

## SZATIETIN: A TÁPLÁLKOZÁST SZELEKTÍVEN SZABÁLYOZÓ ENDOGÉN ANYAG. IZOLÁLÁS ÉS KÉMIAI JELLEMZÉS\*

NAGY JÁNOS, KALÁSZ HUBA, a kémiai tudományok kandidátusa  
és KNOLL JÓZSEF, az MTA rendes tagja

Közlésre érkezett: 1982. I. 27.

A szatietin 1978-ban felfedezett (Knoll 1978) ember és emlősállatok szérumából előállított glikopeptid, mely rendkívül hatékonyan, különleges szelektivitással gátolja a táplálékfelvételt és biológiai tulajdonságai alapján a jóllakottságot jelző szabályozó anyag szerepét játszhatja a vérben (Knoll 1979a, b, Knoll 1979—1980, Knoll 1980, Knoll 1982).

Az emberi vérből sikerült a szatietint izolálni. Az izolálás módjának és az izolált szatietin eddig megismert kémiai jellemzőinek részletesebb ismertetése e tanulmány célja.

### *Anyag és módszer*

#### *Preparatív eljárások*

*Az ultraszűrés körülményei.* A vérszérumot gyűjtés után az Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézettől kaptuk. A szérumot ultraszűrésnek vetettük alá szobahőmérsékleten, Amicon UM-10-es diaflo membránon. Az ultraszűréshez az Amicon cég „High Flow Stirred Cell, Model 2000 C” készülékét használtuk, amellyel naponta (24 óra alatt) mintegy 2000 ml humán szérumot tudtunk leszűrni. A nyert szűrlet színtelen, víztiszta, esetenként opálos folyadékknak bizonyult.

*Szérum preparátumok előkészítése a kromatográfiás tisztításokhoz.* Az ultraszűrletet lefagyasztva tároltuk a felhasználásig. 2000 ml szűrletet vákuumbepárlással („Büchi Rotavapor”) 60 ml-re bekoncentráltunk és preparatív centrifugán az oldhatatlan részt elkülönítettük. A kapott, kissé zavaros, de csapadékmentes oldatot 0 °C és 10 °C közötti hőmérsékletre hűtöttük és 55%-os triklór-ecetsavval 10 súly/tef. %-ra telítettük állandó kevertetés mellett. Az így csapadékossá vált elegyet 0 °C és 5 °C közötti hőmérsékleten legalább egy óra hosszát (legfeljebb éjjelen át) állni hagytuk, majd a kicsapódott szérumfehér-

\* A Magyar és Lengyel Farmakológiai Társaság 1981. október 3-i (Zakopane) „Peptides and their receptors in the central nervous system” című 5. együttes szimpóziumán elhangzott előadás nyomán.

jéket ugyanilyen hőmérsékleten történő ultracentrifugálással ( $30\,000 \times g$ , 30 percig) elkülönítettük. Tiszta, éles sárga színű felülúszót kaptunk.

**Gélkromatográfiás eljárások.** Az előzőekben ismertetett módon előállított és előtisztított szériumpreparátumokat, azaz a mintegy 65–70 ml-es tiszta felülúszókat, Sephadex G-15 oszlopon tisztítottuk. Desztillált vízben duzzasztott Sephadex G-15 géllal megtöltöttünk egy Pharmacia K 50/100-as oszlopot úgy, hogy a gélagy térfogata  $5 \times 90$  cm legyen. Az oszlopot legalább 24 órán át 0,1 M ammónium-acetát, pH 6,6 pufferrel ülepítettük, ill. hoztuk egyensúlyba. Minden esetben 60–70 ml-es mintákat vittünk fel az oszlopra, melyet a minta felvitele után az ülepítéshez használt pufferrel eluáltunk. Az elúciónál a puffer áramlási sebessége 120 ml/óra volt. A szeparálódást LKB Uvicord II átfolyóküvettes spektrofotométerrel 254 nm-nél folyamatosan követtük. Az eluátumot 10 ml-es frakciókban gyűjtöttük. A kizáródási térfogatnál megjelenő frakciókat (500–600 ml) egyesítettük és liofilizáltuk. A liofilizált preparátumokat ezután 10 ml ionmentes vízben feloldottuk és Bio-Gel P-2 oszlopon kromatografáltuk. A Bio-Gel P-2 oszlopot az előzőekben ismertetett módon készítettük azzal a különbséggel, hogy a duzzasztott gélt egy Pharmacia K 26/100 oszlopba töltöttük. A géloszlopot ezután ionmentes vízzel hoztuk egyensúlyba. A 10 ml-nyi térfogatú tisztított szatietin mintát ezen az oszlopon tisztítottuk tovább, ill. ionmentesítettük. A kizáródó anyagokat tartalmazó frakciókat (130–180 ml között) egyesítettük és liofilizáltuk. A nyert liofilizátumok fehér, ill. halvány sárgás, jól kezelhető porok. 2000 ml ultraszűrletnek megfelelő mennyiségből kísérletenként általában 25–30 mg-os mennyiségű sómentes terméket kaptunk.

