

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Anna Urbánková

Fyziologické funkce muskarinového receptoru M3

Physiological functions of muscarinic receptor M3

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: Mgr. Alena Janoušková, Ph.D.

Praha, 2023

Poděkování:

upřímně děkuji Mgr. Janouškové za neocenitelnou pomoc během tvorby mé bakalářské práce na téma Fyziologické funkce muskarinového receptoru M3. Její odborné vedení, trpělivost a ochota věnovat mi čas byly klíčové pro úspěšné zvládnutí této práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Abstrakt:

Muskarinové receptory patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. G-proteiny jsou heterotrimerické proteiny vázající GTP předávající signál od receptorů k efektorům, ty pak mění hladinu druhých posílů v buňce. Jednotlivé podtypy muskarinových receptorů se spřahují s různými typy G-proteinů a dle toho vyvolávají různé změny v hladinách druhých posílů. Jednotlivé podtypy muskarinových receptorů se dále liší lokalizací a funkcí, kterou zastávají.

Podtyp muskarinového receptoru M3 se nachází převážně na periférii, kde zprostředkovává kontrakci hladké svaloviny a sekreci žláz s vnitřní a vnější sekrecí. Cílem této bakalářské práce bylo popsat tkáňově specifické signální dráhy M3 receptoru a jeho fyziologické role jak na periférii, tak i v centrálním nervovém systému. Dále je popsána úloha M3 receptorů v řadě patologií a uvedeno možné uplatnění M3 receptorů jako farmakologického cíle.

Klíčová slova: muskarinové receptory M3, buněčná signalizace, G-proteiny

Abstract:

Muscarinic receptors belong to the family of G-protein coupled receptors. G-proteins are heterotrimeric GTP-binding proteins that transfer signals from receptors to effectors. Effectors change levels of second messengers in the cell. Individual subtypes of muscarinic receptors bind to various classes of G-proteins. According to the G-protein coupling, muscarinic receptors change levels of various second messengers. Individual subtypes of the muscarinic receptor also differ in location and function.

The M3 muscarinic receptor subtype is located primarily on the periphery where it mediates smooth muscle contraction and endocrine secretion. The goal of this bachelor thesis was to describe the tissue-specific signalling pathways of the M3 receptor and their physiological roles in the periphery as well as in the central nervous system. Further, the role of M3 receptors in several pathologies is described. Finally, the M3 receptors as a possible pharmacological target will be discussed.

Key words: muscarinic receptors M3, cell signaling, G-proteins

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	1
Úvod.....	12
1. Acetylcholinové receptory.....	13
1.1. Nikotinové acetylcholinové receptory.....	13
1.2. Muskarinové acetylcholinové receptory.....	13
1.3. G-proteiny.....	14
1.4. Signalizace.....	18
1.5. Struktura.....	20
1.6. Podtypy muskarinových acetylcholinových receptorů.....	22
1.6.1. M1.....	23
1.6.2. M2.....	24
1.6.3. M3.....	24
1.6.4. M4.....	24
1.6.5. M5.....	24
2. Muskarinový receptor M3 v PNS.....	25
2.1. Hladká svalovina.....	25
2.1.1. Dýchací systém.....	26
2.1.2. Močový měchýř.....	27
2.1.3. Žlázy s vnitřní a vnější sekrecí.....	28
2.2. Srdce a cévy.....	30
3. Muskarinový receptor M3 v CNS.....	33
Závěr.....	34
Použitá literatura.....	35

Seznam použitých zkratek

ACh	Acetylcholin
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
cAMP	Cyklický adenosin-3',5'-fosfát
cGMP	Cyklický guanosin-3',5'-fosfát
CK ₁	Kaseinová kináza 1
CK ₂	Kaseinová kináza 2
CNS	Centrální nervová soustava
CM	Kalmodulin
Cx43	Connexin 43
DAG	Diacylglycerol
eNOS	Endotelová syntáza oxidu dusného
ER	Endoplazmatické retikulum
GDP	Guanosindifosfát
GIRKs	Draslíkové kanály spřažené s G-proteiny (anglicky - G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels)
GPCRs	Receptory spřažené s G-proteiny (anglicky – G protein-coupled receptors)
GRKs	G protein-coupled receptor kinázy
GTP	Guanosintrifosfát
IK _{M3}	K ⁺ inwardly rectifying channel M3
IP ₃	Inositoltrifosfát
IP ₃ R	IP ₃ receptor

IPC	Navození ischemie (anglicky - ischaemic preconditioning)
LABAs	Dlouhodobě působící (long-acting) agonisté β 2-adrenergických receptorů
LAMAs	Dlouhodobě působící (long-acting) agonisté M3 receptorů
MLCK	Kináza lehkých myosinových řetězců (anglicky - myosin light chain kinase)
MLCP	Fosfatáza lehkých myosinových řetězců (anglicky - myosin light chain phosphatase)
nNOS	Neuronální syntáza oxidu dusného
PA	Kyselina fosfatidová
PC	Fosfatidylcholin
PIP ₂	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	Proteinkináza A
PKC	Proteinkináza C
PKG	Proteinkináza G
PLA ₂	Fosfolipáza A2
PLC	Fosfolipáza C
PLD	Fosfolipáza D
PMCA	Membránová Ca ²⁺ ATPáza (anglicky - plasma membrane Ca ²⁺ ATPase)
PNS	Periferní nervová soustava
SABAs	Krátkodobě působící (short-acting) agonisté β 2-adrenergických receptorů
SAMAs	Krátkodobě působící (short-acting) agonisté M3 receptorů
SERCA	Ca ²⁺ pumpa sarko/endoplazmatického retikula (anglicky - sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase)
sGC	Solubilní guanylátcykláza
SN	Substantia nigra

SR Sarkoplazmatické retikulum

TM Transmembránový α -helix

VTA Ventrální tegmentum

Úvod

Muskarinové receptory jsou receptory pro acetylcholin patřící do široké skupiny membránových receptorů spřažených s G-proteiny. Existuje 5 podtypů M1-M5, které se liší lokalizací v organismu, farmakologickými vlastnostmi a funkcemi, které v organismu zprostředkovávají. Podílejí se na řízení širokého spektra fyziologických funkcí od vyšších nervových funkcí jako je učení a paměť po vegetativní procesy.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na M3 podtyp, jeho lokalizaci, farmakologii, funkce v organismu a zapojení v patologických procesech. M3 receptor se nachází a hraje důležitou roli převážně na periférii, kde moduluje celou řadu vegetativních procesů pod řízením parasymptiku jako je regulace stahu cév, bronchiální konstrikce, sekrece inzulinu a další. Cílem této práce je literární rešerše a zhodnocuje aktuální vědecké poznatky a studie týkající se M3 receptoru, jeho výskytu v různých tkáních a jeho biologických funkcí v PNS ale i CNS.

V první části je proveden stručný popis muskarinových receptorů, včetně signalizace a struktury. Dále jsou prozkoumány mechanismy, jakými M3 receptor ovlivňuje různé fyziologické procesy v různých tkáních, jako je regulace stahu cév, bronchiální konstrikce, sekrece inzulinu a další, kterým bude věnována hlavní část bakalářské práce.

1. Acetylcholinové receptory

Acetylcholin (ACh) je neurotransmitter, který hraje klíčovou roli v přenosu signálů v nervovém systému. ACh je produkován v neuronech, ale i v buňkách různých tkání, jako je dýchací epitel, gastrointestinální epitel nebo stěny cév (Wessler a spol., 2011). Jeho význam a funkce zasahují do oblastí jak centrálního nervového systému (CNS), periferního nervového systému (PNS), tak i mimo nervový systém (Wessler a spol., 2011). Tento chemický přenašeč je zodpovědný za komunikaci mezi buňkami a reguluje různé procesy, včetně kognitivních funkcí, svalových kontrakcí a reakcí na vnější podněty (Sam a Bordoni, 2023). ACh působí na cílové buňky prostřednictvím interakce s acetylcholinovými receptory, které se nacházejí na povrchu těchto buněk. Tyto receptory jsou dvojího typu: nikotinové a muskarinové receptory.

1.1. Nikotinové acetylcholinové receptory

Nikotinové receptory patří mezi ionotropní, nebo-li ligandem ovládané iontové kanály. Tyto receptory mohou být aktivovány nikotinem, odkud také pochází jejich název. Nacházejí se v CNS, PNS a v kosterní svalovině, kde zprostředkovávají výměnu iontů K^+ , Na^+ , Ca^{2+} nebo Cl^- při excitaci neuronu (Dreyer a spol., 1982). Pro přenos elektrického signálu mezi neurony je podstatný membránový potenciál, který je tvořen elektrickým rozdílem mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky. Membránový potenciál je udržován a regulován právě iontovými kanály, které se po navázání acetylcholinu otevírají a dochází tak ke změně rozložení iontů a k depolarizaci buňky.

1.2. Muskarinové acetylcholinové receptory

Druhým typem acetylcholinových receptorů jsou muskarinové receptory. Název byl odvozen od alkaloidu muskarinu, který tyto receptory aktivuje a je tudíž jeho agonistou (naopak látky, které receptor blokuje, se nazývají antagonisté).

Muskarinové receptory jsou metabotropní membránové receptory spřažené s G-proteiny (anglicky – G protein-coupled receptors - GPCRs) (Hepler a spol., 1992). Tyto receptory mají společnou základní strukturu sestávající ze 7 transmembránových helixů propojených třemi intra- a třemi extracelulárními kličkami.

