

DELTA OPIOID RECEPTOROK JELLEMZÉSE

 $(^3\text{H})\text{D-ALA}^2\text{-LEU}^5\text{-ENKEFALINNAL PATKÁNY AGYBAN}$

Egyetemi doktori értekezés

Készítette: Benyhe Sándor

MTA Szegedi Biológiai Központ

Biokémiai Intézet

Szeged

1989

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	III
Rövidítések jegyzéke	IV
<u>1.</u> IRODALMI ÁTTEKINTÉS	
1.1 Bevezetés	1
1.2 Részletes irodalmi áttekintés	
1.2.1 Az opioid receptorok heterogenitása	1
1.2.2 Enkefalinok és enkefalin receptorok	9
1.2.3 Enkefalin szerkezet és opiát hatás összefüggései	17
1.3 Célkitűzés	20
<u>2.</u> ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	
2.1 Anyagok	22
2.2 Módszerek	
2.2.1 Membrán preparálás	22
2.2.2 Receptor kötés mérés	23
<u>3.</u> EREDMÉNYEK	
3.1 (³ H)DALE specifikus kötés mérése patkány agyi membrán preparátumban	25
3.1.1 Filter kötés meghatározása	25
3.1.2 Nem specifikus kötés	28
3.1.3 A specifikus kötés függése a szöveti fehérje koncentrációjától	29

3.2 A (^3H)DALE kötődés kinetikai jellemzése	
3.2.1 Asszociációs kinetika	29
3.2.2 Disszociációs kinetika	35
3.3 A (^3H)DALE kötődés koncentráció függése	40
3.4 Kationok és guanil nukleotidák hatása a (^3H)DALE kötődésére	
3.4.1 A (^3H)DALE kötődése kationok jelenlétében	43
3.4.2 A (^3H)DALE kötődése guanin nukleotidák jelenlétében	45
3.5 Opiátok és opioid peptidek hatása a (^3H)DALE kötődésére	50
3.5.1 Természetes és szintetikus opiátok hatása	53
3.5.2 Opioid peptidek hatása	53
3.6 Enkefalin klórmetil ketonok vizsgálata	57
3.6.1 Kompetíciós kísérletek	60
3.6.2 A klórmetil keton származékok irreverzibilitása	63
 4. MEGVITATÁS	
4.1 A (^3H)DALE kötődés jellemzői patkány agyi membrán preparátumban	70
4.2 A (^3H)DALE receptor kötési teszt alkalmazása szerkezet - hatás összefüggések vizsgálatában	74
 <u>5. ÖSSZEFOGLALÁS</u>	77
 5.1 A dolgozat alapjául szolgáló közlemények jegyzéke	78
 <u>6. IRODALOM</u>	79

Köszönetnyilvánítás

Az értekezésben ismertetett kísérleti munka a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központja Biokémiai Intézetében, az Opiát Receptor Munkacsoportban készült.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Wollemann Mária tudományos tanácsadónak, csoportvezetőmnek, aki munkámat lehetővé tette, mindvégig figyelemmel kísérte és támogatta. Köszönöm a dolgozat megírásával kapcsolatos észrevételeit és tanácsait is.

Az értekezés anyaga csoport munka része. Köszönöm csoportunk valamennyi tagjának, hogy elméleti és gyakorlati tanácsaikkal előrelendítették munkámat. Külön köszönet illeti Dr. Borsodi Annát, aki figyelmemet az opioid peptidek felé irányította és Dr. Szűcs Máriát, aki az alkalmazott módszerek elsajátításában nyújtott önzetlen segítséget.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Gulya Károlynak, az intézeti vita opponensének értékes tanácsaiért és bírálataiért.

Köszönöm Canjavec Béláné, Németh Józsefné, Papp Béláné és Szigethy Kálmánné asszisztensek lelkiismeretes munkáját, valamint Kaliczka Gabriellának és Borka Andrásnak az ábrák elkészítésében nyújtott segítségét.

Rövidítések jegyzéke

ACE	Angiotenzin konvertáló enzim
ACTH	Adrenokortikotróp hormon
ADH	Antidiuretikus hormon, vazopresszin
ADP	Adenozin difoszfát
ATP	Adenozin trifoszfát
$B_{\max}$	A ligandkötőhelyek maximális száma
CK	klórmetil keton (funkciós csoport)
cpm	beütésszám $\times \text{perc}^{-1}$
DALE	(D-Ala ² -Leu ⁵)enkefalin
DALECK	(D-Ala ² -Leu ⁵)enkefalin klórmetil keton
DADLE	(D-Ala ² -D-Leu ⁵)enkefalin
DADLECK	(D-Ala ² -D-Leu ⁵)enkefalin klórmetil keton
DAGO	(D-Ala ² -(Me)Phe ⁴ -Gly ⁵ -ol)enkefalin
DAMK	Tyr-D-Ala-Gly-(Me)Phe klórmetil keton
DPDPE	(D-Pen ² -D-Pen ⁵)enkefalin
DRG	csigolya közti dúc (dorsal root ganglion)
DSLET	(D-Ser ² -Thr ⁶)enkefalin
EKC	etilketociklazocin
FIT	fentanil izotiocianát
GPI	tengeri malac ileum
GppNHp	5'-guanililimidodifoszfát
GTP	guanozin trifoszfát
ICI	Imperial Chemical Industries
IC ₅₀	a specifikus kötés 50 %-os gátlásához szükséges ligandkoncentráció
K _d	disszociációs állandó
LE	Leucin enkefalin

LECK	Leucin enkefalin klórmetyl keton
Mel	Melfalán (aminósav)
MVD	egér vas deferens
MSH	melanofór hormon
Pen	bisz-penicillamin
POMC	pro-opio-melanokortin
RVD	patkány vas deferens
SEM, S.E.M.	a középérték standard hibája
SD, S.D.	korrigált szórás, standard deviáció
SDS	nátrium lauril-szulfát
TPCK	tozil-fenilalanin klórmetyl keton
TLCK	tozil-lizil-klórmetyl keton

1. I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

1.1 Bevezetés

A hetvenes években ismertté vált, hogy a morfin és a vele rokon kémiai struktúrák, amelyeket opiátoknak neveznek, receptor közvetített módon fejtik ki hatásaikat. Erre az időre tehető ugyanis az opiát receptorok létezését bizonyító, a receptor közvetlen radioaktív jelölésén alapuló technikák megjelenése (1-4). A természetes opioid peptidek, (enkefalinok, endorfinok és dinorfinok) felfedezésével pedig az opiát receptor endogén ligandjainak azonosítása történt meg, lényegében a biokémiai receptor mérési módszerek elterjedésével egy időben (5-10).

Ma már elfogadott, hogy az opiátok és az opioid peptidek sokféleségéből önmagában nem következik farmakológiai és biokémiai hatásaik sokfélesége. E hatások összetett jellege mögött az opioid receptor komplexitását is feltételeznünk kell. Ez a komplexitás a receptor altípusok, mű-, delta- és kappa receptorok létezésében nyilvánul meg (11-14).

Jelen munkánkban vizsgálni kívánjuk a patkány agyi opiát receptorok, elsősorban az enkefalinokat preferáltan kötő delta receptor altípus ligand kötési teszttel mérhető sajátosságait.

1.2 Részletes irodalmi áttekintés

1.2.1 Az opioid receptorok heterogenitása

Az opioid receptorok heterogenitására vonatkozó első adatokat

farmakológiai megfigyelések szolgáltatták. MARTIN és munkatársai krónikus spinális kutyákon végzett kísérleteikben természetes és szintetikus opiát agonisták egymástól lényegesen különböző hatásai alapján három receptor altípust különítettek el (11). A morfinra, illetve egyéb fenantrén vázas származékokra érzékeny receptor a mű elnevezést kapta. A mű receptor közvetíti az antinociceptív, analgetikus hatásokat, ingerülete kutyán hipotermiát, bradikardiát és pupillaszűkületet okoz.

A szintetikus benzomorfán vegyületcsalád ciklazocin származékait (ketociklazocin, bremazocin stb.) preferáló, ún. kappa receptor altípus szedatív hatásokat mediál, pupillatágulatot okoz változatlan pulzusfrekvencia mellett.

A harmadik opiát receptor fajta, a szigma receptor típusos agonistája az N-allil-normetazocin, stimulálása a mániára emlékeztető állapotot eredményez, a vegetatív funkciók közül pupillatágulat, tahipnoe és tachikardia jellemző. Mivel az N-allil-normetazocin hatásspektruma hasonló a dopaminerg agonista apomorfinéhoz, feltételezhető, hogy a szigma hatások nem kizárólagosan opioid jellegűek.

A mű, kappa és szigma receptor altípus egyaránt jellemezhető receptor kötési teszttel, a mű és kappa receptorok megkülönböztethetőek izolált szerv készítményeken is (12-22). Mindhárom receptor altípus működését gátolja az opiát antagonistá naloxon és a naltrexon, bár különböző mértékben. Mű-, kappa- és szigma hatású agonisták krónikus adagolása egyaránt drogfüggőség (tolerancia és dependencia) kialakulásához vezet. Ez utóbbi közös jellegzetességek miatt beszélhetünk egységesen opioid receptorokról, figyelembe véve különbözőségüket is.

A leucin- és a metionin-enkefalin felfedezése (6) után izoláltyszerv preparátumokon mutatott sajátosságai alapján KOSTERLITZ és munkatársai posztulálták az enkefalin szelektivitást mutató delta receptorokat, amelyeket később a központi idegrendszerben is kimutattak. Az enkefalinok ugyanis közel egy nagyságrenddel hatékonyabb opiát agonisták egér vas deferens (MVD) tesztben, mint tengerimalac ileum hosszanti simaizom (GPI) készítményen mérve (12). Az enkefalin hatás ugyanakkor naloxonnal jobban antagonizálható GPI-n, mint MVD-n. Mindkét biológiai teszt az elektromos ingerléssel kiváltott izomkontrakciók opiátokkal való gátolhatóságán alapul.

Patkány vas deferens (RVD) túlélő készítményen béta-endorfinra specifikus receptort írtak le, amelyet epszilon receptornak neveztek el (14).

Eltekintve a viszonylag kevésbé jellemzett szigma és epszilon altípusoktól, három, centrálisan és a periférián is megtalálható, vegetatív és viselkedési reflexek alapján tipizálható, izoláltyszerv készítményen és receptor kötési tesztben jellemzett opioid receptor altípust különíthetünk el, a μ , δ és κ receptorokat (I. táblázat).

A receptor kötési technika elterjedésével, magas fajlagos radioaktivitású ligandok használatával a receptorok biokémiai jellemzésére nyílt lehetőség. Receptor forrásként többnyire patkány, egér, tengerimalac, ritkábban sertés vagy marha agy homogenátumot, illetve különböző mértékig tisztított plazmamembrán preparátumot használtak. Az elsőként alkalmazott jelzett opiát ligandok a (^3H)dihidromorfin, a (^3H)naloxon és a (^3H)etorfin voltak (1,4,23,24), de hamarosan elkészültek a radioaktív enkefalin származékok is (12,13,23,25). A ^{14}C izotóppal jelzett vegyületek a kis fajlagos

I. táblázat

Az opioid receptorok felosztása

		Receptor altípus		
		mű	delta	kappa
Agonista prototípus	Morfin	Leu-enkefalin	Etilketociklazocin	
Szelektív agonista	DAGO	D-Pen ² -D-Pen ⁵ -enk.	U-50,488H	
	Morficeptin (Tyr-Pro-Phe-ProNH ₂)	DADLE DTLET	U-69,593	
	Szufentanil	Deltakefalin (DSLET)		
Antagonista	Naloxon	Naloxon	Naloxon	
Szelektív antagonistá	Naloxon-azin	ICI-154,129	MR-2266	
		ICI-174,864		
Endogén ligand	Béta-endorfin	Leu-enkefalin	Dinorfin-(1-13)	
Közvetített hatások	analgézia	stressz-analgézia	analgézia	
	eufória	letalitás	szedáció	
	katalepszia	hipotenzió	flexor reflex-gátlás	
	légzés gátlás	GH release	ADH release	
	Prolaktin release		pupillaszűkület	
	táplálkozás fokozása	leukocita kemotaxis		
Jellemző előfordulás	Nyúl kisagy	NG-108-15 sejtvonal	Nyúl nagyagy	
	Tengeri malac ileum	egér vas deferens	Nyúl vas deferens	
	Nyúl fülartéria		Kecskebéka agy	
			Tengeri malac kisagy	

aktivitás, a ^{125}J izotóp a gyors bomlás miatt nem terjedhetett el sugárforrásként. Trícium beépítésével viszont megfelelően stabil és nagy moláris radioaktivitású (20-80 Ci/mmol) ligandok készültek.

A tríciált opioidokkal végzett kísérletek igazolták, hogy a receptorok az opiát szenzitív neuronok plazmamembránjában lokalizálhatók. Szubcelluláris frakcionáláskor a kötött ligand a szinaptoszóma-, vagy szinaptikus plazmamembrán frakcióban dúsul fel (26-29), de van kötőkapacitása a mikroszóma frakciónak is (29-32).

Az opiát ligandok megkötődése a receptorokon szigorúan sztereospecifikus (1). A morfin és a morfinan vázas struktúrák jobbra forgató enantiomerjei (+ morfin, dextrorfán) farmakológiailag hatástalanok és a receptorhoz sem kötődnek.

Az opioid receptor protein természetét proteolitikus enzimekkel végzett inaktiválós kísérletekkel (33) és az aminosav oldalláncokat specifikusan módosító reagensek használatával (19) mutatták ki. A detergenssekkel szolubilizált opiát receptorok kötődnek lektinekhez (34), sőt wheat germ agglutinin (WGA) kromatográfiával tisztíthatók is, tehát a receptor, vagy valamelyik alegysége glikoprotein.

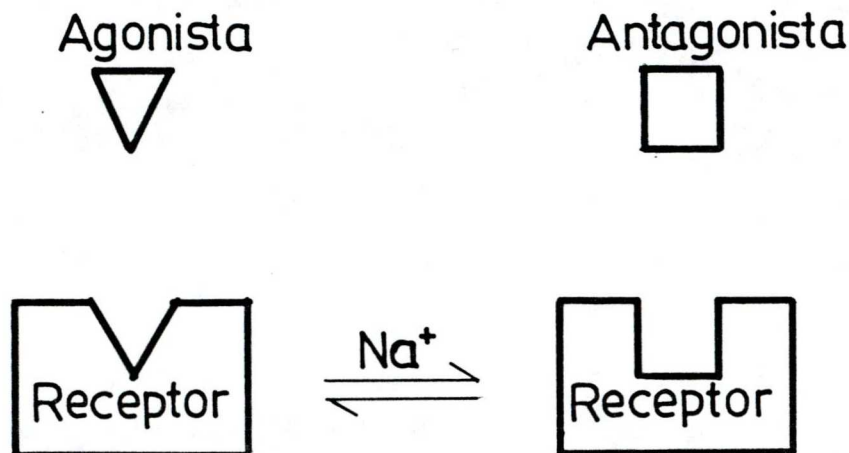
Mivel a receptor kötés detergens- (35-37) és foszfolipáz A_2 érzékeny (38), valószínűsíteni lehet a membránlipidek aktív szerepét a receptor ligandkötő konformációjának kialakításában. Különféle lipidek, így cerebrozid szulfátok képesek narkotikumok sztereoszelektív kötésére (39,40), cerebrozid szulfatáz kezelés gátolja az opiátok kötődését szinaptikus membránokhoz (41). E megfigyelések alapján LEE és SMITH olyan receptor modellt dolgoztak ki, amelyben az alkaloid kötőhely lipid természetű, míg az enkefalinokat kötő alegység fehérje lenne (42). A modell alapján a béta-endorfin kétpontosan kapcsolódik a receptorhoz, az enkefalin

struktúrát tartalmazó N terminális rész az enkefalin kötőhelyhez, a peptid C terminális végén lévő aminosavak hidrofób kölcsönhatások révén a lipid alegységhez kötődnek. Agonisták kötődésére, illetve az enkefalinok kötődésének naloxonnal történő gátolhatóságára a modell nem nyújt kielégítő magyarázatot.

Az opioid receptor ligandkötő sajátosságait az ionerősség, pH viszonyok és a hőmérséklet is befolyásolja (43-45). Egyéb hormonreceptorokhoz hasonlóan az opiát receptor is nagyobb affinitással köti az antagonistákat, mint az agonista ligandokat. Az agonista kötés kevésbé stabilis, hő inaktivációra, proteolízisre, szulfhidril reagensekre (19,33,46), guanil nukleotidákra (47,48) és Na^+ ionokra (49,50) relatíve érzékenyebb. Antagonista kötődése viszonylagos védettséget biztosít a receptornak a fenti hatások ellen, illetve a Na^+ ionok, valamint a guanil nukleotidák növelik az antagonisták affinitását és a kötőhelyek maximális számát (B_{max}) (45). Ebből arra következtettek, hogy a Na^+ ionok a receptor termodinamikailag megszabott határkonformációs állapotai között kialakult egyensúlyt az antagonistákat preferáltan kötő állapotba, "antagonista" konformációba tolják el (51). E fenti agonista / antagonist konformációt (1. ábra) feltételező modell nem írja le az agonista peptidek és az alkaloid narkotikumok kötődésének eltérő jellegzetességeit. Bivalens kationok, vagy N-etilmaleimid kezelés receptor kötésre gyakorolt hatásai viszont jól értelmezhetők a modell alapján.

Opiát alkaloidák és opioid peptidek Na^+ ion mentes és Na^+ ionokat tartalmazó közegben meghatározott in vitro affinitási állandóinak aránya, az ún. Na index alapján eldönthető a ligand agonista, vagy antagonist karaktere, így számos újonnan szintetizált analóg

tesztelhető gyors, egyszerű biokémiai módszerekkel.



1. ábra

A kinetikai kísérletek az opioid receptorok heterogenitásának további bizonyítékait szolgáltatották. Így a ligandkoncentráció-függés Scatchard analízisével nagy és kis affinitású ligandkötőhelyek mutathatók ki agonisták, antagonisták, valamint opioid peptidek esetében (12,13). A nagy affinitású kötőhely jellemzésének mérés technikai okokra visszavezethető nehézségei is vannak, ezért sok esetben nem könnyű a két kötőhely elkülönítése. Kis jelzett ligand koncentrációnál az alacsony beütésszám, nagy ligandkoncentrációban a megnövekedett nem specifikus kötődés nehezíti az adatok értékelését.

Ha elfogadjuk a különböző affinitással és kötőkapacitással jellemezhető opioid kötőhelyek létezését, akkor azokat korreláltatnunk kell a farmakológiai receptor altípusokkal is. A jelzett mü-, és delta ligandokkal felvett telítési görbék egyaránt illeszthetők két kötőhelyes modell alapján, ezért mind az alkaloida-, mind az enkefalin receptor populációk heterogéneknek tekinthetők.

PASTERNAK vetette fel, hogy a különböző ligandok nagy affinitású

kötőhelyei azonos receptor típust reprezentálnak, amelyet μ_1 receptornak nevezett el. Sok kísérleti adattal alátámasztott elképzelése szerint a μ receptort a nagy affinitású, kis kötőkapacitású μ_1 kötőhely, és a kis affinitású, nagy kapacitású μ_2 kötőhely alkotja, míg az enkefalin (delta) receptor μ_1 + delta kötőhelyből áll (52). A delta komponens alacsony affinitású de nagy ligandkötő képességgel rendelkező kötőhely.

Az opiát receptorokban közös μ_1 kötőhely szelektíven és irreverzibilisen gátolható 14-hidroxí-dihidromorfinon-hidrazonokkal (53,54), valamint enkefalin klórmetil ketonokkal (55). A μ_1 kötőhelyen nagy affinitással ($K_d < 1$ nM) kötődnek az alkaloidák és a peptidek is, míg a μ_2 helyhez a morfin származékok, a delta kötőhelyhez az enkefalinok mutatnak szelektivitást. A modell szerint a μ_1 receptor az analgészia receptora, közvetíti továbbá a kataléptogén, hipotermiás, acetilkolin turnover-t növelő és prolaktin release-t okozó hatásokat. A μ_2 receptorral az agyi légzőközpontok gátlása, a bradikardia és a bélmotilitás gátlása hozható összefüggésbe. A közös nagy affinitású enkefalin és morfin (μ_1) kötőhely létét az irreverzibilis ligandok (53-55) használatán túl egyéb biokémiai (56), továbbá autoradiográfiás módszerekkel is alátámasztották (57).

A heterogén opioid receptorok molekuláris szinten történő differenciálására is végeztek biztató kísérleteket. A receptor altípusokhoz nagy specifitással kötődő szelektív ligandok (I. táblázat) szintézise, az idő közben kifejlesztett receptor szolubilizálási eljárások (36,58,59) és affinitásjelölők alkalmazása (60), illetve kombinálása "hagyományos" biokémiai módszerekkel (egyensúlyi grádiens ultracentrifugálás, gélfiltrálás) lehetővé tették a receptor altípusok szeparálását. A kappa receptor altípus tengeri malac (61) és

kecskebéka (62) agyban kromatográfiásan, és szedimentációs koefficiens alapján is elkülöníthető a mü és delta receptoroknak megfelelő molekuláris formáktól. Radiációs inaktivációs analízis alapján is találtak méretbeli különbségeket a mü / delta illetve a kapa receptorok között (63), míg mások azonos molekulatömegű receptor altípusokat mutattak ki ugyanezzel a technikával (64).

Szolubilizált receptor preparátum altípus-szelektív oszlopon (szefaróz mátrixon immobilizált 14-brómacetamido-morfin) végrehajtott affinitás kromatográfiás tisztítása is lehetőséget nyújtott a receptorok molekuláris szeparálására (65). Hybromet (cisz-/+) -3-metil-fentanil-izotiocianát, mü specifikus ligand) affinitás oszlop alkalmazásával is sikerült mü receptort tisztítani patkány agyból (66). A natív gélelektroforézissel 300 kDa relatív molekulatömegűnek meghatározott receptor aktivitás mérés alapján kb. 500 szoros tisztulást mutatott a kiindulási membrán frakcióhoz képest. Újabban 6-szukcinilmorfin töltetű kromatográfiás oszlop, gélszűrés, lektin kromatográfia és izoelektromos fókuszálás kombinálásával tisztítottak mü receptorokat, SDS elektroforézis után egy 58 kDa molekulatömeggel jellemezhető polipeptid sávot detektáltak (67,68).

1.2.2 Enkefalinok és enkefalin receptorok

GOLDSTEIN és munkacsoportja izolált elsőként szarvasmarha hipofízis kivonatából olyan peptid természetű anyagot, amely a morfinéhoz hasonló aktivitást mutatott GPI és MVD teszten, valamint receptor kötési vizsgálat során (7,69). A hatóanyag pontos identifikálása azonban sikertelen maradt.

