

A BIOGÉN AMINOK RECEPTORAI

WOLLEMANN MÁRIA

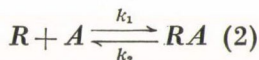
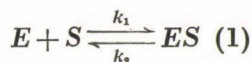
MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete

I. A receptorok általános tulajdonságai

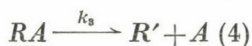
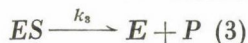
A receptor elnevezés eredetileg fiziológiai, ill. farmakológiai fogalom volt. Az elnevezést LANGLEY vezette be 1905-ben. Feltételezte, hogy az effektor sejtek, melyek különbözőképpen válaszolnak a különböző ingerekre, ezt azért tehetik, mert különböző receptor anyagokat tartalmaznak. Nikotint cseppentve az izom felszínére, ez csak akkor okozott kontrakciót, ha az idegvégződések körül alkalmazta. A nikotin hatását kuraréval ki lehetett védeni. Ez a nikotin-kurare kompetíció vezetett a receptor anyag fogalmához.

A „kemoreceptor” fogalmat EHRlich vetette fel először (*corpora non agunt nisi fixata sunt*) és osztályozásukat a deszenzitizálásra alapította. Kísérleteit tripanoszomákon végezte, három típusú ismert arzénszármazékkal, melyek dózisént növelve a tripanoszomák refraktérek lettek a dróggal szemben. Mikor egy negyedik fajta drógot alkalmazott és ez hatásosnak bizonyult, arra a következtetésre jutott, hogy az illető szer egy másik receptoron keresztül hat. Később kiderült, hogy a deszenzitizálás nem mindig olyan specifikus, mint ahogy EHRlich hitte és hogy a deszenzitizálás egy részéért a meggyorsult dróg anyagcsere (lebontás) felelős. A deszenzitizálás molekuláris mechanizmusával az előadás végén foglalkozunk, a pontos mechanizmusok azonban még ma sem ismertek.

A farmakológiában használt nomenklatura szerint a receptorokra ható anyagokat agonistáknak, az agonista hatást gátlókat pedig antagonistának nevezik. Az enzimek megismerése után, különösen a membrán-enzimokkal foglalkozó biokémikusok figyelme a receptorok felé irányult, miután sok közös tulajdonságot figyeltek meg az enzimek, elsősorban az allostérikus- és membránhoz kötött enzimek és a receptorok között. Az enzimszubsztrát kötést szimbolizáló reverzibilis egyenlethez hasonlóan (1) fel lehet írni a receptor (R)-hormon, transzmitter v. dróg (A) kötést is (2).



A továbbiak folyamán a két reakció abban tér el egymástól, hogy az enzim-szubsztrát komplexben a szubsztrát átalakul terméké (P), (Átmenetileg EP keletkezik) míg az enzim változatlan marad a termék ledisszociálása után. A receptor-biogén amin komplexben az A változatlan alakban ledisszociál és feltételezzük, hogy az R konformáció változást szenved, miközben a fiziológiai vagy farmakológiai hatás bekövetkezik:



A receptor-enzim párhuzamnál tehát az 1-es és 2-es egyenlet hasonlít egymáshoz, míg a 3-as és 4-es egymástól különbözik. A $\frac{k_2}{k_1} = K_s$ -t az enzim-szubsztrát komplex disszociációs állandójának nevezzük, míg a 2-es egyenlet $\frac{k_2}{k_1} = K_D$ állandót disszociációs konstansnak nevezik, A $\frac{k_1}{k_2} = K_a$ -t asszociációs v. affinitási konstansnak.

Régebben a receptorkötési vizsgálatokat gátolta a megfelelő módszer hiánya. Ugyanis, ha magát a biogén amint alkalmazták a kötéshez, akkor nem kaptak telítést a fiziológiás hatásnál észlelt koncentrációkban, mivel a nem specifikus kötőhelyek száma igen magas. Ezért a valódi receptorok kémiai izolálása csak akkor vált lehetővé, amikor magas specifikus aktivitású izotóppal jelölt irreverzibilisen kötődő antagonistákat alkalmaztak a receptor megkötésére. Ekkor érték el azt a követelményt, hogy a kötés specifikus volt, vagyis az affinitási állandó megfelelt az intakt rendszerben működő fiziológiai mechanizmusnak, megegyezett a fiziológiailag hatásos koncentrációval. Ezért kívánatos, hogy az a rendszer, amelyben a kötést tanulmányozzuk, lehetőleg egyszerű, intakt rendszer legyen, ahol a biológiai hatást és a kötést ugyanabban a sejtben lehet mérni (pl. szívizomsejtben), mivel a kötőszövet vagy a heterogén sejtpopuláció a kötést megváltoztatják. Csak a specificitás, affinitás és kötőhelyek számának megállapítása után érdemes a viszonylag kevésbé tisztított és tisztított membrán készítményeket vizsgálni, ahol e sajátosságoknak változatlanoknak kell lenniök. Ezután lehet csak a részletes tisztításra áttérni, mivel a szolubilizálás nemcsak a membránhoz kötött enzimek sajátosságait változtatja meg, hanem a receptorokét is, ezért a tisztított receptor vizsgálatának nemcsak a specifikus kötés a kritériuma, hanem a rendszerbe való újbóli beépítéssel a receptor funkció helyreállítását is megkövetelik (pl. az ionpermeabilitás megváltoztatásával.)

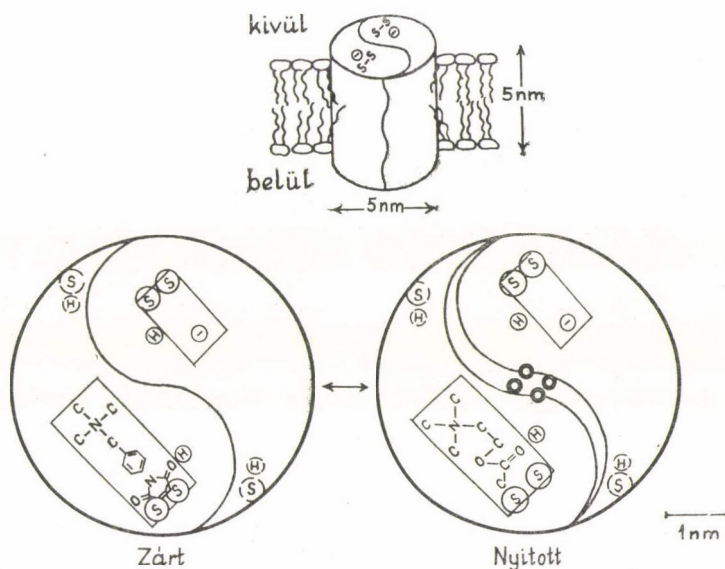
Mint történelmi tévedést meg kell említenünk, hogy a receptorokat egyes biokémikusok (STALČ és ŽUPANČIČ, 1974.) sokáig azonosnak tartották a transzmittereket bontó enzimekkel látszólag hasonló kötés tulajdonságaik miatt, ugyanis mindkét fehérje (enzim és receptor) azonos szubsztrátot, ill.

transzmittert köt meg (pl. acetilkolin receptor és acetilkolineszteráz). Ma már ezt a nézetet jóformán senki sem fogadja el.

2. Az acetilkolin receptor

Ezen általános bevezetés után a továbbiakban részletesen foglalkozunk majd a biogén aminok receptorainak biokémiai sajátágaival. Mint ezt a bevezetésben már említettem, legkorábban az acetilkolin receptorokat ismerte fel LANGLEY (1905) és később e receptorokat gátlhatóságuk alapján nikotinos (harántcsíktolt izomban és a vegetatív dúcokban) és muszkarinos (paraszimpatikus posztganglionális receptor, pl. szív, simaizom, mirigy) receptort különböztetünk meg.

Az acetilkolin receptor fogalmához nemcsak az acetilkolin specifikus megkötése, hanem a posztszinaptikus membrán permeabilitásának megváltozása is hozzátartozik (1. ábra).



1. ábra. Dimér acetilkolin receptor modell (KARLIN 1973a.) Zárt állapotban MBTA-t (4-N-maleimido-alfa-benziltrimetilammonium), nyitva acetilkolint köt

A jelenlegi kutatások, melyek 1970 körül kezdődtek, azt célozzák, hogy e jelenségek molekuláris mechanizmusát leírják. A részleges siker két tényezőnek köszönhető:

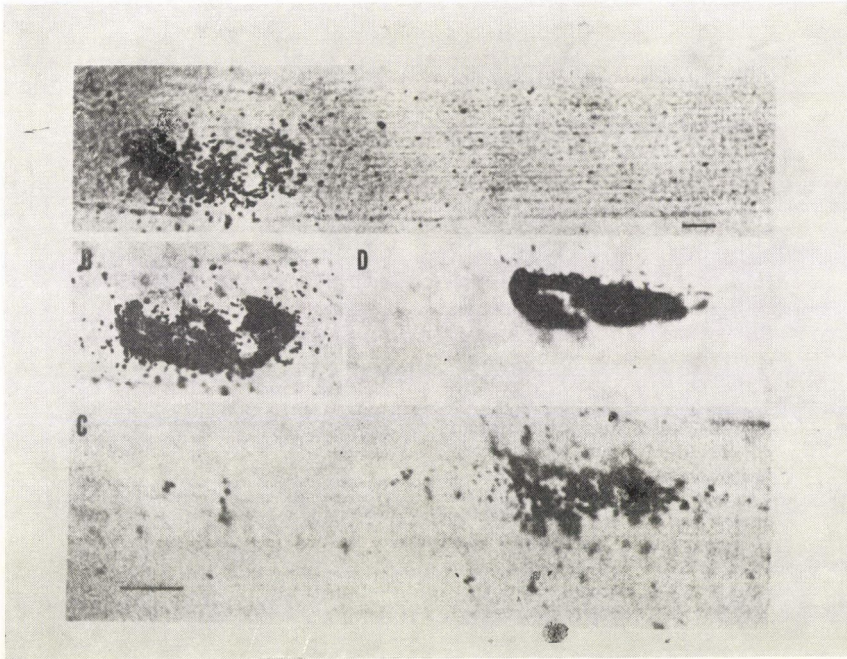
az első, hogy sikerült a receptor tisztításához olyan kiindulási anyagot találni az *Electrophorus electricus*-ban és a *Torpedo marmoratában*, melyek elektromos szervében az acetilkolin receptor magas koncentrációban fordul elő; ez NACHMANSOHN és tanítványainak érdeme volt még a hatvanas években,