**Középfeszültségű preparatív papírelektroforézis.** 30 mg fenti módon kapott nyers termékből desztillált vízzel 5 mg/ml koncentrációjú oldatot készítettünk és ezt az oldatot 2 cm széles és 30 cm hosszú sávban felcsepegtettük egy Whatman 3M papírra. A papírt megszáritottuk, majd 6,2 pH-értékű elektród-pufferrel (10 tf./tf. % piridin, 0,5 tf./tf. % ecetsav) egyenletesen megnedvesítettük és a futtatást folyamatosan hűtött horizontális készülékben (LABOR MIM) 20 V/cm feszültség-grádienssel végeztük 4 órán át. Az elektroforézis befejezése után a papírt megszáritottuk és 1 cm-es csíkot ninhidrin reagenssel (0,3 g ninhidrint 100 ml etanolban oldottunk és 3 ml jégecetet adtunk hozzá), illetve esetenként perjódsavas Schiff reagenssel (Köiv és Grönwall, 1952) megfestettük a szeparálódott komponensek detektálása céljából. A papírt ezután feldaraboltuk és az elkülönített részekből a hatóanyagot desztillált vízzel kioldottuk. Liofilizálás után mintegy 20–23 mg 50–100 E/mg aktivitású tisztított terméket kaptunk.

**Affinitási kromatográfia.** A fenti módon nyert és elektroforézissel tisztított termék 20 mg-ját 4 ml 7,0 pH-értékű induló pufferoldatban (összetétele: 0,02 mol/l Trisz-hidroklorid, 0,5 mol/l nátrium-klorid, 0,001 mol/l kalcium-klorid és 0,001 mol/l mangán-diklorid) oldottuk és az oldatot felvittük egy 1,7 cm átmé-

rőjű és 37 cm hosszú Con A-Sepharose géllal töltött oszlopra, amelyet előzőleg 10-szeres oszloptérfogatnak megfelelő térfogatú indulópufferrel hoztunk egyensúlyba. A gradiens elúciót a következőképpen végeztük: 100 ml fenti összetételű indulópufferhez állandó kevertetés mellett folyamatosan hozzásepegtetünk 100 ml ugyanilyen összetételű, de 0,5 mol/l  $\alpha$ -metil-mannozidot (Sigma) tartalmazó pufferoldatot. Így az eredendő oldatot egy LKB Varioperpex perisztaltikus pumpa segítségével áramoltattuk a Con A-Sepharose oszlopra. Az eluáló oldat  $\alpha$ -metil-mannozid tartalma az eluálás folyamán 0 mol/l-ről 0,5 mol/l-ig lineárisan emelkedett. A szeparálást LKB Uvicord II detektorral 254 nm-nél folyamatosan regisztráltuk. 2,5 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttünk egy, az intézeti műhelyben kifejlesztett, idővezérléssel ellátott frakciókolektor segítségével. Az „affi” géltre felkötődött anyagot tartalmazó frakciókat egyesítettük és liofilizálással 10 ml-re bekoncentráltuk.

Az ezúton kapott koncentrált folyadékot az oldatban jelenlevő sók és egyéb kismolekulájú szennyezések eltávolítása céljából egy, az előzőekben is használt 2,5 cm átmérőjű, 90 cm hosszú Bio-Gel P-2 oszlopra vittük, majd az oszlopot ionmentes vízzel eluáltuk. A 140 ml és 180 ml közötti frakciókat egyesítettük és liofilizáltuk. Ily módon 5–6 mg hófehér, sómentes, homogén 100 E/mg szatietin aktivitású terméket kaptunk.

#### *Analitikai módszerek*

*Poliakrilamid gél elektroforézis nátrium-dodecilszulfát jelenlétében (SDS-PAGE).* 25, 50 és 100  $\mu$ g-os mennyiségeket futtattunk 1% nátrium-dodecilszulfátot (SDS) és 9,15% akrilamidot tartalmazó poliakrilamid gélrudakban 8,3 pH értékű Tris-glicin pufferben. A futtatáshoz REANAL gyártmányú gél-elektroforetikus berendezést használtunk. Az elektroforézis befejeztével a gélrudakat az üvegsövekből óvatosan eltávolítottuk és egyidejűleg kettős festést alkalmaztunk. A párhuzamosan analizált mintákat a fehérjék detektálása céljából Coomassie Brilliant Blue R-250-nel (Bio-Rad Laboratories), szénhidrátokra pedig a perjódsavas-Schiff (PAS) reagenssel történő festést alkalmaztuk.

*Gradiens poliakrilamid gél elektroforézis.* Vizsgálatainkhoz a PAA 4/30 típusú poliakrilamid gradiens gélt (Pharmacia) használtuk. Tisztított preparátumainkkal párhuzamosan standard fehérjekeveréket is futtattunk a preparátumok molekulásúlyának behatárolása céljából.

*Izoelektromos fókuszálás.* A vizsgálatokat akrilamid „slab” gélben polimerizált 3–5 és 5–7 pH-értékű LKB Ampholin jelenlétében végeztük. A szatietin preparátumokkal párhuzamosan minden esetben különböző izoelektromos pontú standard fehérje keveréket (Serva) is futtattunk. A fókuszálást 5–7 °C-on 100–1500 volt feszültség tartományban teljesítményállandóságig végeztük.

A grádiens gélben történő elektroforézishez és az izoelektromos fókuszáláshoz Pharmacia apparátust használtunk.