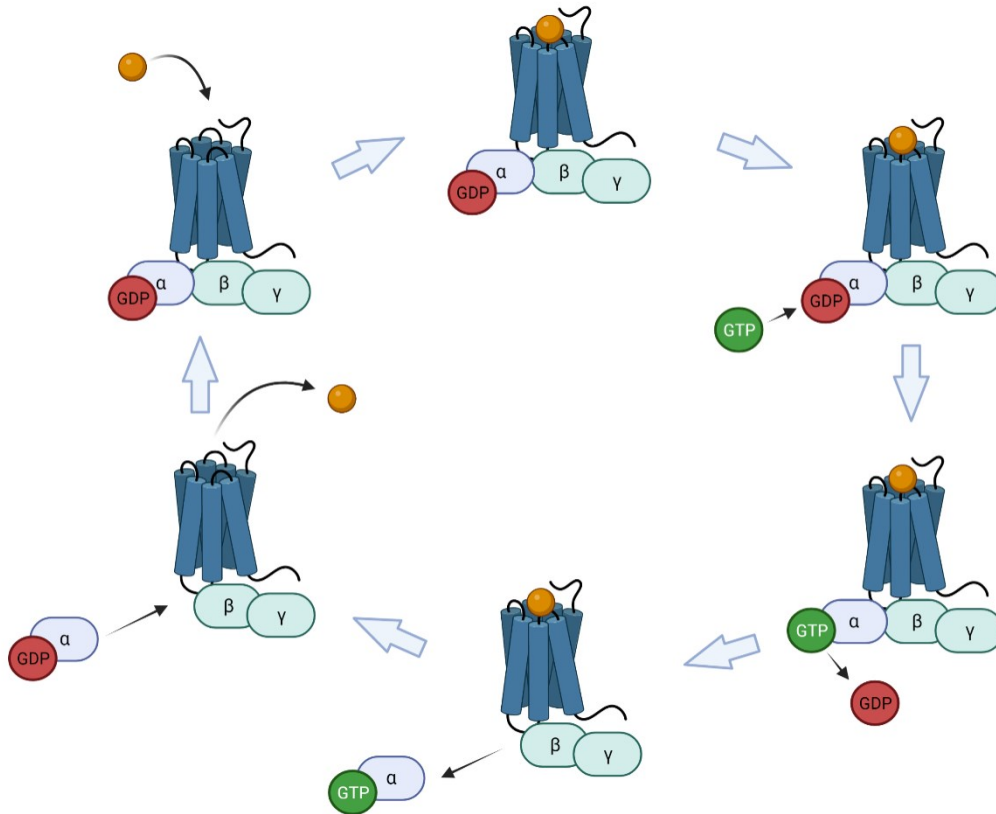
Bylo popsáno 5 podtypů muskarinových receptorů: M1, M2, M3, M4 a M5 (Peralta a spol., 1987). Jednotlivé podtypy se liší svou lokalizací a funkcí v organismu. Podílejí se na řízení celé řady procesů v CNS i na periférii. Na periférii ovlivňují například činnost srdce, sekreci žláz

a kontrakci hladké svaloviny. V CNS mají důležitou roli v procesech učení a paměti (Eglen a spol., 2011).

1.3. G-proteiny

G-proteiny (anglicky - Guanine nucleotide-binding proteins) jsou heterotrimerické proteiny vázající v aktivním stavu guanosintrifosfát (GTP), nebo v neaktivním stavu guanosindifosfát (GDP). Prostřednictvím nich se přenáší extracelulární signál do buňky. Skládají se ze tří podjednotek: samostatná α podjednotka a $\beta\gamma$ podjednotky tvořící komplex (Hepler a spol., 1992). Nacházejí se v cytosolu, kde jsou podjednotky α a β zakotveny lipidovou kotvou v plazmatické membráně buňky.

G- proteiny zprostředkovávají funkční spojení mezi receptorem a intracelulárním efektorovým proteinem. Na aktivaci receptoru, navázání signální molekuly, reaguje G-protein změnou konformace a katalyzuje změnu GDP za GTP na α podjednotce. α podjednotka se aktivuje a oddisociuje od komplexu $\beta\gamma$. Aktivovaná α podjednotka s GTP může reagovat s efektorovými proteiny, které jsou součástí dalších signálních drah. Inaktivaci α podjednotky zajišťuje její vnitřní GTPázová aktivita, která hydrolyzuje GTP na GDP. Inaktivní α podjednotka s GDP se reasociuje s komplexem $\beta\gamma$. Celý cyklus, který je i znázorněn na obrázku 1 níže, se tak může opakovat.



Obrázek 1: Obecné schéma cyklu aktivace G- proteinu

Na obrázku je ve zjednodušené podobě naznačen cyklus G-proteinu. Upraveno podle Jähnichen, 2006.

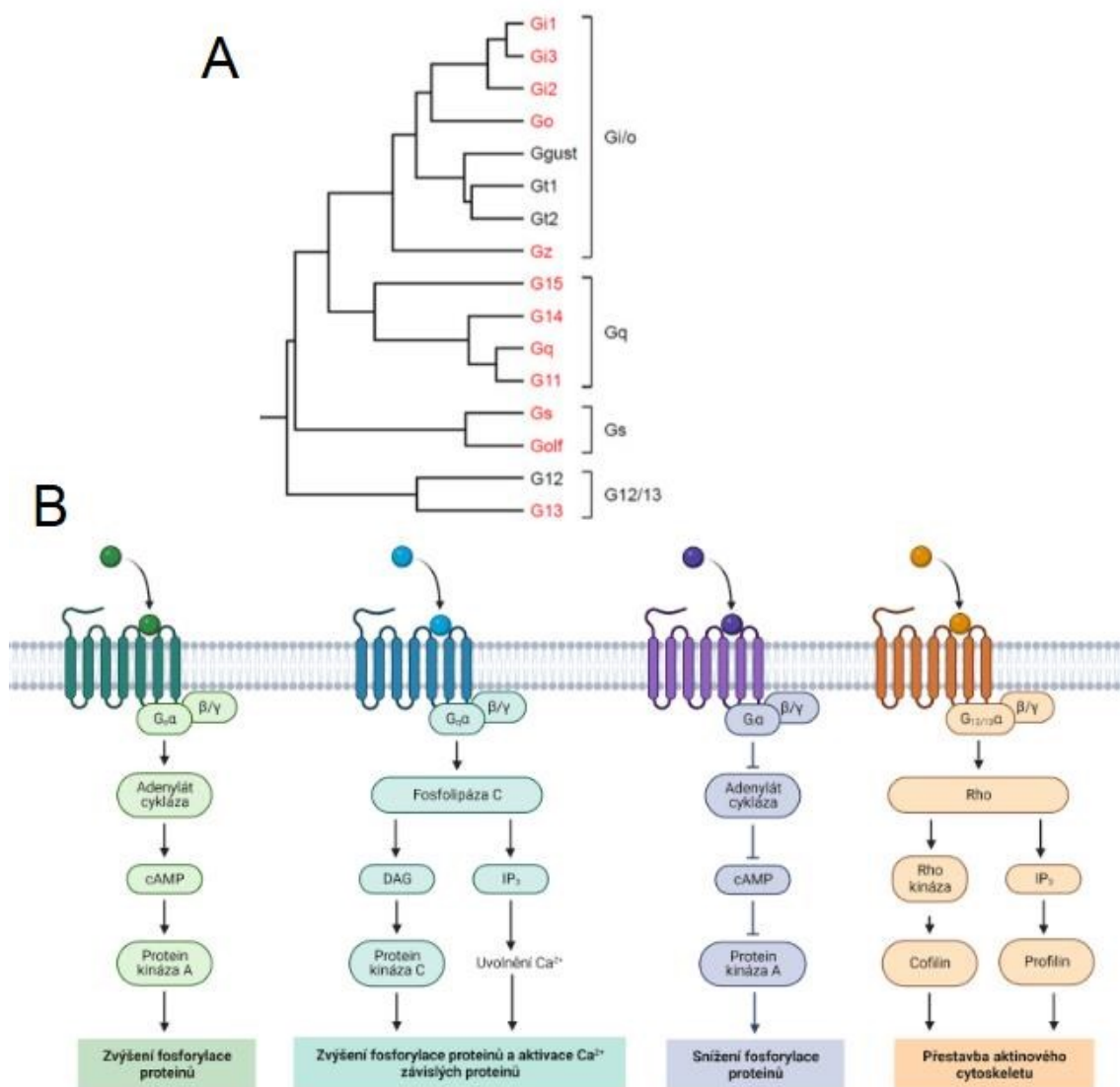
Na základě sekvencí a funkčních podobností α podjednotek, rozdělujeme 4 základní třídy G-proteinů (Gs, Gq, Gi/o a G12/13), kde každá třída má několik typů (obrázek 2A). Jednotlivé typy se liší svojí expresí v organismu (Downes a spol., 1999). Na obrázku 2B jsou schematicky znázorněny signální dráhy jednotlivých tříd G-proteinů.

Třídy G-proteinů podle α -podjednotek a hlavní signální dráhy:

1. G α s: stimulují adenylát cyklázu k produkci cAMP (Downes, 1999) a mají dva členy - G α s, který je exprimován ve všech buňkách, a G α olf, který je exprimován v olfaktorickém neuronu (Yokoyama a spol., 1992).
2. G α q: aktivují fosfolipázu C (Downes, 1999). Typy G α q a G α 11 a jsou exprimovány ve všech buněčných typech. Typ G α 14 je exprimován převážně v plicích, játrech

a ledvinách (Yokoyama a spol., 1992). $G\alpha 15$ je exprimován v krevetvorných buňkách (Wilkie a spol., 1991) a epitelech (Giannone a spol., 2010).

3. $G\alpha i/o$: inhibují adenylát cyklázu a cAMP dependentní signalizaci a jedná se o nejpočetnější třídu viz obrázek 2A (Downes, 1999), kam patří například typ $G\alpha t$, který je exprimován buňkami sítnice oka (Yokoyama a spol., 1992). $G\alpha i1, 2, 3$ jsou exprimovány v celém organismu a $G\alpha o$ převážně v CNS (Downes a spol., 1999).
4. $G\alpha 12/13$: jsou exprimovány ve většině buněčných typech a stimulují přestavbu cytoskeletu pomocí aktivace Rho GTPáz, které interagují s různými efektorovými proteiny, jako je například protein cofilin který působí na depolymerizaci aktinových filament, nebo protein profilin, který podporuje polymerizaci aktinových vláken (Dhanasekaran, 1996).



Obrázek 2: Rozdělení G-proteinů a jejich signálních drah

Na obrázku 2A jsou znázorněny jednotlivé třídy G-proteinů a jejich typy, na základě evoluční příbuznosti, převzato a upraveno podle Masuho a spol., 2015. Obrázek 2B je obecným schématem signálních drah, vytvořeno podle Downes a spol., 1999.