a másik, hogy sikerült olyan nagy affinitású irreverzibilis gátló antagonistákat találni (bungarotoxin és más kígyómérgek, CHANG és LEE 1969), melyeknek segítségével lehetővé vált az enzimek tisztításánál kidolgozott módszerekkel (elsősorban detergens szolubilizálással és affinitás kromatográfiával) a nikotinos receptorok tisztítása és ezzel a receptor kötésének és disszociációjának pontosabb vizsgálata. A receptor funkció (Na^+ , K^+ permeabilitás változás) vizsgálata azonban e tisztított rendszerben nem lehetséges, mivel ez a tiszta fehérje csak a kötő fehérje (binding protein) sajátosságait mutatja, amit a 2-es egyenlettel írtunk le és a receptor funkció — az ionszűrő megnyitása — csak az izolált fehérjének a mesterséges membránokba vagy vezikulákba való visszahelyezésekor lipidek hozzáadásával jelenik meg újra. A permeabilitás változást általában nem közvetlenül mérik, bár mint később látni fogjuk, erre is van példa, — hanem a permeabilitásváltozásoknál fellépő elektrofiziológiai következményeket mérik: a membrán belső és külső oldala között fellépő potenciálkülönbséget, a vezetőképesség megváltozását és az áram intenzitását, végső soron pedig az izomban fellépő kontraktilitást. Természetesen minél távolabb van a történések sorozatában a mért effektus, annál kevésbé fogja tükrözni a koncentráció-hatás összefüggés a megkötött anyag koncentrációját. A másik jelenség, ami ezt az összefüggést zavarja, az ú.n. „tartalék” receptorok (néma vagy nem specifikus) létezése, mely azt eredményezi, hogy már az összes kötőhelyek egy százalékának elfoglalása után maximális válasz jön létre. A tartalék kötőhelyek tehát túlnyomórészt nem specifikus receptorok, vagyis alacsony transzmitter koncentráció mellett nem kötnek acetilkolin. Ez a jelenség különösen jól tanulmányozható az adrenerg β -receptorok esetében, mivel ott az adenilcikláz aktivitásának mérésével a hormonszint és effektus közvetlenül mérhető, amint ezt később tárgyaljuk majd.

Több mint ötven évvel ezelőtt CLARK indirekt módszert használt, hogy békaizomban meghatározza az acetilkolin kötőhelyeket és arra a következtetésre jutott, hogy a kötött molekulák száma igen alacsony, kb. 10 pmol/gr sejt. Hasonló arányt állapított meg affinitás jelölési módszerrel KARLIN és mtsai (1973) DTT (ditiotreitól) redukció és $(^3\text{H})\text{MBTA}$ -val (4-N-maleimidobenziltrimetilammonium jodid) alkilezés után. Ezzel a módszerrel a gr nedves súlyra számított specifikus kötőhelyek mennyisége 10—30 pmol volt.

Elektronmikroszkópos felvételekből kiszámították, hogy az elektroplax mezőknek kb. 30%-a szubszinaptikus és ennek alapján az acetilkolin receptorhelyek sűrűségét 2000—3000 kötőhelyre becsülték μm^2 -ként a szubszinaptikus membránon (KARLIN, 1974). Ezzel szemben bungarotoxin-kötést mérve 30.000 kötőhelyet állapítottak meg μm^2 -ként BOURGEOIS és mtsai (1972). A különbség valószínűleg az elektroplax poszt-szinaptikus membránjának felületéről végzett elektronmikroszkópos mérések eltéréseiből származik, e lemezek nagyfokú és változatos redőzöttsége miatt.

Emlős izomban elsősorban patkány diafragmán (2. ábra) és egér sternomastoideus izmán végeztek hasonló kísérleteket és az egy véglemezre eső receptorhelyek számát 10^7 -re becsülik, ami 13.000 lenne μm^2 -ként (PORTER és mtsai 1973, FAMBROUGH és mtsai 1972), ez kb. $30 \cdot 10^6$ véglemezenként. Ha impulzusonként $6 \cdot 10^6$ acetilkolin molekula szabadul fel 37°C -on véglemezenként, kb. 5 acetilkolin receptor áll rendelkezésre transzmitter mole-

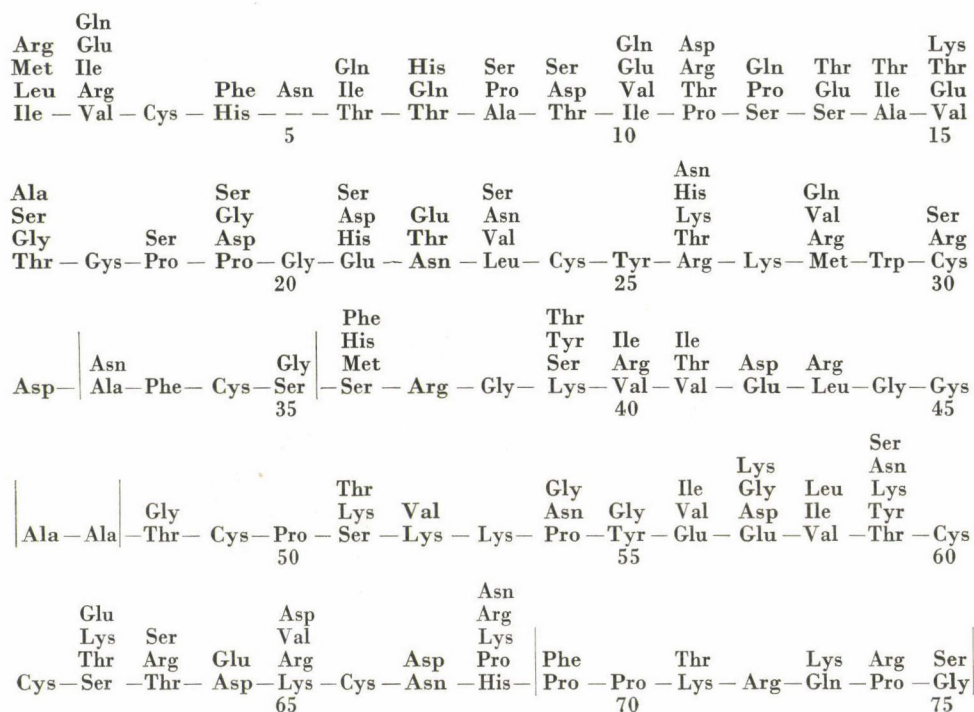


2. ábra. Izolált patkánydiafragmából izomrost véglemez. A, C, ^{125}J -dal jelölt alfa-bungarotoxin kötés autoradiografiával. B, D, Acetilkolinészteráz festés bungarotoxin kezelés után (FAMBROUGH és mtsai 1972)

kulánként. A DFP (diizopropilfluorofoszfát) és bungarotoxin kötőhelyek elhelyezkedéséből a véglemezen arra következtetnek, hogy az acetilkolinészteráz és acetilkolin receptor sűrűn egymás mellett mozaikszerűen helyezkednek el.

Kínai kutatók állapították meg először, hogy egy formosai kígyó mérge (*Bungarus multicinctus*) gátolja a neuromuskuláris transzmissziót azáltal, hogy megakadályozza, hogy az acetilkolin a receptorhoz kapcsolódjon (CHANG, LEE és mtsai 1963). 1971-ben MILEDI és POTTER közölték, hogy a kígyóméregből tisztított 12 polipeptid közül a legnagyobb mennyiségben előforduló (az összfehérje 20–25%-a), egy 8.000 ms. bázikus polipeptid hatásában megegyezik a CHANG és LEE által leírt alfa-bungarotoxinnal. Később meg-

állapították a 74 aminosavból álló alfa-bungarotoxin aminosavszekvenciáját, majd több hasonló hatású kígyómérget (*Naja naja*, *Naja nivea*, *Naja nigricollis*) és megállapították, hogy aminosav szekvenciájuk hasonló (3. ábra, MEBS és mtsai 1972). A legtöbb hasonlóságot az alfa-bungarotoxin és a *Naja nivea* alfa toxinja között találták (50% homológ szekvencia).

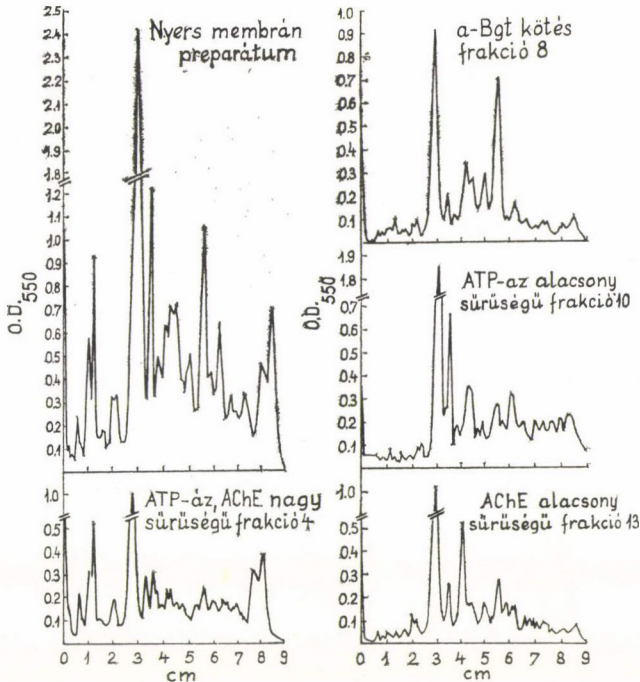


3. ábra. Alfa-Bungarotoxin aminosavszekvenciája az alsó sorban (1–75-ig), a helyettesítések a felső sorokban a következő tíz toxinban fordulnak elő: erabutoxin a és b *Laticauda semifasciata*-ból; alfa toxin *Naja nigricollis*-ből; kobratoxin *Naja naja* atrából; alfa toxin *Naja hajeb*-ből; alfa, béta és gamma toxin *Naja nivea*-ből; toxin II és IV *Haemachatus haemachatus*-ból (MEBS és mtsai 1972)

Az acetilkolin receptor tisztításánál az első lépés egy olyan szubcelluláris membrán frakció tisztítása volt *Electrophorus electricus*-ból, amely szinaptikus membránban gazdag. Ebből szaharóz gradiensen az ACHE (acetilkolinesteráz) és az ACHR (acetilkolinreceptor) egymástól elválasztható (DUGUID és RAFTERY 1973 a és b). E tisztított receptor aktivitás 75 pM ACHR kötőhely/mg fehérje volt. Torpedo halnál, ahol a szinapszis sűrűség nagyobb, 2000 pM toxinkötőhely/mg fehérje tisztaságú volt a receptor. Szerzők ennél is tisztább frakciót állítottak elő *Torpedo californicum*-ból kontinuos szaharóz sűrűségi gradienst használva ultracentrifugálással. Az SDS (Na-

dodecilsulfát) poliakrilamid gélelfóval nyert fehérje frakciók profiljában az ACHE és az ATP (adenozintrifoszfát)-az jól elkülönülnek az ACHR-től (4. ábra).