*Kvalitatív és kvantitatív aminosav analízis.* A vizsgálatokat a preparátumok 6 N sósavval 105 °C-on történő 24 órás hidrolízise után végeztük el automatikus aminosav analizátorral (Biocal Instrument, Biochrom BC 200 Modell), egyoszlopos két pufferes módszer szerint (Dévényi, 1969). Oszlop: Aminex A-5 (Bio-Rad) gyantával megtöltve  $0,9 \times 54$  cm. Alkalmazott eluálópufferek „A” 0,2 n nátrium-citrát, pH 3,25 és „B” 0,8 N nátrium-citrát, pH 4,25 voltak.

*Szatietin minták anorexiás hatásának értékmérése.* Az előállított minták hatékonyságának mérése a Knoll által leírt biológiai titrálással történt (Knoll 1979—1980, 1982), mely szerint 1 E szatietint tartalmaz valamely preparátum azon mennyisége, mely intracerebroventrikulárisan adva 96 órán át éhezõ patkány 24 óra alatti táplálékfogyasztását  $24,4 \pm 0,76$  g-ról 10 g-ra csökkenti.

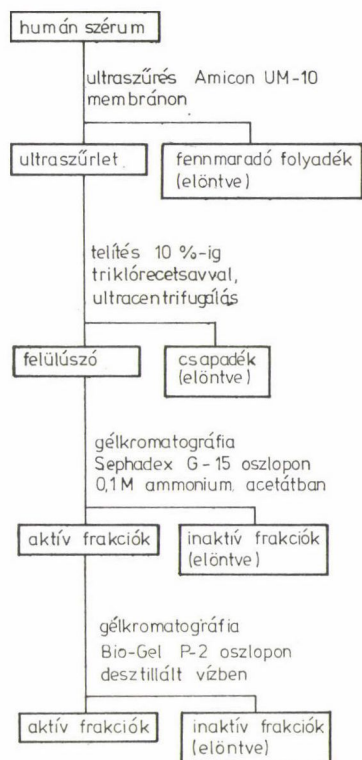
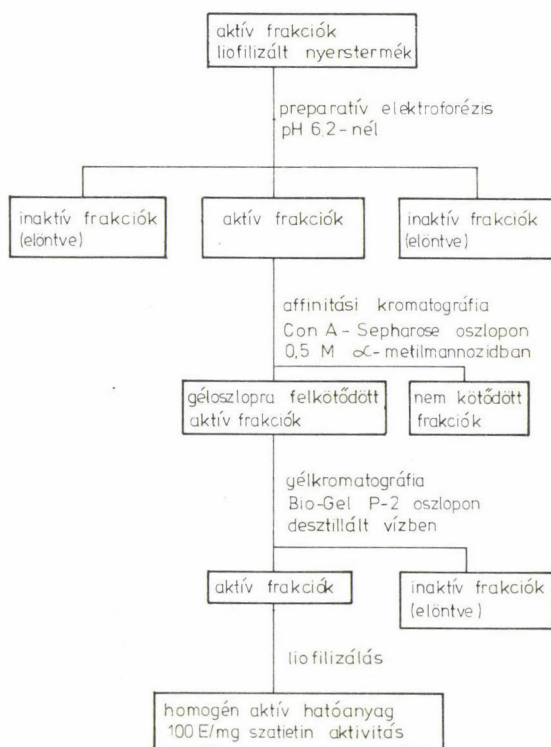
### *Eredmények és megbeszélés*

3000 ml humán szérumnak megfelelő 2000 ml ultraszűrletből a jelen dolgozatban leírt módszer szerint 3—5 mg tiszta homogén szatietint izoláltunk, amelynek aktivitása 100 E/mg körül van.

A táplálékfelvételt gátló tiszta hatóanyag tisztításának menete az 1. ábrán látható. A vérellátóból rendszeresen szállított humán szérumot használtuk fel a szatietin kinyerésére. A szérumot membránszűrésnek vetettük alá egy Amicon UM-10 jelzésű membránon állandó kevertetés és 3—4 atm. nyomás alatt, amelyet inert gázzal (nitrogén) értünk el. A szérum membránszűrlete víztiszta, esetenként kissé opálos folyadéknak bizonyult. Az Amicon gyártmányú membránok közül az UM-10-es membrán használható a legjobban, mivel ez nagy részben csak a 10 000 dalton alatti molekulákat engedi át, annak ellenére, hogy bizonyos mennyiségű szérumalbumin és maga a szatietin is megtalálható a szűrletben. A PM-30-as és XM-50-es membránok is jól alkalmazhatók, de a tisztítás során ezekben az esetekben még nagyobb mennyiségű szérumfehérje is átjuthat az ultraszűrletbe. Az előtisztítás célja végeredményben az, hogy első lépésben eltávolítsuk a szatietin aktivitás szempontjából felesleges szérumfehérjéket vagy legnagyobb részüket, és így rendszerünket kissé feldúsítsuk az aktív hatóanyagra vonatkozólag. Ezt érhetjük el hatásosan membránszűréssel, ahol az elválasztás végig oldatban történik, míg egyéb precipitációs módszerek esetében túl nagy elkenődés volt tapasztalható.

