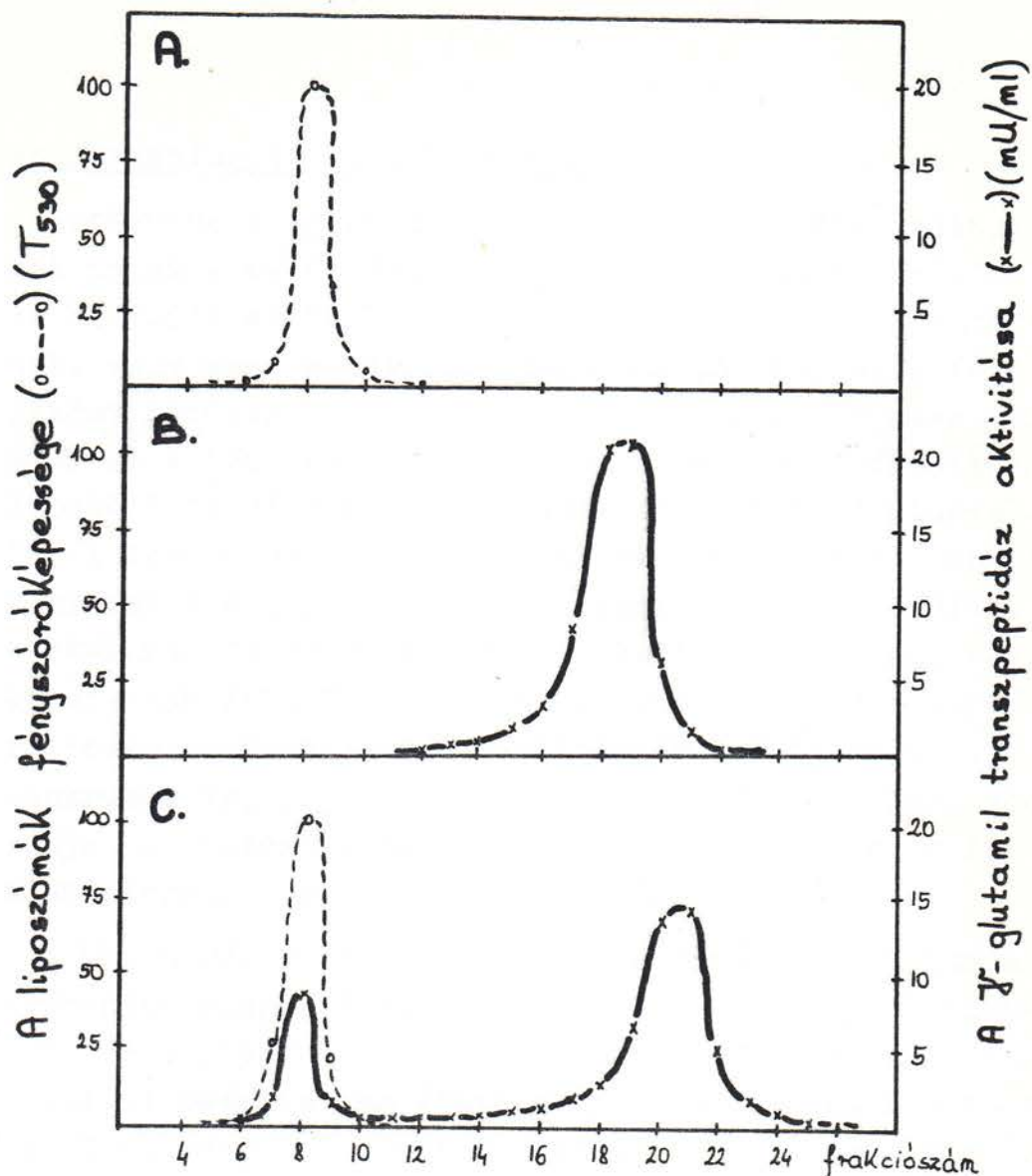
Sikka és Kalra /1980/ a beépülést az enzimaktivitás és a liposzómák együttes kimutathatósága alapján tényként fogadták el.

En, mint azt egy korábbi cikkünkben leírtuk /Csermely és mtsai, 1982/ a fenti bizonyító erejű kísérletek közül a Sepharose 4B gélszűrést és az Arrhenius diagram felvételét végeztem el. Ezekről és az integráns beépülést bizonyító két további eredményről az alábbiakban számolok be.

Együttmozgás Sepharose 4B oszlopon

A beépült enzim mennyiségét a be nem épülttől egy a 4.2.2. fejezetben leírt Sepharose 4B oszlopon történő gélszűréssel választottam el. A 15. ábrából látható, hogy a 4.2.2. fejezetbeli kontrollkísérlet /a. pont/ során a teljes enzimaktivitásnak kb. $1/4$ -e $26.5 \pm 1.5 \%$ volt a liposzómákkal azonos helyen detektálható.

A liposzómáknak és a γ -GT-nek ez az "együttmozgása"



15. ábra: a γ -glutamil transzpeptidáz beépülése tojáslecitin liposzómába, a Sepharose 4B gélszűrési szokásos elúciós profiljai: A, enzimmentes liposzóma; B, liposzómákat nem tartalmazó γ -GT; C, az elúciós profil a beépítés után.

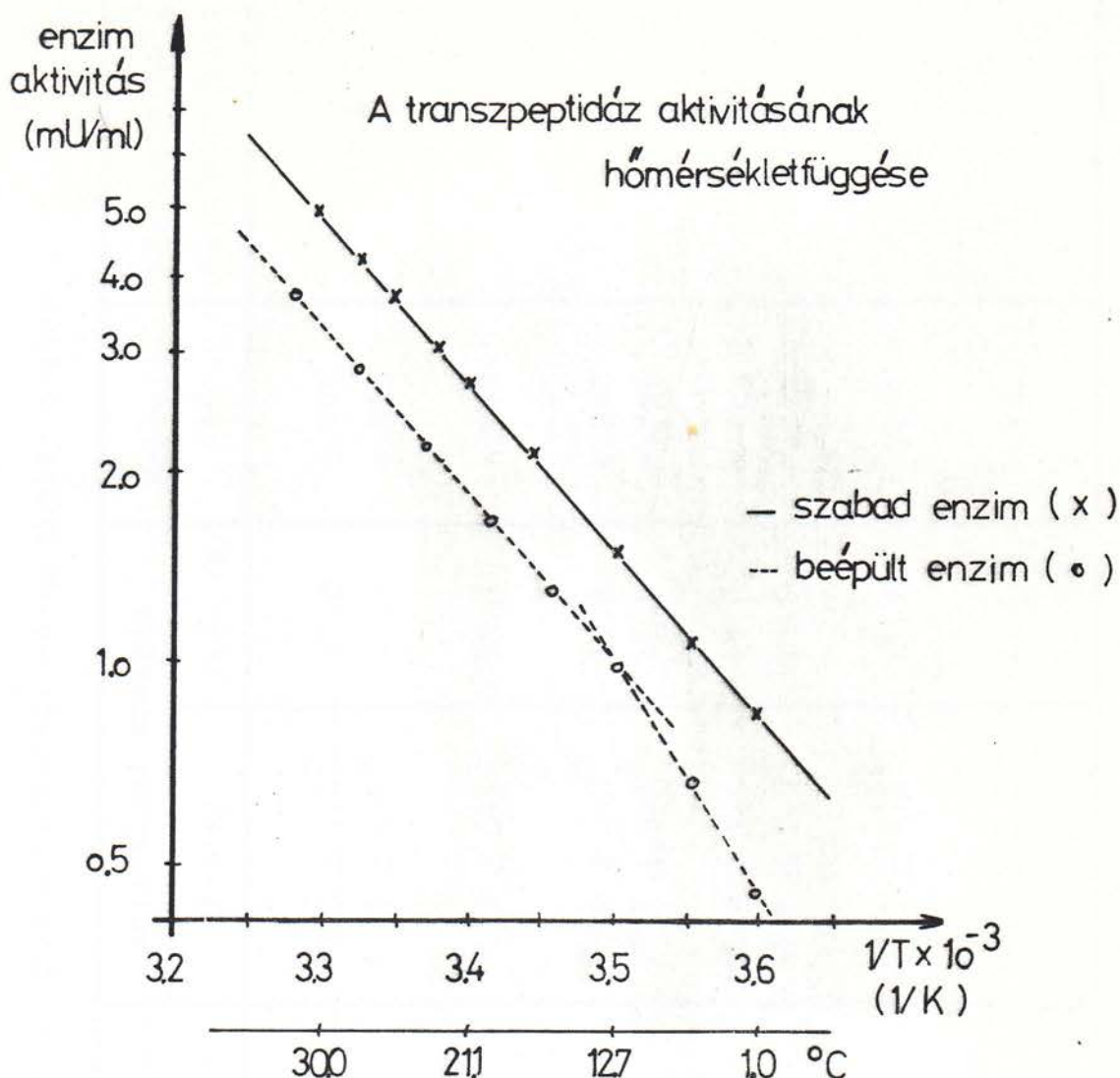
azonban önmagában még nem bizonyító erejű, hiszen akkor is hasonló elúciós képet kapnánk, ha az enzim a liposzómákhoz való pusztán asszociatív /elektrosztatikus/ kötődés miatt vándorolna a liposzómákkal azonos sebességgel. Az enzim beépülésének valóban integráns jellegét bizonyító kísérletekről a következőkben számolok be.

Az Arrhenius diagram felvétele

Arrhenius diagramok vizsgálatát elterjedten alkalmazzák annak a valószínűsítésére, hogy adott membránfehérje hidrofób erővel kötődő integráns része-e a membránnak, vagy csak elektrosztatikusan, perifériális fehérjeként kötődik hozzá /Montal, 1976/. A kísérletek alapjául az a tény szolgál, hogy a membránok rendezett állapotból "fluid" állapotba való átmenetét, fázisátalakulását legtöbbször az integráns részüket képező fehérjék konformációváltozása kíséri. Ilyen konformációváltozást cirkuláris dikroizmus mérések alapján számos esetben kimutattak /pl. Smith és mtsai, 1982/. A konformációváltozás enzimek esetén legtöbbször érinti az aktív centrumot is, így a katalizált reakció aktiválási energiája megváltozik. Ezt a jelenséget észleljük az Arrhenius diagramok vizsgálata során.

A 16. ábrán a tojáslecitin liposzómába épült enzim Arrhenius diagramjában 12-13 °C körül töréspont figyelhető meg. Ilyen törés az 1 %-os TRITON X-100-zal szolubilizált beépítetlen /"szabad"/ enzimmel nem mutatható ki. Ugyancsak nem tapasztalhatunk töréspontot az enzim Arrhenius diagramjában abban az esetben, ha az enzim-liposzóma komplexet szintén 1 %-nyi TRITON X-100-zal, vagy foszfolipáz A₂-vel szolubilizáljuk. A foszfolipáz A₂ hatása az 1/4, 2, illetve 5 perces inkubálási idejű mintáknál azonosnak mutatkozott. A γ-glutamil transz-peptidázra ezen utólagos megbontást alkalmazó kísérletek az irodalomban nem leírtak, azonban a foszfolipáz A₂-vel kapott eredmények igen jó összhangban vannak az Eletr és mtsai /1973/ által néhány mikroszómális enzim esetén tapasztaltakkal.