A kolinerg agonisták kötését három módszerrel határozták meg: egyensúly (ekvilibrium) dialízissel, egy másik liganddal való kompetícióval és retardációs módszerrel (toxinkötés késleltetése). Electrophorus membrán-



4. ábra. *Torpedo californica*ból készített szukróz gradiens frakciók (4, 8, 10, 13) és membránfrakció 1%-os SDS (Na-dodecilsulfát)-ben szolubilizálva és poliakrilamid gélen alfa bungarotoxin jelenlétében futtatva. Komasszi-kékkel festve és denzitometráva. Bungarotoxin feldúsulás egy csúcsban (DUGUID és RAFTERY 1973 b)

fragmentumokban a kompetíciós és a retardációs módszerrel az intakt sejtekhez és a membrán vezikulumokhoz közelálló K_{app} (látszólagos konstans) értékeket kaptak. Az ekvilibrium dialízissel mért disszociációs konstansok különböztek a K_{app} -tól, annál jóval magasabb és alacsonyabb értékek is előfordultak (I. Tábl.). Az egyes módszerek közötti különbségek abból is adódnak, hogy a készítmények ACHE-t is tartalmaznak még és a ligandok egy része oda is kötődik, míg a bungarotoxin szelektíven csak a receptorhoz kötődik. *Electrophorus electricus*ból olyan vezikuláris membránfrakciót készítettek (homogén és diszkontinuus szaharóz sűrűségi gradiensen való centrifugálással), amelyet $^{22}\text{Na}^+$ -val jeleztek belülről. Azt találták, hogy a Na^+

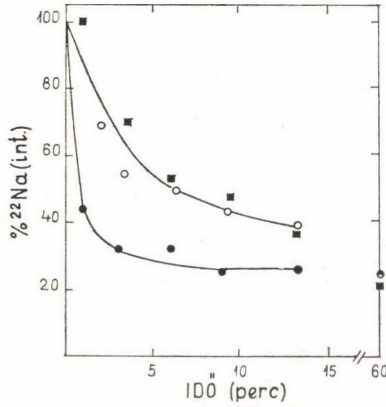
kiáramlása a vezikulákból gyorsabb kolinerg aktivátorok jelenlétében és ezt kompetitíve gátolják a kigyó toxinok. Ebben az esetben a K_{app} jól meg-
egyezett a mért értékekkel (KASAI és CHANGEUX 1971). Legújabbán
MICHAELSON és mtsainak (1974) sikerült *Torpedo californica*-ból tisztított
ACHR-ral foszfolipidek hozzáadására a fentiekhez mindenben hasonló vezi-
kulákat előállítani (5. ábra). A tisztított receptor ms-a 250 000 volt és
40 000-es alegységen kívül 50 000 és 60 000-es alegységeket is tartalmazott.

I. táblázat
Kolinerg ligandok disszociációs konstansai (μM)

Módszer	ACH	CARB	PTA	DECA	NIC	+TC	HEXA
<i>Electrophorus electrophax</i>							
I	3	30	12	1,2		0,16	30
<i>Electrophorus membrán</i>							
II				0,0025 0,055 2,5 100	0,06	0,08 40	
III		40		1,3		0,2	
IV		22		0,8		0,17	61
<i>Electrophorus-ból szolubilizált ACHR</i>							
III		2	1,2	0,02		0,4	62
IV	1	20				0,1	70
<i>Torpedo membrán</i>							
II	0,008 0,068			0,13 0,59 8	0,2 2,5	0,04 1,0	
III				0,7		0,2	
IV	0,008	0,5			0,8		40
IV		5				5	
<i>Torpedo-ból szolubilizált ACHR</i>							
II	0,0014 0,22						
II	2,3			55		6,4	
IV		50				5	

ACH = acetilkolin
 CARB = karbamilkolin
 PTA = feniltrimetilammonium
 DECA = dekametonium
 NIC = nikotin
 + TC = tubokurarin
 HEXA = hexametonium

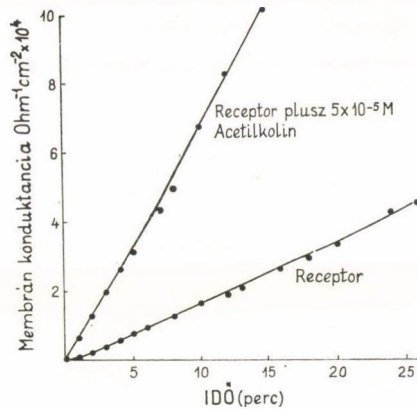
I. dózis-hatásgörbe; II. egyensúlyi dialízis
 III. dekametoniummal történő kompetíció
 IV. toxin kötés lelassítása



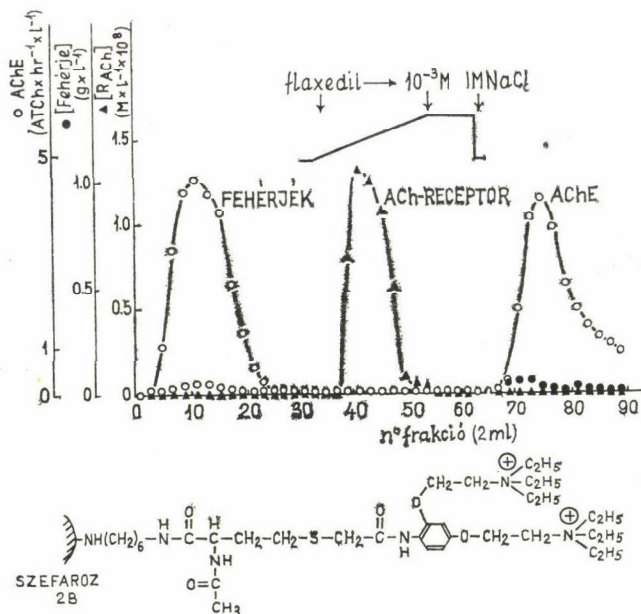
5. ábra. ^{22}Na kiáramlás rekonstituált, tisztított acetilkolin receptor-lipid vezikulákból. \circ --- \circ 200 mM NaCl, 10 mM Trisz pH 7,4 jelenlétében mért kiáramlás, \bullet --- \bullet + 100 μM karbamilkolin; \blacksquare --- \blacksquare 100 μM karbamilkolin + alfa bungarotoxin, háromszoros túlsúlyban (MICHAELSON és RAFTERY 1974)

A receptor fehérje tisztításának egyik lépése a membránból való kioldás. Erre a célra elsősorban nem ionos detergenset alkalmaztak (Triton-X-100) vagy dezoxikolátot. A receptor fehérje meghatározási módszere a megkötött ^3H -val vagy ^{125}J -al jelölt bungarotoxin mérésén, vagy más toxin megkötésén alapult, vagyis a tisztított rendszeren önmagában az effektus mérése többé már nem volt lehetséges.

DE ROBERTIS és mtsai a fentiektől eltérő módszereket (1971) alkalmazott; az Electrophorus és Torpedo elektromos szervet kloroform-metanolos eleggyel vonta ki és a kivonathoz kolinerg ligandokat adott (tubokurarin, hexametonium, acetilkolin). A keveréket egy lipofil Sephadex oszlopra viszik fel (Sephadex LH-20) és kloroform, kloroform-metanolos eleggyel



6. ábra. Konduktancia fokozódása tisztított acetilkolin receptor és lipid jelenlétében O.I M KCl-ban, a fehérje koncentráció 4,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ az egyik oldalon (KEMP és mtsai 1973)



7. ábra. *Electrophorus electricus* elektromos szervéből készített Triton-X-100-as kivonat kromatográfiája CT 5263-as oszlopon. A membránfrakciók elúciós profilja látható Flaxedil gradiens elúcióval (OLSEN és mtsai 1972)

mosva olyan proteolipid csúcsot kaptak, mely a ligandokat tartalmazta. Mesterséges fekete lipid filmekhez hozzátéve egy proteolipid frakciót konduktancia változásokat találtak. Hasonló eredményekre jutottak más módszert használva KEMP és mtsai (1973), (6. ábra). LEVINSON és KEYNES (1972) szerint a proteolipid műtermék. Ennek műtermék voltát később DE ROBERTIS-ék megcáfolták és eljárásukat a muszkarinos receptorok izolálására is kiterjesztették (BARRANTES 1974).

Electrophorusból 2000–4000-szeres tisztítást értek el 5–30%-os kitermeléssel ACHR fehérjére nézve (7. ábra, OLSEN és mtsai 1972, RAFTERY és mtsai 1971, MEUNIER és mtsai 1973), míg Torpedo elektromos szervéből csak 100–300-szoros tisztítást értek el, viszont az utóbbi kiindulási koncentrációja 10–15-szöröse az előbbinek (COHEN és mtsai, 1972; SCHMIDT és RAFTERY 1973). Mindegyik módszer fő lépése az affinitás kromatográfián alapszik (II. tábl.). A specifikusan jelölődő receptor fehérje 40 000 ms, ezenkívül még egy vagy több polipeptidet tartalmaz. E polipeptidek eredete nem tisztázott (valódi, vagy a tisztítás folyamán hozzákötött műtermék). Nem disszociálól enyhe detergensekben, vagy epesavakban az ACHR aggregátumot képez ms.-a kb. 300 000.