Az ultraszűrletet, amely a szatietint tartalmazza, ezután forgóbepárlón bekonzentráltuk. A tisztítás következő jelentős lépése a maradék szérumfehérjék eltávolítása volt, amelyekből egy bizonyos mennyiség még az UM-10-es membránon is áthatolt, és amelyek megnehezítették a szatietin további tisztítá-

## SZATIETIN IZOLÁLÁSA

SZATIETIN IZOLÁLÁSA  
(folytatás)

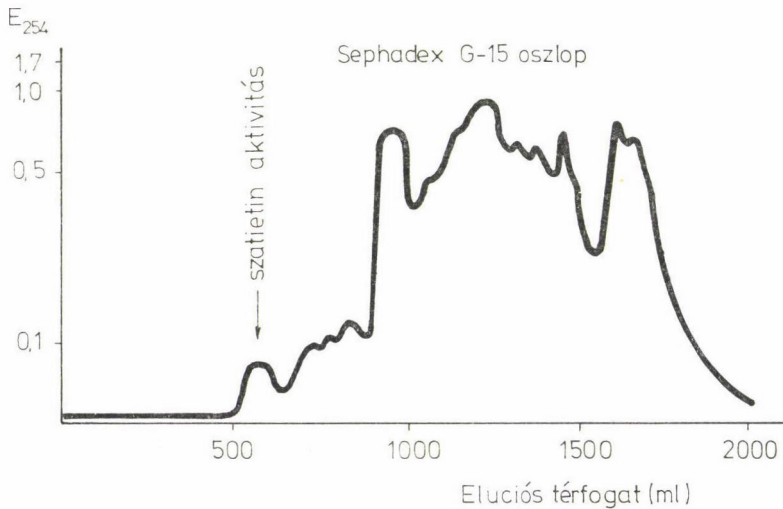
1. ábra. Szatietin izolálása humán szérumból

sát. A szérumalbumintól például az általában használatos kromatográfiai eljárásokkal nem tudtuk elválasztani a szatietint. Az ultraszűrletbe átjutó szérumalbumin mennyisége viszont jelentősnek bizonyult. A probléma megoldására ezért a felesleges szérumfehérjéket triklór-ecetsavas kicsapás útján távolítottuk el úgy, hogy a kicsapódott fehérjéket célszerűen ultracentrifugáltuk, míg a biológiailag aktív szatietin a tiszta felülészóban maradt (megfelelő gravitációs gyorsulás, „g” alkalmazása mellett) glikoprotein természete miatt, amint azt a későbbiekből látni fogjuk.

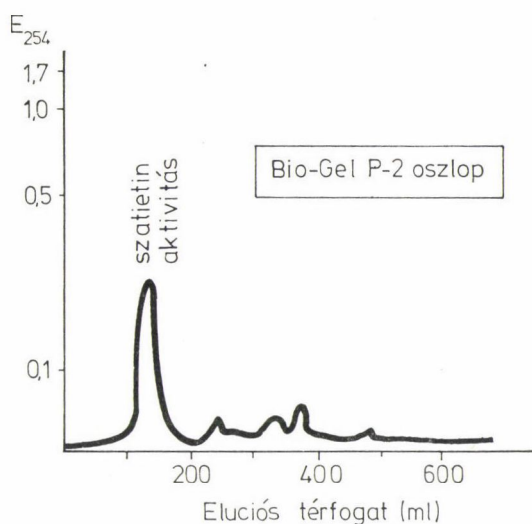
A triklór-ecetsavas telítés optimumaként 10 súlyszázalékot találtunk megfelelőnek, amikor még jó hozammal lehetett a hatóanyagot kinyerni és a preparátumok már gyakorlatilag nem tartalmaztak albumint.

A tiszta felülészót, amelynek pH-ja 4–5 körüli értéknek bizonyult, ezután gélkromatográfiasan tisztítottuk tovább, olyan gélen, melynek kizárási térfogata 4000 dalton alatti tartományba esik. Optimális szeparálódást kap-

tunk Sephadex G-15 géloszloppal illékony puffer, nevezetesen 6,6 pH-értékű 0,1 mol/l ammónium-acetát alkalmazásával. A cél ez esetben az volt, hogy a jelenlevő nagy molekulát — amely jelen esetben már csak a szatietin hatóanyag — nagy felbontással elválasszuk a szérumban még nagy mennyiségben jelenlevő kismól súlyú kísérőanyagoktól, a sóktól és a fehérjekiesapáshoz használt triklór-ecetsavtól. Ez, mint a 2. ábrán látható, nagyon jó eredménnyel valósult meg. Az első kis UV elnyelő csúcs hordozza a szatietin aktivitású frakciókat, amelyek tehát  $V_0$ -nál (500—600 ml, miután az oszlop teljes térfogata  $V_t = 1770$  ml, és ami  $K_d = 0$  értéknek felel meg;  $K_d$  a vizsgált anyag megoszlási együtthatója) jelennek meg, ami azt jelenti, hogy a termék molekulájának mérete nagyobb, mint a gélszemcsék belső lyukátmérői, így nem tudnak behatolni a gél belsejébe, azaz kizáródnak a gélből és az eluenssel együtt a géloszlop térfogatának körülbelül egyharmadát jelentő eluens térfogatnál jelennek meg. Sephadex G-15 gél esetében az 1500 daltonnál nagyobb molekulák viselkednek így. A szérumból származó ennél kisebb molekulású anyagok viszont behatolnak a gél belsejébe és „retardálódnak” (ez esetben  $K_d > 0$ ). Miután az ultraszűrletben jelenlevő kis molekulású anyagok mennyisége a sókkal együtt jóval nagyobb, mint a szeparálódott szatietin mennyisége, ebből következően ez a lépés nagyon jelentős tisztulást eredményez a szatietin javára. A fehérjementesítéshez használt triklór-ecetsav, mint kisebb molekulájú anyag, úgyszintén retardálódik a géloszlopon és így só- és savmentes aktív anyagot kapunk az oszlop-térfogat 1/3-ának megfelelő elúciós (kizárási) tartományban. Ezeket a frakciókat egyesítettük és liofilizáltuk.