Komplexy $\beta\gamma$ hrají v signalizaci také důležitou roli. Stejně jako v případě α podjednotky interagují s různými efektorovými proteiny, například s draslíkovými kanály spáženými s G- proteiny (anglicky - G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels - GIRKs) (Dascal, 1997), které svým otevřením umožňují průchod draslíkových iontů do buňky, což vede ke zvýšení negativního membránového potenciálu (hyperpolarizaci) například u buněk srdečního svalu (Wang a spol., 2007).

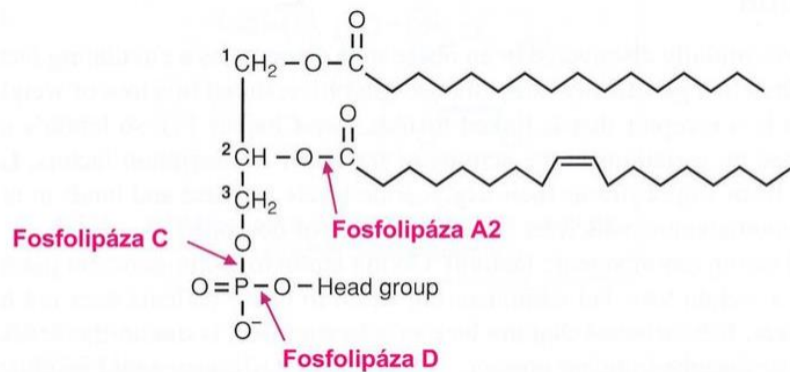
1.4. Signalizace

Muskarinové acetylcholinové receptory využívají k přenosu signálu do buňky G-proteiny. Aktivace receptoru signální molekulou vede k aktivaci G-proteinu a následné amplifikaci signálu v buňce. Jednotlivé podtypy muskarinových receptorů se liší v preferenci spřáhování s jednotlivými G-proteiny a tedy signálními drahami a efekty, které svojí aktivitou regulují.

Podtypy M2 a M4 se preferenčně spřahují s inhibičními G_i/o proteiny (Eglen a spol., 2011). Aktivované G_i/o proteiny svojí alfa podjednotkou α_i/o inhibují aktivitu adenylát cyklázy, která katalyzuje vznik 3',5'-cyklického adenosinmonofosfátu AMP (cAMP) z adenosintrifosfátu (ATP) (Lanzafame a spol., 2003). Inhibicí adenylát cyklázy dochází ke snížení koncentrace druhého posla cAMP v buňce a tedy i ke snížení aktivace specifických proteinkináz, které jsou cAMP dependentní, jako je například proteinkináza A (PKA). PKA je serin/threonin kináza, která reguluje mnoho buněčných procesů prostřednictvím fosforylace aminokyselin Ser a Thr na cílových proteinech. Účastní se například řízení buněčného růstu, buněčného cyklu a regulace genové exprese.

Podtypy M1, M3 a M5 se přednostně spřahují s G-proteiny třídy $G_q/11$ (Eglen a spol., 2011). Podjednotky $\alpha_q/11$ aktivují signální dráhy fosfolipáz (Lanzafame a spol., 2003), jak je vidět na obrázku 4. Fosfolipázy jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu fosfolipidů na různé produkty v závislosti na typu. Hlavními fosfolipázami, které jsou součástí signálních drah muskarinových acetylcholinových receptorů, jsou fosfolipáza C, A₂ a D. Fosfolipáza C (PLC) štěpí esterovou vazbu ve fosfolipidech na pozici 3 (viz obrázek 3). Hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na 1,2-diacylglycerol (DAG, vázaný na membránu) a inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃, volný v cytoplazmě). Tyto signální molekuly, zvané druží poslové, hrají dále v signální dráze svoji roli. IP₃ stimuluje uvolnění vápenatých iontů z endoplazmatického retikula a způsobuje translokaci proteinkinázy C (PKC) z cytoplazmy do buněčné membrány (Thatcher, 2010). DAG zůstává vázaný na membránu a působí jako aktivátor PKC (Alberts, 2002). Zvýšená koncentrace Ca^{2+} v cytosolu napomáhá vazbě mezi DAG a PKC (Thatcher, 2010). Proteinkináza C fosforyluje mnoho proteinů, které jsou zodpovědné za různé fyziologické funkce v cílových tkání (Lanzafame a spol., 2003). Další fosfolipáza, Fosfolipáza A₂ (PLA₂), katalyzuje hydrolýzu membránových fosfolipidů a štěpí je na pozici sn-2 (viz obrázek 3) za uvolnění mastných kyselin, jako je kyselina arachidonová (Lanzafame a spol., 2003), která je prekurzorem různých biologicky aktivních látek (například

prostaglandinů a tromboxanů), které slouží například jako prekurzory při tvorbě hormonů, snižují sekreci HCl v žaludku nebo se účastní při zánětlivých procesech. Fosfolipáza D (PLD) katalyzuje hydrolýzu fosfatidylcholinu (PC) na kyselinu fosfatidovou (PA), což je druhý posel v signálních drahách, ovlivňující procesy, jako je růst buněk, proliferace a odpovědi na stres. Druhým produktem hydrolýzy PC je cholin, který je nezbytný pro správné působení nervového systému, jelikož se jedná o prekurzor acetylcholinu (Lanzafame a spol., 2003).

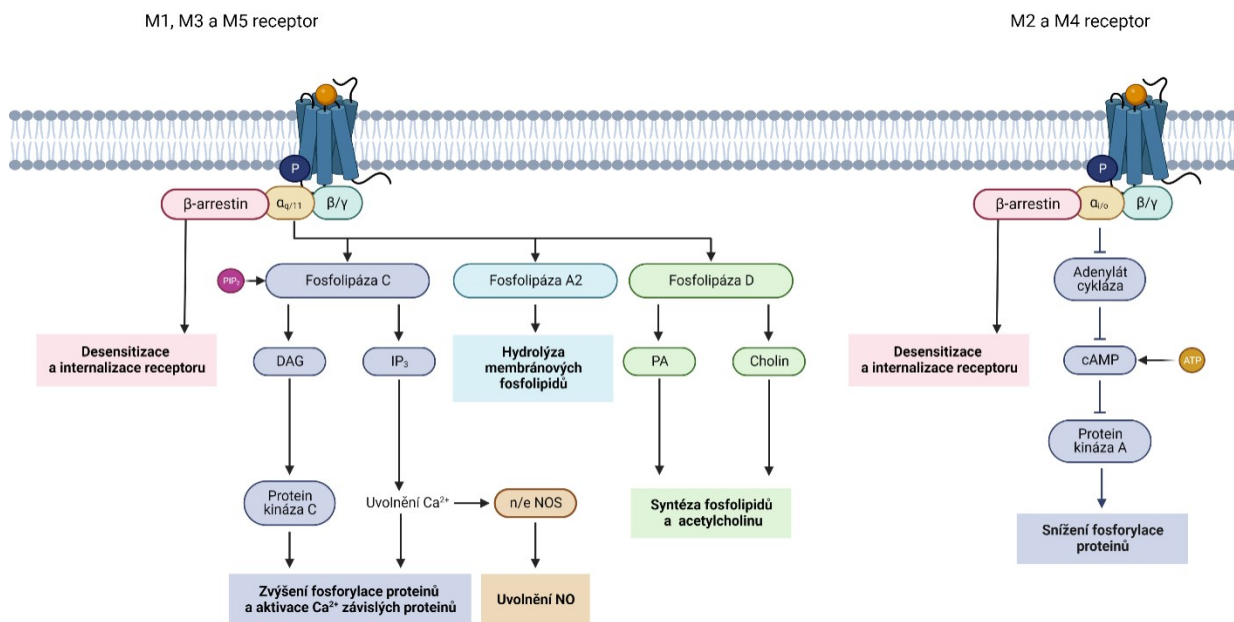


Obrázek 3: Pozice štěpení fosfolipáz

Na obrázku jsou znázorněny pozice štěpení fosfolipidu pro PLC, PLD a PLA₂, převzato a upraveno podle Koolman a spol., 2012.

Muskarinové receptory M1, M2 a M3 mohou také aktivovat Ca²⁺ dependentní syntázu oxidu dusného v nervovém systému (nNOS) a v endotelu (eNOS). NO má důležitou roli v CNS i na periférii (Lanzafame a spol., 2003).

Po spřažení muskarinového receptoru s G-proteinem dochází k fosforylaci receptoru prostřednictvím G protein-coupled receptor kináz (GRK) (Haga a spol., 1993). Na fosforylované muskarinové receptory se váží malé regulační proteiny zvané β-arrestiny, které způsobí desenzitizaci receptorů a jejich internalizaci do buňky. Arrestiny zároveň slouží jako takzvané lešení (scaffold) pro další proteiny účastnící se buněčné signalizace (Poulin a spol., 2010; Kong a spol. 2010).