Az *Electrophorus* ACHR-ának szolubizálás utáni disszociációs konstansai egyes szerzők szerint azonosak a membránban mért konstansokkal,

II. táblázat

Acetilcolinreceptor tisztítás

Gel Ligand	Elució Ligand	Specifikus Aktivitás (μmol kötőhely/g fehérje)	Mol. súly SDS-PGE 10 ³ dalton
<i>Electrophorus</i>			
<i>N. naja</i> toxin	1 mM BENZ	7.5	42.54
<i>N. n. siam.</i> toxin	50 mM HEXA	11	160
<i>Torpedo</i>			
<i>N. n. siam.</i> toxin	CARB grad.	3.3, 7	
<i>N. n. siam.</i> toxin	1 M CARB	7.8	
		2.5	

SDS = Na-dodecilszulfát
 PGE = poliakrilamid gélelektroforézis
 BENZ = benzokinonium
 HEXA = hexamethonium

míg a Torpedo ACHR esetében alacsonyabb konstans értékeket mértek a membránban, mint az oldott receptorban. E mérések alapján, valamint a pozitív és negatív kooperativitást mutató, egymásnak részben ellentmondó adatok alapján több szerző leszögezi, hogy az S alakú dózis-hatás görbék valószínűleg nem a tisztított receptor allosztérikus sajátosságain alapulnak, hanem a receptorfehérje lipid kölcsönhatáson. (MEUNIER és CHANGEUX 1973, ELDEFRAWI és mtsai 1971, FRANKLIN és POTTER 1972, MOODY és mtsai 1973, CHANGEUX és PODLESKI 1968).

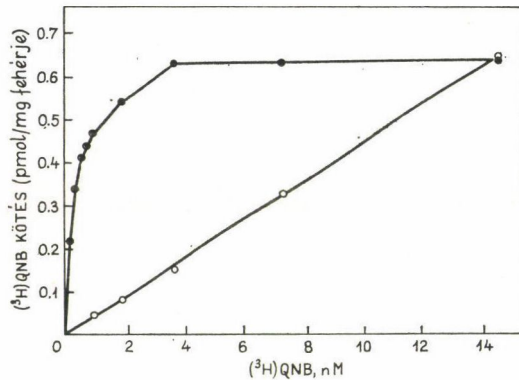
A nehézségeket még fokozza, hogy a toxinkötések száma nem egyezik a kis molekulásúlyú ligandkötések számával és tisztítás után is 2:1 az arányuk. Feltételezik ezért, hogy több a toxinkötőhely, mint a ligandkötő (MOODY és mtsai 1973, MEUNIER és CHANGEUX 1973).

A tisztított ACHR glikoprotein természetű és antitest termelésre is felhasználható. Az így keletkezett nyúl antiszérum az ACHR-hez kötődik specifikusan és meggátolja a ligandok kötését. Így kísérleti úton tüneteiben egy a myasthenia gravishoz hasonló betegséget sikerült létrehozni nyulakon, melyet fizosztigmin adagolással fel lehetett függeszteni (PATRICK és LINDSTRÖM 1973, HEILBRONN és MATTSON 1974). Ezért felvetik az acetilkolinreceptor szerepét bizonyos ideg-izomrendszeri megbetegedésekben.

Az acetilkolin muszkarinos receptorainak identifikálására lényegesen kevesebb kísérlet történt, mint a nikotinos receptorra vonatkozólag, ennek oka, hogy sokáig nem találtak olyan specifikus irreverzibilis gátlót, mely elég nagy affinitással rendelkezett volna. A karbamilkolin előnye az acetilkolin fölött, hogy ezt a kolineszteráz nem bontja, de a nikotinos receptorokat

ez is izgatja, míg a bethanechol nikotinerg, addig a pilokarpin és az arekolin muszkarinerg.

Először kézenfekvő volt, hogy a muszkaronnal, ill. atropinnal kísérleteztek, mely a muszkarinos receptorok specifikus agonistája, ill. antagonistája. E kísérleteknél azonban zavaró körülmény volt részben a nem specifikus kötődés, részben a viszonylag alacsony specifikus radioaktivitás. Újabban YAMAMURA és SNYDER (1974) egy erős muszkarin antagonistá vegyületet vizsgált a ^3H -3-quinuclidinyl-benzilát-ot (QNB), melynek disszociációs konstansa $6 \cdot 10^{-8}\text{M}$ volt tengeri malac agyban és $3 \cdot 10^{-8}\text{M}$ bélen vizsgálva. Az QNB-receptor kötés specifikusságát tengeri malac ileumon vizsgálták, ahol szoros összefüggést találtak a fiziológiai válasz és a QNB-kötés között. A specifikusan kötött QNB 2pM/mg fehérje volt. A QNB kötését az agyban autoradiográfiai vizsgálatokkal is igazolták (YAMAMURA és mtsai 1974) (8. ábra).



8. ábra. (^3H) QNB (3-quinuclidinyl-benzilát) specifikus \bullet - - - \bullet és nem specifikus \circ - - - \circ kötődése muszkarinerg kötőhelyekhez patkány agy homogenátumban (YAMAMURA és SNYDER 1974)

BURGEN és mtsai (1974) egy másik irreverzibilis muszkarinos kolinerg antagonistát a ^3H -propilbenzilkolin mustárt használták patkányagyban a muszkarinerg receptor kötéséhez.

Egyes muszkarinerg receptorokat azonban más oldalról is sikerült megközelíteni. 1970-ben GEORGE és mtsai megmérték patkányszívben acetilkolin perfúzió után a ciklikus 3',5' adenilsav (c-AMP) és ciklikus guanilsav (c-GMP) szintet és azt találták, hogy a c-GMP szint 140%-kal megnőtt, a c-AMP szint nem változott, vagy kissé csökkent.

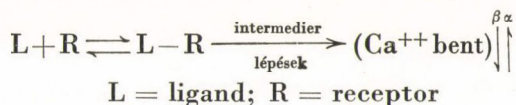
LEE, KUO és GREENGARD (1972), KUO és mtsai (1972), MURAD és mtsai (1962) és mások agyban, ganglion cervicale superiorban, szívben, trachea és hörgő simaizomszövetben (MURAD és mtsai 1974, GOLDBERG és mtsai 1973), vékonybélselejteken, uterusban (SCHULTZ és mtsai 1972, GOLDBERG

és mtsai 1973), ductus deferensben (SCHULTZ és mtsai 1973), pajzsmirigyben (CHAMPION és mtsai 1974), pankréaszban (YANASHITA és FIELD 1972), zsírszövetben, májszeleteken és limfocitákban HADDEN és mtsai (1972) számoltak be hasonló eredményekről. A hatásokat atropinnal ki lehetett védeni, hexametonium, vagy tubokurarin hatástalan volt. A guanilcikláz enzim, — mely a c-GMP szint növekedéséért felelős és hatására GTP-ből c-GMP és pirofoszfát keletkezik (GOLDBERG és mtsai 1973) — feltehetőleg a homogenizálás alatt leoldódik a membránról és centrifugálás után a felülúszóban helyezkedik el. Ezért a transzmitter hatások kimutatására nem olyan alkalmas, mint az adenilcikláz, melyről a továbbiakban még részletesen szólunk. Triton kezeléssel ugyan sikerült a membránról még egy látens kis mennyiségű partikuláris guanilcikláz enzim aktivitást leoldani, de hormon aktiválásra ez már nem volt érzékeny (KIMURA és MURAD 1974).

3. Az adrenerg receptorok

DALE (1906) volt az első, aki felismerte az ergot alkaloidák szimpatolitikus hatását és megállapította, hogy az ergot alkaloidák csak az adrenalin izgató (alfa-receptor) hatását gátolják, míg a gátló hatásokat nem érintik a sima izomban.

AHLQUIST (1948) az adrenerg receptorokat az agonisták effektusa és gátolhatósága alapján alfa és béta receptorokra osztotta. A szervezetben előforduló catekolaminok közül a noradrenalin és a dopamin elsősorban alfa receptorokra hat, míg az adrenalin inkább a béta receptorokra, de a noradrenalin és adrenalin hatása kevert típusú. A mesterségesen szintetizált analógok közül a fenilalkilaminok, pl. a feniletilamin csak az alfa, az izoproterenol csak a béta receptorokat izgatja. A hatás az alfa receptorok esetében túlnyomórészt izgató jellegű, pl. simaizom kontrakció (perifériás erekben, pupillában, lépben, hajszálemelő izomban, pislogó hártyában, méhizomban) kivételt képez a bélizom, melyen elernyedés lép fel. A béta receptor izgatás általában a simaizomzat elernyedését okozza (értágulás, hörgőtágulás, méhelernyedés, pislogóhártya és bélizomzat elernyedés), de a szív működést és a glikogenolízist fokozza. A simaizomzatban fellépő gátlást és ingerlést az intracelluláris Ca^{++} szint változással hozzák összefüggésbe, amiről még később szó lesz:

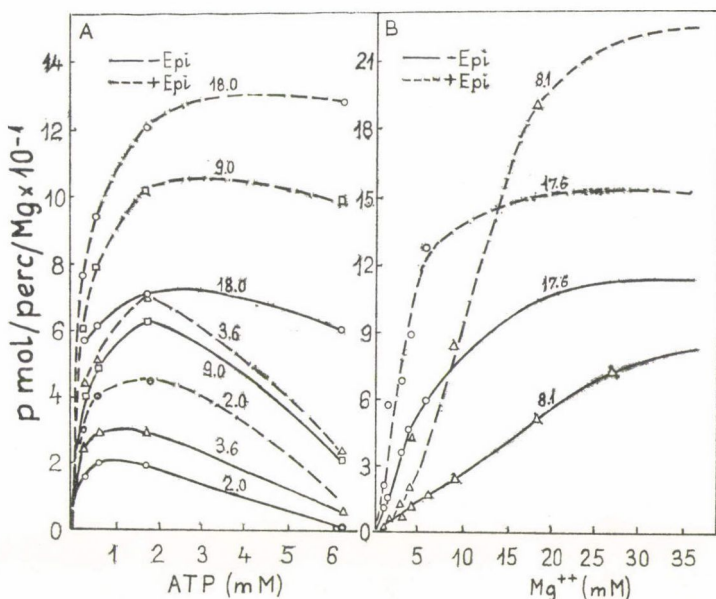


Az alfa és béta receptorok elkülönítése elsősorban specifikus blokkolószerekkel sikerült, ezek közül szelektív alfa-szimpatolitikumoknak bizonyult