Érdekes a "sómentes közegben" végzett kísérlet során 9.8 °C-nál észlelt töréspont helyét a "kontroll" kísérletbeli 12.8 °C-kal összehasonlítani /ld. VII. táblázat,



16. ábra: az 1 % TRITON X-100-zal szolubilizált / x---x / és a tojáslecitin liposzómába épített / o- - -o / enzim Arrhenius diagramja

72. old; a kísérleti körülményeket ld. a 4.2.3. fejezetben/. A 4.1.2. fejezetben közölt DSC vizsgálatok szerint a felhasznált tojáslecitinnek 0.15 M NaCl-ban 9.5 - 10.0 °C tájékán van a fázisátalakulási pontja. Ez igen jó egyezésben van a közel azonos összetételű "sómentes közeg"-ben végzett kísérlet során kapott töréspont helyével. A "kontroll"-kísérletbeli 12.8 °C-os érték igen jól magyarázhatóvá válik, ha figyelembe vesszük, hogy az oldat 10 mM MgCl₂-ot is tartalmaz, amely az irodalom egybehangzó állítása szerint /Möntal, 1976; Ahrens, 1981/ a fázisátalakulási pontot megemeli. /Kísérleteim szerint az oldatban lévő NaN₃ a kétértékű ionok membránmelletti loká-

VII. táblázat: az Arrhenius diagramok felvétele során kapott adatok

Enzim	A kísérle- tek száma	Hőfoktartó- mány /°C/	Aktiválási energia		Korrelá- ció	Fázisátalakulá- si hőmérséklet
			/kJ/M/	/kcal/M/		
γ -GT	2 2	5-15 20-40	72.3 $\pm$ 1.4 $\square$ 46.5 $\pm$ 2.6 ^x	17.2 11.3	0.999 0.999	16.1
γ -GT 1 % TRITON	2 2	5-40	55.3 $\pm$ 3.1 ^x	13.1	0.996	-
γ -GT liposzóma /kontroll/	6 6	5-10 15-40	72.0 $\pm$ 6.3 $\square$ 52.1 $\pm$ 3.4 ^x	17.2 11.7	0.998 0.996	12.8
γ -GT liposzóma sómentes közeg	2 2	5-10 15-40	116.9 $\pm$ 9.3 50.0 $\pm$ 5.5 ^x	27.8 11.9	0.988 0.994	9.8
γ -GT liposzóma + 1 % TRITON	2 2	5-40	47.3 $\pm$ 4.3 ^x	11.2	0.999	-
γ -GT liposzóma + foszfolipáz A ₂	2	5-40	52.5 $\pm$ 9.1 ^x	11.7	0.993	-

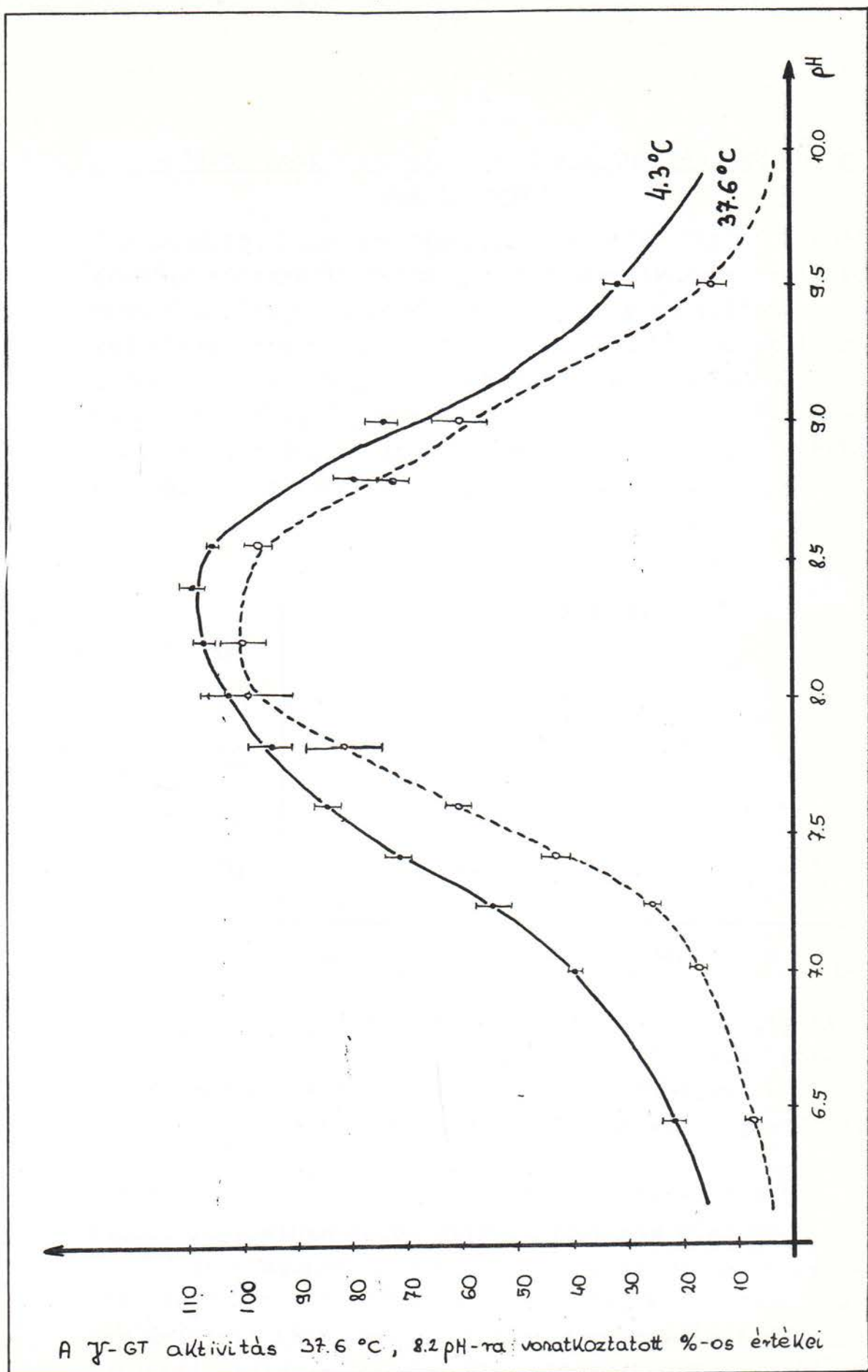
Megjegyzések: az adatok átlagértékek 95 %-os konfidenciaszintű eltérésekkel
x ill. $\square$: az adatok nem térnek el szignifikánsan egymástól

lis koncentrációját szignifikánsan megnöveli. Ez a tény is alátámasztja a MgCl_2 -nak a fázisátalakulási pontot a magasabb hőmérsékletek irányába eltoló képességét./ Mindezen eredmények nagymértékben igazolják, hogy a transzpeptidáz integránsan épült be a liposzómákba.

A VII. táblázat adataiból látható, hogy az egyes szakaszok aktiválási energiái a fázisátalakulási pontok alatti aktiválási energiák kivételével szignifikánsan nem különböznek egymástól. A kapott 50 kJ/M körüli értékek alátámasztják McMurchie és Raison /1979/ megfigyeléseit, akik összefüggést véltek felfedezni a fluid állapotú membránokban mért aktiválási energiák és a membránok fázisátalakulási pontja között. Megfigyeléseik szerint a 13°C körüli fázisátmenet 60 kJ/M aktiválási energiával kell, hogy párosuljon, ami közel jó egyezésben van az általánosan kapott értékekkel.

A " γ -GT"-val végzett mérés esetén 16 °C-nál észlelt töréspont magyarázatára pl. olyan elképzelés szolgálhat, amely az oldatban az enzim és más részek, vagy az enzim önmagával való hőmérsékletfüggő asszociációját, aggregációját feltételezi.

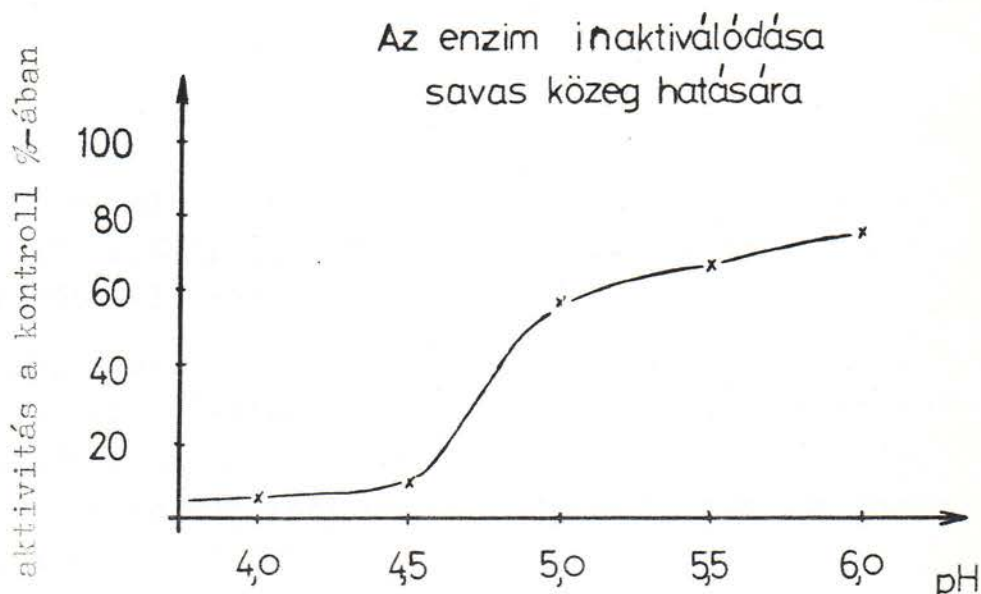
Kísérleteim szerint az enzim által katalizált reakciónak, illetve az enzim katalitikus sajátosságának legfontosabb jellemzői a hőmérsékletváltozás közben ugyanazok maradnak. A reakcióelegy pH-ja nem változott számottevő mértékben a 4°C-ról 40°C-ra történő melegítés során. A transzpeptidáló reakció pH függését 4, illetve 37°C-on a 17. ábra tünteti fel. A két görbe lefutása szinte azonosnak mondható. A γ -glutamil-p-nitroanilidre mért közelítő k_M 4°C-on 1.89 mM-nak, 37°C-on 1.65 mM-nak adódott. Az eltérés az aktivitásmérés során változást nem okoz.



17. ábra: a transzpeptidáló reakció pH függése 4, illetve 37°C-on /az ábrázolt értékek 5 mérés átlagai a 95 %-os szignifikanciájú eltérések feltüntetésével/

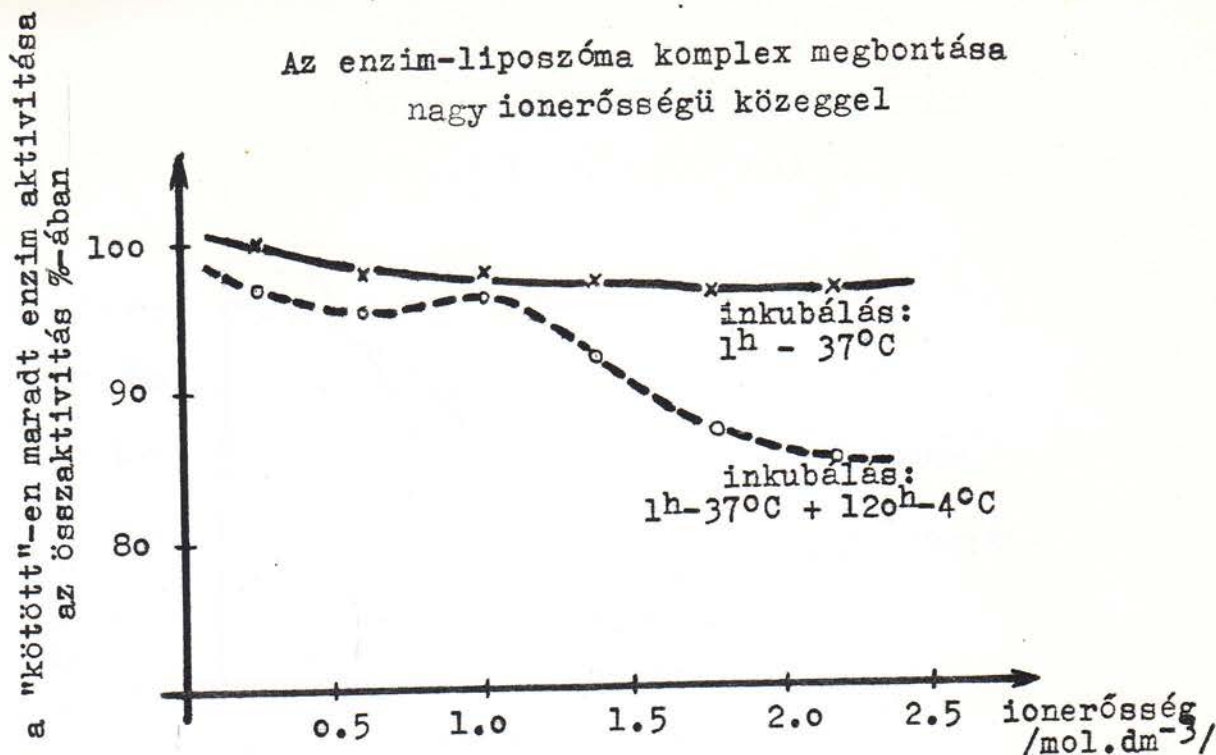
A képződött komplex megbontása nagy ionerősségű közeg segítségével

Köztudott, hogy a membránokhoz perifériálisan /tehát döntően adszorptív módon, elektrosztatikus erőkkel/ kötött fehérjék az ionerősség, illetve a pH változtatásával eltávolíthatók. Mivel a γ -glutamil transzpeptidáz izoelektromos pontja kb. 4-5 körül van /Matsuda és mtsai, 1980/a/, és ha a közeg pH-ját ez alá csökkentjük, inaktiválódik /ld. 18. ábra/, csak az első lehetőség maradt számomra a kérdés vizsgálatára.