Obrázek 4: Obecné schéma signálních drah muskarinových receptorů

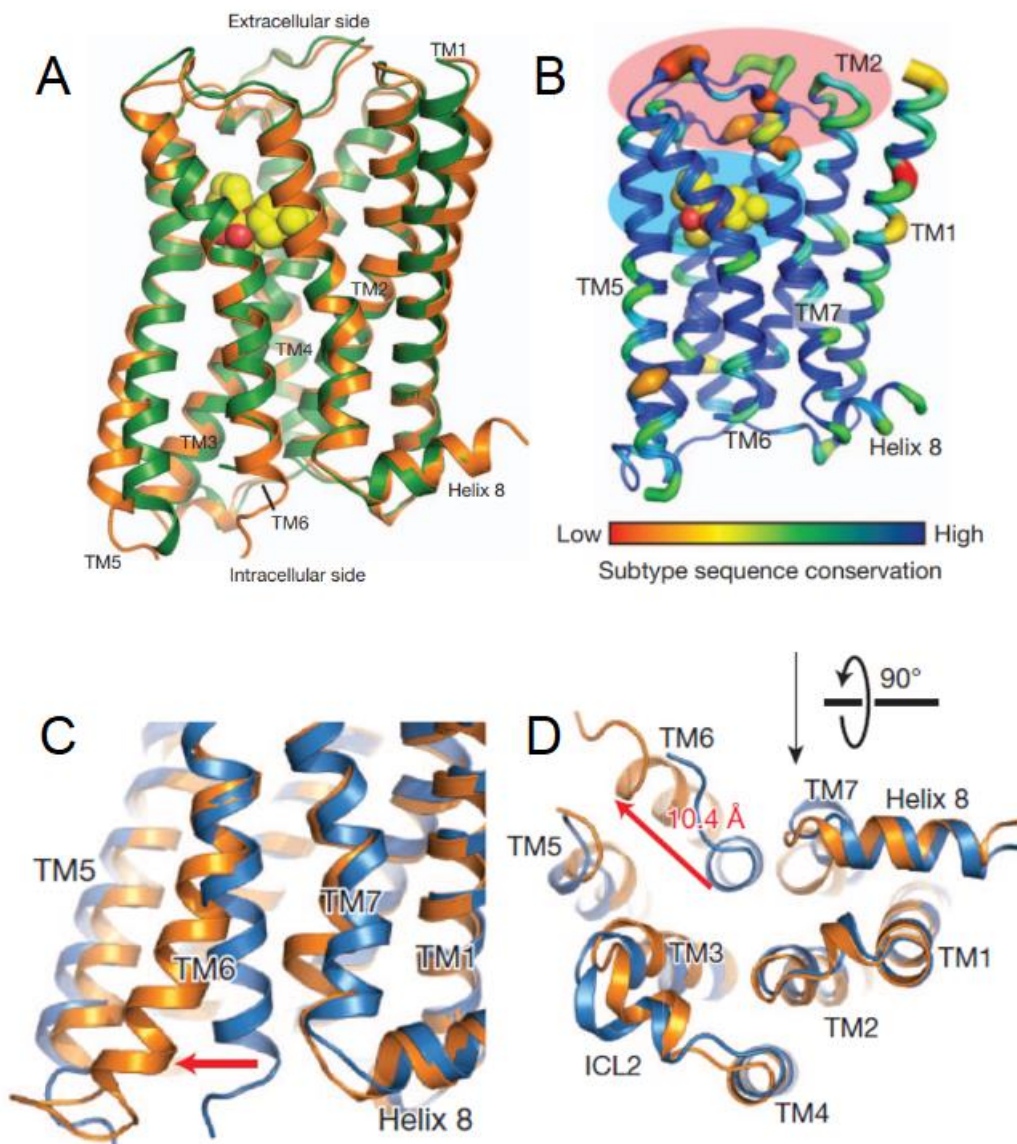
Receptory M1, M3 a M5 se spřahují s G-proteiny třídy Gq/11, které aktivují PLC, PLD nebo PLA₂. Zatímco receptory M2 a M4 aktivují inhibiční G-proteiny. Na fosforylované receptory se váže β-arrestin, který způsobí jejich desenzitizaci a internalizaci do buňky. Vytvořeno podle Lanzafame, 2003.

1.5. Struktura

Muskarinové acetylcholinové receptory jsou membránové proteiny, které mají 7 transmembránových α-helixů (TM1-7), 3 extra- a 3 intracelulární smyčky, N-konec se nachází na extracelulární straně a C-konec na intracelulární. Vazebné místo pro ACh a další ortosterické ligandy se nachází ve vazebné kapse tvořené z transmembránových helixů (Bran, 1993). Struktura vazebného místa je napříč jednotlivými podtypy muskarinových receptorů konzervována. Na vazbě ACh do vazebného místa receptoru se podílejí především aminokyseliny Asp, Asn, Cys, Thr a série Tyr (Hulme a spol., 2003).

U M3 receptoru se ACh váže iontovou vazbou s Asp 147 v TM3 prostřednictvím svého kladně nabitého aminu. Vazbou ligandu na receptor dochází ke konformačním změnám, kdy se extracelulární části helixů nakloní směrem k sobě a tím dojde k uzavření vazebné kapsy. Aminokyseliny tvořící takzvané tyrozinové víčko jsou Thr 231, Thr 234, Tyr 148, Tyr 506, Tyr 529, Tyr 533. Jejich aromatické zbytky se podílí na stabilizaci vazby mezi receptorem a ACh. Intracelulární části helixů se naopak odkloní směrem ven (nejvýraznější posun probíhá u TM6)

a umožní tak vsunutí C-konce α podjednotky G-proteinu do receptoru a jeho následné aktivaci (Brann a spol., 1993; Lanzafame a spol., 2003; Wessler a spol., 2011, 1996; Kruse a spol, 2013).



Obrázek 5: Struktura a dynamika aktivace muskarinových receptorů

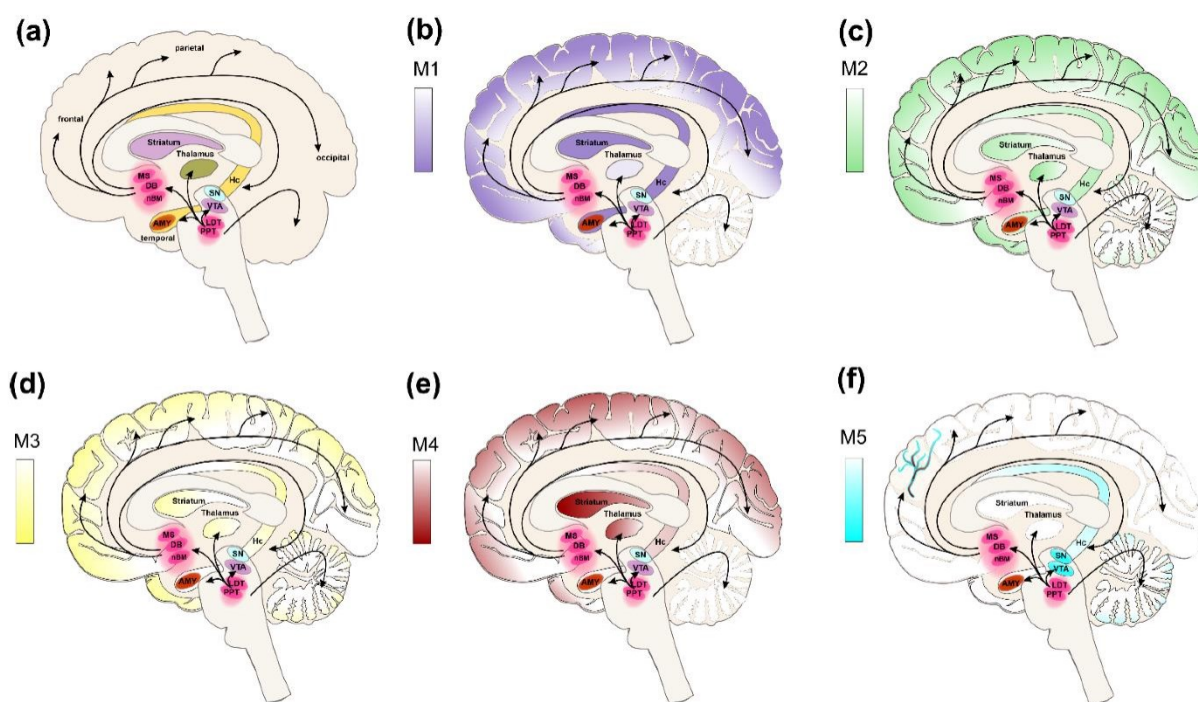
Obrázek 5A znázorňuje strukturální rozdíly mezi M3 receptorem (zelená) a M2 receptorem (oranžová). Konzervovanost struktury M3 receptoru je prezentována na obrázku 5B. Na obrázcích 5C a 5D jsou viditelné strukturální změny při aktivaci receptoru M2 (inaktivní stav – modrá barva, aktivní – oranžová barva). Převzato a upraveno z Kruse a spol, 2013 a Kruse a spol, 2012.

1.6. Podtypy muskarinových acetylcholinových receptorů

Jednotlivé podtypy muskarinových receptorů M1-M5 se liší jak lokalizací v organismu, tak fyziologickými funkcemi, které zprostředkovávají. V tabulce 1 jsou uvedeny oblasti významného zastoupení jednotlivých podtypů muskarinových receptorů v organismu a jejich hlavní fyziologické funkce. Obrázek 5 graficky znázorňuje expresi jednotlivých podtypů v mozku.

Podtyp	Lokalizace	Oblast působení
M1	mozková kůra, striatum, hipokampus, lymfocyty	kognitivní funkce, imunitní systém
M2	hipokampus, mozková kůra, thalamus myokard, hladká svalovina	kognitivní funkce, srdeční činnost, svalová kontrakce, sekrece žláz, dýchací cesty
M3	mozková kůra, bazální ganglia, hladká svalovina, myokard, plíce	kognitivní funkce, sekrece žláz, vazodilatace, srdeční činnost, gastrointestinální systém, urogenitální systém, dýchací cesty, akomodace oka
M4	striatum, mozková kůra, hipokampus, bazální ganglia	kognitivní funkce, motorika, regulace dopaminergní signalizace
M5	ventrální tegmentální oblast, substantia nigra	kognitivní funkce, regulace dopaminergní signalizace, mozková mikrocirkulace

Tabulka 1: Přehled jednotlivých podtypů muskarinových acetylcholinových receptorů a jejich hlavních funkcí v organismu



Obrázek 6: Lokalizace jednotlivých podtypů muskarinových receptorů v mozku

Na obrázku 6A jsou cholinergní vstupy (černé šipky) do kortikálních a subkortikálních struktur z bazálního předního mozku, včetně mediaálního septa (MS), diagonálního pásu Broca (DB) a magnocelulárního jádra (nBM) do neokortexu, amygdaly (AMY) a hippocampu (Hc). Dále z mozečkového kmenového jádra (PPN) a laterodorsálního tegmenta (LDT) do thalamu a struktur bazálního předního mozku. Rozmístění jednotlivých podtypů muskarinových receptorů s úrovněmi exprese naznačenými pomocí barevných gradientů 6B M1 (fialová), 6C M2 (zelená), 6D M3 (žlutá), 6E M4 (červená), 6F M5 (azurová), převzato z Szczurowska a spol., 2023.

1.6.1. M1

Podtyp muskarinového receptoru M1 se ve vysoké míře nachází v mozkové kůře, hipokampu a striatu (viz obrázek 6B). Podílí se na řízení procesů učení a paměti. Dysfunkce M1 receptoru se pojí s kognitivním deficitem u onemocnění jako je například Alzheimerova choroba (Eglen a spol., 2011). M1 receptor se nachází i mimo nervový systém, hojně je jeho zastoupení v lymfocytech. Acetylcholin reguluje imunitní systém prostřednictvím aktivace M1 receptoru, což vede k produkci Interleukinu-2 a tím aktivaci proliferace T-lymfocytů a dalších buněk imunitního systému (Kawashima, 2004).