az ergot alkaloidákon kívül a fentolamin (Regitin). A béta receptor blokkolók közül az első ismert hatású szer a DCI (diklórízoproterenol) volt, melynek hatását 1958-ban állapították meg (POWELL és SLATER), azóta a leggyakrabban használt szer a propranolol lett és a gyógyászatban elsősorban tachykardia megszüntetésére használják. LANDS és mtsai 1967-ben közölték, hogy a béta-receptorokon belül még meg lehet különböztetni β_1 és β_2 receptorokat. Az első csoportba tartoznak azok a szimpatomimetikus aminok, melyek a lipolizist és a szív működést fokozzák, a másodikba a hörgőtágulást és a simaizom ellazulást okozó receptorok tartoznak. A béta adrenerg receptorok biokémiai vizsgálatára akkor nyílt lehetőség, mikor ROBISON, BUTCHER és SUTHERLAND (1967) bebizonyították, hogy a béta-receptor izgatók az adenilciklázt aktiválják. Ezeket a vizsgálatokat májszeleteken végezték kezdetben, ahol az adrenalin és glukagon hatását vizsgálták a glikogenolizisre, melyekről ismert volt, hogy csak a béta receptorokon keresztül hatnak. Miközben ezeket a hatásokat homogenátumokon vizsgálták, ill. sejtfrakciókra igyekeztek lokalizálni, jöttek rá arra, hogy a foszforiláz aktiválása nem közvetlenül ATP-n keresztül történik, hanem c-AMP-n keresztül és hogy az ATP átalakítását c-AMP-ve egy másik enzim, az adenilcikláz végzi, erre hat tulajdonképpen az adrenalin, ill. a glukagon. Ezt az enzimet, az adenilciklázt más szervekből is izolálták, még baktériumokból is, de természetesen nem mindenütt azonos anyagok aktiválják. Mi most csak a béta receptor izgatókkal stimulálható ciklázról foglalkozunk, mely mindenütt előfordul, ahol béta receptor hatás van, de ugyanabban a szervben, sőt sejtben is előfordulhat más hormonhatásra (pl. glukagon, hisztamin stb.), a cikláz aktiválás. Feltételezik, hogy itt a ciklázhoz több receptor alegység kapcsolódik.

Ahhoz, hogy a béta-receptor hatás molekuláris szinten magyarázható legyen, az adenilciklázra kifejtett hatás jó modellnek látszott, mivel a hatás pontosan mérhető az enzim aktivitás révén. Ehhez tudni kell még, hogy az adenilcikláz membránhoz kötött enzim és detergenssel kezelve általában elveszti hormon aktiválhatóságát és alapaktivitása megnő. Két alegységből áll az enzim, egy receptor (40—80 000 ms) és egy katalitikus (200—800 000 ms) alegységből. Az alegységek kapcsolata elég laza és tisztán még nem állították elő őket. Az alegységeket valószínűleg foszfolipidek kapcsolják egymáshoz. Az enzim optimális működéséhez ATP és Mg^{++} kell azonos arányban, ha bármelyik feleslegben van, gátlás lép fel. Kötött Ca^{++} jelenléte is szükséges, de kívülről hozzáadott Ca^{++} gátolja az enzim aktivitását. A katalitikus alegység működését NaF-al lehet aktiválni, ami egyben az ATP-ázét gátolja és így a szubsztrát mennyisége nem fogy el más reakciókban. Az enzim működését még a hozzáadott GTP (guanozintrifoszfát) is fokozza, ha az ATP feleslegben van. Az enzim adenzinimidodifoszfátot is használ szubsztrátként, melyet az ATP-áz nem képes lebontani.

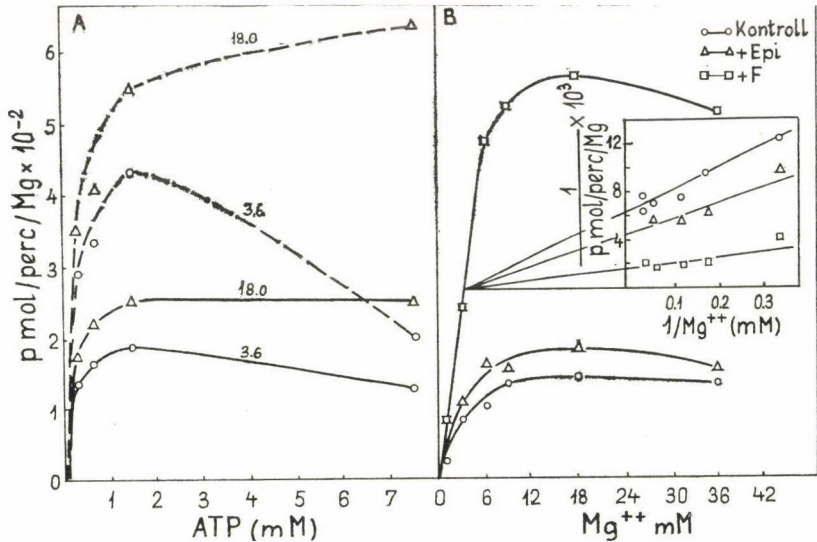
Az enzimkinetikai mérésekből, melyeket szívből, agyból, májból és izomból készült membrán preparátumból végeztek, a katekolaminok aktivitást fokozó hatását nem lehetett affinitás növekedéssel magyarázni. Az ATP koncentrációját változtatva adrenalin jelenlétében csak a V_{\max} (maximális sebesség) változott. Magas ATP koncentráció esetében az adrenalin növeli a Mg látszólagos affinitását (9. ábra, 10. ábra). Mindebből azt a következ-



9. ábra. Adrenalin (Epi) hatása a tengeri malacszív adenilcikláz aktivitására. A. ATP koncentráció hatása néhány rögzített Mg^{++} koncentrációnál adrenalin távollétében (—) és jelenlétében ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) (---). A görbéken levő számok a Mg^{++} koncentrációját tüntetik fel (2,0—18,0) mM-ban. B. Mg^{++} hatása két rögzített ATP koncentráció mellett adrenalin jelenlétében és távollétében (DRUMMOND és mtsai 1971). A mosott partikuláris frakció mennyisége mg-ban van megadva = 287 μg fehérje

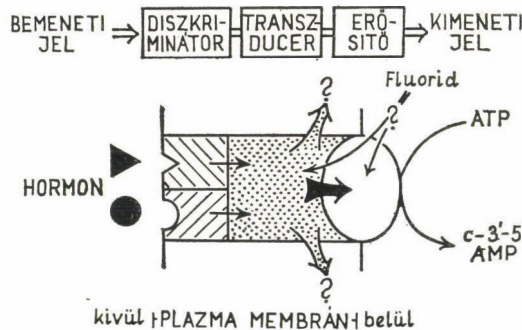
tetést vonta le DRUMMOND (1970 és 1971), hogy pozitív V rendszerű allosztériáról van szó, ahol a Menten—Michaelis konstans (K_m) nem változik, csak a reakció sebessége. Ebben az esetben azonban a tisztított aktív alakot még nem állították elő. Feltételezik, hogy a guanin nukleotidok a valódi regulátorok, ezek az enzim regulátor helyéhez kötődnek és növelik a katekolaminok affinitását az enzimhez. (RODBELL és mtsai 1974, 11. ábra).

A katekolaminok adenilcikláz aktiválásának mérése jobb tesztnek bizonyult a valódi béta-receptor aktivitás meghatározásánál, mint a béta-receptorhoz való kötés vizsgálata, mivel a béta-receptor tiszta alakban nem áll rendelkezésre és a kötési kísérletek kivétel nélkül nem specifikus vagy irreverzibilis kötésekről számolnak be. Pld. a szív esetében a megkötött fehérje



10. ábra. ATP, Mg⁺⁺, F⁻ és adrenalin (Epi) hatása patkányúrs adenilcikláz aktivitására. A. ATP koncentráció és két rögzített Mg koncentráció hatása 8mM F⁻ jelenlétében ——— és távollétében ———. B. Mg⁺⁺ koncentráció változás hatása □——□ 8mM F⁻; △——△ 5 × 10⁻⁵M adrenalin; ○——○ kontroll (0,6 mM ATP jelenlétében) (DRUMMOND és mtsai 1971). A mosott partikuláris frakció mennyisége mg-ban van megadva = 282 μg fehérje

ADENIL CIKLÁZ



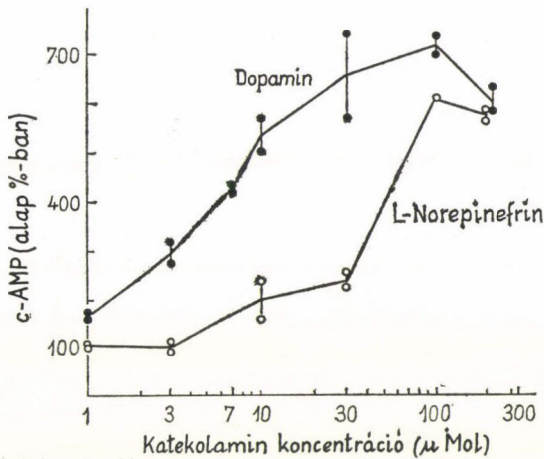
11. ábra. Az adenilcikláz modellje BIRNBAUMER és mtsai (1970) alapján. Discriminator = receptor fehérje a membrán külső felszínén. Transducer = foszfolipidek a membrán belsejében. Amplifier = adenilcikláz katalitikus alegysége a membrán belső felszínén felerősíti a hormon hatását

COMT(katekol-O-metiltranszferáz) volt és nem volt sztereospecifikus, a kötést csak sósavval vagy p-Cl-merkuribenzoáttal lehetett felfüggeszteni (LEFKOWITZ és mtsai 1972, 1974, CUATRECASAS és mtsai 1974).