18. ábra: az enzim inaktiválódása savas közeg hatására /az egyes pH-kat 0.7 M-os AcOH-NaOAc pufferrel állítottam be; az aktivitásméréshez a pH 8.5-re való visszaállítás TRIS-pufferrel történt/.

A liposzómákhoz kötötten maradt /kiülepedő/ γ -GT-t a 4.2.4. fejezetben leírt ultracentrifugás módszerrel elválasztva a megnövekedett ionerősség hatására felszabaduló enzim mennyiségtől, a felülúszóban mért aktivitás nem mutatott különbséget az "elektrolit nélkül" lecentrifugált mintához képest. Mind a kettő az összaktivitásnak kb. 10 %-a volt, tehát a γ -glutamil transzpepti-



19. ábra

dáz megnövelt ionerősség segítségével nem távolítható el a liposzómáról, ami erősen alátámasztja beépülésének hidrofób jellegét.

A 19. ábrából látható, hogy a Sepharose 4B géliszűrőssel történő elválasztást alkalmazva a beépült transz-peptidázt a megnövelt ionerősség hatására számottevő mennyiségben még több napos inkubálás után sem szakad le a liposzómáról.

A képződött komplex megbontása tenzid segítségével

A fentieken kívül a beépülés integrális voltának további bizonyítékeként fogadhatjuk el az enzim-liposzóma komplex TRITON X-100-zal történő fokozatos megbontásának vizsgálatakor kapott eredményeket. A 20. ábrából látható, hogy a liposzómához kötött enzim aktivitása és a fényszóróképeség az alkalmazott TRITON X-100 koncentráció függvényében párhuzamosan csökken a fényszórásmérés során tapasztalt kezdeti maximumtól eltekintve. Ezt a maximumot valószínűleg a TRITON X-100 molekuláinak a saját kritikus micellaképző koncentrációjuk -- 0.016 % /Robinson és Tanford, 1975/ -- alatti, liposzómákba

történő "befúródása" és ezáltal a liposzómák méretének megnövekedése okozza /ld. 21. ábra/. Ezt a jelenséget támasztják alá Fu és Laughlin /1980/ analitikai ultracentrifugás és fényszóródásmérési kísérletei is, amelyekkel hosszú szénláncú tenzideknek /saját kritikus micellaképző koncentrációjuk alatti/ liposzómákhoz való adszorpcióját bizonyítják.

5.2. Beépülés előzetesen elkészített liposzómába

Az enzim-liposzóma komplex stabilitásának vizsgálata során kapott eredmények arra utalnak, hogy a beépülés során az enzim hidrofób része kapcsolódott a lipidmembrán hidrofób régiójával.

Citokróm b_5 -tel végzett kísérletekből már kb. egy évtizede ismert, hogy az ilyen típusú kölcsönhatások bizonyos membránfehérjék és a lipidmembrán között spontán is létrejöhetnek /Strittmatter és mtsai, 1972; Holloway és mtsai, 1982/. Analógiát feltételezve megvizsgáltam a γ -GT beépülésének mértékét olyan kísérleti körülmények között, amikor utólag adtam az enzimet a már előzetesen elkészített liposzómához.

Eredményeim szerint 37°C -on 30 perc alatt a tojáslecitin liposzómákhoz adott enzimaktivitásnak kb. $1/5$ -e /18 %/; 120 perc után kb. $1/4$ -e /23 %/ épült be a liposzómákba a Sepharose 4B oszlopon történő elválasztás alapján. Az inkubálást dimirisztoilfoszfátidilkolin /DMPC/ vezikulákkal különböző hőmérsékleteken szintén 30 percig végezve, a beépült enzimaktivitás igen nagy mértékben függött a hőmérséklettől. A VIII. táblázat adataiból látható, hogy a beépülés mértéke a DMPC fázisátalakulási pontján 23°C / a legnagyobb.

A kapott eredmények könnyen értelmezhetőek, ha figyelembe vesszük, hogy a fázisátalakulási ponton a beépülést megkönnyítő hibahelyek száma igen magas, és hogy a fluid állapotú membránnak a fehérjék általi perturbá-

VIII. táblázat: a DMPC vezikulákba való beépülés
mértékének hőmérsékletfüggése

a beépítés hőmér- séklete	a beépült enzimaktivitás %-os mértéke
10 °C	6.2 ± 2.9 %
23 °C	28.9 ± 3.3 %
35 °C	14.0 ± 2.8 %

ciója a rigid membránba való beékelődésnél jóval keve-
sebb energiát igényel.

A spontán beépülés vizsgálata alapján egyrészt lehe-
tőség nyilhat a beépítés egy új, az enzimet legkevésbé
károsító módjának kifejlesztésére, másrészt azonban le-
hetséges, hogy át kell értékelnünk az enzim beépülésé-
nek mechanizmusáról tudottakat.

Könnyen elképzelhető ugyanis, hogy a liposzómák ke-
letkezése során az enzimnek csak egy tört része épül
be a lipid-vezikulába és a maradék a hosszas dialízis
során spontán ékelődik be a lipid molekulák közé. El-
képzelhető az is, hogy a beépülés zömében a fázisátala-
kulási ponton zajlik le. A 37°-on történő spontán beé-
pülés vizsgálata során felhasznált tojáslecitin minták
géliszűrése 4°C-on történt. Így lehülés közben a lipo-
szómák 10-12 °C-on lezajló fázisátalakulása bekövetkez-
hetett. Nem kizárt tehát a beépülés ily módon való tel-
jessé tétele sem. Ezt a feltételezést támasztják alá a
DMPC liposzómákkal végzett kísérletek is, ahol a beépü-
lés szintén a fázisátalakulási ponton volt a legnagyobb.

A γ -GT-nek e spontán beépülésre való hajlama összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a transzpeptidáz-aktivitás számos testnedvben megtalálható /ld. pl.: Binkley és mtsai, 1975; Binkley és Wiesemann, 1975/. A citokróm b_5 -tel említett analógia az enzim membránbeli elhelyezkedésére is kiterjeszthető. Matsuda és mtsai /1980/b/ eredményei szerint ugyanis a transzpeptidáz is a citokróm b_5 -höz hasonlóan N-terminális hidrofób részlete rögzíti a membránhoz. Emiatt a transzpeptidáz szintézisére a Blobel féle szignál hipotézis /ld. 2.1.4. fejezet/ nem alkalmazható.

Amennyiben a citokróm b_5 -tel való analógiát továbbvisszük a citokróm b_5 -re néhány szerző által leírtak /Rachubinsky és mtsai, 1980; Holloway és mtsai, 1982/ és a fentiek alapján elképzelhető, hogy a transzpeptidáz is a szabad riboszómákon, eredetileg hidrofil formában szintetizálódik és a 2.1.4. fejezetben említett "membránfelismerő-konformáció" elmélet szerint ékelődik be végleges membránbeli helyére. A különböző testnedvekben, a citoszolban előforduló, nem membránhoz kötött forma létét támasztják alá Huseby /1978, 1982/a-b/, Tsuji és mtsai /1980/ valamint Echetebe és Moss /1982/a/ kísérleti eredményei is, amelyek a különböző szövetekben, testnedvekben előforduló "oldható" γ -GT aktivitás meglétéről tanúskodnak. A γ -GT "laza" membránhoz kötöttségét bizonyítják Sikka és mtsai /1982/ kísérletei is, akik szerint a transzpeptidáz liposzómákból "erithrocita-ghost"-okba való átültetése során nem a kétféle membrán fúziója, hanem a transzpeptidáz átvándorlása zajlik le.

Megjegyzendő, hogy legújabban Nash és Tate /1982/ foglalkozott a transzpeptidáz szintézisével. Eredményeik szerint az enzim két alegysége közös fehérjeláncból /pl. az inzulinhoz hasonlóan/ limitált proteolizissal keletkezik.

IX. táblázat: a kísérleti körülmények hatása
a beépülés mértékére

A beépítéskor alkalmazott közeg	A beépült enzimaktivitás %-os mértéke
a. kontroll	26.5 ± 1.5 %
b. " + 0.001 % TRITON	35.7 ± 1.3 %
c. " + 10 mM MgCl ₂	40.9 ± 1.2 %
d. " + 40 mM glutation	25.6 ± 3.2 %

/kontroll: 0.1 M TRIS.HCl -pH 8.5-, 0.15 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 3 mM NaN₃/

5.3. A kísérleti körülmények hatása a beépülés mértékére

Vizsgáltam a kísérleti körülmények változtatásának a beépülés mértékére gyakorolt hatását. A beépült enzimaktivitás tenzid, növelt magnéziumion koncentráció és szubsztrát jelenlétében meghatározható %-os mértékét a IX. táblázat mutatja.

A b. esetben alkalmazott TRITON X-100 koncentráció messze a kritikus micellaképző koncentráció /0.016 %/ és még messzebb a tenzid liposzómákat megbontó /0.1 %, ld. 16. ábra/ koncentrációja alatt van. Az oldatban lévő TRITON X-100 molekulák a 21. ábrán bemutatotthoz hasonlóan a membrán szerkezetében hibahelyeket generálva könnyíthették meg a beépülést. A megnövelt tenzidkoncentráció esetleg az enzim aggregációjának további viszszaszorításában is szerepet játszott. A c. esetben pedig, amint erre Razin /1972/ már régebben rámutatott, a Mg²⁺ ionok a foszfátidilkolin részek foszfátcsoportjai és az enzim között ionos hidat alkotva segíthették elő a beépülést. A d. pontbeli eredmény arra utal, hogy a szubsztrát kötődése a beépülés mértékét nem befolyásolja.

Mint azt már a 4.2.2. fejezetben említettem, a transz-peptidáz liposzómábaépülésének injektálósos módszerrel kapott mértéke eltér a Hughey és mtsai /1979/ által le-
írt beépülési aránytól. A különbség oka az lehet, hogy az oldatban jelenlévő transzpeptidáz aggregátumokat a Hugheyék által alkalmazott 2 %-os Na-kolátos kezelés sokkal inkább képes megbontani, mint a mi kísérleteinkben használt maximálisan kb. 10 % etanolt tartalmazó rendszer dezintegráló hatása. A transzpeptidáz aggregálódására utal a tenzidmentes enzim Arrhenius diagramjában kb. 16°C-nál jelentkező töréspont is /ld. 5.1. fejezet/.