1.6.2. M2

M2 receptory se v hojně míře nachází jak v CNS tak na periférii. M2 se v centrální nervové soustavě nachází především v hipokampu, mozkové kůře a thalamu (viz obrázek 6C), kde ovlivňuje emocionální a náladové stavy. Dysfunkce M2 receptoru bývá spojována s různými psychiatrickými poruchami, jako je například deprese a schizofrenie (Eglen a spol., 2011).

Na periférii hrají M2 receptory významnou roli v myokardu, kde regulují srdeční funkci, jeho aktivace snižuje srdeční frekvenci a sílu srdeční kontrakce. Dále významně ovlivňují kontrakci hladké svaloviny. Jeho aktivací dojde ke stahu hladké svaloviny (Eglen a spol., 2011).

1.6.3. M3

Muskarinový receptor M3 hraje důležitou roli v mnoha fyziologických procesech v těle. Největší zastoupení má na periférii, nicméně v centrálním nervovém systému se nachází v hipokampu a v bazálních gangliích (viz obrázek 6D), kde má vliv na kognitivní funkce a další procesy spojené s fungováním mozku (Levey a spol., 1994).

M3 se podílí významně na kontrakci hladké svaloviny. V žlázách s vnitřní a vnější sekrecí vede aktivace M3 receptoru k jejich sekreci (Eglen a spol., 2011). Nachází se ve hladkém svalstvu např. dýchacích cest, trávicího traktu, močového měchýře, kde způsobuje kontrakci svalových vláken (Eglen a spol., 2011). Společně s M2 podtypem významně reguluje srdeční činnost a činnost dýchacích cest (Wang a spol., 2007).

1.6.4. M4

M4 receptor se nachází převážně v CNS v bazálních gangliích, hipokampu, kortexu a limbickém systému (viz obrázek 6E). Hraje důležitou roli v regulaci motoriky (Eglen a spol., 2011, Flier a spol., 1989). Jeho aktivací dochází v bazálních gangliích k uvolňování dopaminu (Eglen a spol., 2005), který je důležitý pro řízení motorického chování a jeho dysfunkce může vést k poruchám motoriky, jako je Parkinsonova choroba (Eglen a spol., 2011).

1.6.5. M5

Expres muskarinového receptoru M5 je v CNS omezena na oblasti ventrálního tegmenta (VTA) a substantia nigra (SN) (viz obrázek 6F). Oblast VTA je zdrojem dopaminergních neuronů a je spojována s regulací dopaminu, na které se podílí receptor M5. Jeho aktivita je spojována s motivací a vznikem závislostí (Flier a spol., 1989).

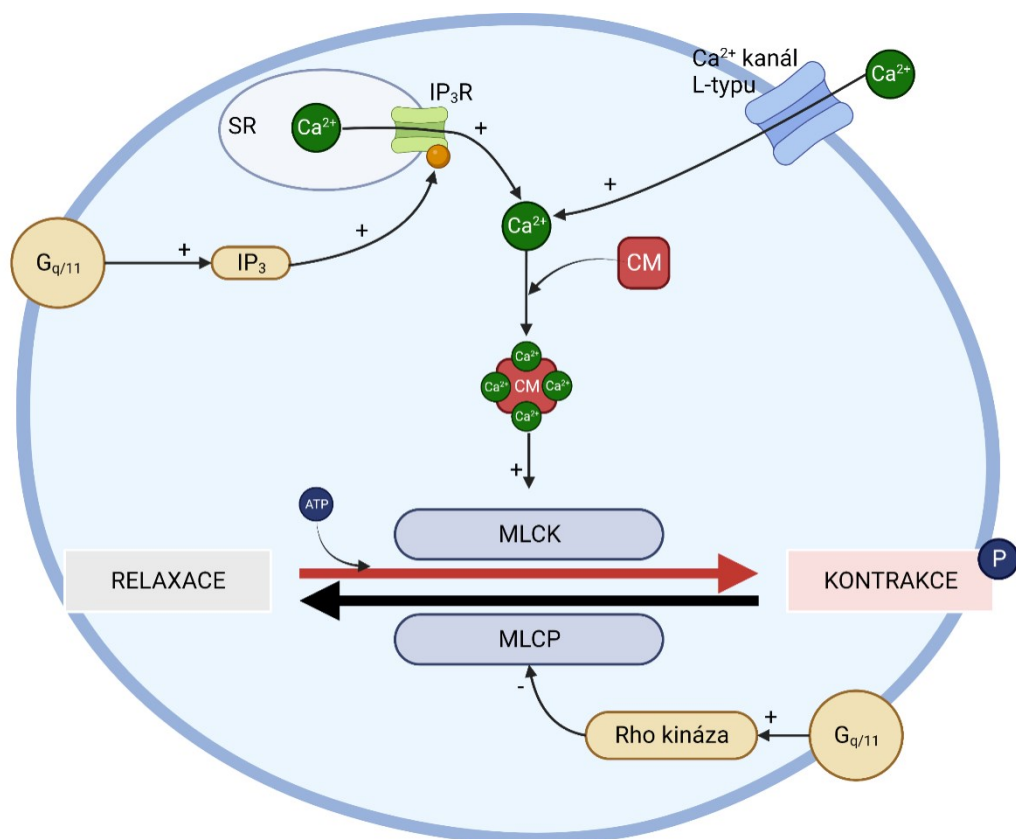
2. Muskarinový receptor M3 v PNS

Muskarinový receptor M3 je převážně exprimován na periférii, kde se účastní regulace celé řady fyziologických funkcí. Hraje důležitou roli při regulaci srdeční činnosti, plní různé funkce v gastrointestinálním traktu, dýchací soustavě ovlivňuje žlázy s vnitřní i vnější sekrecí. V závislosti na druhu buněk dochází k různé odpovědi na aktivaci M3 receptorů. Například v buňkách hladkého svalstva cév dochází po aktivaci muskarinového receptoru M3 ke zvýšení hladiny vápenatých iontů pomocí aktivace fosfolipázy C a k následné kontrakci, zatímco aktivací M3 receptoru ve vaskulárních endoteliálních buňkách dochází k aktivaci syntázy oxidu dusného, čímž dojde k nadprodukci oxidu dusného, který vede k relaxaci hladkého svalstva cév.

2.1. Hladká svalovina

Aktivace M3 receptoru v buňkách hladkého svalstva vede ke kontrakci. Molekulární mechanismus tohoto procesu je schematicky znázorněn na obrázku 7 a spočívá v aktivaci signální dráhy G-proteinu třídy Gq/11, kdy dojde k produkci sekundárního posla IP₃ pomocí PLC. IP₃ se váže na IP₃ receptory (IP₃R), které se nachází především v membráně endoplazmatického retikula (v hladké svalovině se jedná o sarkoplazmatické retikulum). IP₃R jsou zároveň iontovými kanály, které se po aktivaci otevírají a umožní tak uvolnění Ca²⁺ iontů z buněčných kompartmentů do cytosolu (Prole a spol., 2019).

Vápenaté ionty v buňce hladké svaloviny interagují s proteinem kalmodulinem (CM), který v návaznosti na změnu konformace, vyvolanou vazbou čtyř Ca²⁺ iontů, aktivuje kinázu lehkých myosinových řetězců (anglicky - myosin light chain kinase - MLCK). MLCK fosforyluje lehké myozinové řetězce a tím vyvolá kontrakci svalu. M3 receptor může aktivovat i Rho signální dráhu, která vede k inhibici fosfatázy lehkých myosinových řetězců (anglicky - myosin light chain phosphatase - MLCP), který defosforyluje myozinová vlákna. Neaktivní MLCP nedokáže defosforylovat myozinová vlákna a tím podporuje aktivitu MLCK (Hegde, 2006).



Obrázek 7: Obecné schéma molekulárního mechanismu kontrakce hladkého svalstva indukovaná M3 receptorem

Na obrázku je znázorněna aktivace signální dráhy Gq/11 proteinu, která indukuje zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v buňce, což vede k aktivaci CM, který poté fosforyluje MLCK a tím indukuje kontrakci hladké svaloviny. Převzato a upraveno z Klabunde, 2023.

2.1.1. Dýchací systém

Základní role M3 receptoru v dýchacích cestách je kontrakce hladké svaloviny a sekrece hlenu. Na kontrakci hladké svaloviny se mimo M3 receptoru podílí i další podtypy těchto receptorů a to především podtyp M2. M3 receptor vede ke kontrakci přímo, zatímco M2 receptor nepřímo. Kontrakce vyvolaná aktivací M3 receptoru je zprostředkována přes signální dráhu Gq/11 proteinu. M2 receptor vede k aktivaci signální dráhy G proteinu G_i , která inhibuje adenylát cyklázu, čímž dojde ke zmenšení koncentrace cAMP, jehož navýšení naopak vede k relaxaci (Ehlert a spol., 2003). Acetylcholin, který je uvolňován z parasympatických neuronů nebo epiteliálních a endoteliálních buněk plic (plicní buňky mají cholin acetyltransferázu, která katalyzuje syntézu acetylcholinu), vede prostřednictvím aktivace muskarinových receptorů ke

kontrakci hladkého svalstva dýchacích cest (bronchokonstrikci), ke zvýšené sekreci hlenu a zvýšení pohybu ciliárního aparátu řasinkového epitelu dýchacích cest (Struckmann a spol., 2003). Byla potvrzena dominantní role M3 receptoru v těchto procesech (Buels a spol., 2011).

M3 receptor se nachází i v pohárkových buňkách dýchacího epitelu, kde zvyšuje jejich sekreci prostřednictvím aktivace Gq/11 signální dráhy a zvyšování koncentrace vápenatých iontů. Produkce hlenu těmito buňkami je stálá, aktivace muskarinového receptoru způsobí jeho náhlé, rychlé a krátko trvající navýšení (Buels a spol., 2011).