A viszonylag legtisztább béta-receptort pulyka vörös vértest ghostokból tisztították (BILEZKIAN és AUERBACH 1973). Ez a receptor sztereospecifikus volt, de az adenilcikláz szolubilizálás után a hormon aktiválhatósága itt is

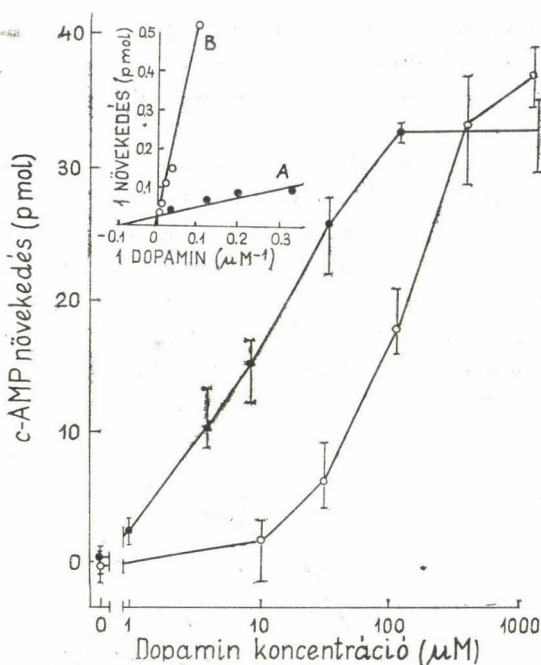
megszűnt és csak a specifikus kötés maradt meg a receptorhoz. A katekolaminok fiziológiai hatása egyébként (a Na és K transzport fokozása) intakt vörös vértesteken itt is alacsonyabb koncentrációnál következik be (10^{-8} M), mint a ghostoknál (10^{-6} M).

Mivel az adrenerg adenilcikláz aktiválhatóság nem egyforma a különböző szervekben, röviden összefoglaljuk a különböző szervek sajátosságait. A legnagyobb aktivitás az idegrendszerben található. Itt az adrenerg receptorok és az adenilcikláz aktiválhatóság egyaránt alfa és béta kevert típusú, mivel mind a propranolollal, mind fentolaminnal gátolható a noradrenalin, csak propranolollal az isoproterenol és fentolaminnal, valamint dopamin receptor gátlókkal (flufenazin és haloperidol) a dopamin aktiváló hatása (GREENGARD és mtsai 1972, 12. ábra, 13. ábra).



12. ábra. Dopamin és l-norepinefrin c-AMP szintet növelő hatása marha ganglion superior cervicaleből (GREENGARD és mtsai 1972)

A szív esetében, amivel már röviden foglalkoztunk, a béta-receptor aktiválás részben az izgathatóság sorrendjében, (izoproterenol, adrenalin, noradrenalin), részben a gátlás sorrendjében nyilvánul meg (Propranolol, DCI, Practolol). Fentolamin nem gátol, metoxamin és fenilefrin (alfa receptor izgatók) nem aktiválnak (III. táblázat). A béta-receptorokon belül pedig a béta₁ típus található (izoproterenol jobban fokoz, mint a hexoprenalin és szalubtamol, 14. ábra, WOLLEMANNS és mtsai 1974). A szív aminerg receptorok differenciálásában LEVEY (1971) az egyes foszfolipideknek is specifikus szerepet tulajdonít (a foszfatidilinozitolnak a béta-receptor, a foszfatidilszerinnek a glukagon és a hisztamin esetében), de ezt mások csak annyiban igazolták, hogy a savanyú foszfolipidek fokozzák a katekolaminok hatását az adenilciklázra, különösen a szolubilizálás után.



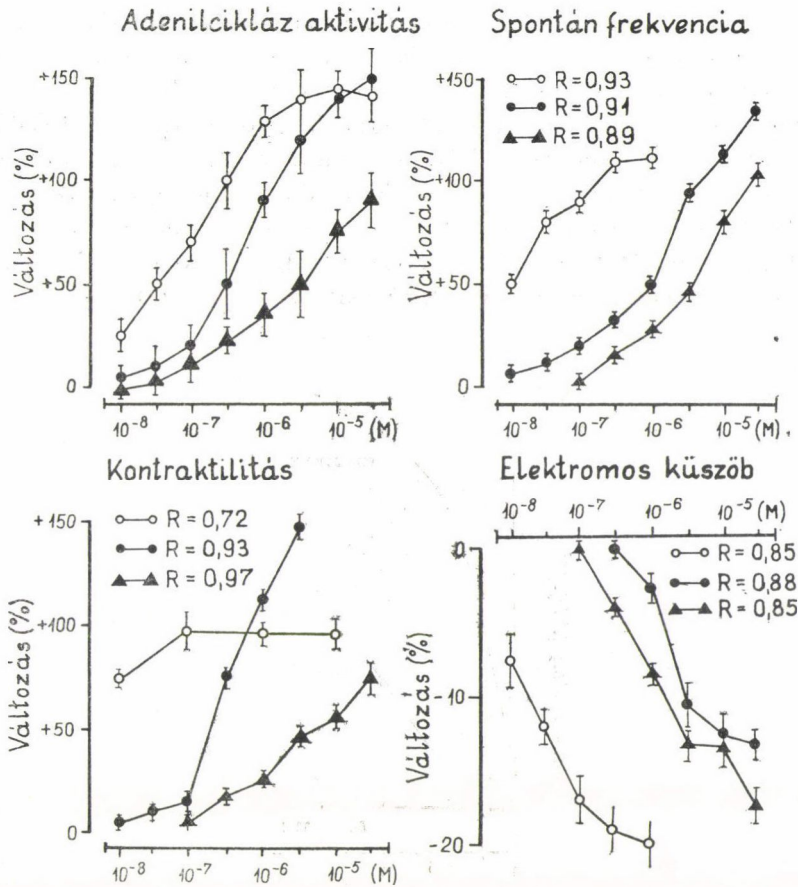
13. ábra. Különböző koncentrációjú dopamin hatása 0,1 µM flufenazin jelenlétében ○—○ és távollétében ●—● patkány nucleus caudatus adenilcikláz aktivitására (CLEMENS-CORMIER 1974)

III. táblázat

Izgatók és gátlók hatása a nyúlszív adenilcikláz aktivitására

Addicio	Kamra pmol c-AMP/mg protein/10 perc	Pitvar pmol c-AMP/mg protein/10 perc
Kontroll	958 ± 42	1330 ± 52
Izoproterenol 50 µM	1528 ± 72	1950 ± 43
Norepinefrin 50 µM	1473 ± 64	2000 ± 75
Hisztamin 50 µM	1640 ± 85	2420 ± 61
Glukagon 10 µM	1720 ± 52	2385 ± 78
Fenilefrin 50 µM	1030 ± 45	1410 ± 54
Metoxamin 50 µM	1100 ± 24	1460 ± 38
NaF 8mM	1980 ± 74	2570 ± 53
Propranolol 50 µM	945 ± 29	1385 ± 47
Izoproterenol + Propranolol	962 ± 56	1325 ± 37
Norepinefrin + Propranolol	959 ± 43	1390 ± 52
Fentolamin 50 µM	963 ± 32	1317 ± 54
Izoproterenol + Fentolamin	1497 ± 64	1922 ± 38
Norepinefrin + Fentolamin	1420 ± 56	1890 ± 62

Minden érték 4 minta átlaga ± standard hiba (WOLLEMANN 1974).

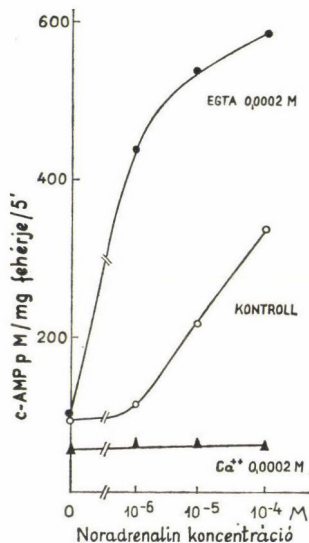


14. ábra. Az adenilcikláz stimuláló anyagok (béta₁ és béta₂ adrenerg receptor izgatók) hatása nyúl pitvar (WOLLEMANN és mtsai 1975) sejtmentes, partikuláris frakciójának enzim aktivitására. r = korrelációs koefficiens

Béta-receptor hatást mutattak ki még adenilcikláz aktivitás méréssel zsírszövetből (RODBELL 1967) és májból, (MURAD és mtsai 1962), tüdőből (KLAINER és mtsai 1962), pajzsmirigyből (WOLFF és JONES 1971), parotiból (BDOLAH és SCHRAMM 1965). A tüdőben lévő bronchus sima izom és az erek sima izma LANDS és mtsainak (1968) vizsgálatai alapján az ún. beta₂receptorokat tartalmazza, melyek abban különböznek a szív- és zsírszövet beta₁-receptoroktól, hogy izoproterenolra érzékenyebbek és gátolhatóságuk praktolollal és butoxaminnal, melyek specifikus beta₁, ill. beta₂ receptor gátlók különböző (WOLLEMANN és mtsai 1975).

Az alfa receptorok molekuláris mechanizmusáról sokkal kevesebbet tudunk, mint a béta receptorokról. ROBISON és mtsai (1967) feltételezték, hogy gátolják az adenilcikláz, de ezt nem sikerült igazolni, sőt agyban akti-

válják a ciklázt. Újabban feltételezik, hogy az adrenalin a Ca^{++} helyére kötődik a sejtben és a felszabadult Ca^{++} K^{+} -ot szabadít fel. BATZRI és SELINGER (1973) parotis szeletekben végeztek ilyen kísérleteket. A K^{+} felszabadulást Ca^{++} -mal is el lehetett érni és gátolni lehetett EGTA-val (etilénglikol-bis-(beta-aminoetiléter)-N, N,-tetraecetsav), vagy a noradrenalin hatást fentolaminnal. EGTA hozzáadása szív adenilciklázhhoz ugyanakkor növeli az adrenalin hatását a cikláza (15. ábra), ezt egyesek a nem specifikus receptorkötés gátlásával (PAIRAULT és LAUDAT 1975), mások a foszfodieszteráz aktiválásának gátlásával magyarázzák (KAKIUCHI és mtsai 1973).