A képződött enzimaggregátumok stabilitására utal az a tény, hogy sem egyszeri beépítés során, sem pedig az első alkalommal beépült enzimmennyiségtől elválasztva a másodszori beépítés alkalmával nem épül be számottevő / 5 %/ mennyiségük a liposzómákba. E "maradék" enzim liposzómába építése a 4.2.2. fejezetben leírt dezoxikolátos kezelés után sem sikerült. Az aggregátumok megbontásának hatásos módszere viszont hig pufferoldatba való helyezésük. A 0.1, 0.01 és 0.005 mólos TRIS pufferben végzett beépítési kísérletek tanulsága szerint a transz-peptidáz egyre növekvő, végül csaknem teljes /95 %-nyi/ mennyiségét be tudtam építeni a képződő liposzómákba. /Elképzelhető, hogy ilyenkor az enzimek által esetleg közbezárt töményebb oldat ozmotikus nyomása "feszíti szét" az aggregátumokat, vagy az ionerősség csökkenésével az enzimnek a liposzómákhoz való affinitása nő meg ugrásszerűen./

Az enzim egy és kétértékű ionokkal történő aktiválhatósága is feltehetően kapcsolatban áll aggregatív sajátosságával. Erre utal az irodalmi adatok nagyfokú el-
lentmondásosságán /ld. X. táblázat/ kívül néhány elő-
kísérletben kapott eredményem is, amelyek a papainnal

X. táblázat: a γ -GT aktiválhatósága egy- és kétértékű ionokkal

Honnan izolálták?	Hogyan izolálták?	Milyen donorral mértek?	Volt-e Gly?	Na ⁺ akti-válhatóság /150 mM, %/	Mg ²⁺ akti-válhatóság /10 mM, %/	Irodalmi hivatkozás
Nyúl agy	homogenát	Gpna	-	40-45	26-28	Okonkwo és mtsai, 1974
Marha agy	"	Gpna	-	85-88	32-34	"
Birka vese	tenzid	GSH	-	120-130	700-750	Orlowski, 1976
Patkány vese	"	Gpna	-	inhibíció	inhibíció	Binkley, 1961
Patkány vese	"	Gpna	-	34	22	saját adat
Patkány vese	"	Gpna	+	21	7	saját adat
Patkány vese	"	Gpna	-	120		Orlowski és mtsai, 1973
Patkány vese	"	GSH	-	inhibíció	inhibíció	Elce és mtsai, 1974
Patkány agy	"	Gpna	-	48	27	Varga és mtsai, 1980
Patkány agy	"	Gpna	+	26	6	Varga és mtsai, 1980
Humán vese	"	Gpna	+	inhibíció	inhibíció	Miller és mtsai, 1976
Humán epe	proteoliz.	Gpna	+	o	o	Indirani és Hel, 1977

Rövidítések: Gpna - γ -glutamil-p-nitroanilid

GSH - glutation

szolubilizált /tehát hidrofób -- aggregálódó -- részétől megfosztott/ enzim csökkent ionaktiválhatóságát mutatják.

5.4. A γ -glutamil transzpeptidáz elhelyezkedése a liposzómákban

Jelenlegi tudásunk szerint alapvetően két kérdést tehetünk fel a γ -GT membránbeli elhelyezkedésével kapcsolatban: a membrán melyik oldalán helyezkedik el az enzim nagyobbik részét kitevő glikozilált hidrofil rész; illetve hogy hol helyezkedik el az enzim hidrofób része a lipid kettősrétegen belül.

Az első kérdésre adandó választ eddig túlnyomórészt az enzimnek a 2.2.2. fejezetben említett papainnal való szelektív emészthetősége alapján keresték. A vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy az *in vivo* és *in vitro* rendszerek membránjához kötött teljes γ -GT aktivitás eltávolítható a membrán papainnal történő emésztésével. /Tsao és Curthroys, 1980/. Az így szolubilizált enzim összaktivitása a kezdeti, membránhoz kötött összaktivitással pontosan megegyezik. A papainnal emésztett enzim liposzómákba való beépülésre képtelen /Hughey és mtsai, 1979/.

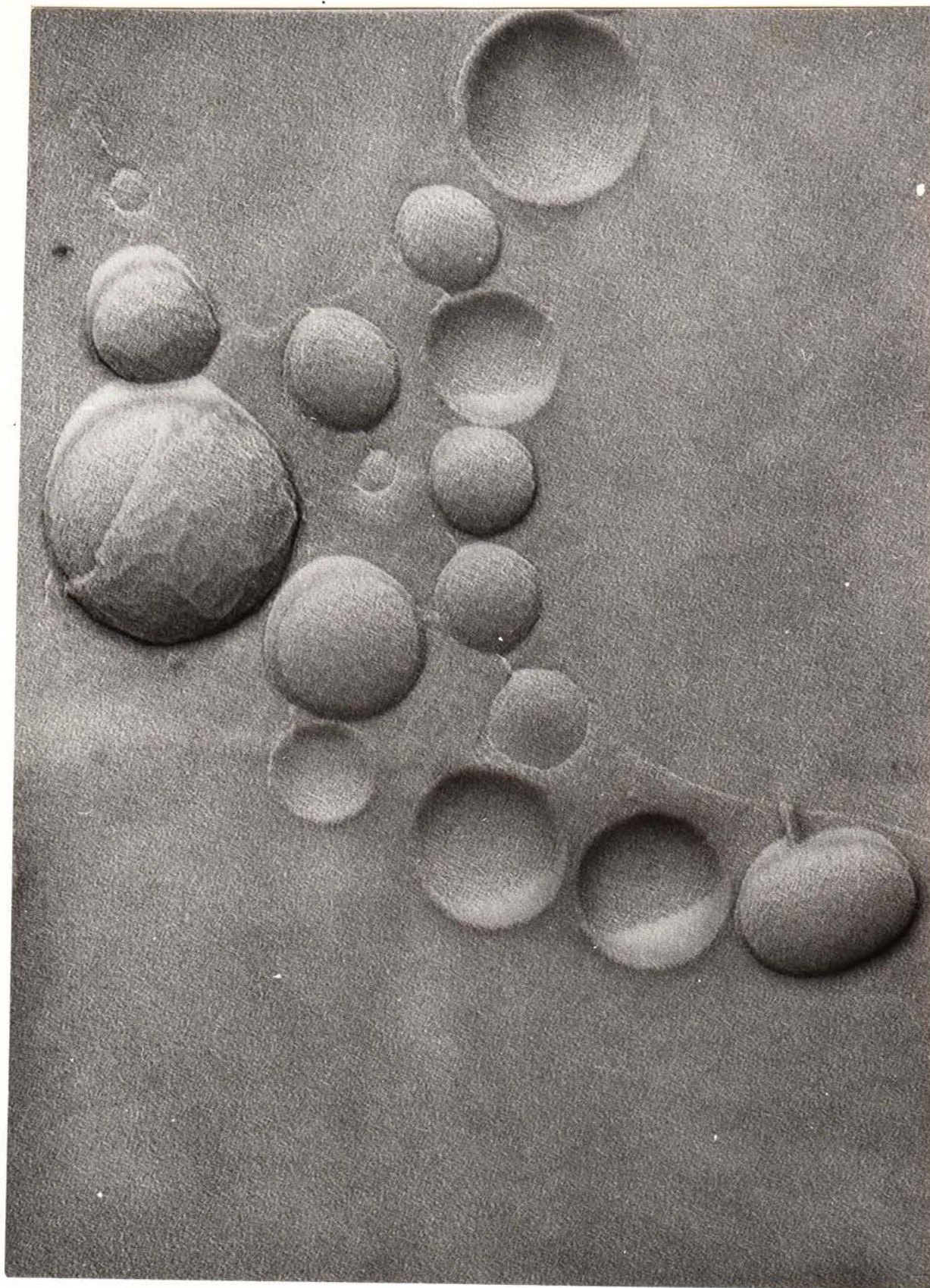
A 4.2.6. fejezetben leírt két típusú enzimaktivitásmérés eredményeinek összevetése alapján a szubsztrát számára az enzim-liposzóma komplexben elérhetetlen enzimaktivitás az összaktivitás 4-5 %-ának adódott. Elmondhatjuk tehát, hogy az enzim zöme /95-96 %-a/ "kifelé" áll. Ez megegyezik a Hughey és mtsai /1979/ által kapott szintén 95 %-os eloszlással /ld. VI. táblázat/ és elég jó összhangban áll a liposzómák által az adott kísérleti feltételek mellett bezárt tárfogat kb. 10 %-os arányával is /Báthori és mtsai, 1981/. /Megjegyzendő, hogy Sikka és Kalra -1980- hasonló módszerrel csak 75-85 %-os kifelé történő orientációt kapott, ami egyér-

telműen az eltérő kísérleti körülményeknek tulajdonítható - ld. VI. táblázat -./

Az enzim ilyen aszimmetrikus elhelyezkedése egyébként nem meglepő, ha tekintetbe vesszük a gömbalakú lipid kettősrétegek aszimmetriájáról tudottakat /ld. pl. Montal, 1976/. A lipidmembrán két rétegének állapota /első közelítésben a térkitöltés mértékéből fakadóan/ korántsem azonos. A külső réteg expandált állapotával szemben a belső kondenzált, rendezett fázisként viselkedik. Különböző /elsősorban töltött/ lipidek, pl. foszfatidilglicerol szignifikánsan aszimmetrikus eloszlást mutatnak a "külső réteg javára". Így érthető, hogy pl. a transzpeptidáz hidrofób farka könnyebben tudja penetrálni a külső, kevésbé kompakt réteget. Azt azonban mindenképpen meg kell jegyezni, hogy a jelenség csupán ezzel nem magyarázható, különösen akkor nem, ha figyelembe vesszük, hogy ilyen nagy /100 nm/ méretek esetén a görbületi sugár növekedése miatt a lipid kettősréteg aszimmetriája erősen lecsökkent.

A hidrofíli rész elhelyezkedésének tisztázása után tekintsük át a hidrofób rész elhelyezkedéséről eddig tudottakat. Az integráns beépülést igazoló kísérletekből következik, hogy az enzimnek ez a része valamilyen módon beágyazódik a lipid kettősrétegbe.

A beágyazódás mélységének eldöntésére az egyik igen alkalmas módszer a fagyasztva-tördeléssel kapott belső /illetve külső/ membránfelszín elektronmikroszkopos vizsgálata. A liposzómákat folyékony nitrogénben lefagyasztva és "eltörve" a lipid kettősréteg a közepén kettéválk és két filmszerű lipidrétetre esik szét. A kettősréteg mindkét felén keresztülhaladó fehérjerészek mint kidudorodások /konkáv, külső felszínnek/, illetve mint bemélyedések /konvex, belső felszínnek/ látszanak.



22. ábra: az enzim-liposzóma komplex fagyasztva-tördeléses elektronmikroszkópos képe / nagyítás 85000-szeres, az ábrázolt szakasz hossza 100 nm-nek felel meg/

A 22. ábrán mutatom be a γ -GT liposzóma komplex fagyasztva-tördeléses eljárással készített elektronmikroszkópos felvételét. A kísérlet során az enzim/lipid arány 25 ug : 1 mg volt, ami a Sepharose 4B gélszűrési tanulsága szerint a beépült enzim mennyiségét tekintve kb. 20 enzim molekulának felelt meg liposzómánként.

A felvételtől kitűnik, hogy még ilyen nagy liposzómabeli enzimkoncentráció mellett sem láthatunk semmiféle "dudorokat", illetve bemélyedéseket a liposzómák külső, ill. belső rétegén. Ez a kísérleti tény eléggé valószínűvé teszi, hogy a γ -GT hidrofób része csak az egyik lipidrétet penetrálja. Így az enzim aminosavakat transzportáló sajátja még az eddigieknél is kétségesebbé válik.