2. ábra. Fehérjementesített humán szérumszűrlet kromatográfiája Sephadex G-15 oszlopon (5,0×90 cm). Eluens 0,1 mol/l ammónium-acetát, pH 6,4 puffer. Detektálás LKB Uvicord II fotométerrel 254 nm-nél



3. ábra. Szatietin ionmentesítése és további tisztítása Bio-Gel P-2 oszlopon (2,5×90 cm) desztilláltvízes közegben. A szeparálás követése 254 nm-nél Uvicord II segítségével történt

A következő tisztítási lépés is gélkromatográfia volt, amelyet Bio-Gel P-2 oszlopon ionmentes vizes közegben végeztünk (3. ábra). E tisztítási lépés célja az volt, hogy a Sephadex G-15 gélen végzett effektív szeparálás után a pufferből származó só maradékát és egyéb kis molekulású fragmenseket (töredék peptidek, szabad aminosav-szennyezés) eltávolítsuk. A szatietin-aktivitású frakciók jelen esetben is kizáródnak a gélből és a  $V_0$  értéknél, azaz az oszloptérfogat ( $V_t = 440$  ml) 1/3-ának megfelelő elúciós térfogattal jelennek meg. A hatékony terméket a frakciók egyesítése után jól kezelhető fehér, esetenként halványsárga-fehér por alakjában kaptuk meg. Így 1 liter emberi vérszérumból, illetőleg az ebből nyerhető 2/3 liter ultraszűrletből kiindulva 8–10 mg liofilizált anyagot kaptunk.

Fenti módszerrel előállított aktív terméket standard nyersanyagként tekintjük, amelynek szatietin aktivitása 25–50 E/mg. A továbbiakban az így előállított nyersanyagot használtuk fel a homogén hatékony termék izolálására.

A fenti módon kapott, 25–50 E/mg aktivitású nyers szatietin nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gél elektroforézissel (SDS-PAGE) és gradiens poliakrilamid gél elektroforézissel meghatározva 65 000–70 000 dalton molekulásúnak mutatkozó — a bovin szérum albumin régiójába eső — anyagnak bizonyult, amely már albumint immunreakcióval kimutatható mennyiségben sem tartalmazott. A termék kémiai analízise — a korábbiakban már leírt részlegesen tisztított termékhez hasonlóan (Kalász és mtsai 1980; Knoll 1982) — glikoprotein tulajdonságot mutatott, alacsony (14–18%) fehérjetartalommal; 60–75% szénhidrátot tartalmazó fehér porszerű termék, amely szénhidrát részében 4 cukorkomponenst, fukózt, mannózt, galaktózt és glükózt

tartalmazott. (Nagy és mtsai 1982). A hidrolizált termékben számottevő mennyiségű (6—8%) glükózamin minden esetben kimutatható volt.

Az anyag heterogenitását SDS-PAGE-vel és analitikai izoelektromos fókuszálással (IEF) vizsgálva 4—6 fehérjefestéssel (Coomassie Brilliant Blue) kimutatható sávot (komponenst vagy alegységet) lehetett találni. Középfeszültségű papír elektroforézissel 6,2 illetve 1,6 pH-értékű pufferoldatban vizsgálva, a nyerstermék még összetett (heterogén) anyagnak mutatkozott (1. táblázat), a biológiailag hatásos főkomponens mindkét pufferben a kiinduló helyzetben maradt, illetve 6,2 pH-jú puffert alkalmazva alig mozdult el a katód irányába. A szeparálódott 4 főkomponens elektroforetikus mobilitása látható az 1. táblázaton. Az 1-es és 2-es komponensek, amelyek a biológiai hatást hordozzák, neutrális tulajdonságot mutattak az elektroforézis során. Ezek a komponensek ninhidrines vagy PAS festéssel egyaránt detektálhatók voltak, ami szintén az anyag glikoprotein természetére utal.

A szatietin nyerstermék további tisztítására tehát az elektroforézises módszer alkalmasnak látszott laboratóriumi körülmények között Whatman 3M preparatív papírt használva a futtatáshoz. 6,2 pH-értékű pufferoldatban lefolytatott papír elektroforézises szeparálás során 70—75% körüli hozammal különíthető el a kiindulási helyzetben maradó főtermék (1 és 2) ( $R_f = 0,00$ ;  $-0,11$ ), míg két peptid jellegű, illetve glikopeptid tartalmú kísérő komponens (3 és 4) az anód irányában mozdul el, és így teljesen elválasztható a magas (50—100 E/mg) szatietin aktivitású, ninhidrinre és PAS festésre pozitív főterméktől.