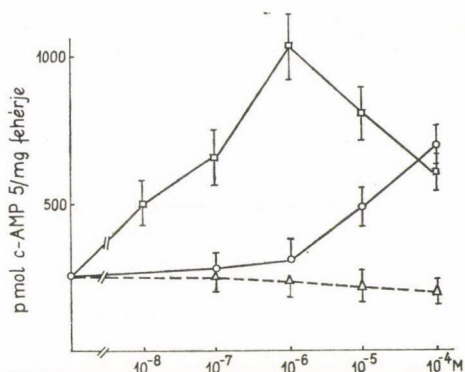


15. ábra. Ca^{2+} és EGTA szerepe patkányszív adenilcikláz működésében. NA = noradrenalin

Az adrenerg receptoroknál még egy problémára kell kitérni; ez a béta receptorok átalakulása alfa receptorokká alacsony hőmérsékleten, amit SZENTIVÁNYI és KUNOS (1968) észleltek békaszívben. LEFKOWITZ és munkatársai megvizsgálták az adenilcikláz aktivitását magas és alacsony hőmérsékleten béka vörösvértetekben, zsírszövetben, valamint patkányszívben (békaszívben nem tudtak adenilcikláz aktivitást mérni). Kísérleteikben nem észleltek hirtelen változást a cikláz aktivitásban vagy aktiválásban a hőmérséklet változtatásával 15–25 °C között, úgy mint azt a Na^{+} K^{+} -ATP-áz aktivitásnál leírták. Újabban azonban RODBELL és mtsai (1974) máj adenilcikláznál fokozott aktiválást észleltek glukagonnal és guanil-5'-ilimidodifoszfáttal 30 és 37 °C között, holott a cikláz hőmérsékleti optimum 32 °C-nál van, míg az aktiválás optimumát 37 °C-on mérték.

4. Szerotoninerg és hisztaminerg receptorok

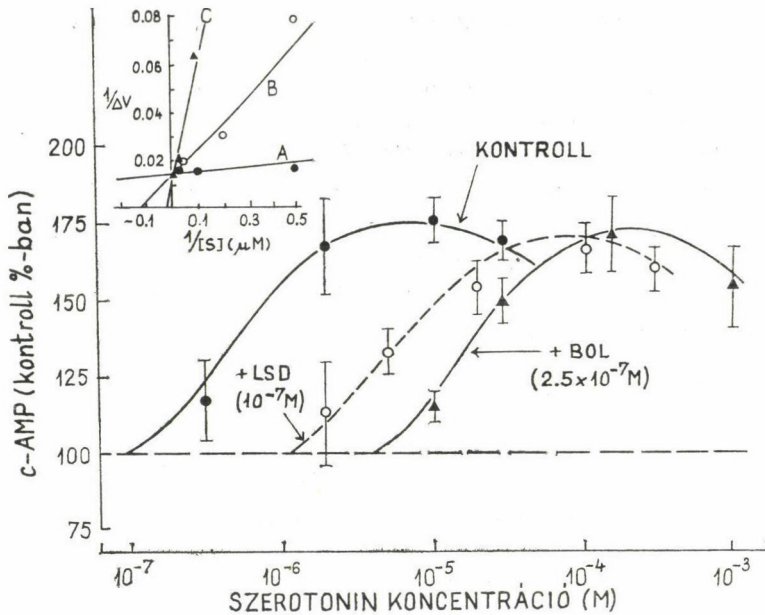
A szerotonin receptorokról már WOOLEY (1964) megállapította, hogy lipoproteid természetűek és gangliozidákat talált bennük. VAN HEYNINGEN és mtsai (1968) és CUATRECASAS (1973) megállapították, hogy a tetanus toxin és kolera toxin, valamint a szerotonin is különböző szialidáze érzékeny gangliozidokhoz kötődik. A kolera toxin, mint ismeretes, erősen fokozza a bél (SHARP és mtsai 1971) és pulyka vvt (FIELD 1974) adenilcikláz aktivitását. Fejlődő idegrendszerben, valamint (VON HUNGEN és mtsai 1974) gerinctelenek ganglionjaiban, pl. svábbogarak mellkasi dúcaiban (NATHANSON és GREENGARD 1974) és kagyló (16. ábra) és csigaszívben a szerotonin az adenilcikláz



16. ábra. Szerotonin, dopamin és noradrenalin hatása különböző koncentrációban kagylószív adenilcikláz aktivitására. □-----□ szerotonin, ○-----○ dopamin, △-----△ noradrenalin (WOLLEMANN és RÓZSA 1975)

aktivitását fokozza (WOLLEMANN és RÓZSA 1975) e hatásokat specifikus antagonisták kivédik (LSD) lizergsavdiethylamid), BOL (bromolizergsavdiethylamid), metizergid, (17. ábra).

Az utolsó biogén amin, amiről még röviden meg kell emlékezni, a hisztamin, ami szintén az adenilcikláz aktiválásán keresztül hat elsősorban az idegrendszerben (PALMER és mtsai 1972), ahol a gliasejtek és a kapillárisok enzim aktivitását növeli (JOÓ és mtsai 1975), a tüdőben (POLSON és mtsai 1974), a szívben, a gyomorban (MC NEIL és mtsai 1972, 1974) és a fehérvérsejtekben (BOURNE és mtsai 1974). A szívben, ill. a gyomorban lévő receptorokat H₂ néven emlegetik, a tüdőben és a fehérvérsejtekben H₁ receptorokat írnak le, míg az agyban újabban kevert receptorokról írnak. A két receptort egymástól megfelelő blokkoló szerekkel különítik el (BLACK és mtsai 1972). A H₁ receptorokat difenilhidraminnal, klórfeniraminnal és prometazinnal lehet gátolni, míg a H₂ receptorokat burimamiddal és metiamiddal. Újabban azt is közölték, hogy tüdőben a hisztamin a guanilcikláz is aktiválja.

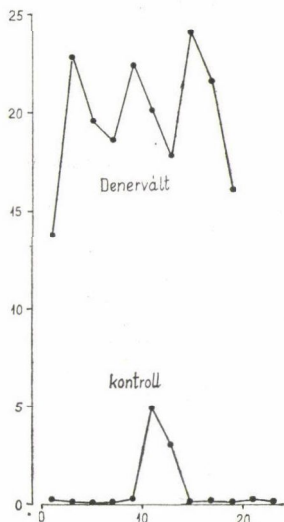


17. ábra. Szerotonin, LSD és BOL hatása *Periplaneta americana* mellkasi dúcának adenilcikláz aktivitására. LSD $1.10 \cdot 10^{-7} M$, BOL $2.5 \cdot 10^{-7} M$. (NATHANSON és GREENGARD 1974)

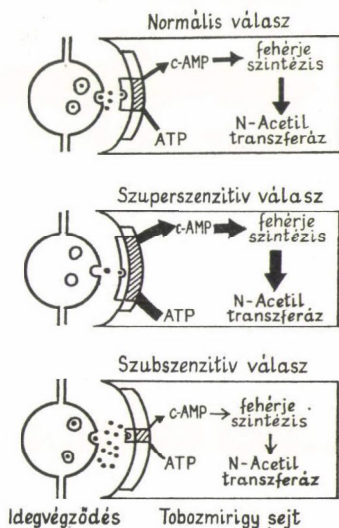
5. Szenzitizálás, deszenzitizálás és modellek

Utoljára hagytam a biogén aminoknak egy olyan sajátosságát, mely valamennyire jellemző, ti. a szenzitizálást és deszenzitizálást. Ez azt jelenti, hogy ha valamilyen okból a transzmitterek fiziológiai szintje csökken, pl. denerválás következtében, ami lehet idegmetszés (MILEDI és POTTER 1971, 18. ábra), vagy kémiai denerválás, ill. depletálás (CHAMPLAIN és mtsa 1971, AXELROD 1974; 19. ábra) (6-hidroxi-dopamin v. rezerpin) a katekolaminok esetében (WOLLEMAN 1975). Ilyenkor a receptorok érzékenysége megnő, ha pedig a transzmitter szint a normális szint fölé emelkedik, akkor az érzékenységük csökken. Ez a dózis-hatásgörbéből is jól látható. Ezekből a vizsgálatokból és az ontogenezis folyamán fellépő adenilcikláz alapaktivitás növekedéséből, majd csökkenéséből (kezdetben az alapaktivitás viszonylag magas, de hormonokkal nem aktiválható, később csökken, de aktiválható), valamint a szolubizálás utáni aktivitás emelkedéséből (PALMER és mtsai 1972, VON HUNGEN és mtsai 1974, LEVEY 1971.) azt a következtetést lehet levonni, hogy az adenilcikláz normálisan gátolt állapotban van és a hormon derepresszálja az enzimet azáltal, hogy a receptorhoz kötődve az enzimaktivitás gátlása megszűnik (WOLLEMAN 1975). A modell lényegében azonos a protein-kináz modellel, ahol a c-AMP kötődik a receptor alegységhez, ami az enzimről

ledisszociál és az enzim ezáltal aktiválódik (RAMSEYER és mtsai 1974). Hogy ez a hatásmód erre és a többi receptorra mennyiben érvényes, azt a jövő vizsgálatai mutatják meg majd.



18. ábra. Kötött bungarotoxin megoszlása normális és denervált izomrostok mentén patkány diafragmából. Az ordinátán a kötött izotóp toxin van feltüntetve (2 mm szegmens) d.p.m. $\times 10^{-3}$, az abszcisszán a központi intől való távolság mm-ben (MILEDI és POTTER 1971)



19. ábra. A receptor szubszenzitív és szuperszenzitív válaszáinak lehetséges mechanizmusa tobozmirigyben. Csökkent mennyiségű katekolaminnak az idegvégződésből történő felszabadulása után a receptor érzékenysége megnő, fokozott kiürítésnél pedig csökken (AXELROD 1974)