Sertés agykivonatból HUGHES és munkatársai (6) határozták meg az

alábbi szekvenciákat tartalmazó opiát hatású peptidpár kémiai szerkezetét:

Leu-enkefalin = Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

Met-enkefalin = Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

A Met-enkefalin szekvenciája azonos a tevé hipofízisből leírt béta-endorfin N terminális végének első 5 aminosavával, a béta-endorfin pedig megegyezik a béta-lipotropinnak nevezett lipolitikus aktivitású peptidhormon 60-91-es szekvenciájával (8). A lipotropin fragmensek, így az endorfinok morfin szerű hatásainak kimutatását e fenti szerkezeti homológia felismerése, végső soron az enkefalinok felfedezése tette lehetővé.

Az opiát aktivitás hordozója az enkefalin struktúra az összes opioid peptidben, beleértve a dinorfinokat (10) is, hiszen a dez-tirozin származékok opiát hatást nem mutatnak. Az opioid peptidek hatásai - méretüknek és aminosav sorrendjüknek megfelelően - különbségeket mutatnak. Ugyancsak különböznek egymástól bioszintetikus prekurzoraik, metabolizmusuk és eloszlásuk tekintetében. Az opioid peptidek szerkezeti összefüggéseit a 2. ábra mutatja be.

Összevetve a morfin röntgen krisztallográfiás adatokból nyert térszerkezetét (70) az energetikailag kedvező enkefalin konformációkkal található olyan, a morfin struktúrával részben átfedő enkefalin konformáció, amely az opioid hatáshoz szükséges minimális szerkezeti feltételeknek (71) megfelel. Az enkefalin struktúrában legalább négy aminosav jelenléte szükséges számottevő opioid hatáshoz (72). Tetrapeptid-, továbbá 5-ös helyzetben prolint tartalmazó analógoknál 1-4 típusú kapcsolódás a termodinamikailag megengedett állapot (73). Ebben a szerkezetben a molekulát a Tyr¹ és a Phe⁴ között kialakult hidrogén kötés stabilizálja. Ez a kötődés létrejöhet a

BETA LIPOTROPIN (1-91):

1
ELTGERLEQRRGPEAQAESAAARAELEYGLVAEAEAAEKK-

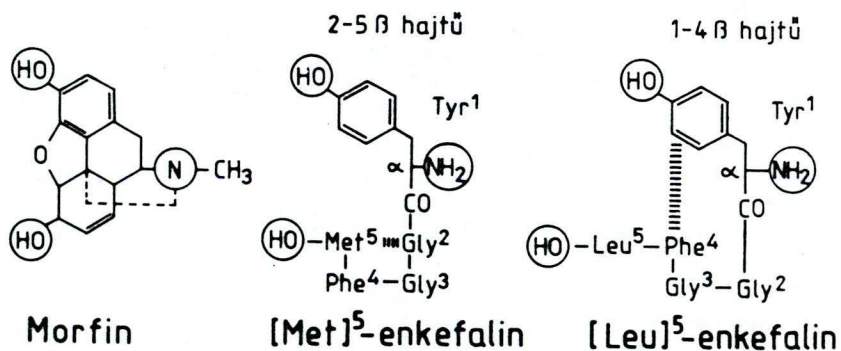
—————beta MSH————— —————beta endorfin—————
40 91
DSGPYKMEHFRWGSPPKDKRYGGFMTSEKSQTPLVTLFKNAIIKNAHKKGQ

beta endorfin	1	31
	YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNAIIKNAHKKGQ	
alfa endorfin	Y—————	T
gamma endorfin	Y—————	L
delta endorfin	Y—————	K
C fragmens	Y—————	H

Met-enkefalin	YGGFM
Leu-enkefalin	YGGFL

	1	17
Dinorfin A (1-17)	YGGFLRRIRPKLKWDNQ	

2. ábra

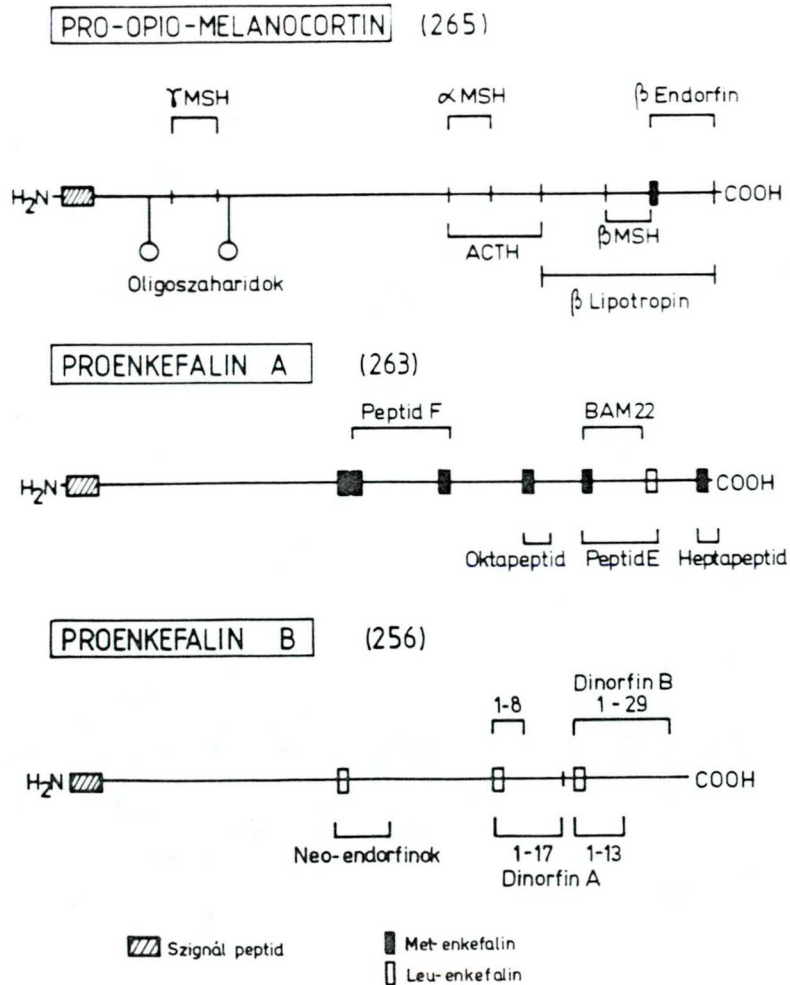


3. ábra

pentapeptid analógoknál is, bizonyított kristályos Leu-enkefalinra. Energetikailag kedvező lehet a 2-5 típusú kapcsolódás is (2-5 béta hajtű), amely pl. a Met-enkefalinra jellemző (3. ábra).

A természetes opioid peptidek három, egymástól különböző prekursor fehérjéből származnak (74). A pro-opio-melanokortinnak (POMC) nevezett prekursor a béta-endorfin szekvenciája mellett a melanofor hormon (MSH) és az adrenokortikotróp hormon (ACTH) szekvenciáit is tartalmazza.

A proenkefalin A-nak nevezett prekursor 6 kópia Met-enkefalint és egy Leu-enkefalin kópiát hordoz. A proenkefalin B, vagy prodinorfin 3 Leu-enkefalin szegmenst tartalmaz, e fragmentumok egyben dinorfin A és B, valamint a neo-endorfinok aminosavsorrendjének részletei is (4. ábra).



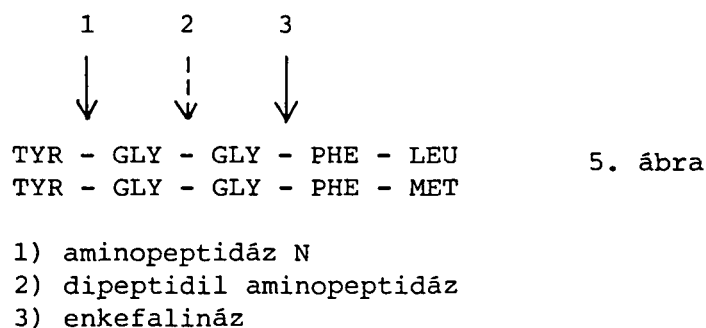
4. ábra

A prekursor peptidekben az opiát hatású peptid szakaszokat bázikus aminosav párok, Lys-Lys, Lys-Arg, Arg-Arg stb. határolják, így a biológiailag aktív fragmensek tripszin szerű, proteolitikus emésztésből származhatnak. A Leu-enkefalin proenkefalin A-ból és prodinorfinból is keletkezhet (75), a Met-enkefalin kizárólag proenkefalin A-ból. A Met-enkefalin korábban feltételezett és a szerkezeti homológia alapján kézenfekvőnek látszó pro-opio-melanokortinból való eredete nem nyert megerősítést. Míg a POMC lokalizációja meglehetősen egyedi, elsősorban a hipofízisre és a nucleus arcuatusra korlátozódik, addig a proenkefalinok kimutathatók számos agyi régióban, és megtalálhatók a perifériás (mellékvese, szimpatikus ganglion, gasztrointesztinális traktus) szövetekben is (76). A proenkefalin A és B együttes előfordulása pedig lehetővé teszi, hogy az enkefalinok bioszintézisének különböző útjai azonos sejtekben, egymás mellett is létezhessenek.

A szisztémásan adott, vagy agykamrába injektált enkefalinok analgetikus aktivitása szerény a morfinéhoz, de még a béta-endorfinéhoz képest is (77). A csökkent aktivitást sokan az enkefalinok gyors degradációjával magyarázzák, ezt látszik alátámasztani az a tény, hogy enkefalinok intracerebroventrikuláris adása után jelentősebb analgetikus hatás mérhető (77). A keringésbe juttatott enkefalinok gyorsan metabolizálódnak (78), és nem, vagy csak kevéssé penetrálnak a vér-agy. gáton (79). Ma mindenesetre megkérdőjelezzük az endogén opioidok, különösen a csekély aktivitású enkefalinok tényleges szerepét az analgézia folyamatában.

Az enkefalinok enzimes inaktiválásában több enzim működhet közre (80). Az N terminális tirozint egy membrán kötött aminopeptidáz hasíthatja le, míg Tyr-Gly dipeptidet eredményezhet egy

aminodipeptidáz aktivitás. Az enkefalinok lebontásában legnagyobb szerepet játszó "enkefalináz" enzim hatására a Gly³-Phe⁴ peptidkötés hidrolizál, tehát Tyr-Gly-Gly tripeptid keletkezik (5. ábra). Az



enkefalináz a metallo endopeptidázok közé tartozik, tiorfánnal specifikusan gátolható, újabban elkülönítik a vele azonosnak tartott és az enkefalinok metabolizálására ugyancsak képes angiotenzin konvertáló enzimtől (ACE). Az enkefalinok receptorhoz való kötődése csökkenti az enzimatis inaktiválás hatékonyságát (81), ugyanakkor a "szabad" enkefalinok gyorsan hidrolizálnak enzimes kezelés hatására. Újabban SIMON és munkatársai írtak le, egy az opioid receptorhoz asszociált, és azzal szolubilizálás után együtt tisztuló enkefalinázt (82).

Egyéb, az enkefalin, endorfin és dinorfin szerkezetével nem homológ peptidek is rendelkezhetnek opiát hatással, így a kazein eredetű kazomorfinok, vagy a szintetikus béta-kazomorfin analóg morfineptin (83,84). Ismereteseek endogén, antiopiát hatású peptidek is (85).

Az enkefalinokat nagy affinitással és specifikusan kötő delta receptorokról molekuláris szinten keveset tudunk. Ennek oka részben az, hogy a központi idegrendszerben a receptor altípusok kevésbé

különülnek el egymástól és sejtfракционálással sem választhatók szét. Az opiát receptorok denzitása egyébként is rendkívül alacsony, pl. a "dús" receptor forrásnak számító agyszövetben is csak néhány száz fmol/mg fehérje a receptorok mennyisége. További nehézséget okoz, hogy még az újabban kifejlesztett nagy specifitású szintetikus ligandok (I. táblázat) is adhatnak kereszt reakciót a nem adekvát receptor altípussal.

Szelektív kötődésű ligandokkal végzett kísérletekben a delta receptorok kötési sajátosságai különbségeket mutattak, a μ receptorokkal összevetve. Így pl. a delta receptor kötés jobban gátolható alkoholokkal (86), Na-koláttal (35), ugyanakkor eltérő kation és GTP regulációt, valamint egyedfejlődést mutatott (35,87-91). A sejtfelszínen a delta receptorok jellegzetes csoportosulásokat alkotnak és nem internalizálódnak (92).

Az NG-108-15 jelű neuroblasztóma x glióma hibrid sejtvonal csak delta receptorokat tartalmaz (13,95), így modell rendszer lehet a delta hatások in vitro tanulmányozásában. NIRENBERG és munkatársai mutatták ki, hogy opiát agonisták kötődése a receptorhoz az adenilát cikláz enzim gátlását eredményezi NG hibrid sejtekben (96). E hatáshoz guanilnukleotidák, GTP vagy Gpp(NH)p szükségesek, ugyanis a cikláz rendszer receptor mediált gátlása GTP-kötő fehérjén (N_i) keresztül valósul meg. Az N_i fehérje alfa alegysége guanozintrifoszfátáz aktivitású, az enzimet opiátok stimulálhatják (97). Pertussis baktérium toxin hatására az N_i fehérje alfa alegysége ADP-riboszilálódik, a kovalens módosítás eredményeként megszűnik a kapcsolat a receptor és az adenilcikláz enzim között (98). Az opiát receptorhoz kapcsolt adenilcikláz rendszer a drogfüggőség (addikció) egyik lehetséges modellje lehet. Opiátok krónikus adagolása az

adenilcikláz enzim tartós gátlásához vezet (96). De novo fehérjeszintézis miatt az enzim mennyisége növekszik, így a cAMP bruttó mennyisége a korábbi szinten stabilizálódik (tolerancia). Antagonista adása esetén (morfin elvonás) a sejtekben a cAMP produkció ugrásszerűen megnő az opiát gátlás megszűnése miatt (megvonási tünetcsoport) (96). Pertussis toxin kezelés az N_i fehérje "kikapcsolásán" keresztül gátolja a tolerancia kifejlődését (98,99).

PERT és munkatársai a nagy affinitású, adenilciklázhoz kapcsolt működésű ún. I. típusú opioid receptorokat definíció szerűen elkülönítik a nem adenilciklázhoz kapcsolt, GTP rezisztens II. receptor típustól (100). Modelljükben az I. típus (GTP szenzitív receptor) μ és delta konformációt egyaránt felvehet (interkonvertáló receptorok), így μ és delta ligandokat is nagy affinitással köthet. Valószínű, hogy az I. típusú receptor megegyezik a PASTERNAK féle μ_1 kötőhellyel.

A hibridóma sejteken túl az opiátok gátolják a prosztaglandinokkal, katekolaminokkal, vagy más módon stimulált adenilcikláz aktivitást agy homogenátumban és szinaptikus plazmamembránokban is (101-103), viszont az enzim alapaktivitásának változtatására vonatkozó irodalmi adatok ellentmondóak.

Az opiátok akut hatásai nem értelmezhetőek csupán az adenilcikláz enzim gátlása alapján. Az opiátok és opioid peptidek direkt hatásai, pl. a membrán hiperpolarizációja, acetilkolin felszabadulása a mienterikus plexusból, továbbá a neuronok tüzelő aktivitásának gátlása a központi idegrendszerben, inkább a specifikus ioncsatornák működésével hozhatók összefüggésbe (104). Agonisták kötődése a delta receptoron, elektrofiziológiai adatok alapján a Ca^{2+} ionok mobilizálásán keresztül a sejtmembrán K^+ -konduktancia ($I_{K/Ca/}$)

növekedéséhez vezet locus coeruleus és csigolya közti dűcsejtekben (DRG sejtek) (105). Hibridóma sejteken az enkefalinoknak Go fehérjén keresztül mediálódó hatását is kimutatták a sejtmembrán kalcium csatornáira (106).

Patkány agyból digitoninnal szolubilizált receptor, delta szelektív ligand affinitás kromatográfia (D-Ala²-Leu⁵-enkefalin szefaróz) után mintegy 450 szerez tisztulást mutatott aktivitás alapján számolva, a kiindulási membrán preparátumhoz képest. A tisztítás során egy SDS elektroforézis alapján 62 kD molekulatömegűnek meghatározott polipeptid dúsult fel az aktív frakcióban (107).

NG-108-15 sejtekből KLEE és munkatársai homogenitásig tisztítottak kovalensen kötődő, tríciált liganddal előjelölt delta receptort lektin kromatográfia, és az előjelölő ligand ellen termeltetett anti-idiotípiás immunoglobulin-affinitás kromatográfia kombinálásával. SDS elektroforézis után fluorográfiával és ezüst festéssel is kimutatható $M_r = 58$ kDa fehérje sávot detektáltak (108). Az 58000-es polipeptid a mü (60,109,110) és kappa (111) receptoroknál is kimutatható.

Különböző agyi régiókban ¹²⁵J-béta-endorfin és keresztkötő reagens alkalmazásával a mü receptor (illetve alegységének) méretére 65 kDa-, a delta receptoréra 53 kDa értéket határoztak meg szelektív jelölési körülmények között. Ez utóbbi az első adat a mü és a delta receptor alegységek molekuláris különbözőségére (112,113). Radiációs-inaktiválós kísérletekben, az NG-108-15 sejtek delta receptorainak (natív) méretét 200 kDa-nak határozták meg (114).

1.2.3 Enkefalin szerkezet és opiát hatás összefüggései

Szintetikus enkefalin analógokkal végzett hatástani vizsgálatok

kimutatták, hogy az N terminális tirozin és a Phe⁴ jelenléte és relatív pozíciója (115,116) alapvető fontosságú a receptorral való kölcsönhatás, illetve az opioid karakter szempontjából. A Tyr¹ kémiai módosítása, cseréje vagy hiánya az opiát hatás markáns csökkenéséhez vezet (72,117). Az 1-es pozícióban szintetikus melfalán aminosavat tartalmazó analógok opiát aktivitása a szubsztitúció után is jelentős maradt (118). Ugyancsak képes volt az N-terminális tirozin helyettesítésére a pirenilalanin (119).

A C terminális aminosav (Leu/Met) viszonylag szabadon módosítható, észterifikálás, savamid képzés nem csökkenti lényegesen az opiát aktivitást. A tetrapeptid enkefalinok számottevő hatása ugyancsak a C terminális relatív módosíthatóságára utal (115). Az enkefalinok delta szelektivitása szempontjából viszont lényeges az intakt pentapeptid szerkezet és a C terminális szabad karboxil csoportja: gyűrűs aminosav vagy iminósav jelenléte, továbbá az amidálás, észterifikálás, illetve a C terminális polárosságának csökkenése a delta hatásjelleg elvesztését eredményezheti (120-123). Az enkefalin molekula C terminális felőli rövidítése csökkenti a keletkezett származékok opiát hatásait, de még szintetikus dipeptidek is mutattak mérhető hatásokat (124).

A C terminálison módosított enkefalinok közül a D-Met²-Pro⁵-enkefalinamid (125) és a D-Ala²-(Me)Phe⁴-Met(O)-ol enkefalin (126) jelentős analgetikus aktivitással és stabilitással rendelkeznek.

A szintetikus tetrapeptid enkefalinok közül a DAGO a morfinét meghaladó mű szelektivitással tűnik ki, így érthető, hogy az opiát receptor kutatás egyik eredményesen használható ligandja lett (127,128).

A Gly² és Gly³ külön-külön és egyidejűleg is szubsztituálható, de a

kapott származék hatásai gyengébbek a kiindulási alapénál. A Gly² cseréje D aminosavra, D-Met, D-Ala, kedvező a termékek viszonylagos enkefalináz rezisztenciája miatt, D-Ser beépítése a 2-es pozícióba jelentősen fokozta a delta specifitást (129,130). A D-Ala²-D-Leu⁵-enkefalin (DADLE) a természetes enkefalinoknál nagyobb delta szelektivitással és megnövekedett enzimrezisztenciával rendelkezik. Tríciált és jódozott formáit elterjedten alkalmazzák a delta receptor szelektív jelölésére.

Izolált szerv készítményen és receptor kötési tesztben számos egyéb analóg mutat több-kevesebb delta szelektivitást: DSLET, vagy deltakefalin (130), DTLET (131), D-Pen²-D-Pen⁵-enkefalin (132), sőt enkefalin dimerek (133) és ciklikus származékok (134) is. A gyűrűbe zárás (132,134), vagyis a térszerkezet merevítése rendszerint fokozza a ligand szelektív tulajdonságait, néha azonban a szelektivitás elvesztését eredményezi (135).

Fluoreszkáló funkciós csoportok bevitele is lehetséges az enkefalin molekulákba, amint arról több közlemény is beszámol (92,119,136).

Az eddig tárgyalt enkefalinok kizárólag agonista sajátságokat mutattak, peptid szerkezetű opioid antagonistát a legutóbbi időig nem találtak. Újabban két ICI vegyület, a 154129 és a 174864 delta specifitású antagonistának mutatkozott (137,138).

Elméleti és gyakorlati szempontból is jelentősek azok a próbálkozások, amelyek az opiát receptorok kovalens jelölésére alkalmas ligandok kifejlesztését célozzák. Az affinitésjelölők irreverzibilis kötődése ugyanis lehetővé teszi a receptor követését pl. annak tisztítása során. Enkefalin klórmetil ketonok szintéziséről irreverzibilis kötődéséről és analgetikus hatásáról több laboratórium

is beszámolt (55,60,109-111,139-142). Az enkefalin melfalán származékai ugyancsak irreverzibilisen kötődhetnek az opioid receptorhoz (118,144). Mivel az elektrofil funkciós csoportok (halometil keton, nitrogén mustár) kialakítása többnyire az enkefalin molekula C terminális részén történt, a ligandok delta szelektivitása kedvezőtlenül változott az alap vegyületekhez képest. Fotoreaktív funkciós csoportok alkalmazásával enkefalin fotoaffinitás jelölésre képes származékokat is szintetizáltak (145,146).

Az enkefalin receptor szelektív, irreverzibilis jelölésére jelen pillanatban egyedül a super-FIT nevű vegyület alkalmas, ez a molekula viszont nem enkefalin származék (147).

1.3 Célkitűzés

Munkacsoportunk 1978-tól foglalkozik az opioid receptorok biokémiájával. E témán belül a patkány agyi opiát receptorok, illetve receptor altípusok jellemzése és izolálása az egyik közvetlen célunk. Ehhez a munkához specifikus radioligandok és megfelelően jellemzett in vitro biológiai rendszer szükségesek. Az Szegedi Biológiai Központ Izotóp Laboratóriumában több, az opioid receptorok vizsgálatában jól hasznosítható jelzett ligandot állítottak elő (148-152).