Az ily módon elkülönített hatékony anyag már nagy tisztaságú, gélkromatográfiával vagy gradiens PAGE-vel vizsgálva egységes viselkedést mutató, 100 E/mg-ot megközelítő aktivitású, lényegileg glikoprotein jellegű termék, amely azonban a fehérjeanalitikában használatos nagyfelbontású módszerekkel, mint pl. SDS-PAGE és IEF — kémiaailag még nem bizonyult

1. táblázat

*Az elektroforézissel szeparált komponensek mobilitása és biológiai hatékonysága*

Szeparálódott komponen- sek N <sup>o</sup>	Mobilitás viszonyítva PHE → LYS = 1,00	Biológiai aktivitás
	puffer pH 6,2	egység/mg
1.	0,00	50—100
2.	-0,11	50—100
3.	-0,26	0
4.	-0,50	0

PHE = fenilalanin  
LYS = lizin



egységes anyagnak. Ezért az elektroforézissel tisztított anyagot a glikoproteinek elválasztására újabban kifejlesztett affinitási kromatográfiai módszerrel (Swallow és mtsai 1977) még egy további tisztítási lépésnek vetettük alá.

Ehhez az affinitási kromatográfiai művelethez adszorbensként az elkülönítendő anyag valamely, az eltávolítandó kísérőanyagokban elő nem forduló csoportját specifikusan megkötni képes anyagot kell alkalmazni; a glikoprotein jellegűnek bizonyult szatietin esetében tehát a glikoproteinek glikopiranoz-csoportjai iránt specifikus affinitást mutató adszorbenst alkalmazunk. A jelenleg ismert ilyen csoport-specifikus adszorbensek közül különösen a „Con A-Sepharose” elnevezésű „affi” gél bizonyult erre a célra előnyösnek. Ez az adszorbens-gél, amelyben a cián-bromiddal aktivált Sepharose 4B-hez Conavalin A van kapcsolva, amely megfelelő műveleti körülmények között specifikusan köti meg az  $\alpha$ -D-mannopiranozil- vagy  $\alpha$ -D-glükopiranozil-csoportot tartalmazó molekulákat, míg az ilyen csoportokat nem tartalmazó kísérőanyagok (egyéb fehérjék, peptidok stb.) a gélből kizáródnak. Ezek a kizáródó anyagok az eluálás során az „áttörő” frakciókban jelennek meg, a gél-oszlop teljes térfogatának körülbelül egyharmadánál, míg az „affi” gélen megkötődött glikoprotein-természetű anyagok adott esetben még a kötés természetétől, azaz a vegyület kémiai sajátosságaitól függően tovább is szeparálódhatnak, különösen ha gradiens-elúciót alkalmazunk a gélen megkötött termék eluálására.

Az előző műveletek útján tisztított szatietin termékünket egy közel semleges kémhatású és alacsony molaritású indulópufferben, trisz-hidrokloridban (2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propándiol-hidroklorid) oldottuk, amely 0,5 mol/l nátrium-kloridot, és 0,001 mol/l  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mn}^{2+}$  iont is tartalmazott. Az indulópufferben a viszonylag magas sókoncentráció azért volt szükséges, hogy ne jöhessen létre nem specifikus fehérje-kötés az adszorbens és a kísérő-fehérje jellegű anyagok között. Az induló pufferoldatban feloldott szeparálandó anyagot ezután vittük fel az „affi” géloszlopra. Az eluálást  $\alpha$ -metil-mannozidot emelkedő koncentrációban tartalmazó pufferoldattal végeztük. Célszerűen 0,5 mol/l koncentrációjú  $\alpha$ -metil-mannozidot tartalmazó oldatot csepegtettünk az induló pufferoldat összetételével egyező eluáló oldatba és az elegy folyamatos kevertetésével biztosítottuk a lineáris gradiens képződést. Az eluáló oldat  $\alpha$ -metil-mannozid-koncentrációja tehát lineárisan emelkedett a kromatográfálás során; az oldat ion-koncentrációját és pH-értékét az eluálás során nem változtattuk. Az elválasztást átfolyóküvetés, folyamatosan regisztráló fotométerrel követtük és a 4. ábrán látható elúciós diagramot kaptuk, amely szerint az „A” csúcsot reprezentáló anyagkeverék az oszlopon áthaladt és az áttörő-frakciókban jelent meg, míg az oszlopon megkötődött glikoprotein lényegesen nagyobb retenciós értékkel, a megközelítően szimmetrikus „B” csúcs alakjában eluálódott a gradiens  $\alpha$ -metil-mannozid koncentráció növekedésének eredményeként. Az oszlopról így eluált biológiaiilag aktív anyagot a



4. ábra. Tisztított humán szatiétin affinitási kromatográfiája Con A-Sepharose oszlopon (1,7 × 37 cm). Induló puffer: 0,02 mol/l Trisz/HCl-ot, pH 7,0, amely 0,001 mol/l  $MnCl_2$ -ot, 0,001 mol/l  $CaCl_2$ -ot és 0,5 mol/l NaCl-ot tartalmaz. Grádiens: az indulópufferben 0,5 mol/l  $\alpha$ -metilmannozidot tartalmaz. Az elúció a grádiens elindításával kezdődött. „A” anyag az oszlopon áthaladó anyagkeverék, „B” anyag az „affi” géltre specifikusan kötődő és az  $\alpha$ -metil-mannozid hatására eluálódó aktív termék

megfelelő frakciók egyesítése és betöményítése útján kaptuk meg. Minthogy az így nyert anyag még a pufferoldathból származó sókat és  $\alpha$ -metil-mannozidot is tartalmazott, ebből az elegyből a tiszta aktív anyagot egy utolsó gélkromatográfiás művelettel választottuk el. Ezt a „sótalanítási műveletet” ismét Bio-Gel P-2 oszlopon végeztük ionmentes vízzel. A tiszta sómentes szatiétin a  $V_0$ -nál jelent meg és a kizáródott frakciók egyesítése és liofilizálása után már kémiaailag homogén anyagot kaptunk.