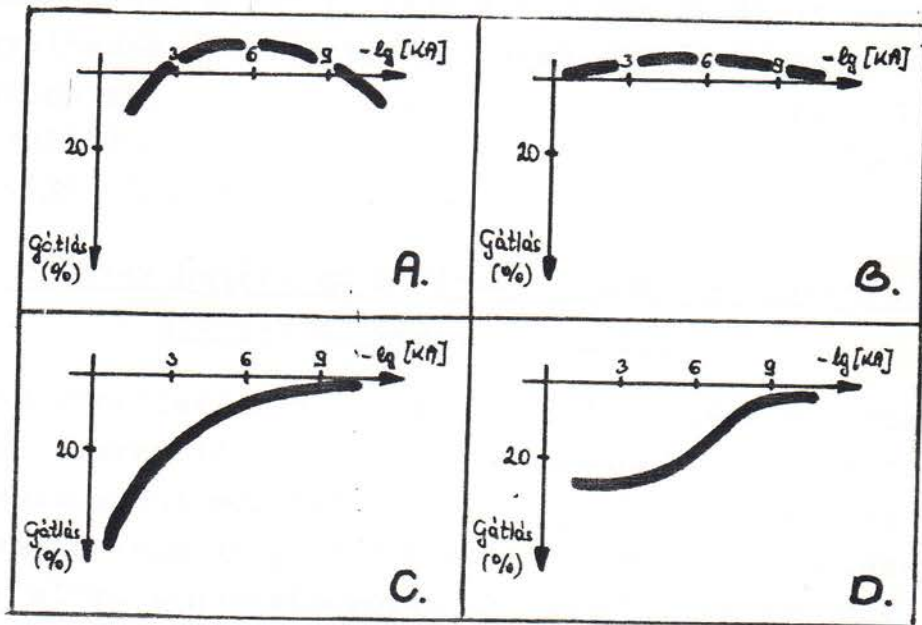
5.5. A kainsav hatása a γ -glutamil transzpeptidázra, az enzim lehetséges szerepe az agyban

A γ -glutamil transzpeptidáz az agyban a 2.2.3. fejezetben leírtak alapján leginkább az agykapillárisok vér-agygátat képező epitheliumában fordul elő. Ugyanakkor néhány újabb közlemény /pl. Shirre és Haber, 1981/ az idegsejtekben megtalálható /igaz, eléggé kismértékű/ γ -GT aktivitásról is beszámol. Ezek az észlelések és az a De Bault által bizonyított tény, hogy a glia sejtek nélkülözhetetlenek az agykapillárisok endothel sejtjeire jellemző transzpeptidáz aktivitás kifejlődéséhez /De Bault és Cancilla, 1980; De Bault, 1981/ elképzelhetővé teszik, hogy a γ -GT szerepet játszik az agybeli ingerületáttevődésben.

Ennek a kérdésnek a tanulmányozására vizsgáltam a glutaminsav-alapú ingerületátvitelre köztudomásúan nagy hatást gyakorló /ld. 2.3. fejezet/ kainsav hatását a γ -glutamil transzpeptidázra.

A kainsav hatása különböző koncentrációkban

A 4.2.7. fejezet szerint elvégzett kísérletek során a 23. ábrán látható négy görbetípust kaptam. Mind a négy különböző esetben a ~~különböző~~ ionok $/\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}/$ hiányában, illetve jelenlétében kapott "gátlási" görbék lefutása az ábrákon bemutatotthoz rendkívül hasonló volt, a görbék egymástól szignifikánsan nem különböztek.



23. ábra: a kainsav hatásának koncentrációfüggése akceptor hiányában, ill. jelenlétében

/A.: patkányvese γ -GT, GlyGly mentes közeg, 150 mM Na^+ ; B.: patkányagy γ -GT, GlyGly mentes közeg, 150 mM Na^+ ; C.: patkányvese γ -GT, 50 mM GlyGly, 150 mM Na^+ ; D.: patkányagy γ -GT, 50 mM GlyGly, 150 mM Na^+ ; $[\text{KA}]$ = kainsavkoncentráció/

A görbék alakjából kitűnik, hogy a kainsav mind a veséből, mind az agyból izolált enzim esetén akceptor hiányában /A. és B./ számottevő hatást nem

mutat. Akceptor jelenlétében /C. és D./ egy, a koncentrációnövekedéssel párhuzamosan erősödő, maximálisan 20-30 %-os gátlás jelentkezik, amely jól magyarázható a kainsavnak /mint rigid szerkezetéből következően a GlyGly-nél feltételezhetően sokkal rosszabb akceptornak/ a GlyGly-t kiszorító hatásával.

Az a tény, hogy a különböző egy- és kétértékű kationok nem befolyásolják a görbék lefutását ellentmond a 2.3.4. fejezetben már említett megfigyelésnek /Constanti és Nistri, 1976; Walker, 1976; Johnston, 1979; Baudry, 1979/, hogy a kainsav Na^+ jelenlétében a glutaminsav felvételt sokkal inkább gátolja mint az ion hiányában.

A kainsav hatása az optimum alatti /összemérhető/
akceptorkoncentrációk esetén

A kísérleti eredményeket a XI. táblázatban foglaltam össze /ld. 90. old./. Látható, hogy a kapott értékek sehol sem térnek el szignifikánsan a nullától, azaz a kainsav glutaminsav, illetve glutamin esetén az előző kísérletsorozat akceptormentes esetéhez hasonlóan semmiféle gátló hatással nem rendelkezik.

A kainsav hatása az optimum alatti donorkoncentrációk
esetén, a $\bar{V}$ -glutamil-p-nitroanilid látszólagos k_M ér-
tékének meghatározása

A Lineweaver-Burk ábrázolással kapott egyenesek lineáris regresszióval számolt adatait a XII. táblázatban /ld. 91. old./ tüntettem fel.

A táblázat adataiból kitűnik, hogy az enzimreakció maximális sebessége a különböző esetekben közel azonos. A glutaminsav aktiváló hatása a vese és agyenzimnél egyaránt megfigyelhető, ugyanakkor a kainsav-

XI. táblázat: 0.1 mM kainsav különböző akceptorkoncentrációk melletti %-os aktiváló hatása

Koncentrációk /mM/	patkányvese γ -GT		patkányagy γ -GT		veslip.		brushb.		agylip.		szinapt.	
	Glu	Gln	Glu	Gln	Glu	Gln	Glu	Gln	Glu	Gln	Glu	Gln
0	$+2.8 \pm 0.6$		-2.4 ± 3.1		-1.7		0		$+1.3$		0	
0.1	-6.7 ± 8.3	$+5.8 \pm 10.0$	$+0.2 \pm 4.9$	-3.3 ± 4.3	-2.9	-1.2	$+1.7$	$+3.5$	-8.1	-3.8	0	0
5	-5.8 ± 1.4	$+2.3 \pm 7.4$	-0.9 ± 3.8	-3.0 ± 6.0	0	0	0	-0.7	-4.4	0	0	0
50	$+2.0 \pm 10.9$	$+1.9 \pm 12.0$	-0.3 ± 7.2	-0.2 ± 8.5	$+1.9$	$+3.0$	-1.2	-1.0	0	0	0	-1.9

/Az adatok három kísérlet átlagai 95 %-os konfidenciaszintű eltérésekkel./

/Rövidítések: veslip. = tojáslecitin liposzómába épített patkányvese γ -GT; brushb. = kefeszegélymembrán-vezikula; agylip. = tojáslecitin liposzómába épített patkányagy γ -GT; szinapt. = patkányagy szinaptoszóma/

XII. táblázat: α -glutamil-p-nitroaniliddel mutatott maximális reakciósebesség és látszólagos k_M különböző enzimfajták, akceptor- és kainsavkoncentrációk esetén

sor- szám	Minta			V_{max} / $\mu M \cdot min^{-1}$	k_M / mM	korre- láció
	enzimfajta	Glu/ mM	[KA]/ mM			
1.	patkányvese γ -GT	0	0	0.364	1.04	0.719
2.		0	50	0.551	1.40	0.966
3.		0	500	0.388	0.68	0.745
4.		0.1	0	0.530	1.01	0.787
5.		0.1	50	0.440	0.54	0.991
6.		0.1	500	0.478	1.07	0.899
7.		25	0	0.508	0.27	0.973
8.		25	50	0.511	0.16	0.952
9.		25	500	0.480	0.12	0.782
10.	patkányagy γ -GT	0	0	0.550	0.49	0.910
11.		0	50	0.450	0.33	0.831
12.		0	500	0.510	0.54	0.916
13.		0.1	0	0.546	1.03	0.940
14.		0.1	50	0.669	0.99	0.963
15.		0.1	500	0.535	0.63	0.943
16.		25	0	0.736	0.28	0.963
17.		25	50	0.658	0.18	0.897
18.		25	500	0.667	0.20	0.952
19.	veslip.	0.1	0	0.547	0.79	0.989
20.		0.1	50	0.510	0.74	0.974
21.		0.1	500	0.558	0.90	0.984
22.	brushb.	0.1	0	0.553	1.04	0.997
23.		0.1	50	0.539	0.96	0.992
24.		0.1	500	0.455	0.76	0.978
25.	agylip.	0.1	0	0.510	0.83	0.938
26.		0.1	50	0.578	1.02	0.971
27.		0.1	500	0.545	0.83	0.982

folytatást ld. 92. old.

XII. táblázat: folytatás

sor- szám	Minta			$V_{\max}$ / $\mu\text{M}/\text{min}/$	k_M / $\text{mM}/$	korre- láció
	enzimfajta	Glut/ $\text{mM}/$	[KA]/ $\mu\text{M}/$			
28.	szinaptosz.	0.1	0	0.444	0.86	0.965
29.		0.1	50	0.424	0.78	0.931
30.		0.1	500	0.359	0.31	0.761

Megjegyzések: a rövidítések megegyeznek a XI. táblázatban használtakkal; [KA] = kainsavkoncentráció; a $V_{\max}$ értékei egységnyi aktivitású enzimre vonatkoztatottak.

koncentráció változtatása semmilyen számottevő hatást nem okoz. Mindez összhangban van az optimum alatti akzeptorkoncentrációk alkalmazása esetén kapott kísérleti eredményekkel.

A látszólagos Michaelis állandók egybevetése során megállapítható, hogy a kainsav az esetek felében /7.-9.; 13.-15.; 16.-18.; 22.-24.; 28.-30. számú minták/ kompetitív aktivátorként viselkedik, a k_M csökkentő hatása azonban maximálisan 50 % körüli.

Mindezen kísérleti eredmények alapján nagymértékben valószínűsíthető, hogy a γ -glutamil transzpeptidáz nem játszik számottevő szerepet az agybeli glutaminsav-alapú ingerületátvitelben, hiszen amennyiben így lenne /tehát pl. a γ -GT a szinaptikus részbe jutott glutaminsav kis, vagy nagy affinitású felvételéért volna felelős/ a kainsavnak számottevően gátolnia kellene az enzim működését, és a kapott gátlásnak Na^+ ionok jelenlétében növekedni kellene.

5.6. A munka további irányai

Az izolált γ -GT jellemzését teljesebbé tehetné az aggregatív sajátságának részletesebb vizsgálata. Így fényt lehetne talán deríteni az enzim egy- és kétértékű kationokkal történő aktiválhatóságának természetére is.

A spontán beépülés tényének ismeretében érdemes lenne megvizsgálni, hogy az enzim képes-e külső behatás nélkül membránváltoztatásra.

Az enzim membránbeli elhelyezkedésének részletesebb tanulmányozását biofizikai módszerekkel /elektronspinrezonancia-spektroszkópia, DSC vizsgálatok, stb./ folytatjuk. Ugyanabba a liposzómába beépített több γ -GT laterális elhelyezkedésének tisztázására is tervezünk kísérleteket.

Mindezen vizsgálataink hozzájárulhatnak a membrán-enzimek membránbeépüléséről, membránbeli elhelyezkedéséről és a fehérje-lipid kölcsönhatásokról alkotott képünk bővítéséhez.

A kainsavas kísérletek befejezéseként néhány szerkezeti analóg hasonló vizsgálatát tervezem a kérdés megnyugtató lezárásához.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során patkányveséből izolált γ -glutamil transz-peptidáz liposzómába való beépülését vizsgáltam. Az en-zim beépítését egy - az irodalomban eddig le nem irt - új módszer kipróbálásával végeztem el.

Az integráns beépülés tényét négy módszerrel bizonyi-tottam: együttmozgás Sepharose 4B gélen, töréspont az enzim Arrhenius diagramjában a membrán fázisátalakulási pontjának megfelelő helyen, az enzim-vezikula komplex stabilitása még nagy ionerősség esetén is, a komplex ten-ziddel történő fokozatos megbontásakor a liposzómák deg-radációjának és a kötött enzimaktivitásnak párhuzamos változása.