Ebben a munkában egy triciált enkefalin származék, a $(^3\text{H})\text{D-Ala}^2\text{-Leu}^5\text{-enkefalin}$ / $(^3\text{H})\text{DALE}$ / kötődési sajátságait vizsgáltuk patkány agyból előállított sejtmembrán preparátum delta receptoraihoz. A receptor-ligand kölcsönhatás közvetlen tanulmányozásán túl a receptor kötési tesztet, mint módszert kívántuk alkalmazni enkefalin származékok szerkezet-hatástani vizsgálatában. E célból az MTA Központi Kémiai Kutatóintézete Peptidkémiai Laboratóriumában

készített enkefalin analógok, közöttük potenciális affinitás jelölők specifitását, affinitását és kötődésük reverzibilis vagy irreverzibilis jellegét határoztuk meg.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 Anyagok

A speciális reagensek, puffer alkotók, sók (ATP, GTP, Gpp(NH)p, bacitracin, TRIS, NaCl stb.) SIGMA Chemical Co., (St. Louis, Mo. USA) gyártmányúak voltak, kivéve néhány finomvegyszert: pl. MnSO_4 (MERCK, Darmstadt, NSzK), SDS (SERVA Feinbiochemica Heidelberg, NSzK).

Az opiát alkaloidák közül a morfin és a nalorfin az ALKALOIDA (Tiszavasvári) terméke volt. A levorfanolt, levallorfant és a dextrorfant a Hoffman-La-Roche-tól (Nutley, NJ. USA) kaptuk. A naloxont a Du Pont de Nemours cég (Endo Labs. Garden City, NY. USA) ajándékozta. Az etilketociklazocint a Sterling Winthrop intézettől (Rensselaer, NY. USA) vásároltuk. A DAGO Dr.D Römer (SANDOZ) ajándéka volt.

Az enkefalin származékokat Dr. Medzihradszky Kálmán munkacsoportjában (MTA KKKI és ELTE Szerves Kémiai Intézet) Dr.Szécsi Judit, Hepp József, Dr. Di Gléria Katalin és Dr. Süli-Vargha Helga szintetizálták. DADLE és DAGO más forrásokból (SIGMA vagy Bachem, Bubendorf, Svájc) is rendelkezésünkre állt. A delta antagonist (174864) az ICI-től származott.

A DALE triciálását Dr. Tóth Géza (SzBK Izotóp Laboratórium) végezte. A (^3H)DALE specifikus aktivitása 37,4 Ci/mmol volt.

2.2 Módszerek

2.2.1 Membrán preparálás

Kísérleteinkben mindkét nembeli, 2-300 g-os, (kb. 5 hónapos) PVG/C törzsbe tartozó patkányokat használtunk. Az agyi membrán frakciót PASTERNAK (19) módszere alapján, kisebb módosításokkal készítettük. Az állatokat dekaptáltuk, az agyakat azonnal jéghideg fiziológiás sóoldatba helyeztük, a kisagyakat eltávolítottuk. A nagyagy féltekéket és az agytörzset együtt homogenizáltuk 20-szoros térfogatú (g/ml) jéghideg TRIS/HCl pH 7,4 pufferben, Potter-Elvehjem üveg-teflon homogenizátorban. A homogenátumot 40000 x g-vel 20 percig centrifugáltuk (Beckman J-21 B centrifuga, JA-20-as rotor), a felülúszót elöntöttük. Az üledéket az eredeti térfogatú, friss pufferben szuszpendáltuk, majd 37 °C-on 30 percig inkubáltuk az endogén ligandok eltávolítása céljából. A szuszpenziót ezután ismét centrifugáltuk (40000 x g, 20 perc), a pelletet 80-szoros térfogatú pufferben vettük fel (0,4 mg fehérje/ml) és frissen felhasználtuk.

A membránpreparátum tárolása 5-szörös térfogatú 50 mM TRIS/HCl - 320 mM szaharóz, pH 7,4 pufferben történt, a mintákat folyékony levegőben megfagyasztottuk és -70 °C-on tároltuk (maximálisan 6 hétig). Felhasználásakor a felolvasztott mintát szaharóz mentes pufferrel hígítottuk, és a szaharózos közegből a membrán szuszpenziót kiülepítettük (40000 x g, 20 perc), majd a pelletet 70-szeres térfogatú cukormentes pufferoldatban homogenizálva azonnal felhasználtuk.

2.2.2 Receptor kötés mérés

A receptor kötés beállítása a (³H)DALE izotóppal laboratóriumunkban történt (150). Az 1 ml térfogatú reakcióelegy 100 ul (³H)DALE-t, 100 ul tridesztillált vizet (vagy ugyanilyen térfogatban jelöletlen DALE-t, a

nem specifikus kötést reprezentáló mintákban), és 800 μ l membránsuszpenziót tartalmazott (250-400 μ g protein/minta).

A reakciót a fehérje hozzáadásával indítottuk, 45 perces, 23 °C-os inkubálás után a mintákat Whatman GF/C üvegszálalás filteren vákuum alatt szűrtük, a nem kötődött radioligandot 2 x 10 ml jéghideg 50 mM TRIS/HCl pufferes mosással távolítottuk el. A szűrés és a mosás mintánként kb. 5 másodpercet vett igénybe, így a receptor-ligand komplex disszociációja és az ebből származó kísérleti hiba elhanyagolható volt. Opioid peptidek kompetíciós képességének meghatározása során a reakcióelegy 50 μ g/ml bacitracint is tartalmazott peptidáz inhibítorként.

A nem specifikus kötést 10 μ M DALE jelenlétében határoztuk meg. A megszáritott filteren maradt radioaktivitást (fehérjéhez kötött ligand) toluol alapú szcintillációs oldatban (5 ml/filter) LKB Minibeta 1211 folyadékszscintillációs spektrométerben mértük kb. 35 %-os mérési hatásfokkal. A specifikus (receptoriális) kötést minden esetben az összes, és a jelöletlen ligand jelenlétében mért nem specifikus kötődés különbségeként definiáltuk.

A minták fehérje tartalmát triklórecetsavas precipitálás után Folin reagenssel PETERSON módszerével (153), vagy közvetlen festék (Coomassie BB) kötődési reakcival (BRADFORD, 154) határoztuk meg. A kalibrációs görbék felvételéhez marha szérum albumint használtunk.

3. E R E D M É N Y E K

3.1 (³H)DALE specifikus kötés mérése patkány agyi membrán preparátumban

A receptor ligand komplex (specifikusan kötött ligand) mennyiségének mérésére többféle eljárás kínálkozik. Valamennyi meghatározásban közös a receptor ligand komplex és a szabad ligand feleslegének szeparálása. Két független módszerrel (membrán filteren keresztül történő szűréssel és centrifugálásos eljárással) mértük a reakció során képződött (³H)DALE-receptor komplex mennyiségét (II. táblázat). A két szeparálás lényegében azonos eredményt adott. A filtrációs módszer egyszerűsége és gyorsasága miatt a továbbiakban ezt alkalmaztuk.

3.1.1 Filter kötés meghatározása

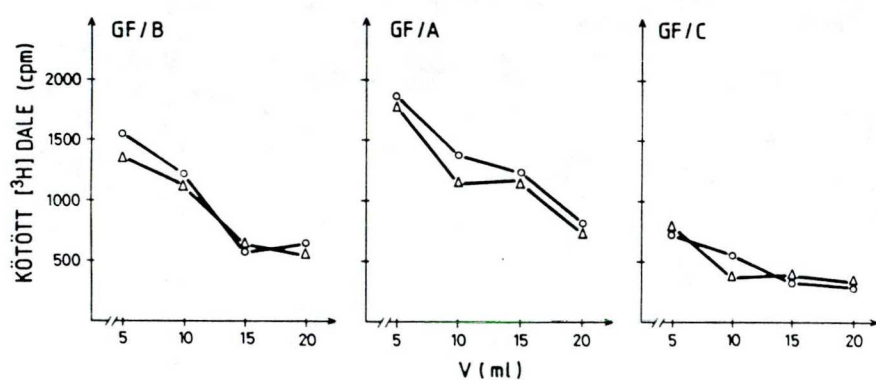
A különböző pórusméretű és vastagságú üvegszálás membrán-filterek adszorpció révén köthetnek radioizotópot. A jelzett ligand filter kötődését a lehetőség szerint minimalizálni kell. Összehasonlítottuk három Whatman gyártmányú filter jelzett ligand kötési kapacitását (6. ábra). 2 x 10 ml pufferes mosás elegendőnek bizonyult a lemosható frakció eltávolítására, míg a (³H)DALE mennyiségének kis hányada (a reakcióelegyben eredetileg levő mennyiség 0,1 - 1 %-a) a filtereken maradt (filter "háttér"). Az aktuális filter kötést a továbbiakban (különösen a nagyobb izotóp koncentrációk használata esetén) kísérletenként meghatároztuk és mérési eredményeinket szükség esetén a háttér levonásával korrigáltuk.

II. táblázat

Receptor kötés meghatározása különböző módszerekkel

	Szűrés (GF/C filter)	Centrifugálás (Eppendorf)
	cpm	
Összes kötés (T_b)	2250	1731
Nem specifikus kötés (NS_b)		
a/ DALE jelenlétében	890	587
b/ levallorfan jelen- létében mérve	1274	-
Specifikus kötés (B_{spec})		
a/	1360	1144
b/	976	-

A patkány agyi membrán mintákat 10 nM (3H)DALE jelenlétében inkubáltuk 23 °C-on 45 percig, majd Whatman GF/C filteren vákuum alatt szűrtük, vagy 10 percig üleptítettük Eppendorf asztali centrifugában. A szárított filterek és a membrán üledék radioaktivitását toluolos oldatban mértük. A nem specifikus kötést 10 μ M DALE vagy 10 μ M levallorfan jelenlétében határoztuk meg.



6. ábra. Whatman GF filterek ligandkötő kapacitása.

Membránfehérje mentes inkubációs elegyek 1 - 1 ml-es alikvotjait szűrtük GF/B, GF/A és GF/C filtereken. Az inkubálás 23 °C-on, 5 nM (³H)DALE jelenlétében történt. A filter kötés értékeket (cpm) a mosópuffer térfogat (V) függvényében ábrázoltuk. A mosások 5 - 5 ml-es alikvotokkal történtek. (o): összes kötés, (Δ): 10 μM DALE jelenlétében mért nem specifikus kötés.

Megvizsgáltuk a filter korongok membrán szuszpenzió visszatartó képességét is, hiszen lényeges, hogy a sejtmembrán partikulumok a filteren maradjanak. A 6. ábrán bemutatott kísérlet alapján legalacsonyabb háttérrel adó Whatman GF/C filter szűrlésében nem találtunk mérhető mennyiségű fehérjét, így a filter alkalmasnak bizonyult a receptorhoz kötött ligand mérésére.

3.1.2 Nem-specifikus kötés

A receptor-ligand komplex kvantitatív meghatározása pontos közvetlen mérő módszer hiányában indirekt úton történik, az alábbi formula alapján:

$$B_{\text{spec}} = T_b - N_{\text{sb}} \quad (\text{I})$$

ahol, B_{spec} a specifikusan kötött ligand mennyisége, T_b az összes kötött ligand mennyisége, N_{sb} a nem specifikusan (tehát nem a ligandkötő helyekhez) kötött ligand mennyisége. Adott jelzett ligand-koncentrációhoz tartozó nem specifikus kötést jelöletlen ligand mintegy ezerszeres feleslegében határozzuk meg. Használhatjuk a radioaktív ligand jelöletlen ("hideg") formáját, vagy a kérdéses receptor egy kémiaiilag eltérő ligandját is (II. táblázat).

Az aspecifikus kötőhelyek nem telíthetőek, a kötőhelyszám lineárisan növekszik a jelzett ligand koncentráció függvényében. Állandó ligandkoncentrációt használva a nem specifikus kötés kialakulása pillanatszerű, az idő függvényében gyakorlatilag nem változik. A nem specifikus kötőhelyek adszorbtív, hidrofób stb. kölcsönhatások révén kötik a ligandot, de ez a kötődés is ellenáll pl.

a szűrési szeparálásnál alkalmazott pufferes mosásnak, vagyis kísérletesen nem kűszöbölhető ki. Csökkentésére pl. tisztított sejtmembrán frakciók használatával nyílik lehetőség.

3.1.3 A specifikus kötés függése a szöveti fehérje koncentrációjától

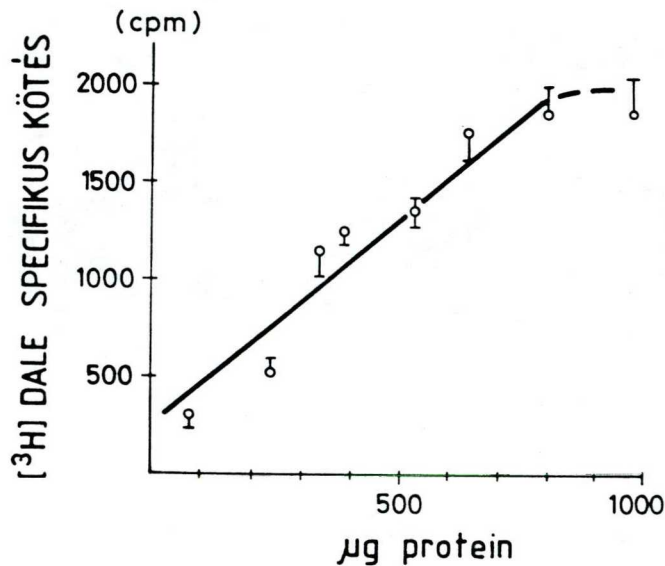
A receptor kötés mérés egyik feltétele (a telíthetőség, gátolhatóság és a reverzibilitás mellett), hogy a jelzett ligand kötődése lineárisan változzon a szöveti fehérje koncentrációjával. A 7. ábrán bemutatott kísérlet eredményei szerint a (^3H)DALE kötődése 50-800 $\mu\text{g/ml}$ agyi fehérje koncentrációig lineáris, 1 mg érték után a fehérjegörbe "letörik".

5 nM (^3H)DALE-t inkubáltunk változó fehérje tartalmú membrán szuszpenziókkal (23 $^{\circ}\text{C}$ -on, 45 percig), majd a specifikus kötést (cpm) a Módszerekben leírtak szerint meghatároztuk. A fehérje mennyiségét az egyes mintákban Folin reagenssel határoztuk meg. A pontok egyedi kísérlet 3 - 3 párhuzamos mintájának számított középértékeit (+/- standard deviáció) tüntetik fel. Az egyenest lineáris regresszióval illesztettük.

3.2 A (^3H)DALE kötődés kinetikai jellemzése

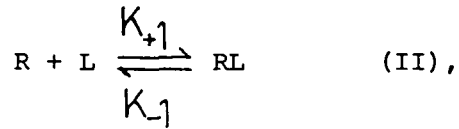
3.2.1 Asszociációs kinetika

A receptor ligand kölcsönhatást, reverzibilis kémiai reakciót feltételezve az alábbi egyenlet írja le:



7. ábra. A ^3H -DALE specifikus kötése függése a membránpreparátum fehérje koncentrációjától.

5 nM ^3H -DALE-t együtt inkubáltunk (45 perc, 23°C) változó fehérje tartalmú membrán-szuszpenziókkal, majd a specifikus kötést (cpm) a Módszerekben leírtak alapján meghatároztuk. A minták fehérje koncentrációját Peterson eljárásával (153) mértük. A pontok egyedi kísérlet párhuzamos mintáinak számított középértékeit ($\pm$ standard deviáció) tüntetik fel. A korrelációs koefficiens $r = 0,97$.



ahol R a receptor szöveti koncentrációja, L a ligand-, RL pedig a receptor ligand komplex koncentrációja. A k_{+1} konstanst asszociációs sebességi állandónak, a k_{-1} -et disszociációs sebességi állandónak nevezzük. Formailag a (II) egyenlet alapján a reakció másodrendű. Mivel a kötési kísérletek kivitelezése során a szabad ligand koncentrációja állandónak tekinthető (egyensúlyban a ligand legfeljebb 3 - 5 %-a van RL formában), az asszociáció sebességét az R határozza meg (pszeudo-elsőrendű reakció).

A 8. ábrán tüntettük fel a (3H)DALE kötődés időfüggését 23 °C-on. A specifikus kötés 30 perc után éri el az egyensúlyt, a nem specifikus kötés nagysága független az inkubálás idejétől.

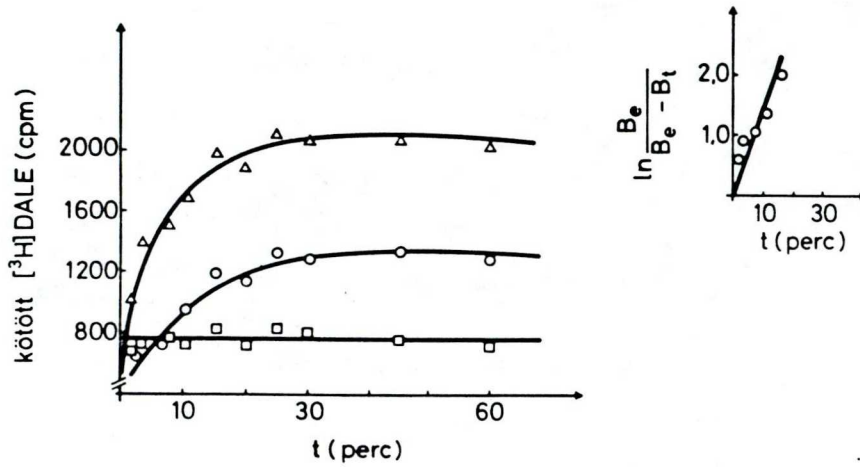
Az asszociáció sebességét, pszeudo-elsőrendű reakció körülményeket feltételezve az alábbi egyenlet írja le:

$$B_t = B_e (1 - e^{-k_{ob} \times t}) \quad (III),$$

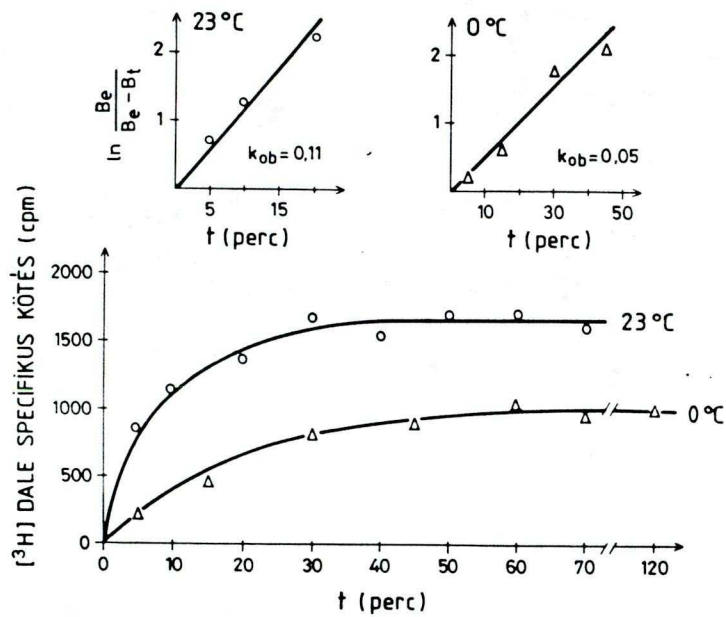
ahol B_e az egyensúlyban kötött ligandot, B_t a t időben kötött ligandot k_{ob} pedig a látszólagos sebességi állandót jelenti. A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó (k_{ob}) grafikus meghatározás (8. ábra) és számítógépes kiértékelés alapján 0,1 perc⁻¹-nek adódott.

A (3H)DALE asszociáció sebessége hőmérséklet függő (9. ábra). Olvadó jégben végrehajtott inkubáláskor a reakció sebessége lecsökken, a sebességi állandó értéke 0,05 perc⁻¹-nek adódott. Equilibriumot ebben az esetben a 60. perc környékén értünk el.

Vizsgáltuk az asszociáció sebességét a jelzett ligand koncentráció függvényében. A kinetikai görbéket a 10. ábrán mutatjuk be. A

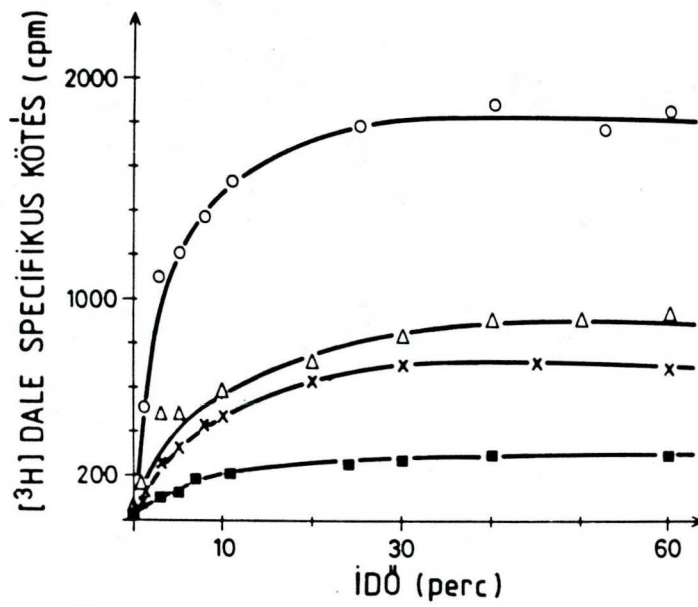


8. ábra. A (³H)DALE asszociációja patkány agyi membrán frakcióban. A membrán preparátumot 10 nM (³H)DALE jelenlétében inkubáltuk 23 °C-on. Az inkubációs elegyekből a meghatározott időpontokban 1 ml-es alikvotokat szűrtünk. A feltüntetett pontok 3 - 3 párhuzamos minta középértékeit jelentik. (Δ): összes kötés, (◻): 10 μM DALE jelenlétében mért nem specifikus kötés, (○): a számított specifikus kötés.



9. ábra. A $(^3\text{H})\text{DALE}$ asszociáció sebességének hőmérséklet függése.

Az asszociációs kísérletet olvadó jégben (Δ) és 23 °C-os termosztátban inkubálva (o) végeztük ugyanabból a membrán preparátumból, a 8. ábra magyarázatában leírt módon. Csak a specifikus kötést ábrázoltuk. A $(^3\text{H})\text{DALE}$ koncentrációja 10 nM volt.



10. ábra. A (^3H)DALE asszociáció sebességének függése a ligand koncentrációjától.

A kísérleteket a 8. ábra magyarázatában leírt módon, 23°C -on végeztük (^3H)DALE különböző koncentrációinak jelenlétében. Csak a specifikus kötést ábrázoltuk. (■): 0,5 nM, (X): 1 nM, (Δ): 3 nM, (o): 5 nM

látszólagos sebességi állandó (k_{ob}) ligandkoncentráció függését a III. táblázatban tüntettük fel.

III. táblázat

A látszólagos sebességi állandó ligandkoncentráció függése

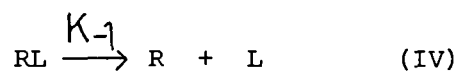
$(^3\text{H})\text{DALE}$ koncentráció (nM)	k_{ob} (perc $^{-1}$)
0,5	0,15
1,0	0,10
3,0	0,10
5,0	0,14
10,0 ⁺	0,10

+: A 8. ábrán bemutatott kísérlet adata.