A szatiétin emberi vérszérumból kiinduló izolálási eljárás eredményeként, amint azt az 1. ábrán vázolt folyamatábra szemlélteti, 1 liter emberi szérumból körülbelül 1,0—1,5 mg liofilizált homogén hatóanyagot tudtunk elkülöníteni, amelynek biológiai aktivitása 100 E/mg körül van.

A tiszta, sómentes, homogén anyagot a fehérjeanalitikában alkalmazott analitikai módszerekkel vizsgáltuk és karakterizáltuk. Ezeket az alábbiakban ismertetjük.

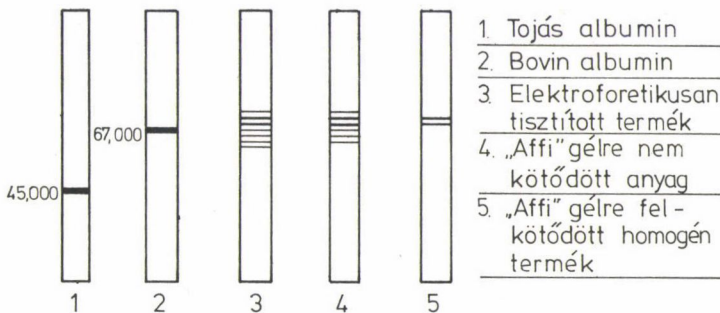
#### *Kvalitatív vizsgálatok*

SDS poliakrilamid gél elektroforézis (Davis 1964) információt szolgáltatott a termék homogenitására vonatkozólag és egyben párhuzamosan futtatott standard fehérjekeverékkel összehasonlítva az anyag molekulásúlyára szolgáltatott adatot. Az 5. ábrán demonstráltuk tojás és szérumalbuminnal együtt futtatott részlegesen tisztított szatiétin mintát és az affinitási kromatográfiával

tisztított, homogénnek mutatózó termék viselkedését. A szeparálódott fehérje-tartalmú sávokat Coomassie Brilliant Blue-val és PAS festéssel is párhuzamosan detektáltuk. Az elektroforézissel elkülönített nagy tisztaságú preparátumban már, és az izolált termékben is, a specifikus fehérjére és cukorra történő festéssel detektált sávok *identikusnak bizonyultak*. Ezekben a preparátumokban szérum albumint immunológiai módszerrel sem lehetett kimutatni. A szorosan közelálló kettős sáv a tiszta anyag esetében, mint az ábrából látható, az albumin molekulásúlyának tartományába esik. A molekulásúlyra vonatkozó vizsgálatokat megerősíti, ill. jó összhangban vannak a Pharmacia 4/30% gradiens slab gélen végzett futtatásokkal, amelyek szerint az albuminmentes hatóanyag standard fehérjekeverék jelenlétében az albuminnal hasonló migrációt mutatott.

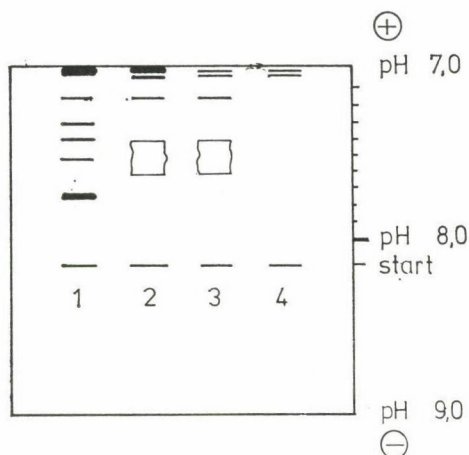
Az izolált anyag homogenitására és jellemzésére adekvát módszerként az izoelektromos fókuszálást használtuk analitikai léptékben, poliakrilamid slab gélekben. A futtatásokat minden esetben először 3,0–10 pH értékű amfolin jelenlétében végeztük azon célból, hogy bármilyen izoelektromos pontú fehérjét detektálhassunk. A tisztított nyersanyagtól az izolált hatóanyagig bezárólag minden esetben a 7,0 pH értékű tartományban tudtunk — egyéb szennyezések mellett — egy kettős ívvel rendelkező anyagot kimutatni Coomassie és PAS festéssel egyaránt. A pontos izoelektromos pont (pI) meghatározása és a jobb felbontás érdekében ezért szűkebb tartományban működő, nevezetesen 5–7, ill. 7–9 pH értékű amfolint használtunk a futtatásokhoz. A vizsgálatok eredményeként a 6. ábrán standard fehérjekeverék mellett látható a parciálisan tisztított és az izolált termék izoelektromos fókuszálása. Az izolált hatékony termék izoelektromos pontja (pI) = 7,0–7,05-nek adódott a vizsgálatok sze-

#### SZATIETIN MINTÁK ANALÍZISE SDS POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZISSSEL



5. ábra. Tisztítás követése SDS-PAGE-vel 9,15%-os akrilamidot tartalmazó Trisz-glicin pufferben. A sávokat Coomassie Brilliant Blue R-250-nel történő festéssel detektáltuk

SZATIETIN MINTÁK IZOELEKTROMOS  
FÓKUSZÁLÁSA LAP GÉLEN



1. Standard fehérje keverék
2. Elektroforetikusan tisztított szatietin
3. „Affi” gélen nem kötődött szatietin
4. „Affi” gélen felkötődött szatietin

6. ábra. Szatietin tisztításának követése izoelektromos fókuszálással „slab” gélben standard fehérjekeverék jelenlétében. A fókuszálás pH 5–7 tartományban működő LKB Ampholinnal történt

rint, ami semleges (neutrális) jellegre utal, és amely jó egyezésben van a papír elektroforetikus vizsgálatok adataival.