IRODALOM

1. AHLQUIST, R. P.: *J. Physiol.* **153**, 586 (1948).
2. AXELROD, J.: *Science* **184**, 1341 (1974).
3. BARRANTES, F. J., ARBILLA, S., DE CARLIN, M. C. L., DE ROBERTIS, E.: *BBRC* **63**, 194 (1974).
4. BATZRI, S., SELINGER, Z.: *J. Biol. Chem.* **248**, 356 (1973).
5. BDOLAH, A., SCHRAMM, M.: *BBRC* **18**, 452 (1965).
6. BILEZIKIAN, J. P., AURBACH, G. D.: *J. Biol. Chem.* **248**, 5577 (1973).
7. BIRNBAUMER, L., POHL, S. L., KRANS, M. L., RODBELL, M.: *Adv. in Biochem. Psychopharmacol.* **3**, 185 (1970).
8. BLACK, J. W., DUNCAN, W. A. M., DURANT, C. J., GANELLIN, C. R., PARSONS, E. M.: *Nature* **236**, 385 (1972).
9. BOURGEOIS, J. P., RYTER, A., MENEZ, A., FROMAGEOT, P., BOQUET, P., CHANGEUX, J. P.: *FEBS Letters* **25**, 127 (1972).
10. BOURNE, H. R., LICHTENSTEIN, L. M., MELMON, K. L., HENNEY, C. S., WEINSTEIN, Y., SHEARER, G. M.: *Science* **184**, 19 (1974).
11. BURGEN, A. S. V., HILEY, C. R., YOUNG, J. I.: *Br. J. Pharmacol.* **51**, 279 (1974).
12. CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J.: *Nature* **249**, 258 (1974).
13. CHAMPION, S., HAYE, B., JACQUEMIN, C.: *FEBS Letters* **46**, 289 (1974).
14. CHAMPLAIN, J., NEDAUE, R.: *Fed. Proc.* **30**, 877 (1971).
15. CHANG, C. C., LEE, C. Y.: *Arch. Intern. Pharmacodyn.* **144**, 241 (1963).
16. CHANGEUX, J. P., PODLESKI, T. R.: *PNAS* **59**, 944 (1968).
17. CLARK, A. J.: *Mode of Action of Drugs on Cells*. Arnold, London (1933).
18. CLEMENT-CORMIER, Y. C., KEBABIAN, J. W., PETZOLD, G. R., GREENGARD, P.: *PNAS* **71**, 1113 (1974).
19. COHEN, J. B., WEBER, M., HUCHET, M., CHANGEUX, J. P.: *FEBS Letters* **26**, 43 (1972).
20. CUATRECASAS, P.: *Biochem.* **12**, 3558 (1973).
21. CUATRECASAS, P., TELL, G. P. E., SICA, V., PARIKH, I., CHANG, K. J.: *Nature* **247**, 92 (1974).
22. DALE, H. H.: *J. Physiol.* **34**, 163 (1906).
23. DE ROBERTIS, E.: *Science* **171**, 963 (1971).
24. DRUMMOND, G. I., DUNCAN, L.: *J. Biol. Chem.* **245**, 976 (1970).
25. DRUMMOND, G. I., SEVERSON, D. L., DUNCAN, L.: *J. Biol. Chem.* **246**, 4166 (1971).
26. DUGUID, J. R., RAFTERY, M. A.: *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 512 (1973a).
27. DUGUID, J. R., RAFTERY, M. A.: *Biochemistry* **12**, 3593 (1973b).
28. ELDEFRAWI, M. E., ELDEFRAWI, A.T., O'BRIEN, R. D.: *PNAS* **68**, 1047 (1971).
29. EHRLICH, P.: *Collected Papers* **3**, 183 (1960).
30. FAMBROUGH, D. M., HARTZELL, H. C.: *Science* **176**, 189 (1972).
31. FIELD, M.: *PNAS* **71**, 3299 (1974).
32. FRANKLIN, G. J., POTTER, L. T.: *FEBS Letters* **28**, 101 (1972).
33. GEORGE, W. J., POLSON, J. B., O'TOOLE, A. G., GOLDBERG, N. D.: **66**, 398 (1970).
34. GOLDBERG, N. D., O'DEA, R. F., HADDOX, M. K.: *Adv. in Cyclic Nucl. Res.* **3**, 155 (1973).
35. GREENGARD, P., MCAFEE, D. A., KEBABIAN, J. W.: *Adv. in Cycl. Nucl. Res.* **1**, 337 (1972).
36. HADDEN, J. V., HADDEN, E. M., HADDOX, N. K., GOLDBERG, N. D.: *PNAS* **69**, 3024 (1972).
37. HEILBRONN, E., MATTSON, Ch.: *J. Neurochem.* **22**, 315 (1974).
38. VAN HEYNINGEN, W. E., MELLANBY, J.: *J. Gen. Microbiol.* **52**, 447 (1968).
39. VON HUNGEN, K., ROBERTS, S., HILL, D. F.: *J. Neurochem.* **22**, 811 (1974).
40. JOÓ, F., RAKONCZAY, Z., WOLLEMANN, M.: *Experientia* **31**, 582 (1975).
41. KAKIUCHI, S., YAMAZAKI, R., TESHIMA, Y., UENISHI, K.: *PNAS* **70**, 3526 (1973).
42. KARLIN, A., COWBURN, D. A.: *PNAS* **70**, 3636 (1973).
43. KARLIN, A.: *Fed. Proc.* **32**, 1847 (1973a).
44. KARLIN, A.: *Life Sci.* **14**, 385 (1974).
45. KASAI, M., CHANGEUX, J. P.: *J. Membr. Biol.* **6**, 1 (1971).
46. KEMP, G., DOLLY, J. O., BARNARD, E. A., WENNER, C. E.: *BBRC* **54**, 607 (1973).
47. KIMURA, H., MURAD, F.: *J. Biol. Chem.* **249**, 6910 (1974).
48. KLAINER, L. M., CHI, Y. M., FREIDBERG, S. L., RALL, T. W., SUTHERLAND, E. W.: *J. Biol. Chem.* **237**, 239 (1962).
49. KUNOS, G., SZENTIVÁNYI, M.: *Nature* **217**, 1077 (1968).
50. KUO, J. F., LEE, T. P., REYES, P. C., WALTON, R. G., DONNELLY, T. E. Jr. and GREENGARD, P.: *J. Biol. Chem.* **247**, 16 (1972).
51. LANDS, A. M., ARNOLD, A., MCAULIFF, J. P., LUDUENA, F. P., BROWN, T.: *Nature* **214**, 597 (1967).
52. LANGLEY, J. N.: *J. Physiol.* **33**, 374 (1905).

53. LEE, T. P., KUO, J. F., GREENGARD, P.: PNAS **69**, 3287 (1972).
54. LEFKOWITZ, R. J.: BBRC **58**, 1110 (1974).
55. LEFKOWITZ, R. J., HABER, E., O'HARA, D.: PNAS **69**, 2828 (1972)
56. LEVEY, G. S.: BBRC **43**, 108 (1971).
57. LEVINSON, S. R., KEYNES, R. D.: BBA **288**, 241, (1972).
58. MC NEILL, J. H., MUSCHEK, L. D.: J. Mol. Cell. Card. **4**, 611 (1972).
59. MC NEILL, J. H., VERMA, S. C.: Br. J. Pharmacol. **52**, 104 (1974).
60. MEBS, D., NARITA, K., IWANAGA, S., SAMEJIMA, Y., LEE, C. Y.: Hoppe-Seyler Zschr. f. physiol. Chem. **353**, 242 (1972).
61. MEUNIER, J. C., CHANGEUX, J. P.: FEBS Letters **32**, 143 (1973).
62. MICHAELSON, D., VANDLEN, R., BODE, J., MOODY, T., SCHMIDT, J. X., RAFTERY, M. A.: Arch. Biochem. Biophys. **165**, 796 (1974).
63. MILEDI, R., POTTER, L. T.: Nature **233** 599 (1971).
64. MOODY, T., SCHMIDT, J., RAFTERY, M. A.: BBRC **53**, 761 (1973).
65. MURAD, F., CHI, Y. M., RALL, T. W., SUTHERLAND, E. W.: J. Biol. Chem. **237**, 1233 (1962).
66. MURAD, F., KIMURA, H.: BBA **343**, 275 (1974).
67. NACHMANSOHN, D.: Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity, N. Y. Acad. Press. (1959).
68. NATHANSON, J. A., GREENGARD, P.: PNAS **71**, 797 (1974).
69. OLSEN, R. W., MEUNIER, J. C., CHANGEUX, J. P.: FEBS Letters **28**, 96 (1972).
70. PAIRAULT, J., LAUDAT, M. H.: FEBS Letters **50**, 61 (1975).
71. PALMER, G. C., SCHMIDT, M. J., ROBISON, G. A.: J. Neurochem. **19**, 2251 (1972).
72. PATRICK, J., LINDSTROM, J.: Science **180**, 871 (1973).
73. POLSON, I. B., KRZANOWSKI, J. J., SZENTIVÁNYI, A.: R. C. Chem. Path. Pharm. **9**, 243 (1974).
74. PORTER, C. W., CHIU, T. H., WIECKOWSKI, J., BARNARD, E. A.: Nature New Biol. **241**, 3 (1973).
75. POWELL, C. E., SLATER, I. H.: J. Pharm. Exp. Therap. **124**, 223 (1958).
76. RAFTERY, M. A., SCHMIDT, J., CLARK, D. G., WOLCOTT, R. G.: BBRC **45**, 1622 (1971).
77. RAMSEYER, J., KOSLOW, H. R., GILL, G. N.: BBRC **59**, 813 (1974).
78. ROBISON, G. A., BUTCHER, R. W., SUTHERLAND, E. W.: Ann. N. Y. Ac. Sci. **139**, 703 (1967).
79. RODBELL, M.: J. Biol. Chem. **239**, 375 (1964).
80. RODBELL, M., LIN, M. C., SALOMON, Y.: J. Biol. Chem. **249**, 259 (1974).
81. SCHMIDT, J., RAFTERY, M. A.: Biochemistry **12**, 852 (1973).
82. SCHULTZ, G., HARDMAN, J. G., SCHULTZ, K., DAVIS, J. Q., SUTHERLAND, E. W.: PNAS **70**, 1721 (1973).
83. SHARP, G. W. G., HYNIE, S.: Nature **229**, 266 (1971).
84. STALČ, A., ŽUPANČIČ, A. O.: 9th FEBS Meeting Abstracts Budapest (1974).
85. WOLFF, J., JONES, A. B.: J. Biol. Chem. **246**, 3939 (1971).
86. WOLLEMANN, M.: Adv. in Biochem. Psychopharm. **9**, 731 (1974).
87. WOLLEMANN, M.: 9th FEBS Meeting Abstracts, p. 203 Budapest (1974).
88. WOLLEMANN, M.: MTA Biol. Oszt. Közl. **18**, 261 (1975).
89. WOLLEMANN, M., BORBOLA, J. Jr., PAPP, J. Gy., SZEKERES, L.: J. Mol. Cell. Card. (1975). in press.
90. WOLLEMANN, M., RÓZSA, S. K.: Comp. Biochem. Physiol. **50c** (1975). in press.
91. WOOLEY, D. W.: Nature **202**, 1074 (1964).
92. YAMAMURA, H. J., SNYDER, S. H.: PNAS **71**, **59**, 944 (1968).
93. YANASHITA, K., FIELD, J. B. J. Biol. Chem. **247**, 7062 (1972).