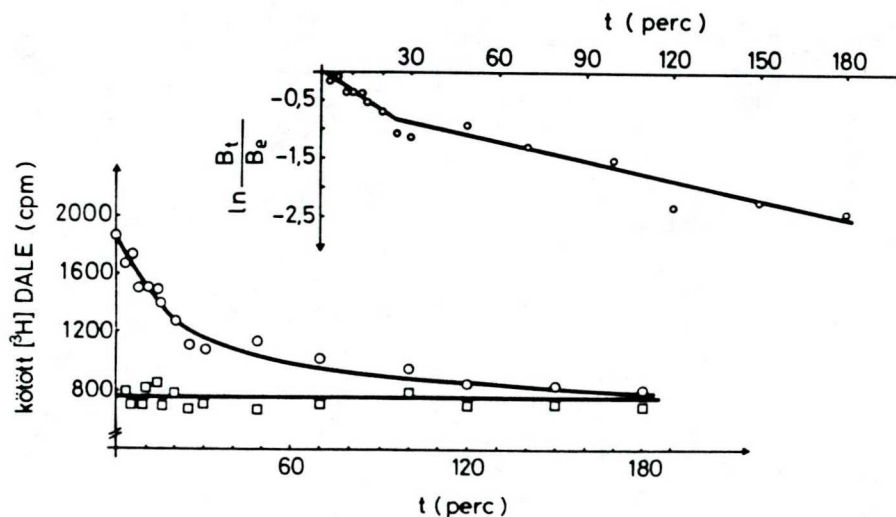
Minthogy bimolekulás, pszeudo elsőrendű reakcióban a látszólagos sebességi állandó (k_{ob}) értéke lineárisan függ a ligandkoncentrációtól, és a III. táblázatban közölt adatok nem mutatnak linearitást, a $(^3\text{H})\text{DALE}$ kötődése többféleképpen értelmezhető. Feltételezhetjük független ligandkötő helyek létezését, kooperativitást, vagy ligand-indukált konformáció változást is. A kérdés megválaszolására további kísérleteket végeztünk.

3.2.2. Disszociációs kinetika

A receptor ligand komplex disszociációja elsőrendű reakció, amelyet a disszociációs sebességi állandó (k_{-1}) jellemez:



A disszociáció sebességének mérésére két módszer kínálkozik. Az



11. ábra. A $(^3\text{H})\text{DALE}$ disszociációja patkány agyi membrán preparátumban.

A membrán szuszpenziót 10 nM $(^3\text{H})\text{DALE}$ jelenlétében inkubáltuk az egyensúly eléréséig (23°C , 45 perc), majd 10 μM DALE hozzáadásával elindítottuk a disszociációt (0 perc). A kísérletben közös inkubációs elegyeket használtunk, és a jelzett időpontokban 3 - 3, 1 ml-es alikvotot szűrtünk. A nem specifikus kötést (□) 10 μM DALE jelenlétében mértük. (o): összes $(^3\text{H})\text{DALE}$ kötés

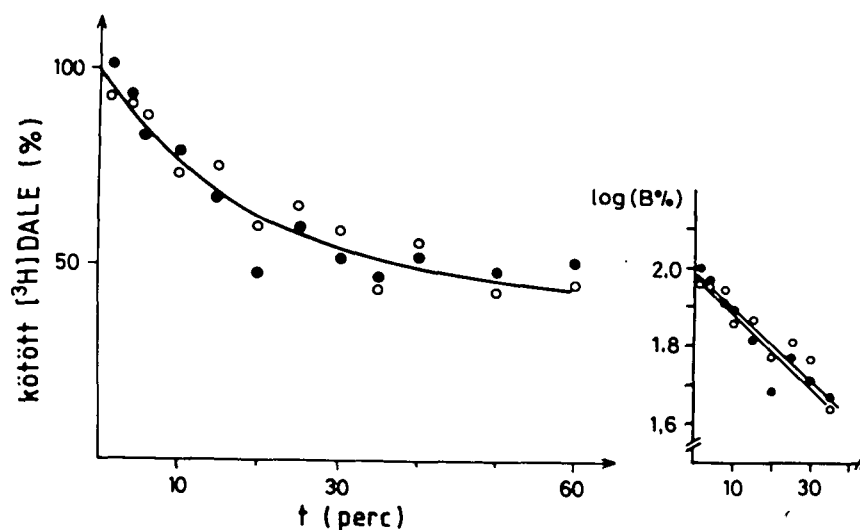
ekvilibrium elérése után a receptor-ligand komplexet jelöletlen ligand hozzáadásával (11. ábra), vagy a reakcióelegy térfogatának megnövelésével (12. ábra) disszociáltathatjuk. A t időpontban specifikusan kötött ligand (B_t) mennyiségét a következő összefüggéssel határozhatjuk meg:

$$B_t = B_e (1 - e^{-k_{-1} t}) \quad (v)$$

ahol B_e az egyensúlyban kötött ligand. Ábrázolva az $\ln(B_t/B_e)$ függvényt olyan egyenest kapunk, amelynek k_{-1} a meredeksége.

A 11. ábrán a (^3H)DALE disszociációs kinetikáját tüntettük fel. A membránpreparátummal 23°C -on ekvilibrált (^3H)DALE-t $10\text{ }\mu\text{M}$ jelöletlen DALE hozzáadásával (0 perc) disszociáltattuk. A nem specifikus kötés (u) mértékét a rendszerhez adott "hideg" anyag nem változtatta meg. Az egyensúlyi receptor-ligand komplex mennyiségének 50 %-a szobahőmérsékleten a 20. perc környékén már disszociált ($t_{1/2} = 19$ perc). A disszociációs görbe matematikai analízise alapján (11. ábra, inzert) két, kötési paramétereikben különböző ligandkötő helyet feltételezhetünk. A logaritmizált kinetikai görbe ugyanis felbontható két egyenesre, amelyek egy "gyors" ($k_{-1} = 0.025$) és egy "lassú" ($k_{-1} = 0.009$) disszociációs komponensnek felelnek meg.

A 3.2.1. fejezetben, a látszólagos sebességi állandó (k_{ob}) ligandkoncentráció függése alapján felvetettük, hogy a (^3H)DALE esetleg heterogén receptor populációhoz kötődik, de a kooperativitás lehetősége is fennáll. A kérdés megválaszolására megismételtük a disszociációs kísérleteket a hígítási módszerrel (155). Az inkubációs elegyeket az ekvilibrium elérése után 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) pufferrel, vagy $1\text{ }\mu\text{M}$ levallorfant (opiát antagonist) tartalmazó



12. ábra. A $(^3\text{H})\text{DALE}$ disszociáció sebessége P. Meyts szerint, hígítási módszerrel mérve.

A membrán készítményt, és 10 nM $(^3\text{H})\text{DALE}$ -t jelöletlen DALE jelen- vagy távollétében tartalmazó 1 ml-es reakcióelegyeket az egyensúly eléréséig 23°C -on, 45 percig inkubáltuk. A mintákat ekkor százszoros térfogatúra hígítottuk változatlan hőmérséklet mellett (0 perc), majd a feltüntetett időpontokban az 100 ml-es reakcióelegyeket leszűrtük. A nem specifikus kötést 10 μM DALE jelenlétében határoztuk meg. Csak a specifikus kötést ábrázoltuk (az egyensúlyban mért specifikus kötést tekintettük 100 %-nak). (o): hígítás 50 mM TRIS/HCl pH 7,4 pufferrel, (●): hígítás 1 μM levallorfant tartalmazó 50 mM TRIS/HCl pH 7,4 pufferrel.

A szemilogaritmikus ábrázolást az ábra B részén tüntettük fel. A regressziós egyenesek egyenletei azonosak voltak:

$$\log(B_{\%}) = 1,98(+/-0,01) - 0,01 \times t$$

A korrelációs koeficiensek: $R = 0,95$ a (o) pontokra, és $R = 0,93$ a (●) pontokra illesztett egyeneseknél.

pufferrel százszoros térfogatra hígítottuk, majd a mintákat a meghatározott időpontokban szűrtük (12. ábra). A kísérleti eredményekből látható, hogy a levallorfan jelenlétében, illetve hiányában a disszociáció mértéke hibahatáron belül azonos, vagyis az opioid ligand hozzáadása nem befolyásolta a (hígítási) disszociáció sebességét. A ligandkötő helyek kooperativitása esetén a disszociáció sebessége különbözne a két vizsgált esetben. Mivel a szemilogaritmizált ábrázolásban (12. ábra B) a pontokra lineáris regresszióval illesztett egyenesek gyakorlatilag nem különböznek, a kooperatív kölcsönhatásokat kizárhatjuk.

A disszociációs sebességi állandó(k) (k_{-1}) ismeretében (10. ábra adatai) lehetőség nyílik a reális asszociációs sebességi konstans (k_{+1}) meghatározására a következő összefüggés alapján:

$$k_{+1} = (k_{ob} - k_{-1}) / L \quad (VI)$$

A (VI) egyenletben k_{ob} a pszeudo elsőrendű reakcióban szereplő látszólagos sebességi állandó, L a jelzett ligand koncentrációja.

A k_{+1} állandókat a "gyorsan" és "lassan" disszociáló kötőhelyekre külön-külön meghatároztuk. A k_{+1} ismeretében a

$$K'_d = k_{-1} / k_{+1} \quad (VII)$$

formula segítségével a kinetikai disszociációs konstans (K'_d) értékét számíthatjuk ki. A két disszociációs sebességi állandó felhasználásával kapott disszociációs konstansok rendre 1,0 és 3,3 nM. A kinetikai állandókat a IV. táblázatban foglaltuk össze.

IV. táblázat

A (³H)DALE kötés fontosabb kinetikai paraméterei

	k_{ob}	k_{-1}	$t_{1/2}$	k_{+1}	K_d'
	(perc ⁻¹)	(perc ⁻¹)	(perc)	(perc ⁻¹ x M ⁻¹)	(nM)
0 °C	0,05	-	-	-	-
23 °C	0,10				
23 °C	"gyors" komponens	0,025	28	$7,5 \times 10^6$	3,3
	"lassú" komponens	0,009	77	$9,0 \times 10^6$	1,0

A táblázat alapjául szolgáló kísérletekben a (³H)DALE koncentrációja 10 nM volt.

3.3. A (³H)DALE kötődés koncentráció függése

A receptor ligand kölcsönhatás egyik lényeges tulajdonsága a specifikus kötőhelyek véges száma, másképpen a receptorok telíthetősége. A ligand kötőhelyek maximális számát (kapacitás, B_{max}) a következőképpen fejezhetjük ki:

$$B_{max} = R_T = RL + R \quad (VIII)$$

ahol RL receptor ligand komplexet, R pedig a szabad receptorokat jelenti. Mivel a (II) és (VII) egyenletek alapján nyilvánvaló, hogy

$$(R \times L) / RL = k_{-1} / k_{+1} = K_d \quad (IX)$$

behelyettesítés és átrendezés után a következő összefüggést kapjuk:

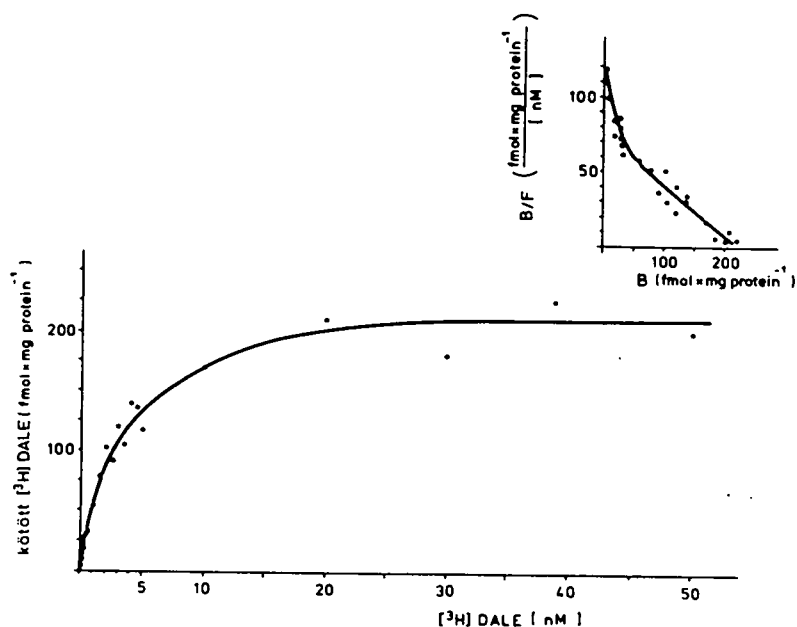
$$RL = B_{\max} \times L / (L + K_d) \quad (X)$$

amely formailag a Michaelis-Menten egyenletnek felel meg. $RL = B$ helyettesítés és transzformálás után a

$$B/L = B_{\max}/K_d - 1/K_d \times B \quad (XI)$$

összfüggést kapjuk, amely a SCATCHARD egyenlet (156). Ha a B/F értékeket a B függvényében ábrázoljuk, olyan egyenest kapunk, amelynek meredeksége $1/K_d$, abszcissza metszete pedig a $B_{\max}$ (Scatchard ábrázolás). Az $1/K_d$ állandót szokás affinitási konstansnak (K_a) is nevezni. Ha a Scatchard görbe lineáristól való eltérése heterogén kötőhelyek, vagy kooperativitás létezésére utalhat.

A specifikus (3H)DALE kötés ligandkoncentráció függését (telítési vagy szaturációs görbe) a 13. ábrán mutatjuk be. Látható, hogy a Scatchard szerinti transzformációval hiperbolát kaptunk, amelynek aszimptotái két független kötőhelyet: 1) nagy affinitású, kis kapacitású, és 2) kis affinitású, nagy ligandkötő kapacitással rendelkező helyet határoznak meg. A kísérleti adatok kiértékelése computeres görbeillesztéssel történt (Dr. Gaál József, Enzimológiai Intézet). A számítógépes szimuláció alapján meghatározott egyensúlyi disszociációs konstansok (K_d) 0,8 és 3,0 nM-nak, a kötőhelyek maximális száma ($B_{\max}$) 46 és 183 fmol/mg proteinnek adódtak. A számítógépes görbeillesztésnél két független ligandkötő helyet feltételeztünk. Megjegyezzük, hogy egy kötőhelyet (homogén receptor populációt) feltételezve a program szignifikánsan nagyobb hibával



13. ábra. A specifikus (³H)DALE kötődés ligandkoncentráció függése patkány agyi membrán preparátumban.

A membrán frakciót 23 °C-on, 45 percig inkubáltuk (³H)DALE jelenlétében. Az izotóp koncentrációját 1-50 nM tartományban változtattuk. A nem specifikus kötést 10 uM DALE jelenlétében mértük. Csak a specifikus kötés értékeket (B, fmol/mg fehérje) ábrázoltuk. Egy pont ábrázolásánál 3 párhuzamos minta középértékét vettük figyelembe, amelynek hibája 5 % körül mozgott. A fehérje koncentrációja a reakcióelegyben 0,6 mg/ml volt. Az inzert a Scatchard görbét mutatja.

közelítette adatainkat.

Három független kísérlet alapján számított K_d és B_{max} értékeket tüntettünk fel az V. táblázatban. Az egyensúlyi disszociációs konstansok jó közelítéssel egyeznek a kinetikai kísérletekből nyert K'_d értékekkel.

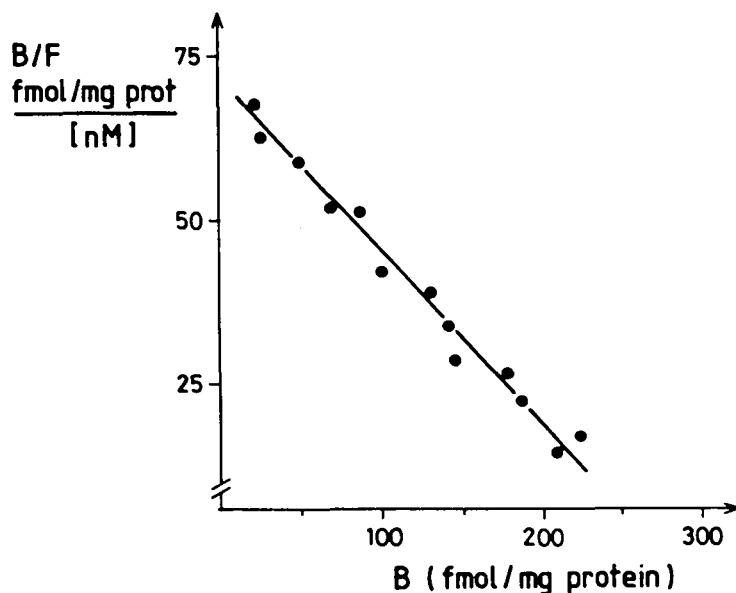
V. táblázat

	B_{max} (fmol/mg fehérje)	K_d (nM)	K'_d (nM)
"Nagy affinitású" kötőhely	54 $\pm$ 7	0,7 $\pm$ 0,25	1,0
"Kis affinitású" kötőhely	161 $\pm$ 21	5,0 $\pm$ 2,6	3,3

Meghatároztuk a (3H)-DALE kötődés koncentráció függését 10 nM DAGO (mú receptor szelektív opioid peptid) jelenlétében, 23 °C-on. A kísérleti adatok Scatchard transzformációját a 14. ábrán láthatjuk. DAGO jelenlétében egy kötőhelyet észleltünk, amelyet 3,6 nM disszociációs állandó és 244 fmol/mg fehérje kötőkapacitás jellemez. Ez a kötőhely a "kis affinitású" kötőhelynek felel meg, míg a "Nagy affinitású" kötőhely a mú szelektív ligand jelenlétében nem mutatható ki.

3.4. Kationok és guanil nukleotidák hatása a (3H)-DALE kötődésére

3.4.1. A (3H)-DALE kötődése kationok jelenlétében



14. ábra. (^3H)DALE specifikus kötés koncentrációfüggése patkány agyi membrán preparátumban, 10 nM DAGO jelenlétében. Scatchard szerinti ábrázolás.

A kísérleti körülmények megegyeztek a 13. ábrán bemutatott kísérlet körülményeivel, azzal a különbséggel, hogy az inkubációs elegyek 10 nM DAGO-t is tartalmaztak. A jelzett ligand koncentrációja 0,1 - 25 nM között változott. Az adatok kiértékelése a KINETFIT számítógépes program segítségével történt.

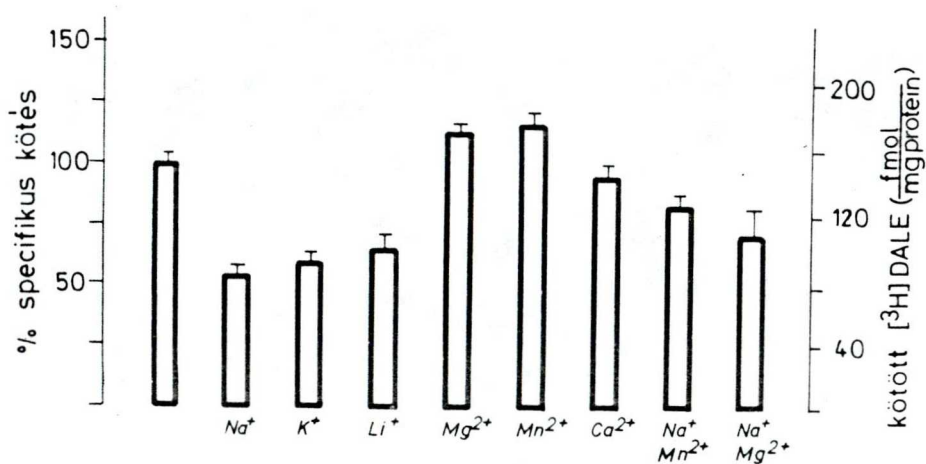
Vizsgáltuk a (^3H)DALE egyensúlyi kötődését különböző egy- és kétértékű kationok jelenlétében. Az endogén ionokat a membrán frakció preparálása során többszöri mosással távolítottuk el a rendszerből. A 15. ábrán alkálifém- (100 mM) és alkáliföldfém (2 mM) kationok, valamint ezek kombinációinak hatását tüntettük föl. Az egyértékű kationok $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$ sorrendben gátolták, míg a Mg^{2+} és a Mn^{2+} ionok fokozták a (^3H)DALE kötést. Ez a kötésnövekedés Na^+ ionokkal gátolható volt.

A Na^+ és a Mg^{2+} hatás ionkoncentráció függését a 16. ábrán mutatjuk be. A Na^+ ionok már 20 mM-os és a fiziológiás koncentrációban is gátolták a (^3H)DALE kötést. A Mg^{2+} ionok gátlást csak 50 mM-nál nagyobb koncentrációban mutattak, míg a fiziológiás koncentráció tartományban szignifikánsan növelték a receptor kötést.

3.4.2 A (^3H)DALE kötődése guanin nukleotidák jelenlétében

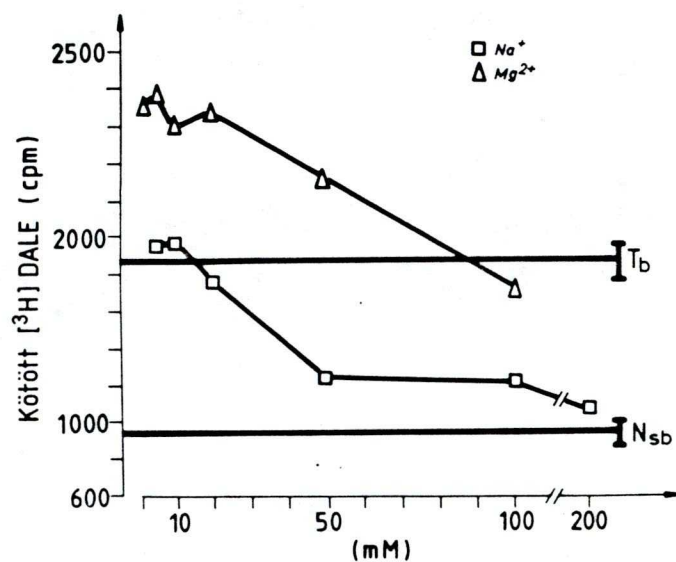
A guanozin trifoszfát (GTP) és egy hidrolízis rezisztens GTP származék, az 5'-guanilil-imidodifoszfát (GppNHp), valamint kontrollként az adenosin trifoszfát (ATP) hatását vizsgáltuk a (^3H)DALE kötődésére. A kísérleti eredmények a 17. ábrán láthatók. A guanil nukleotidák mikromólos koncentrációkban gátolták (GppNHp > GTP, ATP nem!) a jelzett ligand kötődését. Na^+ ionok jelenlétében a gátlás növekedését észleltük.