Cílená desenzitizace a snížení aktivity tohoto podtypu muskarinového receptoru je prostředkem při léčbě astmatu (Matera a spol., 2020). Astma je chronické onemocnění dýchacích cest, které je charakterizováno zúžením a zánětem průdušek, což vede ke ztíženému dýchání, dušnosti a kašli, navíc je přítomna nadměrná produkce hlenu. Pro léčbu astmatu jsou obvykle používány inhalované kortikosteroidy primárně tlumící zánět, dlouhodobě působící (long-acting) agonisté β 2-adrenergických receptorů (LABAs), krátkodobě působící (short-acting) agonisté β 2-adrenergických receptorů (SABAs) jejichž působení vede přes stimulaci Gs signální dráhy a zvýšení hladiny cAMP k relaxaci hladké svaloviny dýchacích cest. Další možnosti léčby jsou v některých případech např. antagonisté leukotrienových receptorů nebo teofylin. Léčba astmatu je rovněž doplňována využitím antagonistů M3 receptorů. Tito antagonisté jsou dvojího typu: krátkodobě působící (short-acting) agonisté M3 receptorů (SAMAs) a dlouhodobě působící (long-acting) agonisté M3 receptorů (LAMAs). Mezi SAMAs patří například lék ipratropium bromid a jako LAMAs je využíván tiotropium (Matera a spol., 2020).

2.1.2. Močový měchýř

I přes to, že koncentrace M2 receptoru je přibližně třikrát větší než hustota M3 receptoru, tak za stah hladké svaloviny jak v dýchacích cestách tak i v močovém měchýři může především přímé působení právě M3 receptoru (Fetscher a spol., 2002). M3 receptor způsobuje kontrakci hladké svaloviny močového měchýře a dysfunkce receptoru může vést k hyperaktivitě močového měchýře (Uchiyama a spol., 2004). Aktivace M3 muskarinového receptoru vede prostřednictvím Gq/11 signální dráhy k otevření kanálů pro vápenaté ionty v sarkoplazmatickém retikulu a navýšení cytosolické koncentrace vápenatých iontů, což má za následek kontrakci hladké svaloviny močového měchýře.

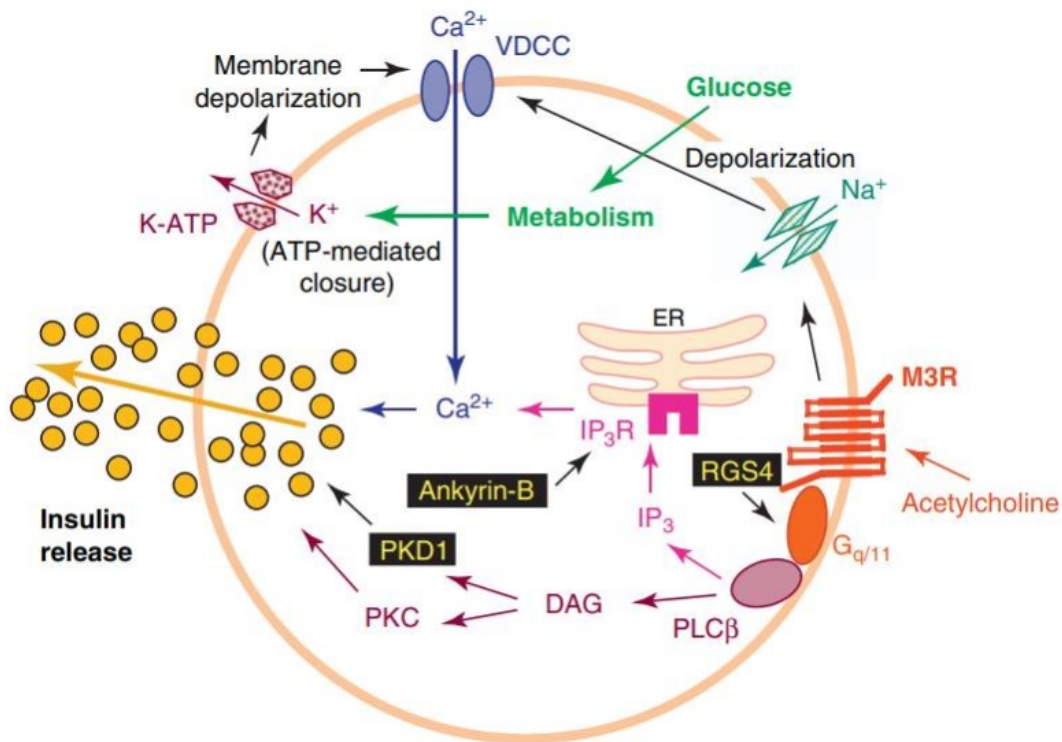
Onemocnění močového měchýře, které se projevuje častým močením a inkontinencí, ovlivňuje miliony lidí (Abrams a spol., 2000). Hyperaktivita močového měchýře je způsobena špatnou funkcí M3 receptoru a léčba je zaměřena na snížení aktivity receptorů. Farmakoterapie

využívá antimuskarinika oxybutynin, tolterodin, darifenacin, solifenacin nebo fesoterodin. Tyto léky blokují vazbu acetylcholinu na muskarinový receptor, který pak nemůže stimulovat stah hladkého svalstva močového měchýře (White a spol., 2016).

2.1.3. Žlázy s vnitřní a vnější sekrecí

Stejně jako v plicích a močovém měchýři je hladká svalovina žláz s vnitřní i vnější sekrecí řízena působením acetylcholinu přes M3 receptor. Příkladem může být sekrece inzulínu v pankreatu. Inzulín je hormon produkován pankreatickými β buňkami, které se nacházejí v Langerhansových ostrůvcích. Inzulín má zásadní roli v regulaci hladiny cukru v těle tím, že usnadňuje vstup glukózy z krevního řečiště do buněk, ta je potom využita jako zdroj energie. Na glukóze závislá sekrece inzulínu je regulovaná mnoha modulátory (jako jsou neuropeptidy, hormony a neurotransmitery), ale především parasymptickým neurotransmiterem acetylcholinem, který je uvolňován z pankreatických nervových zakončení bloudivého nervu (Gautam a spol., 2006) na popud zvýšené hladiny cukru v krvi po příjmu jídla. Muskarinový receptor, který je zodpovědný za uvolňování inzulínu z β buněk, je M3 receptor (Gautam a spol., 2006) a jeho přítomnost a aktivita přímo řídí glukózovou homeostázu. Aktivace G-proteinu třídy Gq/11 vede uvolnění druhého posla IP_3 , který se váže na IP_3R , což způsobí uvolnění Ca^{2+} iontů do buňky a následné uvolnění inzulínu z buňky (Kong a spol., 2019). Tento mechanismus je znázorněn na obrázku 8.

Diabetes je onemocnění spojené s poruchou produkce inzulínu nebo neschopností těla účinně ho využívat. Existují dva hlavní typy diabetu: diabetes typu 1 a diabetes typu 2. Diabetes typu 2 je charakterizován nedostatečným uvolňováním inzulínu z β buněk. V důsledku nedostatku inzulínu nastává hyperglykemie. Možnou léčbou tohoto onemocnění jsou pozitivní modulace M3 receptorů v pankreatu.



Obrázek 8: Obecné schéma molekulárního mechanismu uvolňování inzulínu z β buňky
Aktivace M3 receptoru vede ke zvýšení nitrobuňkové koncentrace Ca^{2+} iontů, které indukují uvolnění inzulínu z buňky. Tento mechanismus je podporován dalšími signálními drahami. Převzato a upraveno z Azua a spol. 2011.

Dalším příkladem působení M3 receptoru na periférii může být sekrece slinných žláz. Sekrece slin je řízena aktivitou sympatiku i parasympatiku. Noradrenalin uvolňovaný z vláken sympatiku se váže na β_2 -adrenergní receptory, které prostřednictvím Gs signální dráhy aktivují adenylát cyklázu, což vede ke zvýšení koncentrace cytosolického cAMP. Nicméně cholinergní působení parasympatiku je při regulaci sekrece slin výraznější, což dokázal výzkum na transgenních myších bez funkčního M3 receptoru (M3KO), které prokazovaly nedostatečnou produkci slin (Nakamura a spol., 2004).

Stimulace M3 receptoru je možným terapeutickým cílem při léčbě Sjögrenova syndromu (Eglen a spol., 2007), což je autoimunitní onemocnění charakterizované převážně suchostí sliznic (postihuje především slinné žlázy a oči, ale i další exokrinní žlázy). Léčba cílí na aktivaci M3 receptoru, který podporuje produkci sekrece žláz, což by mohlo při tomto syndromu pomoci.

2.2. Srdce a cévy

Přestože je za hlavní podtyp muskarinového receptoru v srdci považován podtyp M2, byla potvrzena i přítomnost ostatních podtypů. Přítomnost M3 receptoru byla potvrzena v síních a komorách lidského srdce v oblasti interkalárních disků mezi jednotlivými buňkami (Wang a spol., 2007). Činnost srdečního svalu regulují souhry receptorů M1, M2 a M3 (Saternos a spol., 2018), každý z nich má v regulaci kardiovaskulárního systému svoji roli a jejich molekulární spolupráce je pro správnou funkci srdce zásadní.

Muskarinový receptor M3 řídí srdeční činnost, jako je tepová frekvence a kontrakce srdečního svalu, různými signálními drahami, které se pojí s aktivitou draslíkového kanálu IK_{M3} (K^+ inwardly rectifying channel M3) nebo s regulací proteinu connexin 43 (Cx43), který vytváří mezibuněčné spoje (gap junctions) a umožňuje mezibuněčnou komunikaci a přispívá tak regulaci repolarizace srdečních buněk (Wang a spol., 2007). Působení muskarinových receptorů M3 v srdci hraje roli i v aktivaci procesů buněčné ochrany v případě poškození myokardu při ischemické choroby srdeční (Saternos a spol., 2018). Defekty ve funkcích M3 receptoru mohou vést ke srdečním vadám, jako je fibrilace síní, srdeční ischemie a srdeční infarkt (Wang a spol., 2007). Draslíkové kanály spřažené s aktivací muskarinových receptorů (GIRK), jsou dvojího typu: GIRK aktivované Gq/11 proteinem a GIRK aktivované Gi/o proteinem (Wang a spol., 2007). Tyto kanály vyvolávají repolarizaci membrány srdeční buňky díky opožděnému preferenčnímu toku draslíkových iontů do buňky. To způsobuje zpomalení srdečního rytmu a prodloužení diastoly. IK_{M3} kanál je regulovaný M3 receptorem prostřednictvím Gq/11 signální dráhy (Shi, 2004).