A hatóanyag elemi analízise az előzőekben már a részlegesen tisztított anyagra való feltételezéssel összhangban van, ami az anyag glikoprotein természetére utalt. A nagy tisztaságú anyag aminosav analízise elővizsgálatok szerint azt mutatta, hogy elsősorban savas aminosavakban és lizinben gazdag a molekula fehérjerésze, valamint a szénhidrátrészt illetően az aktív termék négy hexózt, fukózt, mannózt, galaktózt és glükózt tartalmaz, jelentős mennyiségű glükózamin mellett.

#### Kvantitatív elemi analízis

A fehérjerész aminosavkomponenseit savas hidrolízis után automatikus aminosavanalizátorral határoztuk meg egyoszlopos technikával. A 16,67% fehérjetartalom aminosav-analízise: Asp 2,0%, Thr 1,2%, Ser 0,88%, Glu 1,42%, Gly 0,32%, Ala 1,15%, Val 0,30%, Leu 1,3%, Tyr 0,6%, Lys 7,5%; összes aminosav: 16,67%, glükózamin: 6,15%.

A 60%-os szénhidráttartalom megoszlása: fukóz 12%, mannóz 13%, galaktóz 11%, glükóz 24%.

Tekintettel arra, hogy a fenti elemzési adatok liofilizált termékre vonatkoznak, a készítmény víztartalma a liofilizálás körülményeitől függően változó lehet és a kötött víztartalom mellett változó mennyiségű szabad víz is lehet a liofilizált hatóanyagban.

Az elemzési adatok alapján így az izolált tiszta homogén anyag elemi analízise az alábbi összetételt mutatja:

fehérjetartalom	17%
szénhidráttartalom	60%
glükózamin	6%
kötött víztartalom	5—10%

Konklúzióként a következőket állapíthatjuk meg. Az ismertetett eljárással humán szérumból izoláltuk a szatietint, mely glikoprotein természetű anyagnak bizonyult. A hatóanyag molekulásúlya 65—70 000 dalton, izoelektromos pontja  $pI = 7,0-7,05$ . Az izolált termék az affinitási kromatográfiás lépés után az alkalmazott összes kromatográfiás és elektroforetikus módszerrel, valamint izoelektromos fókuszálással is homogénnek bizonyult. Indirekt és direkt bizonyítékok alapján bizonyítottnak tekinthető, hogy (triklór-ecetsavas kezelés, glükózamin jelenléte a hidrolizátumban és az affinitási lépés ténye) a hatékony termék fehérjerésze vagy részei a szénhidráttal kovalens kötésben vannak jelen. Megfontolás tárgyát képezheti az a hipotézis, hogy a molekula egésze több glikopeptid alegységből épülhet fel, amely az elemi analízisből számolva mintegy 11 000 dalton mólsúlyú egységet jelentene. Az izolált szatietin kémiai természetének további megismerése, az anyag specifikus fehérje és cukorbontó enzimek segítségével történő emésztése a fragmensek analízise érdekében folyamatban van.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Dr. Mészáros Miomirnak (ELTE Szerves Kémiai Intézet) a szénhidrát komponensek analíziséért és Dr. Harmath Sándornak (PHYLAXIA) a tisztított preparátumok fehérjeanalitikai vizsgálatában nyújtott értékes segítségéért.

## IRODALOM

- Davis, B. J.*: Ann. N. Y. Acad. Sci. **121**, 404 (1964).
- Dévényi, T.*: Acta biochim. biophys. Hung. **4**, 297 (1969).
- Kalász, H., Nagy, J. és Knoll, J.*: Proc. Vth cong. of Polish Pharmacol. Soc., Poznan, p. 223 (1980).
- Knoll, J.*: Neuroscience Letters, Suppl. **1**, 55 (1978).
- Knoll, J.*: In: A Korányi Társaság Tudományos Ülései. XVI. Az extrém tápláltsági állapotok. (Eds.: Eckhardt, S., Gyenes, G.) Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 29—44 (1979a).
- Knoll, J.*: Physiol. Behav., **23**, 497 (1979b).
- Knoll, J.*: Orvostudomány, **30—31**, 351 (1979—1980).
- Knoll, J.*: In: Modulation of Neurochemical Transmission (Ed.: Vizi, E. S.) Akadémiai Kiadó-Pergamon Press, Budapest, pp. 97—125 (1980).
- Knoll, J.*: In: CNS Pharmacology — Neuropeptides, (Eds.: Yoshida, H., Hagihari, Y., Ebashi, S.) Pergamon Press, Oxford, pp. 147—162 (1982).
- Köiv, E. és Grönwall, A.*: Scand. J. clin. Invest. **4**, 244 (1952).
- Nagy, J., Kalász, H. és Knoll, J.*: Polish J. Pharmacol. Pharm. (in press) (1982).
- Swallow, D. M., Evans, L. és Hopkinson, D. A.*: Nature **269**, 261 (1977).