Munkám jelenlegi fázisában a γ -glutamil transzpepti-dáz liposzómákba való beépülésének alapvető jellemzését végeztem el. Így többek között megvizsgáltam a kísérle-ti körülmények / Mg^{2+} , TRITON X-100 ill. szubsztrátkon-centráció / változtatásának a beépülés mértékére gyako-rolt hatását.

Néhány új információval szolgáltam az enzim aggrega-tív sajátosságának jobb megismeréséhez. Eredményeim sze-rint a keletkezett enzim-liposzóma komplex igen stabil: a huzamosabb ideig tárolt liposzómákban is a teljes en-zimaktivitás kötötten marad.

Külön figyelmet érdemel az enzim spontán beépülésre való hajlama. E folyamat leginkább a membrán fázisátalakulási pontján játszódik le. A spontán beépülést felhasználva lehetőség nyílik a beépítés egy új, igen kiméletes módjának kifejlesztésére.

Kísérleteim alapján egy hozzávetőleges képet alkothatunk az enzim elhelyezkedéséről a liposzómákban. Eredményeim szerint a transzpeptidáz aktív centrumával 95 %-ban kifelé orientált, hidrofób része feltehetőleg csak a membrán külső rétegét penetrálja. E megfigyelések az ^{Enzim}aminosavtranszportban játszott szerepét elég valószínűtlenné teszik.

A kainsav, az agybeli glutaminsav-alapú ingerületátvitel hatékony befolyásolószere a γ -glutamil transzpeptidázra lényegében semmilyen hatást nem gyakorol. Ez a tény eléggé kizárja a transzpeptidáz részvételét az ingerületátvivő folyamatokban.

Budapest, 1983. február

IRODALOMJEGYZÉK:

1. Ahrens, M-L. /1981/: Electrostatic control by lipids upon the membrane bound $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ase}$. Biochim. Biophys. Acta 642, 252-266.
2. Allen, Th.M., Romans, A.Y., Kercet, H., Segrest, J.P. /1980/: Detergent removal during membrane re-constitution. Biochim. Biophys. Acta 601, 328-342.
3. Allison, R.D., Meister, A. /1981/: Evidence, that transpeptidation is a significant function of γ -glutamyl transpeptidase. J.Biol. Chem. 256, 2988-2992.
4. Anderson, M.E., Allison, R.D., Meister, A. /1982/: Interconversion of leukotrienes catalised by purified γ -glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D4 and γ -glutamyl amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1088-1091.
5. Anderson, M.E., Bridges, R.J., Meister, A. /1980/: Direct evidence for inter-organ transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism of glutathione utilization involves γ -glutamyl transpeptidase. Biochim. Biophys. Res. Commun. 96, 848-853.
6. Balcar, V.J., Johnston, G.A.R. /1972/: The structural specificity of the high affinity uptake of L-Glu and L-Asp ba rat brain slices. J. Neurochem. 23, 2657-2666.
7. Bangham, A.D. /1972/: Lipid bilayers and biomembranes. Ann. Rev. Biochem. 41, 753-776.

8. Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C. /1965/: Diffusion of univalent cations across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238-252.
9. Báthori, Gy., Holly, S., Grandics, P., Náray, A. /1981/: Szerkezet és funkció vizsgálatok lipid vezikulákon. *MTA Biol. Oszt. Közl.* 24, 187-194.
10. Batzri, S., Korn, E.D. /1973/: Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 1015-1019.
11. Baudry, M. /1979/: Two glutamate binding sites in rat hippocampal membranes. *Eur.J. Pharmacol.* 57, 283-285.
12. Baudry, M., Lynch, G. /1979/: Glutamate binding sites in rat CNS. *Eur.J. Pharmacol.* 57, 104-109.
13. Binkley, F. /1951/: Metabolism of glutathione. *Nature* 167, 888-889.
14. Binkley, F. /1961/: Purification and properties of renal glutathionase. *J. Biol. Chem.* 236, 1075-82.
- 15. Binkley, F., Wiesemann, M.L. /1975/: Glutathione and γ -glutamyl transpeptidase in secretory processes. *Life Sci.* 17, 1359-62.
- 16. Binkley, F., Wiesemann, M.L., Groth, P., Powell, R.W. /1975/: γ -glutamyl transpeptidase: a secretory enzyme. *FEBS Letters* 51, 168-170.
17. Biziere, K., Coyle, J.T. /1978/: Effect of kainic acid on ion distribution and ATP levels of striatal slices incubated in vitro. *J. Neurochem.* 31, 513-520.
18. Blobel, G., Dobberstein, B. /1975/: Transfer of proteins across membranes I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosome of murine myeloma. *J. Cell. Biol.* 67, 835-851.

19. Blobel, G., Sabatini, D.D. /1971/: Ribosome-membrane interaction in eukariotic cells. In Biomembranes, L.A. Mansen Ed. Plenum Publishing Corporation. N.Y. 2, 193-195.
20. Booth, A.G., Kenny, A.J. /1974/: A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney. Biochem. J. 142, 575-581.
21. Bregar, F.W., Hughey, R.P., Curthroys, N.P. /1980/: Rat renal γ -glutamyl transpeptidase activity: a reaction of glutamine-synthetase. J. Can. Biochem. 59, 54-59.
22. Cavallheiro, E.A., Riche, D.A., de Gal La Salle, G. /1982/: Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. Electroencephalography and Clin. Neurophysiol. 53, 581-589.
23. Constanti, A., Nistri, A. /1976/: A comparative study of the effects of glutamate and kainate on the lobster muscle fibre and the frog spinal cord. Br. J. Pharmacol. 57, 359-368.
24. Coyle, J.T. /1978/: Neuronal mapping with kainic acid. Trends in Neurosci. 1, 132-135.
25. Csermely, P., Müllner, N., Báthori, Gy., Varga, V., Somogyi, J. /1982/: γ -glutamyl transzpeptidáz beépítése liposzómákba. MTA Biol. Oszt. Közl. 25, 79-92.
26. Curtis, D.R., Watkins, J.C. /1963/: Acidic amino acids with strong excitatory actions of mammalian neurones. J. Physiol. Lond. 166, 1-14.
27. Dakin, D.H., Dudley, H.W. /1913/: Glyoxalase, part III. The distribution of the enzyme and its relation to the pancreas. J. Biol. Chem. 15, 463-474.
28. Danner, J., Cobb, M.H., Heagy, W., Lenhoff, H.M.,

Marshall, G.R. /1978/: Interaction of glutathione analogues with hydra attenuata γ -glutamyl transpeptidase. *Biochem. J.* 175, 547-553.

29. Davies, J., Evans, R.H., Francis, A.A., Watkins, J.C. /1979/: Excitatory amino acid receptors and synaptic excitation in the mammalian central nervous system. *J. Physiol. /Paris/* 75, 641-644.
30. Davies, J., Watkins, J.C. /1981/: Excitatory amino acid receptors and their role in synaptic excitation in the dorsal horn of the mammalian spinal cord. In: *Neurotransmitters, seizures and epilepsy*. Ed.: P.L. Morselli. Raven Press N.Y. pp 141-149.
31. DeBault, L.E. /1981/: γ -glutamyl transpeptidase induction-mediated by glial foot process to endothelium contact in co-culture. *Brain. Res.* 220, 432-435.
32. DeBault, L.E., Cancilla, P.A. /1980/: γ -glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science* 207, 653-655.
33. Depierre, J.W., Dallner, G. /1975/: Structural aspects of the membrane of the endoplasmatic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 411-472.
34. De Robertis, E., Fiszer de Plazas, S. /1976/: Isolation of hydrophobic protein binding amino acids. Selectivity of the binding of L- 14 C-Glu in cerebral cortex. *J. Neurochem.* 26, 1237-1243.
35. Ding, J.L., Smith, G.D., Searle, A., Peters, T.J. /1982/: In situ determination of the molecular weight of hepatic γ -glutamyl transpeptidase and γ -glutamine hydrolase activities. *Biochim. Biophys. Acta* 707, 164-166.
36. Echeteu, Z.O., Moss, D.W. /1982/a/: Multiple forms of human γ -glutamyl transpeptidase I. Preparation

and characterisation of different molecular weight fractions. *Enzyme* 27, 1-8.

37. Echeteu, Z.O., Moss, D.W. /1982/b/: Multiple forms of human γ -glutamyl transpeptidase II. Modification and possible structures of different molecular weight fractions. *Enzyme* 27, 9-18.
38. Elce, J.S. /1980/: Active-site amino acid residues in γ -glutamyl transpeptidase and the nature of the γ -glutamyl-enzyme bound. *Biochem. J.* 185, 473-481.
39. Elce, J.S., Broxmeyer, B. /1976/: γ -glutamyl transpeptidase of rat kidney. *Biochem. J.* 153, 223-232.
40. Elce, J.S., Bryson, J., McGirr, L.G. /1974/: γ -glutamyl transpeptidase of rat kidney, some properties and kinetic konstants. *Can. J. Biochem.* 52, 33-41.
41. Eletr, S., Zakim, D., Vessey, D.A. /1973/: A spin-label study of the role of phospholipids in the regulation of membrane-bound microsomal enzymes. *J. Mol. Biol.* 78, 351-362.
42. Ferkany, J.W., Zaczek, R., Coyle, J.T. /1982/: Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature* 298, 757-759.
43. Foster, A.C., Roberts, P.J. /1978/: High affinity L- 3 H-Glu binding to postsynaptic receptor sites on rat cerebellar system. *J. Neurochem.* 31, 1467-1477.
44. Friedle, N.M., Kelly, P.H., Moore, K.E. /1978/: Regional brain atrophy and reductions in glutamate release and uptake after intrastriatal kainic acid. *Br. J. Pharmacol.* 63, 151-158.
45. Frielle, T., Curthroys, N.P. /1982/: Characterisation of the amphipatic structure of γ -glutamyl transpeptidase. *Biophys. Journ.* 37, 193-195.

46. Fu, Y.C., Laughlin, R.G. /1980/: Distearoil phosphatidyl-choline/ammoniohexanoate surfactant interactions. *Chem. Phys. Lipids.* 26, 121-139.
47. Gardell, S.J., Tate, S.S., /1979/: Latent proteinase activity of γ -glutamyl transpeptidase light subunit. *J. Biol. Chem.* 254, 4942-4945.
48. Gardell, S.J., Tate, S.S. /1980/: Affinity labeling of γ -glutamyl transpeptidase by glutamine antagonists. *FEBS Letters* 122, 171-174.
49. Gardell, S.J., Tate, S.S. /1981/: Subunit interactions in γ -glutamyl transpeptidase /Reconstitution of the active species from isolated subunits/. *J. Biol. Chem.* 256, 4799-4804.
50. Garnier, J., Gaye, P., Marcier, J.C., Robson, B. /1980/: Structural properties of signal peptides and their membrane insertion. *Biochimie* 62, 231-239.
51. Gennis, R.B., Jonas, A. /1977/: Protein-lipid interactions. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 6, 195-249.
52. Goldberg, J.A., Friedman, O.M., Pineda, E.P., Smith, E.E., Chatterji, R., Stein, E.H., Rutenburg, A.M. /1960/: The colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase with a sythetic substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 91, 61-70.
53. Griffith, O.W., Bridges, R.J., Meister, A. /1979/: Transport of γ -glutamyl amino acids: role of glutathione and γ -glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6319-6322.
54. Griffith, O.W., Bridges, R.J., Meister, A. /1981/: Formation of γ -glutamyl-cysteine in vivo is catalised by γ -glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2777-2778.
55. Griffith, O.W., Meister, A. /1979/: Translocation of intracellular glutathione to membrane bound γ -glutamyl transpeptidase as a discrete step in the

γ -glutamyl cycle. Glutathione urea after inhibition of γ -glutamyl transpeptidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 268-272.