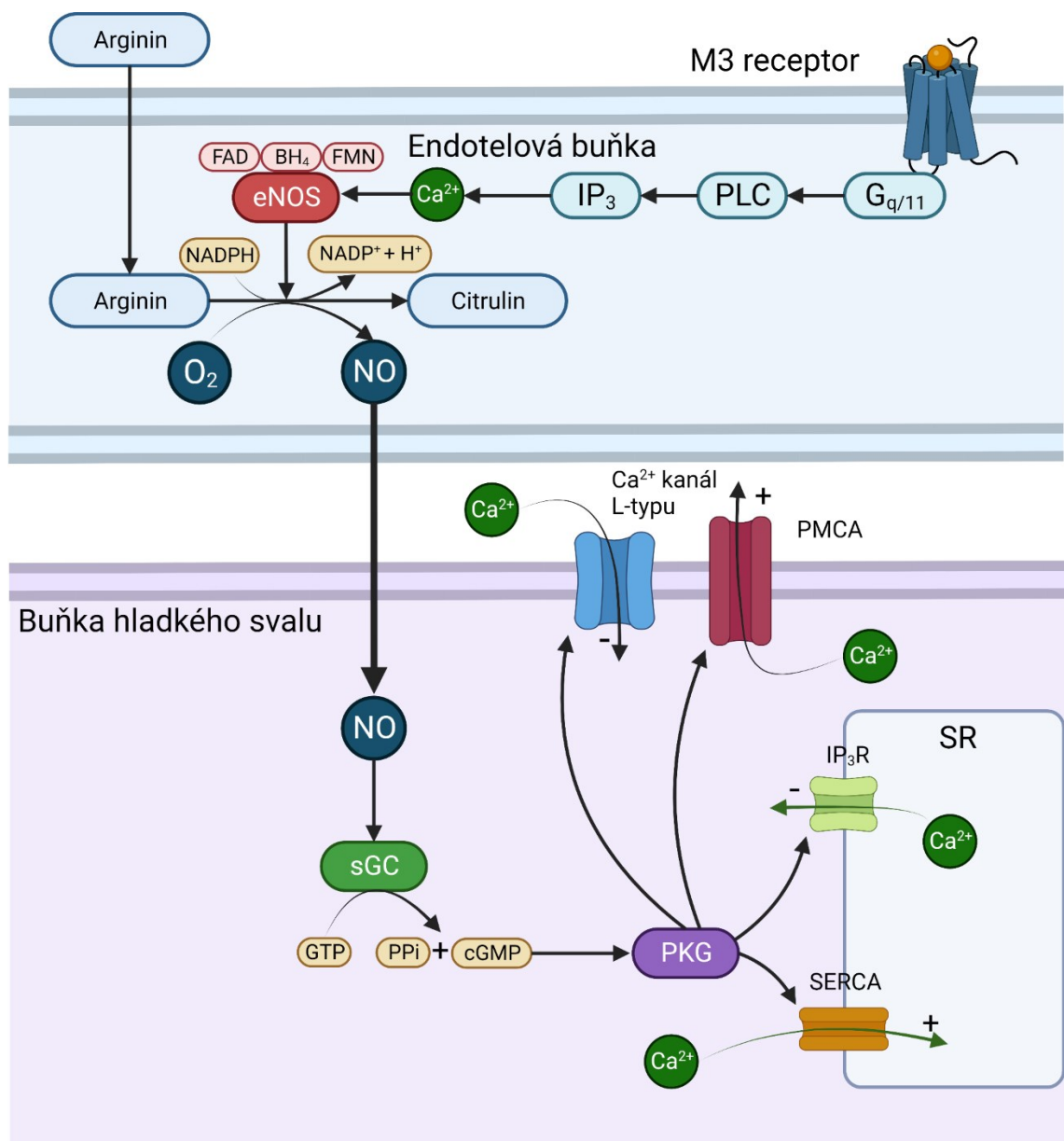
Regenerace srdečního svalu po ischemii je podporována stimulací M3 receptoru. Konkrétně se tak děje při krátkodobém vyvolání ischemie (anglicky - ischaemic preconditioning - IPC), které poskytuje ochranu proti následujícímu delšímu období ischemie. Působení M3 receptoru v tomto procesu zahrnuje snížení incidence a závažnosti arytmií způsobených následnou ischemií, omezení poškození myokardu aktivací několika molekul přežití, snížení úrovně apoptotických mediátorů a snížení koncentrace intracelulárního vápníku (Zhao a spol., 2010).

Avšak primární role M3 receptoru v oběhovém systému je regulace průsvitu cév. Narozdíl od buněk hladkého svalstva žláz, močového měchýře nebo průdušek, vede aktivace M3 receptoru v cévách k relaxaci svalové buňky a následné vazodilataci. Nicméně tento účinek se přisuzuje syntéze a uvolňování chemického mediátoru oxidu dusného (NO) (Lanzafame

a spol., 2003). NO je produkován endotelovými buňkami cév kontinuálně pro udržení průtoku krve cévami. Zvýšená produkce NO, jakožto odpověď na nervovou stimulaci, vede k vazodilataci (Lanzafame a spol., 2003). NO je plyn syntetizován eNOS, která katalyzuje přeměnu argininu na citrulin za uvolnění oxidu dusného, který poté volně difunduje z endotelové buňky do buňky hladkého svalu (Krawutschke a spol., 2015). Molekulární mechanismus aktivace eNOS je zajištěn M3 receptorem prostřednictvím Gq/11 signální dráhy (Rosignoli a spol., 2002). IP₃ způsobí uvolnění vápenatých iontů z ER a jejich zvýšená koncentrace v cytosolu stimuluje aktivaci eNOS. Uvnitř hladké svalové buňky se NO váže na enzym solubilní guanylátcyklázu (sGC), která se nachází v cytosolu a produkuje cyklický guanosin-3',5'-fosfát (cGMP) z GTP. cGMP aktivuje proteinkinázu G (PKG), která snižuje intracelulární koncentraci Ca²⁺ několika mechanismy a tím dojde k relaxaci hladké svalové buňky (Khalaf a spol., 2019).

Těmito mechanismy jsou:

1. inhibice napětově závislých Ca²⁺ kanálů typu L, která zastaví přísun Ca²⁺ do buňky
2. aktivace membránové Ca²⁺ pumpy (anglicky - plasma membrane Ca²⁺ ATPase - PMCA), která pumpuje Ca²⁺ ionty z buňky,
3. inhibice IP₃R, která sníží uvolňování Ca²⁺ iontů ze sarkoplazmatického retikula,
4. aktivace Ca²⁺ pumpy sarkoplazmatického retikula (anglicky - sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase - SERCA), která pumpuje Ca²⁺ z cytosolu zpět do SR (Khalaf a spol., 2019).



Obrázek 9: Obecné schéma aktivace eNOS pomocí M3 receptoru

Muskarinový receptor M3 aktivuje eNOS pomocí zvýšené koncentrace vápenatých iontů v cytosolu. Vytvořeno podle Khalaf a spol., 2019.

3. Muskarinový receptor M3 v CNS

Zastoupení muskarinového receptoru M3 v centrální nervové soustavě je obecně malé. Největší koncentrace M3 receptoru je však v oblasti kůry, dále pak v bazálních gangliích a hipokampu (Flynn a spol., 1993; Levey a spol., 1994) viz obrázek 6D (kapitola 1.6., strana 23), kde má přímý vliv na učení a paměť (Eglen a spol., 2007).

Hipokampus je zapojen v různých typech učení, včetně prostorového učení, učení na základě paměti, učení asociací a kontextuálního učení a zároveň má vliv na procesy při zpracovávání strachu a odpovědi na něj (Poulin a spol., 2010).

Ukazuje se, že v některých těchto procesech hraje důležitou roli fosforylace M3 receptoru (Poulin a spol., 2010). M3 receptor je po aktivaci agonistou fosforylován ve své intracelulární oblasti, což vede k aktivaci arrestin dependentní signální dráhy (Tobin, 2008) i přes to, že spojení s Gq/11 proteinem není přerušeno (Poulin a spol., 2010). Fosforylaci receptoru M3 v hipokampu provádí kaseinové kinázy CK1 α a CK2 na cílových motivech i3 smyčky Lys370- Ser425 a Ser351-Arg-Ser-Ser-Asp-Glu-Glu-Asp356 a Ser358 (Tobin, 2008; (Poulin a spol., 2010). Na fosforylovaný receptor se váže β -arrestin. Tento intercelulární protein způsobuje desenzitizaci a internalizaci receptoru a také se na něj váží další intercelulární proteiny. Aktivita těchto signálních drah reguluje dlouhodobou synaptickou plasticitu, což je schopnost synapsí měnit svou sílu a účinnost v důsledku opakovaného vstupu. To je základní mechanismus, který přispívá k procesům učení a paměti v hipokampu (Poulin a spol., 2010).

Poulinův výzkumu ukázal, že myši s modifikovaným M3 receptorem s nízkou afinitou k fosforylaci neprokázaly změny v expresi sekundárních posílů (DAG a IP₃) v signalizační dráze Gq/11 proteinů, ale prokázaly velké snížení exprese β -arrestinu. Tato snížení vedlo u transgenních myši k odlišné reakci na strachový stimul, kdy se odpovědi na strach snížily. Velmi podobný výsledek dostal při pokusech s transgenními myši bez funkčních M3 receptorů. Zároveň mutace fosforylačních míst na receptoru nevedla ke snížení interakcí s Gq/11 proteinem (Poulin a spol., 2010).

Závěr

Tato literární rešerše se zabývala fyziologickou rolí M3 receptoru v organismu. M3 receptor hraje významnou úlohu v řadě vegetativních procesů řízených prostřednictvím parasymptiku, jako je regulace stahu cév, bronchiální konstrikce, sekrece inzulinu a další. V menší míře se nachází také v CNS, kde hraje roli v procesech paměti.