A GppNHp hatás mechanizmusának részletesebb elemzése céljából mértük a guanin nukleotida hatását a (^3H)DALE asszociáció és disszociáció sebességére (18. ábra). A kinetikai kísérletek eredményéből a következőket állapíthatjuk meg: 1) 50 μM GppNHp csökkentette a triciált peptid egyensúlyi kötését, a látszólagos



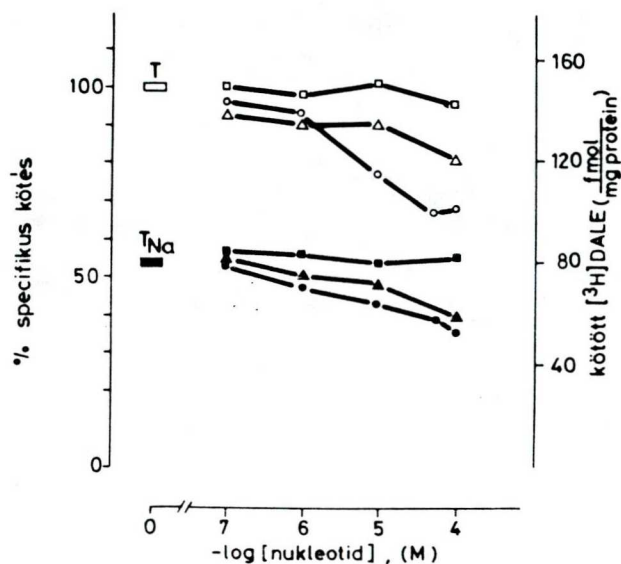
15. ábra. Kationok hatása a (³H)DALE egyensúlyi kötődésére

A patkány agyi membrán frakciót 3 nM (³H)DALE jelenlétében inkubáltuk 23 °C-on, 45 percig, különböző kation környezetben. A kísérletben klorid sókat használtunk, a Mn²⁺ ionokat kivéve, amelyeket szulfát formában használtuk. Az egyértékű ionokat 100 mM-os, a kétértékű kationokat 2 mM-os koncentrációban alkalmaztuk. Csak a specifikus kötés értékeit (± S.E.M.) tüntettük fel.



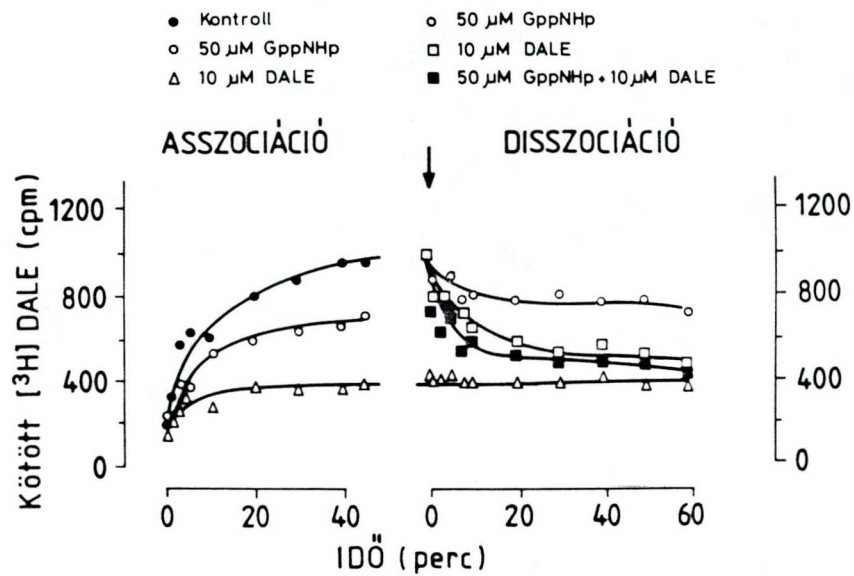
16. ábra. A $(^3\text{H})\text{DALE}$ receptor kötés függése a Na^+ - és Mg^{2+} ionok koncentrációjától.

Az 5 nM $(^3\text{H})\text{DALE}$ -t és a patkány agyi membrán preparátumot együtt inkubáltuk (23°C , 45 perc) Na^+ vagy Mg^{2+} ionokkal, majd a receptor kötést a szokásos módon meghatároztuk, és az ionkoncentráció függvényében ábrázoltuk. A TRIS/HCl pufferben mért összes (T_b) és a 10 μM DALE jelenlétében mért nem specifikus (N_{sb}) kötést ($\pm\text{SD}$) vízszintes vonalakkal reprezentáljuk. ($\square$): Na^+ , (Δ): Mg^{2+}



17. ábra. Nukleotidák hatása a (^3H)DALE egyensúlyi kötésre patkány agyi membrán készítményben.

A membrán preparátumot nukleotidák és (^3H)DALE jelenlétében inkubáltuk 23°C -on, 45 percig. A trícíált ligand koncentrációja 3 nM volt. A nem specifikus kötést 10 uM DALE jelenlétében mértük. A specifikus kötés értékeit a nukleotida koncentráció függvényében ábrázoltuk. (□): ATP, (Δ): GTP, (o): GppNHp. "Üres" jelek: Na^+ mentes környezetben végrehajtott mérés, "töltött" jelek: 100 mM Na^+ jelenlétében mért adatok.



18. ábra. GppNHp hatása a (3 H)DALE kötés kinetikájára patkány agyi membrán frakcióban.

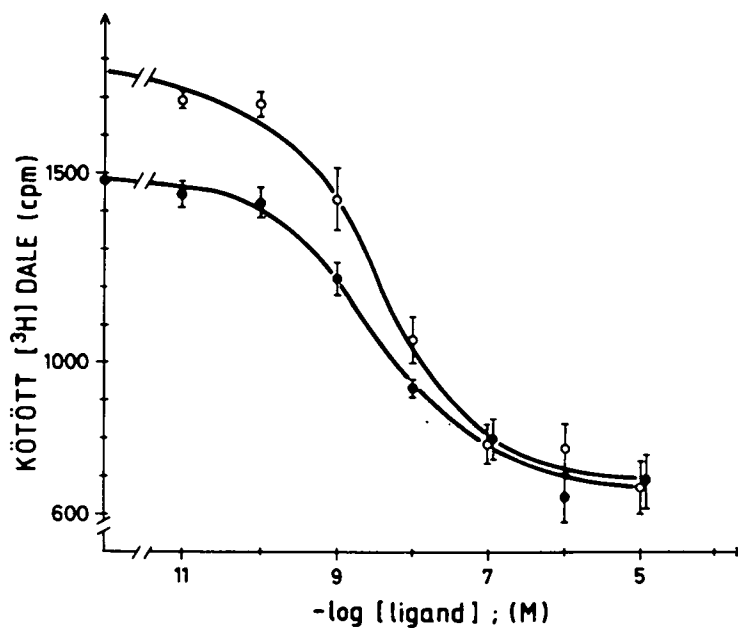
A jelzett ligand koncentrációja 3 nM volt. Az asszociációs és disszociációs kísérletben a korábbiakban leírtak szerint egyesített reakcióelegyeket használtunk, amelyekből az adott időpontokban 1 - 1 ml-es alikvotokat vettünk. A mintavételeket három párhuzamosban végeztük. A nem specifikus kötést (Δ) 10 μ M DALE jelenlétében határoztuk meg. Az inkubálás 23 $^{\circ}$ C-on történt.

sebességi állandók azonban nem különböztek szignifikánsan. 2) Ha a jelzett liganddal ekvilibrált rendszerhez adtunk 50 μM GppNHp-t, disszociációt észleltünk. 3) Guanin nukleotida jelenlétében növekedett a jelöletlen DALE hozzáadásával indított disszociáció sebessége. A disszociációs sebességi állandó (k_{-1}) értékek GppNHp nélkül 0,07, GppNHp jelenlétében 0,12 perc^{-1} voltak.

Meghatároztuk a jelöletlen DALE affinitását a patkány agyi opiát receptorokhoz 10 μM GppNHp jelenlétében (19. ábra). A kötőhelyek affinitására jellemző IC_{50} -érték (a jelöletlen ligand azon koncentrációja, amely a (^3H)DALE kötés 50%-os gátlását eredményezi) a kompetíciós görbéből meghatározható. A GppNHp gátolta ugyan a (^3H)DALE egyensúlyi kötődését (a leszorítási görbék lefutása különbözik), de nem változtatta szignifikánsan a receptor affinitását. Az IC_{50} értékek a két vizsgált esetben 3 nM körül voltak (19. ábra).

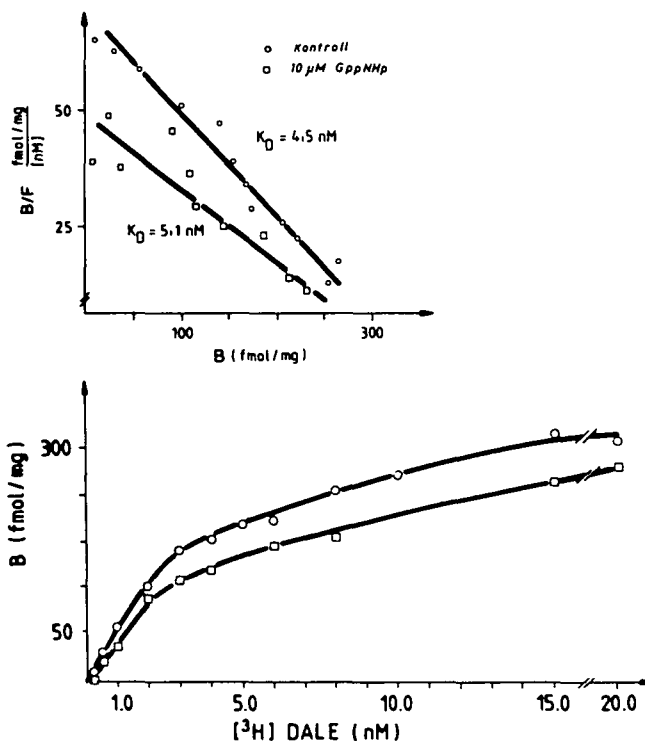
Tanulmányoztuk a GppNHp (10 μM) hatását a (^3H)DALE kötés ligandkoncentráció függésére. A telítési- és a megfelelő Scatchard görbéket a 20. ábrán mutatjuk be. Ebben a kísérletben a jelzett ligand delta szelektivitásának növelése céljából DAGO-val gátoltuk a keresztreakciót. A kísérleti adatok kiértékelésére a KINETFIT computer programot használtuk (Dr. Bagyinka Csaba, Biofizikai Intézet). GppNHp jelenlétében a B_{max} értékek csökkenését tapasztaltuk (290 fmol/mg fehérjéről 267 fmol/mg-ra, 8 %-os változás), egyidejűleg a receptor affinitása is csökkent (a K_d érték 4,5 nM-ról 5,1 nM-ra 12 %-os eltérés) növekedett. 50 μM GppNHp jelenlétében a B_{max} csökkenése kifejezettebb (15 %), a K_d megváltozása a nukleotida hatására 4,8 nM-ról 7,7 nM-ra pedig már szignifikáns volt.

3.5 Opiátok és opioid peptidek hatása a (^3H)DALE kötődésére



19. ábra. 10 μM GppNHp hatása a (^3H)DALE egyensúlyi kötődésére kompetíciós kísérletben.

A membrán preparátumot 5 nM (^3H)DALE és jelöletlen DALE különböző koncentrációinak (0,01 - 10000 nM) jelenlétében inkubáltuk 23 °C-on, 45 percig. A jelzett ligand kötődését (cpm), a jelöletlen DALE koncentráció függvényében tüntettük fel. (o): pufferes kontroll, (●): 10 μM GppNHp hatása



20. ábra. GppNHp hatása a (^3H)DALE kötési ligandkoncentráció függésére patkány agyi membrán preparátumban.

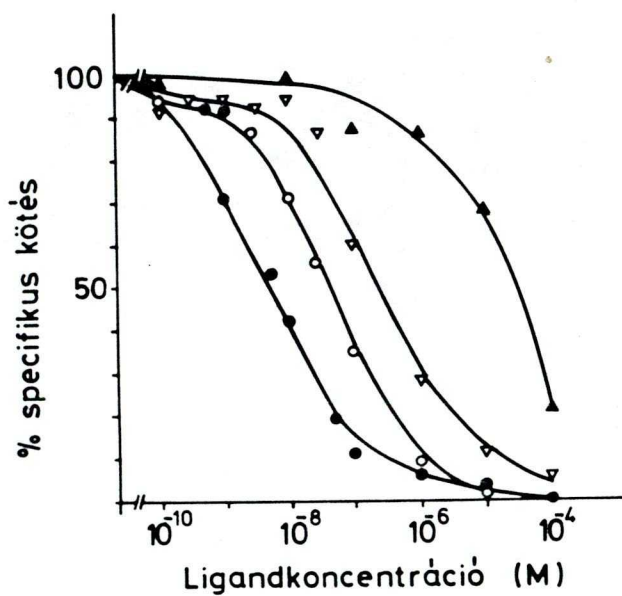
A 14. ábra szövegében leírt módon mértük a (^3H)DALE kötési ligandkoncentráció függését 10 μM GppNHp jelen- ($\square$), és távollétében ($\circ$). A nem specifikus kötést 10 μM DALE jelenlétében mértük. Csak a specifikus kötést ábrázoltuk. Az inkubálás (23°C , 45 perc) során 10 nM DAGO volt jelen a reakcióelegyekben. Az inzert a Scatchard transzformációt mutatja. Az adatok kiértékelése a KINETFIT számítógépes program segítségével történt.

3.5.1 Természetes és szintetikus opiátok hatása

A felhasznált vegyületek között morfinan vázas (levallorfan, levorfanol, dextrorfan), fenantrén vázas (naloxon, nalorfin és a természetes ópium alkaloid morfin), valamint benzomorfan (etilketociklazocin, EKC) és fenilpiperidin (szufentanil) származékok találhatók. A 21. ábrán bemutatott kompetíciós kísérletben három opiát ligand és - összehasonlítás céljából - a DALE hatását vizsgáltuk a (³H)DALE egyensúlyi kötésre. Valamennyi ligand koncentráció függő módon gátolta a tríciált enkefalin kötését (leszorítási görbék). A hatás mértékét itt is a specifikus kötés 50 %-os gátlását okozó ligandkoncentráció értékkel (IC₅₀) jellemezhetjük. Az affinitás sorrendje DALE levallorfan EKC dextrorfan volt. További kísérletek során meghatároztuk egy sor opiát ligand IC₅₀ értékeit a (³H)DALE kötőhelyekhez. A receptor kötést 0,5 és/vagy 5 nM tríciált ligand jelenlétében mértük (VI. táblázat). Az antagonistá nalo xon és levallorfan voltak a (³H)DALE kötés leghatékonyabb inhibitorai. A levorfanol és jobbra forgató sztereoizomerje, a dextrorfan IC₅₀ értékei közötti mintegy százszoros különbség az opiát kötőhelyek sztereospecifitását igazolja.

3.5.2. Opioid peptidek hatása

Az e fejezetben bemutatásra kerülő peptidek zömét az MTA KKKI peptidkémiai munkacsoportja állította elő szerkezet-hatástani vizsgálatok céljából. Referens ligandokként néhány kereskedelmi terméket is felhasználtunk. A szerkezeti változtatások a Gly² szubsztitúciójára, a C és az N terminális kémiai módosítására,



21. ábra. Opiát ligandok hatása a (^3H)DALE egyensúlyi kötésre patkány agyi membrán készítményben.

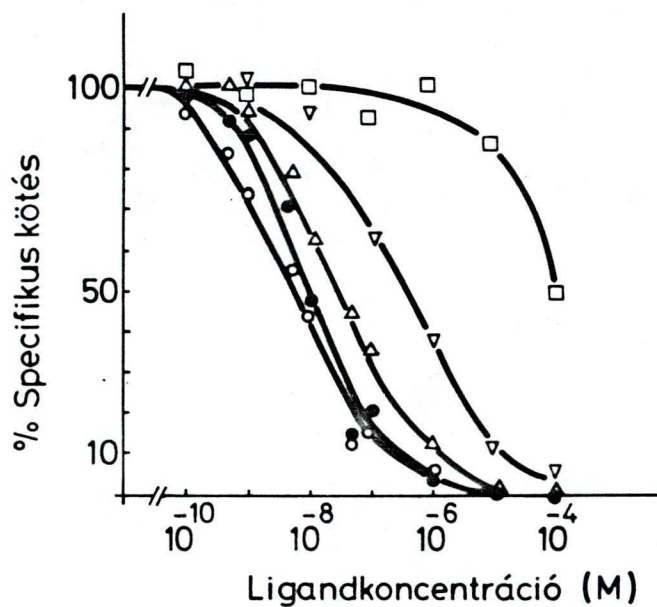
A membrán preparátumot 23°C -on, 45 percig inkubáltuk opiátok és 3 nM (^3H)DALE jelenlétében. A vizsgált anyagok koncentrációját 0,1 - 100000 nM között változtattuk. A specifikus kötést százalékosan tüntettük fel. (●): DALE, (○) levallorfan, (▽): etilketociklazocin, (Δ): dextrorfan

VI. Táblázat

Opiátok hatása a (³H)DALE egyensúlyi kötődésére
patkány agyi membrán preparátumban

Ligandok	Specifitás	IC ₅₀ értékek (nM)	
		(³ H)DALE (0,5 nM)	(³ H)DALE (5 nM)
Morfin	μ -agonista	70±20	-
Levorfanol	μ -agonista	40± 6	-
Dextrorfan	hatástalan	3500	10000
Szufentanil	μ -agonista	-	200
Etilketo- ciklazocin	κ -agonista	-	200
Levallorfan	antagonista	20± 7	40±7
Naloxon	antagonista	15± 3	30±5
Nalorfin	agonista/ antagonista	60±20	100

A jelöletlen ligandokat 0,01 - 100000 nM között használtuk. Az inkubálásokat szobahőmérsékleten, 45 percig végeztük a membrán preparátum (0,4-0,6 mg fehérje) és a (³H)DALE jelenlétében. A leszorítási görbék alapján meghatároztuk az IC₅₀ értékeket (± standard deviáció, ahol legalább három kísérlet volt).



22. ábra. Oioid peptidek hatása a (³H)DALE egyensúlyi kötésre patkány agyi membrán készítményben.

A membrán preparátumot 23 °C-on, 45 percig inkubáltuk jelöletlen enkefalin származékok és 3 nM (³H)DALE jelenlétében. A vizsgált anyagok koncentrációját 0,1 - 100000 nM között változtattuk. A specifikus kötést százalékosan tüntettük fel. (o): DALE, (Δ): Leu-enkefalin, (●): DALECK (▽): enkefalin pikolil észter, (□): karbamoil enkefalin.

valamint a pentapeptid szekvencia meghosszabbítására irányultak. A C terminális klórmetil keton származékokat a következő fejezetben tárgyaljuk.

A 22. ábrán öt enkefalin származék reprezentatív kompetíciós görbéit tüntettük fel. A legnagyobb affinitást a DALE mutatta, de számottevő gátlást okozott a Leu-enkefalin és a DALECK is. Az N terminálison módosított karbamoil enkefalin viszont hatástalan volt a (³H)DALE kötési tesztben. A további kísérletek eredményeit a VII. és a VIII. táblázatban foglaltuk össze. Az endogén, és a delta szelektív enkefalinok nagy affinitással (DALE > DADLE > DSLET > Leu-enkefalin > Met-enkefalin > DPDPE > ICI174864) kötődtek a (³H)DALE kötőhelyekhez. A C terminális észterifikálása metilészter formába némiképpen, pikolil észter kialakítása jelentékenyen csökkentette az affinitást. A C terminális aminosavakkal történő meghosszabbítása után jól mérhető, bár az enkefalinokéhoz képest kisebb affinitás értékeket találtunk (Met⁶ és Arg⁶-Arg⁷ = dinorfin¹⁻⁷ peptidek). Az N terminális tirozin módosítása (karbamoil enkefalin) vagy eltávolítása (Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg = dinorfin²⁻⁷) hatástalan származékokat eredményezett, viszont a melfalán képes volt a Tyr¹ helyettesítésére jelentősebb affinitás csökkenés nélkül. A pentapeptid szekvencia polaritásának megfordításával (C - N terminális cseréje, retro-enkefalin) az opioid aktivitás megszűnt. A mü₁ receptor szelektív, szintetikus ligandja, a ..DAGO mintegy 16-szor kisebb affinitást mutat a Leu-enkefalin származékokhoz (DALE, DADLE) képest, igaz viszont, hogy más delta szelektív ligandokhoz (DPDPE, ICI174864) viszonyítva a különbség csupán kétszeres.

3.6 Enkefalin klórmetil ketonok vizsgálata

VII. Táblázat

Enkefalin származékok hatása a (³H)DALE egyensúlyi kötődésére
patkány agyi membrán preparátumban

Szekvencia	Specifitás	Név	IC ₅₀ értékek (nM)	
			(³ H)DALE (0,5 nM)	(³ H)DALE (5 nM)
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	δ -agonista	Leu-enkefalin	6 ±3	16 ±7
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu	δ -agonista	DALE	3,7±1	5,5±1,5
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu	δ -agonista	DADLE	-	4
Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	μδ / -agonista	Met-enkefalin	8 ±3	21 ±5
N,N-diallil-Tyr-Aib-Phe-Leu	-antagonista	ICI 174864	-	40
Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr	inaktív	Retro-enk.	2000	20000
H ₂ NCO-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	inaktív	Karbamoil-enk.	4500	15000
Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen	δ -agonista	DPDPE	-	30
Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr	δ -agonista	DSLET	-	4
Tyr-D-Ala-Gly-(Me)Phe-Gly-ol	μ-agonista	DAGO (DAMGE)	-	80

A jelöletlen peptideket 0,01 - 100000 nM között használtuk. Az inkubálásokat szobahőmérsékleten, 45 percig végeztük a membrán preparátum (0,4-0,6 mg fehérje) és a (³H)DALE jelenlétében. A leszorítási görbék alapján meghatároztuk az IC₅₀ értékeket (± standard deviáció, ahol legalább három kísérlet volt).

VIII. Táblázat

Szintetikus enkefalin származékok hatása a (^3H)DALE egyensúlyi
kötődésére patkány agyi membrán preparátumban

Szekvencia	IC ₅₀ értékek (nM)	
	(^3H)DALE (0,5 nM)	(^3H)DALE (5 nM)
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O-(2-pikolil) (Enkefalin pikolil észter)	40 $\pm$ 20	260 $\pm$ 60
Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Lys-Lys-Gly-Gln	22 $\pm$ 4	36 $\pm$ 3
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Mel-OCH ₃	8 $\pm$ 2	20 $\pm$ 4
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-OCH ₃	10	-
Mel-Gly-Gly-Phe-Leu-OCH ₃	20	-
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg	-	120
Mel-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg	-	150
Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg	-	5000

A jelöletlen ligandokat 0,01 - 100000 nM között használtuk. Az inkubálásokat szobahőmérsékleten, 45 percig végeztük a membrán preparátum (0,4-0,6 mg fehérje) és a (^3H)DALE jelenlétében. A leszorítási görbék alapján meghatároztuk az IC₅₀ értékeket ($\pm$ standard deviáció, ahol legalább három kísérlet volt).