56. Griffith, O.W., Meister, A. /1980/: Excretion of Cysteine and γ -glutamyl moieties in human and experimental animal γ -glutamyl transpeptidase deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3384-88.
57. Griffith, O.W., Novgorodsky, A., Meister, A. /1979/: Translocation of glutathione from lymphoid cells that have markedly different γ -glutamyl transpeptidase activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2249-2252.
58. Griffith, O.W., Tate, S.S. /1980/: The apparent glutathione oxidase activity of γ -glutamyl transpeptidase. Chemical mechanism. J. Biol. Chem. 255, 5011-5014.
59. Guldin, W.C., Markowitch, H.J. /1982/: Epidural kainate but not ibotenate produces lesions in local and distant regions of the brain. A comparison of the intracerebral actions of kainic acid and ibotenic acid. J. Neurosci. Meth. 5, 83-93.
60. Hajós, F. /1975/: An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. Brain. Res. 93, 485-489.
61. Haleouya, S., Inouye, M. /1979/: Translocation and assembly of outer membrane proteins of Escherichia Coli. J. Mol. Biol. 130, 39-61.
62. Hamberger, A.C., Chiang, G.H., Nylén, E.S., Scheff, S.W., Cotman, C.W. /1979/a/: Glutamate as a CNS transmitter I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. Brain Res. 168, 513-530.
63. Hamberger, A.C., Chiang, G.H., Sandoval, E., Cotman, C.W. /1979/b/: Glutamate as a CNS transmitter II.

Regulation of synthesis in the releasable pool.
Brain Res. 168, 531-541.

64. Hanes, C.S., Hird, F.J.R., Isherwood, F.A. /1950/:
Synthesis of peptides in enzymic reactions involving
glutathione. Nature 166, 288-292.
65. Hanes, C.S., Hird, F.J.R., Isherwood, F.A. /1952/:
Enzymic transpeptidation reactions involving
 γ -glutamyl peptides and α -amino acid peptides.
Biochem. J. 51, 25-35.
66. Heinle, H., Wendel, A. /1977/: The activities of
the key enzymes of the γ -glutamyl cycle in micro-
dissected segments of the rat nephron. FEBS Letters
73, 220-224.
67. Heinrich, P.C. /1982/: Proteolytic processing of
polypeptides during the biosynthesis of subcellular
structures. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 93,
116-187.
68. Helenius, A., Simons, K. /1975/: Solubilisation of
membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta
415, 29-79.
69. Holloway, P.W., Markello, T.C., Leto, T.L. /1982/:
The interaction of cytochrom b₅ with lipid vesicles.
Biophys. J. 37, 63-64.
70. Honoré, T., Krogsgaard-Larsen, P., Hansen, J.J.,
Lauridsen, J. /1981/: Glutamate and aspartate
agonists structurally related to ibotenic acid.
Mol. and Cell. Biochem. 98, 123-128.
71. Horiuchi, S., Inoue, M., Morino, Y. /1978/: Evidence
for the presence of a latent active site in the
large subunit of rat kidney γ -glutamyl transpeptidase.
Biochim. Biophys. Res. Commun. 80, 873-878.
72. Huang, C. /1969/: Studies on phosphatidylcholine
vesicles. Formation and physical characteristics.
Biochemistry, 8, 344-351.

73. Hughey, R.P., Coyle, P.J., Curthroys, N.P. /1979/: Comparision of the association and orientation of γ -glutamyl transpeptidase in lecithin vesicles and in native membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 1124-1128.
74. Hughey, R.P., Curthroys, N.P. /1976/: Comparision of the size and physical properties of γ -glutamyl transpeptidase from rat kidney following solubilization with papain or with TRITON X-100. *J. Biol. Chem.* 251, 7863-7870.
75. Huseby, N.E. /1978/: Multiple forms of γ -glutamyl transpeptidase in normal human liver, bile and serum. *Biochim. Biophys. Acta* 522, 354-362.
76. Huseby, N.E. /1982/a/: Multiple forms of serum γ -glutamyl transpeptidase. Association of the enzyme with lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 124, 103-112.
77. Huseby, N.E. /1982/b/: Hydrophobic form of γ -glutamyl transpeptidase. Proteolytic formation in liver homogenates and its estimation in serum. *Clin. Chim. Acta* 124, 113-121.
78. Indirani, N., Hel, R.G. /1977/: Partial purification and some properties of γ -glutamyl transpeptidase from human bile. *Biochim. Biophys. Acta* 483, 57-62.
79. Inoue, M., Horiuchi, S., Morino, Y. /1977/a/: γ -glutamyl transpeptidase in rat ascites tumor cells. Non involvement in amino acid transport. *Eur. J. Biochem.* 78, 609-615.
80. Inoue, M., Horiuchi, S., Morino, Y. /1977/b/: Affinity labeling of γ -glutamyl transpeptidase of tumor cell AH-130 and transport activity of glutathione and amino acids. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 79, 1104-1110.
81. Iwami, K., Fushiki, T., Yamamoto, K., Iwai, K. /1981/: Glutathione oxidase from bovine skim milk membranes: its co-purification with γ -glutamyl

- transpeptidase. Agric. Biol. Chem. 45, 307-308.
82. Johnston, G.A.R., Lennedy, S.M.E., Twitchin, B. /1979/: Action of the neurotoxin, kainic acid on high affinity uptake of L-Glu in rat brain slices. J. Neurochem. 32, 121-127.
83. Kasahara, M., Hinkle, P.C. /1977/: Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from the Human Erythrocytes. J. Biol. Chem. 252, 7384-7390.
84. Kremer, J.M.H., Esker, M.W.J., v.d. Pathmanoharan, U., Wiersema, P.H. /1977/: Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. Biochemistry 16, 3932-3935.
85. Krespan, B., Berl, S., Nicklas, W.J. /1982/: Alteration in neuronal-glial metabolism of glutamate by the neurotoxin kainic acid. J. Neurochem. 38, 509-518.
86. Laksmanan, J., Padmanaban, G. /1974/: Effect of some "strong" excitants of central neurones on the uptake of L-Glu and L-Asp by synaptosomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 690-698.
87. London, E.D., Coyle, J.T. /1979/: Cooperative interactions at ^3H -kainic acid binding sites in rat and human cerebellum. Eur. J. Pharmacology 56, 287-290.
88. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fass, A.L., Randall, R.J. /1951/: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
89. Magnan, S.D.J., Shimota, F.N., Nagasawa, H.T. /1982/: Drug latentiation by γ -glutamyl transpeptidase. J. of Medicinal Chem. 25, 1018-1021.
90. Mamelok, R.D., Groth, D.F., Prusiner, S.B. /1980/: Separation of membrane bound γ -glutamyl transpeptidase from brush border transport and enzyme activities.

Biochemistry 19, 2367-2373.

91. Marathe, G.V., Damle, N.S., Hashemeyer, R.H., Tate, S.S. /1980/: Localisation of γ -glutamyl transpeptidase in lymphoid cells. FEBS Letters 115, 273-278.
92. Marathe, G.V., Nash, B., Hashemeyer, R.H., Tate, S.S. /1979/: Ultrastructural localisation of γ -glutamyl transpeptidase in rat kidney and jejunum. FEBS Letters 107, 436-440.
93. Mason, S.T., Fibiger, H.C. /1979/: On the specificity of kainic acid. Science 204, 1339-1341.
94. Matsuda, Y., Tsuji, A., Katunuma, W /1980/a/: Studies on the structure of γ -glutamyl transpeptidase I. Correlation between sialylation and isoenzyme forms. J. Biochem. 87, 1243-1248.
95. Matsuda, Y., Tsuji, A., Katunuma, W /1980/b/: Studies on the structure of γ -glutamyl transpeptidase II. Localisation of the segment anchoring γ -glutamyl transpeptidase to the membrane. J. Biochem. 87, 1567-1571.
96. Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E. /1978/: Modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87, 206-210.
97. McGeer, E.G., McGeer, P.L., Singh, K. /1978/: Kainate induced degeneration of neostriatal neurons: dependency upon corticostriatal tract. Brain Res. 139, 381-383.
98. McIntyre, Th., Curthroys, N.P. /1979/: Comparison of the hydrolytic and transfer activities of rat renal γ -glutamyl transpeptidase. J. Biol. Chem. 254, 6499-6504.
99. McLennan, H. /1980/: The effect of decortication of the excitatory amino acid sensitivity of striatal neurons. Neurosci. Letters 18, 313-316.

100. McMurchie, E.J., Raison, J.K. /1979/: Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane associated enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 554, 364-374.
101. Meister, A. /1973/: On the enzymology of amino acid transport. *Science* 180, 33-39.
102. Meister, A. Tate, S.S. /1976/: Glutathione and related γ -glutamyl compounds, biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.* 45, 560-604.
103. Meyer, D.J., Krause, E., Dobberstein B. /1982/: Secretory protein translocation across membranes -- the role of the "docking protein". *Nature* 297, 647-650.
104. Michaelis, E.K. /1975/: Partial purification and characterisation of a glutamate-binding membrane glycoprotein from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 1004-1012.
105. Michaelis, E.K., Michaelis, M.L., Boyarsky, L.L. /1974/: High affinity glutamate binding to brain synaptic membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 367, 338-348.
106. Michaelis, E.K., Michaelis, M.L., Grabbs, R.D. /1980/: Distinguishing characteristics between glutamic acid and kainic acid binding sites in brain synaptic membranes. *FEBS Letters* 118, 55-57.
107. Miller, S.P., Awasthi, Y.C., Srivastava, S.K. /1976/: Studies of human kidney γ -glutamyl transpeptidase. *J. Biol. Chem.* 251, 2271-2278.
108. Milnerowitz, H., Prusak, E., Siewinski, M., Ziomek, E., Kustrzeba-Wojcicka, J., Szewczuk, A. /1981/: Molecular forms of bovine γ -glutamyl transpeptidase and their enzyme immunoassay. *Arch. Immunologie et Therap. Exper.* 29, 543-549.

109. Minchin, M.C.W. /1977/: The release of amino acids synthesised from various compartmented precursors in rat spinal cord slices. *Exp. Brain Res.* 29, 515-526.
110. Montal, M. /1976/: Experimental membranes and mechanisms of bioenergy transductions. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 5, 119-175.
111. Montigny, D. de, Tardif, D. /1981/: Differential excitatory effects of kainic acid on CA₃ and CA₁ hippocampal pyramidal neurones: further evidence for the excitotoxic hypothesis and for receptor mediated action. *Life Sci.* 29, 2103-2111.
112. Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.Ti., Wescott, W.C. /1962/: Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* 194, 979-980.
113. Nadler, J.V. /1981/: Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci.* 29, 2031-2042.
114. Nadler, J.V., Cuthbertson, G.J. /1980/: Kainic acid neurotoxicity toward hippocampal formation: dependence upon specific excitatory pathways. *Brain Res.* 195, 47-56.
115. Nash, B., Tate, S.S. /1982/: Biosynthesis of rat renal γ -glutamyl transpeptidase. *J. Biol. Chem.* 257, 585-588.
116. Neumann, H., Habermann, E. /1954/: Über die Phospholipase-A des Bienengiftes. *Hoppe-Schleiers Zeitschr. für Physiol.-Chem.* 296, 166-179.
117. Nicklas, W.J., Krespan, B., Berl, S. /1980/: Effect of kainate on ATP levels and glutamate metabolism in cerebellar slices. *Eur. J. Pharmacology* 62, 209-213.

118. Nicklas, W.J., Nunez, R., Berl, S., Duvoisin, R. /1979/a/: Neuronal-glial contributions to transmitter amino acid metabolism: studies with kainic acid-induced lesions of rat striatum. *J. Neurochem.* 33, 839-844.
119. Nicklas, W.J., Nunez, R., Berl, S., Duvoisin, R. /1979/b/: Amino acids in rat neostriatum: alteration by kainic acid lesion. *Brain Res.* 167, 107-117.
120. Novgorodsky, A., Tate, S.S., Meister, A. /1976/: γ -glutamyl transpeptidase a lymphoid cell surface marker: relationship to blastogenesis, differentiation and neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2414-2418.
121. Okonkwo, O., Orłowski, M., Green, J.P. /1974/: Enzymes of the γ -glutamyl cycle in the choroid plexus and brain. *J. Neurochem.* 22, 1053-1058.
122. Orłowski, M. /1976/: Possible role of glutathione in transport processes; in *Glutathione: metabolism and function* /Ed.: J.M. Arias, W.B. Jacoby/ Raven Press N.Y. pp. 13-28.
123. Orłowski, M., Meister, A. /1963/: γ -glutamyl-p-nitroanilide a new convenient substrate for determination and study of L- and D- γ -glutamyl transpeptidase activities. *Biochim. Biophys. Acta* 73, 679-681.
124. Orłowski, M., Meister, A. /1965/: γ -glutamyl transpeptidase isolation from hog kidney. *J. Biol. Chem.* 240, 338-347.
125. Orłowski, M., Meister, A. /1970/: The γ -glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1248-1255.
126. Orłowski, M., Okonkwo, P.O., Green, J.P. /1973/: Activation of γ -glutamyl transpeptidase by monovalent cations. *FEBS Letters* 31, 237-240.

127. Orlowski, M., Sessa, G., Green, J.P. /1974/: γ -glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood brain barrier for amino acids. *Science* 184, 66-68.
128. Orlowski, M., Wilk, S. /1975/: Intermediates of γ -glutamyl cycle in mouse tissues. *Eur. J. Biochem.* 53, 581-590.
129. Orlowski, M., Wilk, S. /1976/: Metabolism of γ -glutamyl amino acids and peptides in mouse liver and kidney "in vivo". *Eur. J. biochem.* 71, 549-555.
130. Pagano, R.E., Weinstein, J.N. /1978/: Interactions of liposomes with mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 7, 435-468.
131. Pellefigue, F., DeBrohun-Butler, J. Spielberg, S.P., Hollenberg, M.D., Goodman, S.J., Schulman, J.D. /1976/: Normal amino acid uptake by cultured human fibroblasts does not require γ -glutamyl transpeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 997-1002.
132. Pennincxx, M., Jaspers, Ch., Wiame, J-M. /1980/: Glutathione metabolism in relation to the amino acid permeable systems of the yeast. *Eur. J. Biochem.* 104, 119-123.
133. Potashner, S.J. /1978/: Effects of tetrodotoxin, Ca, and Mg on the release of amino acids from slices of guinea pig cerebral cortex. *J. Neurochem.* 31, 187-195.
134. Rachubinsky, R.A., Verma, D.P.S., Bergeron, J.J.M. /1980/: Synthesis of rat liver microsomal cytochrome b_5 by free ribosomes. *J. Cell. Biol.* 84, 705-716.
135. Racker, E. /1979/: Reconstitution of membrane processes. *Meth. Enzymol.* LV, 699-711.
136. Racker, E., Chien, T.F., Kandrach, A. /1975/: Colate dilution procedure for reconstitution of

Ca^{2+} pump, P_i -ATP exchange, and oxidative phosphorylation. FEBS Letters 57, 14-18.

137. Retz, K.C., Coyle, J.T. /1982/: Effect of kainic acid on high-energy metabolites in the mouse striatum. J. Neurochem. 38, 196-203.
138. Revel, J.P., Ball, E.G. /1959/: The reaction of glutathione with amino acids and related compounds as catalysed by γ -glutamyl transpeptidase. J. Biol. Chem. 234, 577-582.
139. Reyes, E., Praher, E.E. /1976/: Subcellular and regional localisation of γ -glutamyl transpeptidase in sheep brain. Neurochem. Res. 1, 251-259.
140. Roberts, P.J. /1974/: Glutamate receptors in rat central nervous system. Nature /Lond/ 252, 399-401.
141. Robinson, N.C., Tanford, C. /1975/: The binding of deoxycholate, TRITON X-100, sodium dodecyl sulphate and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b_5 . Biochemistry 14, 369-378.
142. Ross, L.L., Barber, L., Tate, S.S., Meister, A. /1973/: Enzymes of the γ -glutamyl cycle in ciliary body and lens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2011-2014.
143. Rothman, J.E., Lenard, J. /1977/: Membrane asymmetry. Science 195, 743-753.
144. Rutenberg, A.M., Kim, H., Fischbein, J.W., Hanker, J.S., Wasserkrug, H.L., Seligman, A.M. /1969/: Histochemical and ultrastructural demonstration of γ -glutamyl transpeptidase activity. J. Histochem. Cytochem. 17, 517-526.
145. Schulman, J.D., Goodman, S.J., Mace, J.W., Patrick, A.D., Tietze, F., Butler, E.J. /1975/: Glutathionuria: inborn error of metabolism due to tissue deficiency of γ -glutamyl transpeptidase. Biochem.

Biophys. Res. Commun. 65, 68-74.

146. Schwarz, R., Scholz, D., Coyle, J.T. /1978/: Structure-activity relations for the neurotoxicity of kainic acid derivatives and glutamate analogues. *Neuropharmacology* 17, 145-151.
147. Shakespeare, P.G., Stokes, S.H., Futerman, A.H. /1982/: Heat inactivation of γ -glutamyl transpeptidase in homogenates of human kidney. *Ann. Clin. Biochem.* 19, 43-46.
148. Shimada, H., Endou, H., Sakai, F. /1982/: Distribution of γ -glutamyl transpeptidase and glutaminase isoenzymes in the rabbit single nephron. *Japan J. Pharmacol.* 32, 121-129.
149. Shingleton, W.S., Gray, M.S., Brown, M.L., White, L.J. /1965/: Chromatographically homogenous lecithin from egg phospholipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42, 53-57.
150. Shinozaki, H., Konishi, S. /1970/: Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. *Brain Res.* 24, 368-371.
151. Shinozaki, H., Shibuya, J. /1974/: Potentiation of glutamate-induced depolarization by kainic acid in the crayfish opener muscle. *Neuropharmacology* 13, 1057-1065.
152. Shirre, H.D., Haber, B. /1981/: Immunochemical localisation of γ -glutamyl transpeptidase in the rat central nervous system. *Brain Res.* 217, 339-349.
153. Sikka, S.C., Green, G.A., Chauhan, V.P.S., Kalra, V.K. /1982/: Proteoliposome interaction with human erythrocyte membranes: functional implantation of γ -glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 21, 2156-2166.

154. Sikka, S.C., Kalra, V.K. /1980/: γ -glutamyl transpeptidase mediated transport of amino acids in lecithin vesicles. *J. Biol. Chem.* 255, 4399-4402.
155. Simon, J.R., Contrera, J.F., Kuhar, M.J. /1976/: Binding of ^3H -kainic acid, an analogue of L-Glu, to brain membranes. *J. Neurochem.* 26, 141-147.
156. Singer, S.J., Nicholson, G.L. /1972/: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
157. Smith, V.L., Brent, L.G., Shabbot, M.S., Thompson, R.E. /1982/: Regulation of microsomal HMG-CoA reductase by enzyme-lipid interactions. *Biophys. J.* 37, 42-44.
158. Sochov, M., El Sheik, O.K., McLean, P. /1980/: γ -glutamyl transpeptidase in glomeruli and tubules of rat kidney cortex: effect of experimental diabetes. *Enzyme* 25, 205-209.
159. Steitz, T.A., Goldman, A., Engelman, D.M. /1982/: Quantitative application of the helical hairpin hypothesis to membrane proteins. *Biophys. J.* 37, 124-125.
160. Strittmatter, P., Rogers, M.J., Spatz, L. /1972/: The binding of cytochrome b_5 to liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 247, 7188-7194.
161. Szewczuk, A., Milnerovitz, H., Polosatov, M.V., Sobiech, K.A. /1980/: Immunofluorescent localization of γ -glutamyl transpeptidase in rat and bovine tissues. *Acta Histochem.* 66, 152-159.
162. Takeuchi, A., Onodera, K. /1975/: Effects of kainic acid on the glutamate receptors of the crayfish muscle. *Neuropharmacology* 14, 619-625.
163. Tanford, C. /1973/: The hydrophobic effect. Wiley Intersci. N.Y. 1973.

164. Tapia, R., Arias, C. /1982/: Selective stimulation of neurotransmitter release from chick retina by kainic and glutamic acids. *J. Neurochem.* 39, 1169-1178.
165. Tate, S.S., Grau, E.M., Meister, A. /1979/: Conversion of glutathione to glutathione-disulfide by cell membrane bound oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2715-2719.
166. Tate, S.S., Meister, A. /1974/a/: Stimulation of the hydrolytic activity and decrease of the transpeptidase activity of γ -glutamyl transpeptidase by maleate, identity of rat kidney maleate stimulated glutaminase and γ -glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3329-3333.
167. Tate, S.S., Meister, A. /1974/b/: Interaction of γ -glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides and derivatives and analogs of glutathione. *J. Biol. Chem.* 249, 7593-7602.
168. Tate, S.S., Meister, A. /1975/: Identity of maleate stimulated glutaminase with γ -glutamyl transpeptidase in rat kidney. *J. Biol. Chem.* 250, 4619-4624.
169. Tate, S.S., Meister, A. /1977/: Affinity-labeling of γ -glutamyl transpeptidase and location of the γ -glutamyl binding site on the light subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 931-935.
170. Tate, S.S., Meister, A. /1978/: Serine-borate complex as a transition state inhibitor of γ -glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4806-4809.
171. Tate, S.S., Meister, A. /1981/: γ -glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol. and Cell Biochem.* 39, 357-368.
172. Thompson, G.A., Meister, A. /1979/: Modulation of the hydrolytic, transfer and glutaminase activity

by maleate bound at the cysteinyl-glycine binding site of the enzyme. J. Biol. Chem. 254, 2956-2960.

173. Thompson, G.A., Meister, A. /1980/: Modulation of γ -glutamyl transpeptidase activities by hippurate and related compounds. J. Biol. Chem. 255, 2109-2113.
174. Tran, V.T., Snyder, S.H. /1979/: Amino acid neurotransmitter candidates in rat cerebellum: selective effect of kainic acid lesions. Brain Res. 167, 345-353.
175. Taso, B., Curthoys, N.P. /1980/: The absolute asymmetry of orientation of γ -glutamyl transpeptidase and aminopeptidase on the external surface of the rat brush border membrane. J. Biol. Chem. 255, 7708-7712.
176. Tsuji, A., Matsuda, Y., Katunuma, N. /1980/: Characterisation of human serum γ -glutamyl transpeptidase. Clin. Chim. Acta 104, 361-366.
177. Varga, V., Somogyi, J., Csató, Zs., Gulyás, J., Török, K., Vodnyánszky, L. /1977/: Localisation and possible role of γ -glutamyl transpeptidase in brain tissue. 6th Intern. Meeting of the ISN Copenhagen, Denmark; Abstr. No: 490.
178. Varga, V., Ghandour, M.S., Langley, O.K., Somogyi, J., Vincendon, G., Manel, P. /1980/: γ -glutamyl transpeptidase in brain tissue and in cerebral cortex tissue cultures. Proc. of the 3rd Meeting of the ESN, Bled, Yugoslavia pp. 655.
179. Viña, J., Puertes, R., Estrela, J.M., Vina, J.R., Galbis, J.L. /1981/: Involvement of γ -glutamyl transpeptidase in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat. Biochem. J. 194, 99-102.

180. von Hejne, G. /1981/: On the hydrophobic nature of signal sequences. Eur. J. Biochem. 116, 419-422.
181. Walker, R.J. /1976/: The action of kainic acid and quisqualic acid on the glutamate-receptors of three identifiable neurons from the brain of the snail *Helix Aspersa*. Comp. Biochem. Physiol. 55C, 61-67.
182. Weinstein, J.E. /1981/: Liposomes as targeted drug carriers: a physical-chemical perspective. Pure and Appl. Chem. 53, 2241-2254.
183. Welbourne, T.C., Dass, P.D., Smith, R.L. /1980/: Renal glutamine utilization, glycyl-glycine stimulation of γ -glutamyl transpeptidase. Can. J. Biochem. 58, 614-620.
183. Wickner, W. /1980/: Assembly of proteins into membranes, Science 210, 861-868.