3.6.1 Kompetíciós kísérletek

Bizonyos aminosavak halometil keton származékait (pl. TPCK, TLCK) a hatvanas évek óta használják különböző proteolitikus enzimek irreverzibilis inhibítoraiként. Az enkefalinok hasonló származékai - elvileg - ugyancsak képesek lehetnek az opioid receptorok irreverzibilis (affinitás-) jelölésére.

A KKKI peptidkémiai csoportja által szintetizált enkefalin klórmetil keton származékok (IX. táblázat) receptor kötésben mutatott sajátságait a X. táblázatban hasonlítottuk össze. A delta agonista (^3H)DALE mellett a mű agonista (^3H)dihidromorfint ((^3H)DHM) és az antagonistát (^3H)naloxont is használtuk a kísérletek során. A klórmetil keton származékok tulajdonságait a megfelelő "alapvegyülettel" is összevethetjük. Megállapításaink a következők: Az enkefalin alapvázát hordozó öt klórmetil keton molekula nem veszítette el opiát aktivitását. A (^3H)naloxon jelenlétében meghatározott IC_{50} értékek nem, vagy csak kevéssé különböztek a natív származékok hasonló értékeitől. Az affinitás változatlansága a DAMK esetében a legkifejezettebb. Ugyanakkor az aminosav származékok (TPCK, TLCK) és a dipeptid klórmetil keton inaktívak voltak a receptor kötésben. A klórmetil keton funkciós csoport tehát megfelelő struktúra nélkül nem reagál az opiát receptorokkal. A Na^+ index alapján valamennyi vizsgált enkefalin klórmetil keton agonista sajátságot mutatott in vitro. A mű és delta szelektív ligandokkal mért IC_{50} értékekből és ezek arányaiból (X. táblázat, utolsó oszlop) a ligandok receptor altípus szelektivitásának változásaira következtethetünk.

Míg az enkefalinok (a DAGO nem!) az opiát receptor delta altípusa felé mutatnak preferenciát, addig az enkefalin klórmetil ketonok

IX. táblázat

Enkefalin- és enkefalin klórmetil keton származékok ()
aminosav sorrendjei

$\text{H}_2\text{N-Tyr-Gly - Gly - Phe - Leu-COOH}$	LE
$\text{---+--- D-Ala ---+---+---+--- COOH}$	DALE
$\text{---+--- D-Ala ---+---+--- D-Leu-COOH}$	DADLE
$\text{---+---+---+---+--- COCH}_2\text{Cl}$	LECK [*]
$\text{---+--- D-Ala ---+---+--- COCH}_2\text{Cl}$	DALECK [*]
$\text{---+--- D Ala ---+---+--- D-Leu-COCH}_2\text{Cl}$	DADLECK [*]
$\text{---+--- D-Ala ---+--- MePhe - Gly - ol}$	DAGO
$\text{---+--- D Ala ---+--- MePhe - CH}_2\text{Cl}$	DAMK [*]

X. táblázat

Enkefalin klórmetil keton származékok vizsgálata opiát receptor kötési tesztekben

Jelöletlen peptid	IC ₅₀ (nM)		Na ⁺ index	IC ₅₀ (nM)		mu/delta arány
	(³ H)naloxon pufferben	+100 mM NaCl		(³ H)DHM (mu)	(³ H)DALE (delta)	
Leucin enkefalin (LE)	120	2000	17	70	6	12
DALE	100	2000	20	20	3	10
DADLE	90	1500	17	50	4	12
DAGO	8	200	25	2	80	0,025
LECK	60	3000	50	20	20	1
DALECK	50	1000	20	10	15	0,7
DADLECK	60	2500	40	20	20	1
DAMK	10	200	20	2	80	0,025
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH-NH-CO- -(CH ₂) ₂ -NH-CO-NH-(CH ₂) ₂ -Cl		2000	20	32	45	0,7
TPCK	30000	20000	-	-	-	-
Phe-Leu-CK	100000	-	-	-	-	-
TLCK	80000	80000	25	2	-	-

Meghatároztuk a jelöletlen klórmetil keton származékok IC₅₀ értékeit különféle triciált opioid ligandokkal (2 nM (³H)naloxon, vagy 3 nM (³H)DHM, vagy 3 nM (³H)DALE). A vizsgált koncentráció tartomány 0,01-100000 nM-ig terjedt.

Na⁺ index: IC₅₀ Na⁺ jelenlétében / IC₅₀ Na⁺ nélkül

Mű/delta arány: (³H)DHM IC₅₀ / (³H)DALE IC₅₀

szelektivitási mutatói a mű specificitás irányába mozdultak el (DAMK · DALECK > DADLECK = LECK). A DAMK kivételével az IC₅₀ értékek nagyságából önmagában nem következtethetünk ezen ligandok mű szelektivitására, hiszen a két rendszerben (³H)DALE-nal és (³H)DHM-nal mért affinitások számértékei gyakorlatilag azonosak. Ugyanakkor a natív enkefalinokhoz képest bekövetkezett mintegy nagyságrendnyi változás a mű/delta arányban (X. táblázat) kifejezi az enkefalin klórmetil ketonok mű szelektivitásának növekedését és/vagy a delta preferencia csökkenését.

3.6.2 A klórmetil keton származékok irreverzibilis kötődése

Mivel kísérleteinkben az enkefalin klórmetil ketonok jelöletlenek voltak, az irreverzibilitási vizsgálatok indirekt módon, "hideg" klórmetil ketonokkal és radioaktív opiát ligandok felhasználásával történtek. Úgy jártunk el, hogy a patkány agyi membrán preparátumot előinkubáltuk a tesztelendő anyagokkal, majd a ligand feleslegét centrifugálással (25000 x g) eltávolítottuk. Az üledék reszuszpendálása és pufferes hígítása után a ligand reverzibilisen kötött formáját 15 perces, szobahőmérsékleten végrehajtott inkubálás során disszociáltattuk. Az első centrifugálási / disszociációs lépést háromszor megismételtük. A végső üledék pufferben történő homogenizálása után, tríciált ligandokkal mértük a preparátum opiát receptor kötését (maradék aktivitás visszamérése). Pufferrel előinkubált membrán készítmény szolgált kontrollként. A reverzibilisen kötött ligand-frakció eltávolítására az alkalmazott módszer megfelelőnek bizonyult, mert reverzibilis ligandokkal és csak pufferrel előinkubált receptor preparátum a négy mosási lépés után

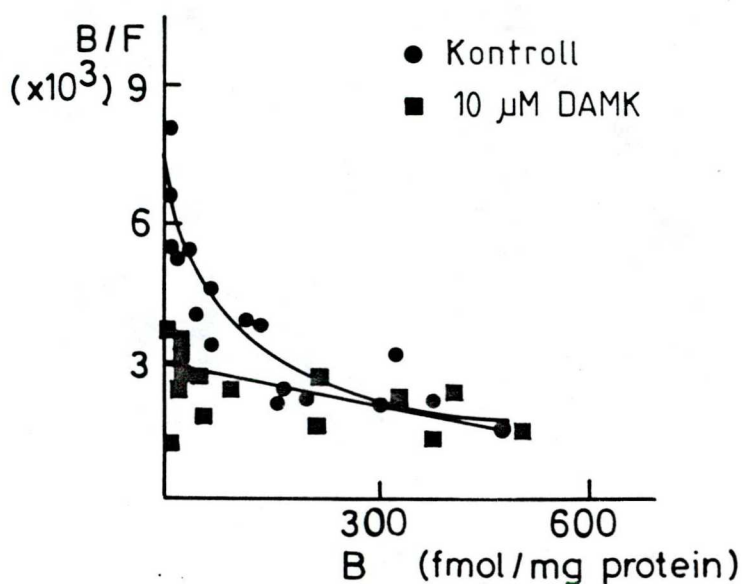
azonos receptor kötést mutatott.

Az enkefalin klórmetyl ketonok irreverzibilisen gátolták a nagy affinitású (^3H)naloxon kötőhelyet (23. ábra). A (^3H)naloxon telítési görbék Scatchard analízise alapján nyilvánvaló, hogy 10 μM DAMK előinkubálás "eltünteti" a pufferes előkezelés után egyébként jól detektálható nagy affinitású kötőhelyeket. Hasonló eredményeket kaptunk a LECK és DADLECK (141) valamint a DALECK (55) esetében is.

A kompetíciós kísérletben mű specifikusnak talált DAMK 1 μM koncentrációban szignifikánsan gátolta a (^3H)DHM kötődését, de nem volt számottevő hatása a (^3H)DALE kötődésére (24. ábra). A (^3H)DHM kötés gátlása a kötőkapacitás mintegy 40 %-os csökkenésével értelmezhető, a K_d értékek változatlanok maradtak.

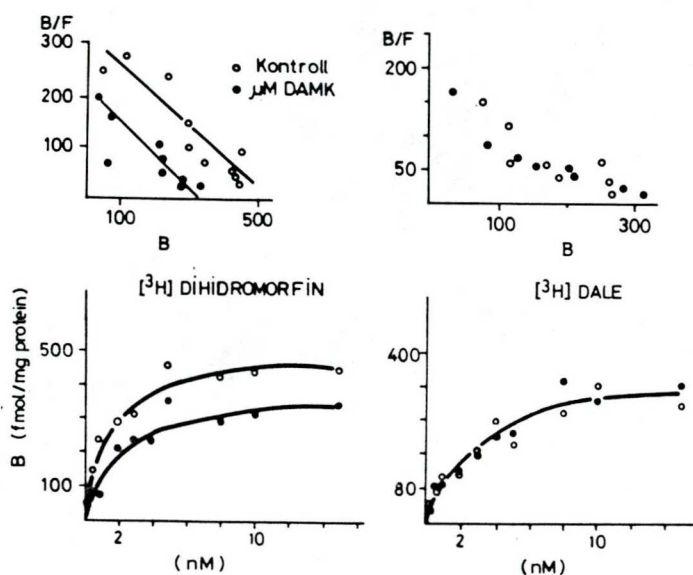
A 25. ábrán a LECK és a DALECK kötődés irreverzibilitását mutatjuk be mű szelektív (^3H)DAGO és delta szelektív (^3H)DALE peptidekkel végrehajtott mérések alapján. A klórmetyl keton affinitás jelölőket 50 μM -os koncentrációkban alkalmazva a (^3H)DAGO kötés 50 %-os, a (^3H)DALE kötés 10-15 %-os gátlását észleltük. A klórmetyl ketonok koncentrációjának további növelése nem fokozta a gátló hatásokat.

A 26. ábrán összefoglaltuk a klórmetyl keton-, és az ugyancsak kovalensen kötődő, mustárnitrogén funkciós csoportot tartalmazó melfalán származékok irreverzibilis hatását a (^3H)DALE egyensúlyi kötődésére. Az alkiláló csoportot nem tartalmazó ligandok (naloxon, DADLE), és a reaktív funkciót opioid ligand struktúra nélkül hordozó vegyületek (melfalán, Phe-Leu-CK) sem mutattak irreverzibilis receptor kötést. Az enkefalin klórmetyl ketonok is csak viszonylag nagy (50) μM -os koncentrációban gátolták a (^3H)DALE kötődését, szemben a már 5 μM -ban hatékony Mel¹-DALE-OMe-rel. Az enkefalin klórmetyl keton származékok a (^3H)DHM és (^3H)DAGO kötődését számottevően nagyobb



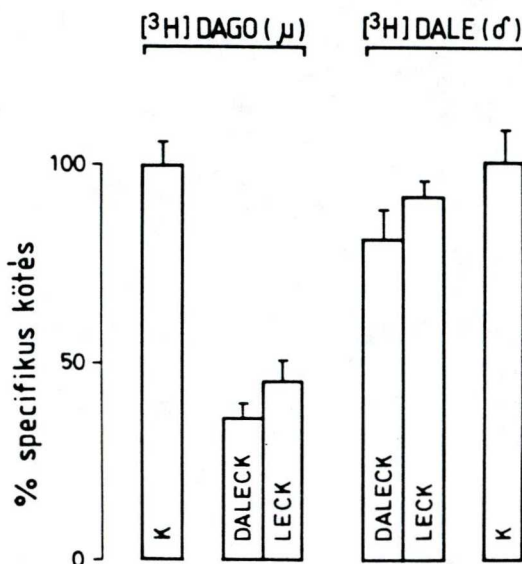
23. ábra. Specifikus (^3H)naloxon kötés koncentráció függésének Scatchard analízisei DAMK jelen- és távollétében.

A membránfehérjét 30°C -on 60 percig előinkubáltuk TRIS/HCL pufferrel (●) vagy $10\ \mu\text{M}$ DAMK-nal (■), majd a preparátumot négyszer mostuk. Minden mosásos lépés $25000 \times g$ -vel történő centrifugálást, pufferes reszuszpendálást, és 23°C -os 15 perces inkubálást foglalt magában. A (^3H)naloxon kötés mérése 0°C -on, 60 perc után történt. A (^3H)naloxon koncentrációját $0,05 - 25\ \text{nM}$ között változtattuk. A nem specifikus kötést $10\ \mu\text{M}$ naloxon jelenlétében határoztuk meg. B: kötött, F: kötésben nem lévő (szabad) ligand. A pontok három párhuzamos inkubálás középértékeit reprezentálják. A fehérje koncentrációkat Bradford módszere alapján mértük (154).



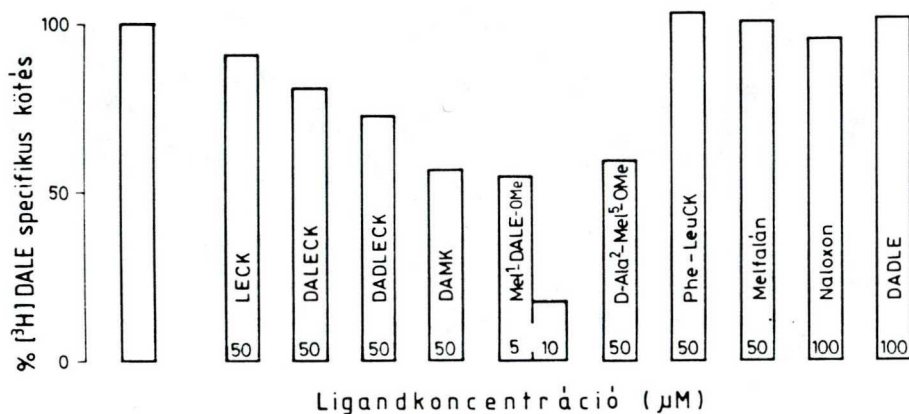
24. ábra. DAMK hatása a (^3H)DHM és a (^3H)DALE kötés ligandkoncentráció függésére patkány agyi membrán preparátumban.

A 23. ábra szövegében leírt módon inkubáltuk és mostuk a membrán frakciót, majd a mintákban mértük a (^3H)DHM (20 perc, 23 °C) és a (^3H)DALE (45 perc, 23 °C, 10 nM DAGO jelenlétében) kötés ligandkoncentráció függését. A nem specifikus kötést 10 uM morfin, illetve DALE segítségével határoztuk meg. Csak a specifikus kötést ábrázoltuk. Az inzertek a Scatchard transzformációkat mutatják. B: kötött, F: kötésben nem lévő (szabad) ligand. (o): pufferes kontroll, (●): 1 uM DAMK-nal végrehajtott előinkubálás. A pontok három párhuzamos inkubálás középértékeit reprezentálják. A protein meghatározás Bradford módszerével történt.



25. ábra. Enkefalin klórmetyl ketonok irreverzibilis hatása a $(^3\text{H})\text{DAGO}$ és a $(^3\text{H})\text{DALE}$ egyensúlyi kötődésére.

A patkány agyi membrán frakciókat (5 ml térfogat, 4-6 mg/ml protein) 23°C -on 90 percig előinkubáltuk az enkefalin klórmetyl ketonokkal (50 μM), majd a 23. ábrán leírt módszerrel mostuk a preparátumot. A következőkben a mintákat 3 nM $(^3\text{H})\text{DAGO}$ (35°C , 40 perc) vagy 3 nM $(^3\text{H})\text{DALE}$ (23°C , 45 perc, 10 nM "hideg" DAGO jelenlétében) inkubáltuk és szűrtük. A nem specifikus kötés meghatározása levorfanol, illetve DALE jelenlétében történt. A specifikus (^3H) ligand kötést a fehérje koncentrációkkal történő korrekció után a (pufferes) kontroll százalékában fejeztük ki. A fehérje meghatározás Bradford módszerével történt. Az adatok 5 - 5 párhuzamos minta átlagát ($\pm$ SD) jelentik.



26.  bra. Reverzibilis és irreverzibilis kötődést mutató ligandok hatása a (³H)DALE kötődésére.

Az előző ábrán ismertetetett módon meghatároztuk a rendelkezésre álló affinit sjel l k, és néhány referens vegyület irreverzibilis (mosás rezisztens) gátló hatását. A maradék (3 nM (³H)DALE jelenlétében visszamérhető) opiát aktivitásokat a kontroll (pufferes előinkubálás + 4 mosás után mért) specifikus kötés százalékában adtuk meg.

mértékben gátolták, mint a (^3H)DALE kötését (141,14 , és 25. ábra).

4. M E G V I T A T Á S

4.1 A (^3H)DALE kötődés jellemzői patkány agyi membrán preparátumban

Vizsgáltuk a patkány agyból preparált partikuláris sejtmembrán frakció és egy triciált enkefalin analóg, a (^3H)DALE kölcsönhatásait opiát receptor kötési tesztben. A jelzett ligand viszonylag nagy fajlagos aktivitása (37,3 Ci/mmol) és tisztasága (150) megfelelt a kötési kísérletekben megkövetelt elvárásoknak. A mérés technikai szempontból lényeges, a szabad és a kötött ligand szeparálását lehetővé tevő módszerek (157) közül a szűrési elválasztást alkalmaztuk sikeresen. Ez a tény sorozatmérések kényelmes elvégzését is lehetővé tette. Öröndetes volt, hogy a használt GF/C üvegszálas szűrőkorong kis ligandvisszatartó képességgel, ennek megfelelően alacsony háttér aktivitással rendelkezett (6. ábra). Kis beütésszám értékekkel dolgozva a tényleges aktivitások meghatározása során a filter háttérrel figyelembe vettük. A szcintillációs mérésekben a minták önabszorpciója és quenchelése elhanyagolható volt.

A (^3H)DALE reverzibilisen kötődött a patkány agyi opiát receptorokhoz. Mind az asszociáció, mind a disszociáció sebessége viszonylag lassú volt, egyéb az irodalomból ismert peptid ligandhoz hasonlóan (23,158). A receptor ligand komplexet 23 °C-on 20 perces félélet idővel jellemeztük (11. ábra). A disszociációs kísérletekben a ligandkötő helyek heterogenitását figyeltük meg. A heterogén receptor populációban két, kötési sajátágaiban különböző ligandkötő helyet találtunk (11. ábra). A két kötőhely létezése egyensúlyi körülmények között is kimutatható (13. ábra). Az egyik (^3H)DALE kötőhely nagyobb affinitással kötötte a jelzett ligandot (nagy affinitású, vagy a

kinetikai kísérletekben "lassan" disszociáló kötőhely), míg a kötőhelyek másik csoportja kisebb affinitást mutatott a tríciált ligandhoz (alacsony affinitású, vagy "gyorsan" disszociáló kötőhely). Itt kell megjegyeznünk, hogy a disszociációs görbe bifázikus jellege és a látszólagos asszociációs sebességi állandó (k_{ob}) koncentráció függése (III. táblázat) alapján a kötőhelyek esetleges kooperativitása is felvethető. Ezt a lehetőséget a 12. ábrán bemutatott disszociációs kísérlet nem erősítette meg, így rendszerünkben kooperatív kölcsönhatások létezését kizárhatjuk (155). A kinetikai és egyensúlyi mérések alapján számított K_d értékek igen jó egyezést mutatnak (V. táblázat).

Két független enkefalin kötőhely detektálására számos irodalmi adatot találunk (13,35,159), de ismerünk ennek ellentmondó eredményeket is (21). A homogén receptor populáció vagy két független kötőhely kérdésének megválaszolásához elsősorban nagy moláris aktivitású ligand, másodsorban megbízható, lehetőleg számítógépes analízis szükséges. A telítési görbék minden esetben kiértékeljük az egy és a két független kötőhelyes modelleken alapuló programmal is, és a közelített görbék korrelációs együtthatói alapján állapítottuk meg az illeszkedés pontosságát, ebből pedig meghatároztuk a kísérleteknek legjobban megfelelő modellt. A (3H)DALE esetében ez a két kötőhelyes modell volt.

DAGO jelenlétében végrehajtott kísérletek értékelése során lineáris Scatchard görbékét észleltünk, ennek megfelelően a (3H)DALE kötődése a mű szelektív ligand jelenlétében homogén receptor populációhoz történik (14. ábra). A Pasternak és munkatársai által felvetett hipotézis értelmében a különböző opiát ligandok és az enkefalinok nagy affinitású kötőhelyei azonos receptor populációt

jelentenek. Ezt a kötőhelyet tekintik az analgészia, antinocicepció közvetítésében szerepet játszó receptor struktúrának (52,160). A DAGO $m\ddot{u}_1$ szelektivitásával és a $m\ddot{u}$ receptorokhoz mutatott nagy affinitásával (127,128) értelmezhetjük a $(^3H)DALE$ kötődés megváltozását. A $m\ddot{u}$ receptorok DAGO-val történő blokkolása ugyanakkor a mérési körülményeket teszi szelektívebbé. Ezt a lehetőséget a további kísérletekben felhasználtuk a receptor altípusok és a mérésükre használt ligandok közötti kereszt reakciók csökkentésére.

Kívülről a rendszerbe vitt kationokkal regulálni tudtuk a $(^3H)DALE$ ekvilibrium kötődését (15. és 16. ábrák). Az endogén ionkörnyezetet a membránpreparátum többszöri előzetes kimosásával szüntettük meg, így a lehetőségekhez képest "tisztá" hatásokat detektálhattunk. A megfigyelt ionhatások jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal (35,49,88,161). A Na^+ ionok jelenlétében kapott kötőhely gátlást valamint a Mg^{2+} ionok ezzel ellentétes hatásait a bevezetésben körvonalazott allosztérikus kölcsönhatásokat feltételező konformációs modell (1. ábra) illetve annak továbbfejlesztett változatai (162,163) alapján értelmezhetjük. Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a Na^+ ionok jelenlétében tapasztalt gátlás a kötőhelyek maximális számának és/vagy a receptor ligand komplex disszociációs állandójának megváltozásából adódik-e, saját kísérleteket nem végeztünk. A legtöbb irodalmi adat a K_d és a B_{max} értékek egyidejű megváltozására utal.

A guanin nukleotidák $(^3H)DALE$ kötésre gyakorolt hatásának mechanizmusa, valamint a kötés gátlásának hatóanyag koncentráció függése az előzőektől eltérő. Vizsgálatainkban a metabolikusan stabil GTP analógot (GppNHp) alkalmaztunk a bomlékony guanozintrifoszfát helyett. A GppNHp egyrészt növelte a ligand indukálta disszociáció sebességét, másrészt valószínűleg a G_i fehérjén keresztül önmagában is

indukálta a receptor ligand komplex disszociációját (18. ábra). A disszociációs állandó (K_d) GppNHp jelenlétében mérhető növekedését (azaz a receptor affinitásának csökkenését), igaz, csak viszonylag nagy GppNHp koncentrációknál, egyensúlyi mérésekkel is kimutattuk. A GppNHp a Na^+ ionok hatásával szinergizmust mutatott az egyensúlyi mérésekben, sőt a 17. ábrán bemutatott kísérleti adatok alapján a gátlás additivitásának lehetősége is felmerül. Mind az additivitás ténye, mind pedig a (^3H)DALE kötés azonos mértékű gátlásához szükséges koncentrációk közötti nagyságrendnyi különbség az egyértékű kationok és a guanil nukleotidák különböző támadáspontjaira utalnak. Az eltérő hatásmechanizmust az irodalmi adatok is megerősítik (164).

Lényeges információkat nyújtanak a kompetíciós kísérletek eredményei a (^3H)DALE kötőhelyek szelektivitásával kapcsolatban. A ligandok affinitását jellemző mérőszámok (IC_{50} értékek) összevetéséből az enkefalinok antagonisták morfin etilketociklazocin hatáserősségi sort állapíthatjuk meg (21. ábra). Másképpen fogalmazva ez a (^3H)DALE kötőhelyek $\delta > \mu > \kappa$ szelektivitását jelenti. A mért affinitási értékek jó közelítéssel megegyeznek az irodalomból ismert értékekkel (pl. 162). A (hatékony) δ ligandok pl.DALE és a morfin affinitása közötti különbség körülbelül egy nagyságrend. Annak megítélése, hogy ez sok-e, avagy kevés, meglehetősen viszonylagos. Az irodalom az opioid receptorok és a szelektívligandok vonatkozásában a telítési görbékből számítható K_d , és a kompetíciós kísérletekből nyerhető IC_{50} értékek közötti legalább tízszeres különbséget tekinti szignifikánsnak (165). A kísérleti adatok értékelése során nem használtuk az irodalomban a kompetíció mértékének jellemzésére elterjedt K_i inhibítor állandót, mert az annak meghatározására használt Cheng-Prushoff egyenlet (166) formailag eleve egy homogén

ligandkötő helyet feltételez.

4.2 A (^3H)DALE receptor kötési teszt alkalmazása szerkezet - hatás összefüggések vizsgálatában

A receptor kötési teszt újonnan szintetizált ligandok (hormon-, neurotranszmitter- analógok, gyógyszerek) vizsgálatában ma már nélkülözhetetlen, és sok tekintetben más módszerekkel nem is helyettesíthető.

Ebben a dolgozatban az enkefalin molekula kémiai szerkezeti módosításainak a biológiai hatás (opiát aktivitás) megváltozásában jelentkező következményeit két szempontból vizsgáltuk: 1) Hogyan befolyásolja a struktúra megváltozása a ligandok affinitását a (^3H)DALE kötőhelyekhez? 2) Találunk-e az opiát receptorhoz irreverzibilisen kötődő enkefalin analógot?

Az első kérdés megválaszolására megállapítottuk, hogy a legnagyobb affinitása a (^3H)DALE kötőhelyekhez magának a jelöletlen DALE-nak és a DADLE-nak volt. Kisebb affinitást mutatott mind a két természetes enkefalin, valamint az összes egyéb vizsgált származék. A natív enkefalinok viszonylag alacsonyabb affinitása talán az enkefalináz hatásának következménye lehet, bár a reakcióelegy minden esetben tartalmazott bacitracint is (167). Ha eltekintünk a D-aminosav tartalmú peptidáz rezisztens enkefalinoktól, akkor az összes kémiai módosítás végső soron az enkefalin hatások csökkenését eredményezte (VII. és VIII. táblázatok). A C terminális észterifikálása (O-metil és pikolil észterek), aminosavakkal (Arg-Arg, Lys-Lys-Gly-Gln, Met stb.) történő meghosszabbítása, az opiát aktivitás mérsékelt csökkenését okozta. Ugyanakkor az N-terminális tirozin modifikációja (karbamoil

enkefalin) és a fordított polaritású pentapeptid szekvencia (retro-enkefalin) kialakítása drasztikusan csökkentette az aktivitást. Ugyanezen származékok különféle perifériás szervi- szöveti preparátumokon a receptor kötési kísérletekben látottakhoz igen hasonló relatív hatásváltozásokat produkáltak farmakológiai kísérletekben (168).

A másik kérdés eldöntése céljából közvetett módszert dolgoztunk ki az irreverzibilis kötődés mérésére. A módszer alkalmazásakor a membránpreparátumot előinkubáltuk az irreverzibilis liganddal, ezt követően a ligand feleslegét, illetve a csak reverzibilisen kötött hányadát a preparátum "mosása" során a rendszerből eltávolítottuk. Az irreverzibilis ligand által elfoglalt opioid kötőhelyek meghatározása úgy történt, hogy a maradék aktivitást reverzibilisen kötődő, tríciált liganddal visszamértük.

In vitro irreverzibilis kötődési sajátosságokat az általunk vizsgált enkefalin származékok két csoportja mutatott: 1) a szintetikus melfalán aminosavval szubsztituált struktúrák, és a 2) halometil keton származékok. Ezen hely specifikus irreverzibilis ligandok közül a legnagyobb delta receptor szelektivitási mutatóval a Mel¹-DALE-OMe rendelkezett. A C terminális aminosav szabad karboxil csoportjának klórmetil ketonná történő konvertálása viszont rontott az enkefalin jellegen, azaz a delta specifitáson. Mindkét molekulatípusra igaz, hogy az alkiláló funkciós csoportok (nitrogénmustár vagy klórmetil keton) csak a megfelelő opioid peptidhez kapcsolva mutattak irreverzibilis kötődést az opiát receptorokhoz. A melfalán önmagában, vagy a Phe-Leu-klórmetil keton még nagy koncentrációban sem okozott irreverzibilis gátlást (26. ábra). Ugyanakkor a funkciós csoportokat nem hordozó szerkezetanalóg peptidek csak reverzibilis kötési

sajátságokkal rendelkeztek.

A peptid affinitásjelölők közül az enkefalin klórmetil keton származékait vizsgáltuk részletesebben. Kimutattuk, hogy mikromólos koncentráció tartományban alkalmazva irreverzibilis módon gátolták a nagy affinitású (^3H)naloxon kötőhelyet, amelyet gyakran az analgéziáért felelős receptor aktív helyének tekintenek (160). Ugyanakkor a kis affinitású naloxon kötőhelyek lényegében változatlanul maradtak a klórmetil ketonokkal végrehajtott előkezelés után (23. ábra). A receptor kötési kísérletekben kimutatott irreverzibilis kötődést a μ_1 receptorhoz megerősíteni látszanak az enkefalin klórmetil ketonok in vivo analgetikus (55), és in vitro izolált szerv készítményeken mutatott hatásai (142).

A radioaktívan jelzett, klórmetil keton hatócsoporthoz tartozó peptid származékokkal végzett egyéb kísérletek (fluorográfia, pH függés vizsgálata, N-etil-maleimid kezelés hatása a klórmetil ketonok kötődésére, stb., 109) és az irodalmi adatok is alátámasztják az irreverzibilis kötés kovalens természetét, továbbá valószínűsítik egy nukleofil centrummal, feltehetően szulfhidril csoporttal történő kémiai reakciót a receptor affinitásjelölése során. E feltételezett reakciócentrum és a receptor kötőhely minden bizonnyal térbelileg közel esnek egymáshoz, mert a funkciós csoport távolítása az enkefalin alapvázról $(\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH-NH-CO-(CH}_2)_2\text{-NH-CO-NH-(CH}_2)_2\text{Cl})$ jelentősen csökkentette az irreverzibilis kötődés hatékonyságát.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Ebben a dolgozatban jellemeztük a $(^3\text{H})\text{D-Ala}^2\text{-Leu}^5$ -enkefalin kötődését patkány agyi membrán frakció opioid receptoraihoz. A jelzett ligand kötődése megfelelt a receptor kötés elfogadott kritériumainak: telíthető, sztereospecifikus és reverzibilis volt (150).

Kinetikai és egyensúlyi méréseink alapján is két ligandkötő helyet mutattunk ki a preparátumban, amelyek 0,7 nM-os és 5,5 nM-os disszociációs állandókkal jellemezhetők (150). Az összes opioid kötőhelyek mintegy 25 %-a tekinthető a nagy affinitású ligandkötő helynek.

A $(^3\text{H})\text{DALE}$ kötődése kation- és guanil nukleotida függő regulációt mutatott. Az egyértékű kationok, a guanozin trifoszfát, valamint az 5'-guanililimidodifoszfát gátolták a ligand egyensúlyi kötődését (169). A kétértékű kationok hatása ezzel ellentétes volt.

Az enkefalinok viszonylag jobban gátolták a $(^3\text{H})\text{DALE}$ kötést patkány agyi membrán preparátumban, mint a morfin vázas alkaloidák. A triciált peptid a mű (morfin) receptorok egyidejű szupresszálása mellett alkalmas ligand a delta (enkefalin) receptorok mérésére.

A vizsgált enkefalin analógok közül a melfalán, illetve a klórmetyl keton funkciós csoportokat tartalmazó származékok in vitro irreverzibilis módon kötődtek a sejtmembrán preparátumhoz. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az irreverzibilis (kovalens) kölcsönhatás kialakításában a mű receptor altípus vesz részt, míg a delta receptorok szelektív affinitás-jelölésére ezen ligandok nem alkalmasak (141,143).

5.1 A dolgozat alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

1. Benyhe, S., Tóth, G., Kevei, J., Szűcs, M. és Borsodi, A. (1984) Binding of D-Ala²-(Tyr-3,5-³H)-enkephalin (Leu⁵) to opiate receptors of rat brain membranes. Acta Physiol. Hung. 64: 175.
2. Benyhe, S., Tóth, G., Kevei, J., Szűcs, M., Borsodi, A., Di-Glória K., Szécsi, J., Süli-Vargha, H. és Medzihradsky, K. (1985) Characterization of rat brain opioid receptors by (Tyr-3,5-³H)-D-Ala²Leu⁵-enkephalin binding. Neurochem. Res. 10: 551-559.
3. Benyhe, S., Hepp, J., Szűcs, M., Simon, J., Borsodi, A., Medzihradsky, K. és Wollemann, M. (1986) Irreversible labelling of rat brain opioid receptors by enkephalin chloromethyl ketones. Neuropeptides 8: 173-184.
4. Benyhe, S. és Wollemann, M. (1986a) The effect of guanylnucleotides, magnesium and sodium ions on opiate receptor binding. Acta Physiol. Hung. 68: 359.
5. Benyhe, S. és Wollemann, M. (1986b) Different effects of metal cations and guanine nucleotides on opioid agonists and antagonist binding. Proceedings of 17th FEBS Meeting, Berlin (West), Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367: 303.
6. Benyhe, S., Hepp, J., Simon, J., Borsodi, A., Medzihradsky, K. és Wollemann, M. (1987) Tyr-D-Ala-Gly-(Me)Phe-chloromethyl ketone: a mu specific affinity label for the opioid receptor. Neuropeptides 9: 225-235.
7. Benyhe, S., Szűcs, M., Varga, É., Simon, J., Borsodi, A. és Wollemann, M. (1989) Cation and guanine nucleotide effects on ligand binding properties of mu and delta opioid receptors in rat brain membranes. Acta Biochim. Biophys. Hung. 24: 69-81.

6. I R O D A L O M

1. Goldstein, A., Lowney, L. I. and Pal, B. K.: Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1742-1747. (1971)
2. Pert, C. B. and Snyder, S. H.: Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014. (1973)
3. Terenius, L.: Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 32: 317-320. (1973)
4. Simon, E. J., Hiller, J. M. and Edelman, I.₃: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesics (³H)etorphine to rat brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1947-1949. (1973)
5. Hughes, J.: Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88: 295-308. (1975)
6. Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A. and Morris, H. R.: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579. (1975)
7. Teschemacher, H., Opheim, K. E., Cox, B. M. and Goldstein, A.: A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. I. Isolation. *Life Sci.* 16: 1771-1775. (1975)
8. Li, C. H. and Chung, D.: Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1145-1148. (1976)
9. Bradbury, A. F., Smyth, D. G., Snell, C. R., Birdsall, N. J. M. and Hulme, E. C.: C fragment lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors. *Nature* 260: 793-795. (1976)
10. Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M. and Hood, L.: Dynorphin (1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6666-6670. (1979)
11. Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. G., Huppler, R. E. and Gilbert, P. E.: The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharm. Exp. Ther.* 197: 517-532. (1976)
12. Lord, J. A. H., Waterfield, A. A., Hughes, J. and Kosterlitz, H. W.: Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-499. (1977)

13. Chang, K. J. and Cuatrecasas, P.: Multiple opiate receptors: Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. *J. Biol. Chem.* 254: 2610-2618. (1979)
14. Schulz, R., Faase, E., Wüster, M. and Herz, A.: Selective receptors for beta-endorphin on the rat vas deferens. *Life Sci.* 24: 843-850. (1979)
15. Hiller, J. M. and Simon, E. J.: (³H)ethylketocyclazocine binding: lack of evidence for a separate kappa receptor in rat CNS. *Eur. J. Pharmacol.* 60: 389-390. (1979)
16. Zykin, R. S. and Zukin, S. R.: Demonstration of (³H)cyclazocine binding to multiple opiate receptor sites. *Mol. Pharmacol.* 20: 246-254. (1981)
17. Wolozin, B. L. and Pasternak, G. W.: Classification of multiple morphine and enkephaline binding sites in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6181-6185. (1981)
18. Itzhak, Y., Hiller, J. M. and Simon, E. J.: Characterization of specific binding sites for (³H)(d)-N-allylnormetazocine in rat brain membranes. *Mol. Pharmacol.* 27: 46-52. (1984)
19. Pasternak, G. W., Wilson, H. A. and Snyder, S. H.: Differential effects of protein modifying reagents on receptor binding of opiate agonists and antagonists. *Mol. Pharmacol.* 11: 340-351. (1975)
20. Zukin, S. R., Tempel, A., Gardner, E. L. and Zukin, R. S.: Interaction of (³H)(-)-SKF-10,047 with brain sigma receptors: Characterization and autoradiographic visualization. *J. Neurochem.* 46: 1032-1041. (1986)
21. Law, P. Y., Loh, H. H. and Li, C. H.: Properties and localization of beta-endorphin receptor in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5455-5459. (1979)
22. Pasternak, G. W.: Multiple opiate receptors: (³H)-ethylketocyclazocine receptor binding and ketocyclazocine analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3691-3694. (1980)
23. Low, P. Y. and Loh, H. H.: (³H)Leu⁵-enkephalin specific binding to synaptic-membrane comparison with (³H)dihydromorphine and (³H)naloxone. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 21: 409-434. (1978)
24. Hiller, J. M., Pearson, J. and Simon, E. J.: Distribution of stereospecific binding of the potent narcotic analgesic etorphine in the human brain: Predominance in the limbic system. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 6: 1052-1062. (1973)
25. Audigier, Y., Mazarguil, H. and Cros, J.: Structure-activity relationships of enkephalin analogs at opiate and enkephalin

- receptors: Correlation with analgesia. Eur. J. Pharmacol. 63: 35-46. (1980)
26. Pert, C. B., Snowman, A. M. and Snyder, S. H.: Localization of opiate receptor binding in synaptic membranes of rat brain. Brain. Res. 70: 184-188. (1974)
 27. Simantov, R., Snowman, A. M. and Snyder, S. H.: A morphine like factor "enkephalin" in rat brain: subcellular localization. Brain Res. 107: 650-657. (1976)
 28. Szűcs, M., Borsodi, A., Bogdány, A., Gaál, J. Batke, J. and Tóth, G.: Detailed analysis of heterogeneity of ³H-naloxone binding sites in rat brain synaptosomes. Neurochem. Res. 12: (1987)
 29. Glazel, J. A., Venn, R. F. and Barnard, E. A.: Distribution of stereospecific opiate receptor binding activity between subcellular fractions from ovine corpus striatum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95: 263-268. (1980)
 30. Roth, B. L., Laskowski, M. B. and Coscia, C. J.: Evidence for distinct subcellular sites of opiate receptors: Demonstration of opiate receptors in smooth microsomal fractions isolated from rat brain. J. Biol. Chem. 256: 10117-10123. (1981)
 31. Roth, B. L. and Coscia, C. J.: Microsomal opiate receptors: Characterization of smooth microsomal and synaptic membrane opiate receptors. J. Neurochem. 42: 1677-1684. (1984)
 32. Klein, C., Levy, R. and Simantov, R.: Subcellular compartmentation of opioid receptors: Modulation by enkephalin and alkaloids. J. Neurochem. 46: 1137-1144. (1986)
 33. Pasternak, G. W. and Snyder, S. H.: Opiate receptor binding: Effects of enzymatic treatment. Mol. Pharmacol. 10: 183-193. (1974)
 34. Gioannini, T., Foucaud, B., Hiller, J. M., Hatten, M. E. and Simon, E. J.: Lectin binding of solubilized opiate receptors: Evidence for their glycoprotein nature. Biochem. Biophys. Res. Commun. 105: 1128-1134. (1982)
 35. Kouakou, Y., Zajac, J. M., Moisand, C. and Meunier, J. C.: The opiate receptor-binding interactions of opiate alkaloids and of an opioid peptide in rat brain membranes: Selection by manganese ions and by cholic acid (sodium salt) and minimalization of cross-reaction in vitro. Mol. Pharmacol. 21: 564-569. (1982)
 36. Simonds, W. F., Koski, G., Streaty, R. A., Hjelmeland, L. M. and Klee, W. A.: Solubilization of active opiate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4623-4627. (1980)
 37. Itzhak, Y., Hiller, J. M., Gioannini, T. L. and Simon, E. J.: Effect of digitonin on the binding of opiate agonists and

- antagonists to membrane-bound and soluble opioid binding sites. Brain. Res. 291: 309-315. (1984)
38. Pasternak, G. W. and Snyder, S. H.: Opiate receptor binding: Enzymatic treatments that discriminate between agonist and antagonist interactions. Mol. Pharmacol. 11: 478-484. (1975)
39. Loh, H. H., Cho, T. M., Wu, Y. C. and Way, E. L.: Stereospecific binding of narcotics to brain cerebroside. Life Sci. 14: 2231-2245. (1974)
40. Abood, L. G. and Hoss, W.: Stereospecific morphine adsorption to phosphatidylserine and other membranous components of brain. Eur. J. Pharmacol. 32: 66-75. (1975)
41. Low, P. Y., Fischer, G., Loh, H. H. and Herz, A.: Inhibition of specific opiate binding to synaptic membrane by cerebroside sulfatase. Biochem. Pharmacol. 28: 2557-2562. (1979)
42. Lee, N. M. and Smith, A. P.: A protein-lipid model of the opiate receptor. Life Sci. 26: 1459-1464. (1980)
43. Simantov, R., Snowman, A. M. and Snyder, S. H.: Temperature and ionic influences on opiate receptor binding. Mol. Pharmacol. 12: 977-986. (1976)
44. Fischel, S. V. and Medzihradsky, F.: Scatchard analysis of opiate receptor binding. Mol. Pharmacol. 20: 269-279. (1981)
45. Creese, I., Pasternak, G. W., Pert, C. B. and Snyder, S. H.: Discrimination by temperature of opiate agonist and antagonist receptor binding. Life Sci. 16: 1837-1842. (1975)
46. Simon, E. J., Hiller, J. M., Edelman, I., Groth, J. and Stahl, K. D.: Opiate receptors and their interactions with agonists and antagonists. Life Sci. 16: 1795-1800. (1975)
47. Blume, A. J.: Opiate binding to membrane preparations of neuroblastoma x glioma hybrid cells NG 108-15: Effects of ions and nucleotides. Life Sci. 22: 1843-1852. (1978)
48. Childers, S. R. and Snyder, S. H.: Guanine nucleotides differentiate agonist and antagonist binding interactions with opiate receptors. Life Sci. 23: 759-762. (1978)
49. Pasternak, G. W., Snowman, A. M. and Snyder, S. H.: Selective enhancement of (³H)-opiate agonist binding by divalent cations. Mol. Pharmacol. 11: 735-744. (1975)
50. Simon, E. J., Hiller, J. M., Groth, J. and Edelman, I.: Further properties of stereospecific opiate binding sites in rat brain: On the nature of the sodium effect. J. Pharm. Exp. Ther. 192: 531-537. (1975)
51. Snyder, S. H.: Opiate receptors and internal opiates. Sci. Am. 44-56. (1979)

52. Pasternak, G. W.: Multiple mu opiate receptors: Biochemical and pharmacological evidence for multiplicity. *Biochem. Pharmacol.* 35: 361-364. (1986)
53. Pasternak, G. W., Childers, S. R. and Snyder, S. H.: Naloxazone, a long-acting opiate antagonist: Effects on analgesia in intact animals and an opiate receptor binding in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214: 455-462. (1980)
54. Pasternak, G. W. and Hahn, E. F.: Long-acting opiate agonists and antagonists: 14-hydroxydihydromorphinone hydrazones. *J. Med. Chem.* 23: 674-676. (1980)
55. Szűcs, M., Benyhe, S., Borsodi, A., Wollemann, M., Jancsó, G., Szécsi, J. and Medzihradszky, K.⁵: Binding characteristics and analgesic activity of D-Ala²-Leu⁵-enkephalin chloromethyl ketone. *Life Sci.* 32: 2777-2784. (1983)
56. Nishimura, S. L., Recht, L. D. and Pasternak, G. W.: Biochemical characterization of high affinity ³H-opioid binding: Further evidence for mu₁ sites. *Mol. Pharmacol.* 25: 29-37. (1984)
57. Goodman, R. R. and Pasternak, G. W.: Visualization of mu₁ opiate receptors in rat brain by using a computerized autoradiographic subtraction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6667-6671. (1985)
58. Simon, E. J., Hiller, J. M. and Edelman, I.: Solubilization of a stereospecific opiate-macromolecular complex from rat brain. *Science* 190: 389-390. (1975)
59. Simon, J., Benyhe, S., Abutidze, K., Borsodi, A., Szűcs, M. and Wollemann, M.: Kinetics and physical parameters of rat brain opioid receptors solubilized by digitonin and CHAPS. *J. of Neurochem.* 46: 695-701. (1986)
60. Newman, E. L. and Barnard, E. A.: Identification of an opioid receptor subunit carrying the mu binding site. *Biochemistry* 23: 5385-5389. (1984)
61. Itzhak, Y., Hiller, J. M. and Simon, E. J.: Solubilization and characterization of mu, delta, and kappa opioid binding sites from guinea pig brain: Physical separation of kappa receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4217-4221. (1984)
62. Simon, J., Benyhe, S., Borsodi, A., Szűcs, M. and Wollemann, M.: M. Separation of kappa-opioid receptor subtype from frog brain. *FEBS Letters* 183: 395-397. (1985)
63. Lai, F. A., Newman, E. L., Peers, E. and Barnard, E. A.: Sizes of opioid receptor types in rat brain membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 103 349-354. (1984)
64. Ott, S., Costa, T., Wüster, M., Hietel, B. and Herz, A.: Target size analysis of opioid receptors: No difference between receptor types, but discrimination between two receptor states. *Eur. J.*

- Biochem. 155: 621-630. (1986)
65. Bidlack, J. M., Abood, L. G., Osei-Gyimah, P. and Archer, S.: Purification of the opiate receptor from rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 636-639. (1981)
 66. Maneckjee, R., Zukin, R. S., Archer, S., Michael, J. and Osei-Gyimah, P.: Purification and characterization of the mu opiate receptor from rat brain using affinity chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 594-598. (1985)
 67. Cho, T. M., Ge, B. L., Smith, A. P. and Loh, H. H.: Isolation of opiate binding components by affinity chromatography and reconstitution of binding activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5176-5180. (1983)
 68. Cho, T. M., Hasegawa, J-I., Ge, B-L. and Loh, H. H. Purification to apparent homogeneity of a mu-type opioid receptor from rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4138-4142. (1986)
 69. Cox, B. M., Opheim, K. E., Teschemacher, H. and Goldstein, A.: A peptidelike substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties. Life Sci. 16: 1777-1782. (1975)
 70. Loew, G. H. and Berkovitz, D. S.: Quantum chemical studies of morphine-like opiate narcotics: Effect of N-substituent variations. J. Med. Chem. 18: 656-661. (1975)
 71. Beckett, A. and Casy, A. F.: Synthetic analgesics: Stereochemical considerations. J. Pharm. Pharmacol. 6: 986-992. (1954)
 72. Morley, J. S.: Structure-activity relationships of enkephalin-like peptides. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20: 81-110. (1980)
 73. Wijnne, H.: Empirical energy calculations on some conformationally restricted analogs of enkephalin. In: Third congress of the Hungarian Pharmacological Society, Budapest, Part II. Chemical structure- biological activity relationships: Quantitative approaches (ed. Darvas, F.) Akadémiai Kiadó, Budapest, 279-284. (1980)
 74. Khacaturian, H., Lewis, M. E., Schafer, M. K. H. and Watson, S. J.: Anatomy of the CNS opioid systems. Trends Neurosci. 8: 111-119. (1985)
 75. Traynor, J. R.: Prodynorphin as a source of Leu-enkephalin. Trends Pharmacol. Sci. 8: 47-48. (1987)
 76. Weber, E., Roth, K. A. and Barchas, J. D.: Immunohistochemical distribution of alfa-neo-endorphin / dynorphin systems in rat brain: Evidence for colocalization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3062-3066. (1982)
 77. Bellunzi, J. D., Grant, N., Garsky, V., Sarantakis, D., Wise, C. D. and Stein, L.: Analgesia induced in vivo by central administration of enkephalin in rat. Nature 260: 625-626. (1976)

78. Roda, L. G., Venturelli, F. and Roscetti, G.: Hydrolysis and protection from hydrolysis of circulating enkephalins. *Comp. Biochem. Physiol.* 85C: 449-454. (1986)
79. Zlokovic, B. V., Begley, D. J. and Chain-Eliash, D. G.: Blood-brain permeability to leucine enkephalin, D-Alanine²-D-Leucine⁵-enkephalin and their N-terminal amino acid (Tyrosine). *Brain Res.* 336: 125-132. (1985)
80. Schwartz, J. C.: Metabolism of enkephalins and inactivating neuropeptidase concept. *Trends Neurosci.* 6: 45-48. (1983)
81. Gráf, L., Nagy, A. and Lajtha, A.: Enkephalin-hydrolyzing peptidases of rat brain membranes: Are they topographically / functionally coupled to opiate receptors. *Life Sci.* 31: 1861-1865. (1982)
82. Hui, K. S., Gioannini, T., Hui, M., Simon, E. J. and Lajtha, A.: An opiate receptor-associated aminopeptidase that degrades enkephalins. *Neurochem. Res.* 10: 1047-1058. (1985)
83. Brantl, V. and Neubert, K.: Opioid peptides derived from food proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* 7: 6-7. (1986)
84. Chang, K. J., Killian, A., Hazum, E. and Cuatrecasas, P.: Morphiceptin (NH₄-Tyr-Pro-Phe-Pro-CONH₂): A potent and specific agonist for morphine (mu) receptors. *Science* 212: 75-77. (1981)
85. Galina, Z. and Kastin, A. J.: Existence of antiopiate systems as illustrated by MIF-1/Tyr-MIF-1. *Life Sci.* 39: 2153-2159. (1986)
86. Hiller, J. M., Angel, L. M. and Simon, E. J.: Multiple opiate receptors: Alcohol selectively inhibits binding to delta receptors. *Science* 214: 468-469. (1981)
87. Pfeiffer, A. and Herz, A.: Enhancement of delta-, but not mu-opiate agonist binding by calcium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 319: 147-153. (1982)
88. Zajac, J. M. and Roques, B. P.: Differences in binding properties of mu and delta opioid receptor subtypes from rat brain: Kinetic analysis and effects of ions and nucleotides. *J. Neurochem.* 44: 1605-1614. (1985)
89. Spain, J. W., Roth, B. L. and Coscia, C. J.: Differential ontogeny of multiple opioid receptors (mu, delta, kappa). *J. Neurosci.* 5: 584-588. (1985)
90. Petrillo, P., Tavani, A., Verotta, D., Robson, L. E. and Kosterlitz, H. W.: Differential postnatal development of mu-,delta- and kappa-opioid binding sites in rat brain. *Dev. Brain. Res.* 31: 53-58. (1987)
91. Szűcs, M., Oetting, G. M. and Coscia, C. J.: Unique characteristics of early neonatal delta opioid binding sites. *Biochem. Soc. Transact.* 14: 1156-1157. (1986)

92. Hazum, E., Chang, K. J. and Cuatrecasas, P.: Opiate (enkephalin) receptors of neuroblastoma cells: Occurrence in clusters on the cell surface. *Science* 206: 1077-1079. (1979)
93. Goodman, R. R., Snyder, S. H., Kuhar, M. J. and Young, W. S. III.: Differentiation of delta and mu opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6239-6243. (1980)
94. Mansour, A., Lewis, M. E., Khachaturian, H., Akil, H. and Watson, S. J.: Pharmacological and anatomical evidence of selective mu, delta and kappa opioid receptor binding in rat brain. *Brain. Res.* 399: 69-79. (1986)
95. Klee, W. A. and Nirenberg, M.: A neuroblastoma x glioma hybrid cell line with morphine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 3474-3477. (1974)
96. Sharma, S. K., Nirenberg, M. and Klee, W. A.: Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 590-594. (1975)
97. Koski, G. and Klee, W. A.: Opiates inhibit adenylate cyclase by stimulating GTP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4185-4189. (1981)
98. Milligan, G., Simonds, W. F., Streaty, R. A., Tocque, B. and Klee, W. A.: Functional control of the delta-opiate receptor by the inhibitory guanine nucleotide-binding protein. *Biochem. Soc. Transact.* 13: 1110-1113. (1985)
99. Lux, B. and Schultz, R.: Opioid dependence prevents the action of pertussis toxin in the guinea-pig myenteric plexus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 330: 184-186. (1985)
100. Bowen, W. D., Gentleman, S., Herkenham, M. and Pert, C. B.: Interconverting mu and delta forms of the opiate receptor in rat striatal patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4818-4822. (1981)
101. Collier, H. O. J. and Roy, A. C.: Morphine-like drugs inhibit the stimulation by E prostaglandins of cyclic AMP formation by rat brain homogenate. *Nature* 248: 24-27. (1974)
102. Wollemann, M., Szebeni, A., Bajusz, S. and Gráf, L.: Effect of Met-enkephalin and (D-Met²-Pro⁵)-enkephalinamide on the adenylate cyclase activity of rat brain. *Neurochem. Res.* 4: 627-631. (1979)
103. Law, P. Y., Wu, J., Koehler, J. E. and Loh, H. H.: Demonstration and characterization of opiate inhibition of the striatal adenylate cyclase. *J. Neurochem.* 36: 1834-1846. (1981)
104. Miller, R.: How do opiates act *Trends Neurosci.* 7: 184-185. (1984)
105. Williams, J. T., Egan, T. M. and North, R. A.: Enkephalin opens

- potassium channels on mammalian central neurones. *Nature* 299: 74-77. (1982)
106. Hescheler, J., Rosenthal, W., Trautwein, W. and Schultz, G.: The GTP-binding protein, G_i , regulates neuronal calcium channels. *Nature* 325: 445-447. (1987)
107. Fujioka, T., Inoue, F. and Kuriyama, M.: Purification of opioid-binding materials from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 640-646. (1985)
108. Simonds, W. F., Burke, T. R. Jr., Rice, K. C., Jacobson, A. E. and Klee, W. A.: Purification of the opiate receptor of NG 108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4974-4978. (1985)
109. Newman, E. L., Borsodi, A., Tóth, G., Hepp, J., Barnard, E. A.: Mu-receptor specificity of the opioid peptide irreversible reagent, 3H -DALECK. *Neuropeptides* 8: 305-315. (1986)
110. Szűcs, M., Belcheva, M., Simon, J., Benyhe, S., Tóth, G., Hepp, J., Wollemann, M. and Medzihradský, K.: Covalent labeling of opioid receptors with 3H -D-Ala²-Leu⁵-enkephalin chloromethyl ketone: I. Binding characteristics in rat brain membranes. *Life Sci.* 41: 177-184. (1987)
111. Simon, J., Szűcs, M., Benyhe, S., Tóth, G., Hepp, J., Borsodi, A., Wollemann, M. and Medzihradský, K.: Covalent labeling of opioid receptors with 3H -D-Ala²-Leu⁵-enkephalin chloromethyl ketone: II. Binding characteristics in frog brain membranes. *Life Sci.* 41: 185-192. (1987)
112. Howard, A. D., de La Baume, S., Gioannini, T. L., Hiller, J. M. and Simon, E. J.: Covalent labeling of opioid receptors with radioiodinated human beta-endorphin: Identification of binding subunits. *J. Biol. Chem.* 260: 10833-10839. (1985)
113. Howard, A. D., Sarne, Y., Gioannini, T. L., Hiller, J. M. and Simon, E. J.: Identification of distinct binding site subunits of mu and delta opioid receptors. *Biochemistry* 25: 357-360. (1986)
114. McLawhon, R. W., Ellory, J. C. and Dawson, G.: Molecular size of opiate (enkephalin) receptors in neuroblastoma - glioma hybrid cells as determined by radiation inactivation analysis. *J. Biol. Chem.* 258: 2102-2105. (1983)
115. Roques, B. P., Gacel, G., Fournie-Zaluski, M. C., Senault, B. and Lecomte, J. M.: Demonstration of the crucial role of the phenylalanine moiety in enkephalin analogues for differential recognition of the mu- and delta-receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 60: 109-110. (1979)
116. Shimohigashi, Y., Costa, T., Nitz, T. J., Chen, H. C. and Stammer, C. H.: Importance of the stereo-orientation of aromatic groups in enkephalins to opiate receptor recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121: 966-972. (1984)

117. Chang, J. K., Fong, B. T. W. and Pert, C. B.: Opiate receptor affinities and behavioral effects of enkephalin: Structure-activity relationship of ten synthetic peptide analogues. *Life Sci.* 18: 1473-1482. (1976)
118. Szűcs, M., Di-Glória, K. and Medzihradszky, K.: Melphalan potently substitutes the N-terminal Tyr of D-Ala²-Leu⁵-enkephalin methyl ester. *FEBS Letters* 179: 87-90. (1985)
119. Mihara, H., Lee, S., Shimohigashi, Y., Aoyagi, H., Kato, T.¹, Izumiya, N. and Costa, T.: Tyr¹-substituted and fluorescent Pya¹-enkephalins bind strongly and selectively to mu and delta opiate receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136: 1170-1176. (1986)
120. Rónai, A. Z., Székely, J. I., Berzétei, I., Miglécz, E. and Bajusz, S.: Tetrapeptide-amide analogues of enkephalin: The role of C-terminus in determining the character of opioid activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1239-1249. (1979)
121. Fournie-Zaluski, M. C., Gacel, G., Maigret, B., Premilat, S. and Roques, B. P.: Structural requirements for specific recognition of mu or delta opiate receptors. *Mol. Pharmacol.* 20: 484-491. (1981)
122. Audigier, Y., Mazarguil, H., Roy, J., Morgat, J. L. and Cros, J.: Binding and metabolism studies with tritium-labeled 2-D-alanine, 5-leucine-enkephalinamide and tritium-labeled 2-D-alanine, 5-proline-enkephalinamide: Evidence for a selective interaction of 2-D-alanine, 5-proline-enkephalinamide with mu-receptors. *Eur. J. Pharm.* 74: 273-278. (1981)
123. Rónai, A. Z., Berzétei, I. P., Székely, J. I., Miglécz, E., Kurgys, J. and Bajusz, S.: Enkephalin-like character and analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 69: 263-271. (1981)
124. Vavrek, R. J., Cui, R. L. and Stewart, J. M.: Selectivity of minimum structure enkephalins. *Life Sci* 31: 2249-2252. (1982)
125. Bajusz, S., Rónai, A. Z., Székely, J. I., Dunai-Kovács, Zs., Berzétei, I.: A superactive antinociceptive pentapeptide (D-Met²-Pro⁵)-enkephalinamide. *FEBS Lett.* 76: 91-95. (1977)
126. Roemer, D., Buescher, H. H., Hill, R. C., Pless, J., Bauer, W., Cardinaux, F., Closse, A., Hauser, D. and Huguenin, R.: A synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity. *Nature* 268: 547-549. (1977)
127. Handa, B. K., Lane, A. C., Lord, J. A. H., Morgan, B. A., Rance, M. J. and Smith, C. F. C.: Analogues of beta-LPH(61-67) possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 70: 531-540. (1981)
128. Kosterlitz, H. W. and Paterson, S. J.: Tyr-D-Ala-Gly-(Me)Phe-NH(CH₂)₂OH is a selective ligand for the mu opiate binding site. *Brit. J. Pharmacol.* 73: 299P. (1981)

129. Miller, R. J., Chang, J. K., Cuatrecasas, P. and Wilkinson, S.: The metabolic stability of enkephalins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 1311-1317. (1977)
130. Gacel, G., Fournie-Zaluski, M. C. and Roques, B. P.: Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr, a highly preferential ligand for delta-opiate receptors. *FEBS Letters* 118: 245-247. (1980)
131. Zajac, J. M., Gacel, G., Petit, F., Dodey, P., Rossignol, P. and Roques, B. P.: Deltakephalin, Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Thr: A new highly potent and fully specific agonist for opiate delta-receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 390-397. (1983)
132. Mosberg, H. I., Hurst, R., Hruby, V. J., Gee, K., Yamamura, H. I., Galligan, J. J. and Burks, T. F.: Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5871-5874. (1983)
133. Shimohigashi, Y., Costa, T., Matsuura, S., Chen, H-C. and Rodbard, D.: Dimeric enkephalins display enhanced affinity and selectivity for the delta opiate receptor. *Mol. Pharmacol.* 21: 558-563. (1982)
134. Berman, J. M., Goodman, M., Nguyen, T. M. D. and Schiller, P. W.: Cyclic and acyclic partial retro-inverso enkephalinamides: Mu receptor selective enzyme resistant analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 864-870. (1983)
135. Schiller, P. W., Maziak, L. A. Lemieux, C. and Nguyen, T. M. D.: Side chain to side chain cyclization of an enkephalin analog results in loss of opioid receptor selectivity. *Int. J. Peptide Protein Res.* 28: 493-497. (1986)
136. Mihara, H., Lee, S., Shimohigashi, Y., Aoyagi, H., Kato, T. Izumiya, N. Costa, T.: Delta and mu opiate receptor probes: Fluorescent enkephalins with high receptor affinity and specificity. *FEBS Lett.* 193: 35-38. (1985)
137. Shaw, J. S., Miller, L., Turnbull, M. J., Gromley, J. J. and Morley, J. S.: Selective antagonists at the opiate delta-receptor. *Life Sci.* 31: 1259-1262. (1982)
138. Cotton, R., Giles, M. G., Miller, L., Shaw, J. S. and Timms, D.: ICI 174864: A highly selective antagonist for the opioid delta-receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 97: 331-332. (1984)
139. Pelton, J., Johnston, R., Balk, J., Schmidt, C. and Roche, E.: Synthesis and biological activity of chloromethyl ketones of leucine enkephalin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 1391-1398. (1980)
140. Venn, R. and Barnard, E. A.: A potent peptide affinity reagent for the opiate receptor. *J. Biol. Chem.* 256: 1529-1532. (1981)
141. Benyhe, S., Hepp, J., Szűcs, M., Simon, J., Borsodi, A.

- Medzihradzsky, K. and Wollemann M.: Irreversible labelling of rat brain opioid receptors by enkephalin chloromethyl ketones. *Neuropeptides* 8: 173-181. (1986)
142. Peers, E., Shaw, J. S., Rance, M. J. and Barnard, E. A.: Specificity of the opioid affinity reagent, DALECK, in a set of isolated tissue assay systems. *Neuropeptides* 8: 317-325. (1986)
 143. Benyhe, S., Hepp, J., Simon, J., Borsodi, A., Medzihradzsky, K. and Wollemann M.: Tyr-D-Ala-Gly-(Me)Phe-chloromethyl ketone: a mu specific affinity label for the opioid receptor. *Neuropeptides* 9: (1987) 9: 225-235. (1987)
 144. Szűcs, M., Di-Gléria, K. and Medzihradzsky, K.: A new potential affinity label for the opiate receptor. *Life Sci.* 33, Sup. I.: 435-438. (1983)
 145. Smolarsky, M. and Koshland, D. E. Jr.: Inactivation of the opiate receptor in bovine caudate nucleus by azide enkephalin analogs. *J. Biol. Chem.* 255: 7244-7249. (1980)
 146. Garbay-Jaureguiberry, C., Robichon, A. and Roques, B. P.: Selective photoinactivation of delta-opiate binding sites by azido DTLET: Tyr-D-Thr-Gly-pN₃Phe-Leu-Thr. *Life Sci.* 33: Sup. I. 247-250. (1983)
 147. Burke, T. R. Jr., Rice, K. C., Jacobson, A. E., Simonds, W. F. and Klee, W. A.: J. Labeled Compd. Radiopharm. 21: 693-702. (1984)
 148. Tóth, G., Krámer, M., Sirokmán, F., Borsodi, A. and Rónai, A. Preparation of (7,8,19,20-³H)-naloxone of high specific activity. *J. Label. Comp. Radiopharm.* 19: 1021-1030. (1982)
 149. Tóth, G., Krámer, M., Szűcs, M., Benyhe, S. and Sirokmán, F. Preparation of 1,7,8-³H-dihydromorphine of high molar activity and its application in opiate receptor binding experiments. *Radiochem. Radioanal. Letters* 56: 209-216. (1982)
 150. Benyhe, S., Tóth, G., Kevei, J., Szűcs, M., Borsodi, A., Di-Gléria, K., Szécsi, J., Süli-Vargha, H. and Medzihradzsky, K.: Characterization of rat brain opioid receptors by (Tyr-3,5-³H)¹, -D-Ala²,Leu⁵-enkephalin binding. *Neurochem. Res.* 10: 551-559. (1985)
 151. Tóth, G., Hepp, J., Sirokmán, F., Medzihradzsky K.: Synthesis of ³H-D-Ala²-Leu⁵-enkephalin chloromethyl ketone of high specific activity. *J. Label. Comp. Radiopharm.* 24: 859-866. (1987)
 152. Varga, E., Tóth, G., Benyhe, S., Hosztafi, S. and Borsodi, A.: Synthesis of ³H-Tyr-D-Ala-Gly-N-Me-Phe chloromethyl ketone - an opioid affinity label. *Neuropeptides* 12: 135-139. (1988)
 153. Peterson, G. L.: A simplification of the protein assay method of Lowry et. al., which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356. (1977)

154. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254. (1976)
155. De Meyts, P., Roth, J., Neville, Jr. D. M., Gavin, J. R. and Lesinak, M. A.: Insulin interactions with its receptors experimental evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55: 154-161. (1973)
156. Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672. (1949)
157. Bennett, Jr. J. P.: Methods in binding studies. In: *Neurotransmitter Receptor Binding*, ed by Yamamura, H. I. et al. Raven Press, New York, 57-90. (1978)
158. Rothman, R. B. and Westfall, T. C.: Alterations in the binding of ³H-leucine enkephalin to striatal membranes by endogenous factors. *J. Neurochem.* 33: 191-200. (1979)
159. Simantov, R., Childers, S. R. and Snyder, S. H.: The opiate receptor binding interactions of ³H-Metionine enkephalin, an opioid peptide. *Eur. J. Pharmacol.* 47: 319-331. (1977)
160. Zhang, A. and Pasternak, G. W.: Opiates and enkephalins: a common binding site mediates their analgesic actions in rats. *Life Sci.* 29: 843-851. (1981)
161. Paterson, S. J., Robson, L. E. and Kosterlitz, H. W. (1986) Control by cations of opioid binding in guinea pig brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6216-6220.
162. Demoliou-Mason, C. D. and Barnard, E. A.: Distinct subtypes of the opioid receptor with allosteric interactions in brain membranes. *J. Neurochem.* 46: 1118-1128. (1986)
163. Wollemann, M.: The molecular structure of opiate receptors. *Neurochem. Res.* 12: 129-133. (1987)
164. Childers, S. R.: Interaction of opiate receptor binding sites and guanine nucleotide regulatory sites: selective protection from N-ethylmaleimide. *J. Pharm. Exp. Ther.* 230: 684-691. (1984)
165. Goldstein, A.: Binding selectivity profiles for ligands of multiple receptor types: focus on opioid receptors. *Trends in Pharmacol.* 8: 456-459. (1987)
166. Cheng, Y. C. and Prusoff, W. H.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 % inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108.
167. Miller, R. J., Chang, K-J. and Cuatrecasas, P.: The metabolic stability of the enkephalins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 1311-1317. (1977)

168. Friedmann, T., Medzihradszky, K., Kovács, A., Kerecsen, L., Szécsi, J., Di Gléria, K. and Knoll, J.: Comparison of biological activities of enkephalin analogues in isolated organs. Pol. J. Pharmacol. Pharm. 34: 53-62. (1982)
169. Benyhe, S., Szűcs, M., Varga, E., Simon, J., Borsodi, A. and Wollemann, M.: Cation and guanine nucleotide effects on ligand binding properties of mu and delta opioid receptors in rat brain membranes. Acta Biochim. Biophys. Hung. 24: 69-81. (1989)