Výzkumy ukazují, že dysfunkce M3 receptoru může hrát klíčovou roli v patofyziologii různých onemocnění. Poruchy spojené s nadměrnou aktivací M3 receptoru se podílí na patologii onemocnění jako je například astma nebo hyperaktivní močový měchýř. Blokování muskarinového receptoru M3 nachází tedy uplatnění v terapii těchto onemocnění. Na druhou stranu farmakologická stimulace M3 receptoru by mohla pomoci v léčbě onemocnění jako je Sjörgenův syndrom, který doprovází snížená sekrece žláz.

M3 receptor je zajímavým terapeutickým cílem pro léčbu onemocnění na periférii a nové studie ukazují, že ovlivnění signalizace M3 má potenciál i při léčbě některých onemocnění CNS. Poznatky o roli M3 receptoru jsou stále rozšiřovány a výzkum v této oblasti má velký farmakologický potenciál pro budoucí objevy. Je však třeba zdůraznit, že je důležité, aby se cílilo na M3 receptor selektivně, aby se zabránilo možným vedlejším účinkům způsobeným ovlivněním dalších podtypů muskarinových receptorů.

Použitá literatura

Symbolem ☆ jsou označeny review.

ABRAMS P, Kelleher CJ, Kerr LA, Rogers RG. Overactive bladder significantly affects quality of life. *Am J Manag Care*. 2000 Jul;6(11 Suppl):S580-90. PMID: 11183901.

ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0-8153-4072-9.

☆ AZUA, Inigo Ruiz de, Dinesh GAUTAM, Jean-Marc GUETTIER a Jürgen WESS. Novel insights into the function of β -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. 2011, 22(2), 74-80 [cit. 2023-08-01]. ISSN 10432760. Dostupné z: doi:10.1016/j.tem.2010.10.004

BRANN, Mark R., V.J. KLIMKOWSKI a John ELLIS. Structure/function relationships of muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sciences* [online]. 1993, 52(5-6), 405-412 [cit. 2023-06-11]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/0024-3205(93)90295-E

BUELS, Kalmia S. a Allison D. FRYER. Muscarinic Receptor Antagonists: Effects on Pulmonary Function. In: FRYER, Allison D., Arthur CHRISTOPOULOS a Neil M. NATHANSON, ed. *Muscarinic Receptors* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, 2012-11-03, s. 317-341 [cit. 2023-06-17]. *Handbook of Experimental Pharmacology*. ISBN 978-3-642-23273-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-23274-9_14

☆ DASCAL, Nathan. Signalling Via the G Protein-Activated K⁺ Channels. *Cellular Signalling* [online]. 1997, 9(8), 551-573 [cit. 2023-06-24]. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/S0898-6568(97)00095-8

☆ DOWNES, G.B. a N. GAUTAM. The G Protein Subunit Gene Families. *Genomics* [online]. 1999, 62(3), 544-552 [cit. 2023-08-01]. ISSN 08887543. Dostupné z: doi:10.1006/geno.1999.5992

DREYER, F. ACETYLCHOLINE RECEPTOR. *British Journal of Anaesthesia* [online]. 1982, 54(2), 115-130 [cit. 2023-06-11]. ISSN 00070912. Dostupné z: doi:10.1093/bja/54.2.115

EGLLEN, Richard M. Muscarinic Receptor Subtype Pharmacology and Physiology [online]. In: . Elsevier, 2005, 2005, s. 105-136 [cit. 2023-06-11]. Progress in Medicinal Chemistry. ISBN 9780444515728. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6468(05)43004-0

☆ EGLLEN, Richard M. Overview of Muscarinic Receptor Subtypes. In: FRYER, Allison D., Arthur CHRISTOPOULOS a Neil M. NATHANSON, ed. Muscarinic Receptors [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, 2012-11-3, s. 3-28 [cit. 2023-06-11]. Handbook of Experimental Pharmacology. ISBN 978-3-642-23273-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-23274-9_1

EHLERT, Frederick J. Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. Life Sciences [online]. 2003, 74(2-3), 355-366 [cit. 2023-07-31]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2003.09.023

FETSCHER, Charlotte, Marina FLEICHMAN, Martina SCHMIDT, Susanne KREGE a Martin C MICHEL. M3 muscarinic receptors mediate contraction of human urinary bladder. British Journal of Pharmacology [online]. 2002, 136(5), 641-644 [cit. 2023-06-19]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bjp.0704781

FLIER, Jeffrey S., Lisa H. UNDERHILL a Raj K. GOYAL. Muscarinic Receptor Subtypes. New England Journal of Medicine [online]. 1989, 321(15), 1022-1029 [cit. 2023-06-11]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM198910123211506

FLYNN, Donna D. a Deborah C. MASH. Distinct kinetic binding properties of N-[3H]-methylscopolamine afford differential labeling and localization of M1, M2, and M3 muscarinic receptor subtypes in primate brain. Synapse [online]. 1993, 14(4), 283-296 [cit. 2023-06-13]. ISSN 0887-4476. Dostupné z: doi:10.1002/syn.890140406

GAUTAM, Dinesh, Sung-Jun HAN, Fadi F. HAMDAN, et al. A critical role for β cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. Cell Metabolism [online]. 2006, 3(6), 449-461 [cit. 2023-06-21]. ISSN 15504131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2006.04.009

☆ GIANNONE, Flavia, Giorgio MALPELI, Veronica LISI, et al. The puzzling uniqueness of the heterotrimeric G15 protein and its potential beyond hematopoiesis. Journal of Molecular Endocrinology [online]. 2010, 2010-05-11, 44(5), 259-269 [cit. 2023-08-01]. ISSN 0952-5041. Dostupné z: doi:10.1677/JME-09-0134

G-protein signaling: REWTY [online]. 2022. [cit. 2023-06-11]. Dostupné z: <https://www.cisbio.eu/dd/by-universe/g-protein-signaling>

HAGA, Tatsuya, Kazuko HAGA, Kimihiko KAMEYAMA a Hiroko NAKATA. Phosphorylation of muscarinic receptors: regulation by G proteins. *Life Sciences* [online]. 1993, 52(5-6), 421-428 [cit. 2023-06-24]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/0024-3205(93)90297-G

HEGDE, Sharath S. Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2006, 147(S2), S80-S87 [cit. 2023-06-17]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bjp.0706560

HEPLER, John R. a Alfred G. GILMAN. G proteins. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 1992, 17(10), 383-387 [cit. 2023-06-11]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/0968-0004(92)90005-T

HULME, E.C., Z.L. LU, J.W. SALDANHA a M.S. BEE. Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2003, 31(1), 29-34 [cit. 2023-06-11]. ISSN 0300-5127. Dostupné z: doi:10.1042/bst0310029

JÄHNICHEN, Sven. Activation cycle of G-proteins by G-protein-coupled receptors [online]. In: . [cit. 2023-08-01]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:GPCR-Zyklus.png>

KAWASHIMA, Koichiro. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2004, 9(1-3) [cit. 2023-06-11]. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/1390

KHALAF, David, Marcus KRÜGER, Markus WEHLAND, Manfred INFANGER a Daniela GRIMM. The Effects of Oral l-Arginine and l-Citrulline Supplementation on Blood Pressure. *Nutrients* [online]. 2019, 11(7) [cit. 2023-07-27]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11071679

KLABUNDE, Richard E. Vascular Smooth Muscle Contraction and Relaxation [online]. In: . [cit. 2023-08-01]. Dostupné z: <https://cvphysiology.com/blood-pressure/bp026>

KONG, Kok Choi, Adrian J. BUTCHER, Phillip MCWILLIAMS, et al. M₃-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of

protein kinase D1. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 2010, 107(49), 21181-21186 [cit. 2023-06-21]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1011651107

KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. Barevný atlas biochemie. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.

KRAWUTSCHKE, Christian, Doris KOESLING a Michael RUSSWURM. Cyclic GMP in Vascular Relaxation. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology [online]. 2015, 35(9), 2011-2019 [cit. 2023-07-27]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.115.306133

KRUSE, Andrew C., Aaron M. RING, Aashish MANGLIK, et al. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. Nature [online]. 2013, 504(7478), 101-106 [cit. 2023-07-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12735

KRUSE, Andrew C., Jianxin HU, Albert C. PAN, et al. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. Nature [online]. 2012, 482(7386), 552-556 [cit. 2023-07-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature10867

LANZAFAME, A. A., A. CHRISTOPOULOS a F. MITCHELSON. Cellular Signaling Mechanisms for Muscarinic Acetylcholine Receptors. Receptors and Channels [online]. 2011, 9(4), 241-260 [cit. 2023-06-11]. ISSN 1060-6823. Dostupné z: doi:10.3109/10606820308263

LEVEY, A.I., S.M. EDMUNDS, C.J. HEILMAN, T.J. DESMOND a K.A. FREY. Localization of muscarinic M3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. Neuroscience [online]. 1994, 63(1), 207-221 [cit. 2023-06-13]. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/0306-4522(94)90017-5

MASUHO, Ikuo, Olga OSTROVSKAYA, Grant M. KRAMER, Christopher D. JONES, Keqiang XIE a Kirill A. MARTEMYANOV. Distinct profiles of functional discrimination among G proteins determine the actions of G protein-coupled receptors. Science Signaling [online]. 2015, 8(405) [cit. 2023-07-31]. ISSN 1945-0877. Dostupné z: doi:10.1126/scisignal.aab4068

☆ MATERA, Maria Gabriella, Barbara RINALDI, Carmela BERARDO, Michele RINALDI a Mario CAZZOLA. A review of the pharmacokinetics of M 3 muscarinic receptor antagonists used for the treatment of asthma. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology [online].

2020, 16(2), 143-148 [cit. 2023-06-17]. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:10.1080/17425255.2020.1716730

NAKAMURA, Takeshi, Minoru MATSUI, Keiko UCHIDA, et al. M₃ muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. *The Journal of Physiology* [online]. 2004, 558(2), 561-575 [cit. 2023-07-27]. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2004.064626

PERALTA, E. G., A. ASHKENAZI, J. W. WINSLOW, D. H. SMITH, J. RAMACHANDRAN a D. J. CAPON. Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *The EMBO Journal* [online]. 1987, 6(13), 3923-3929 [cit. 2023-07-31]. ISSN 02614189. Dostupné z: doi:10.1002/j.1460-2075.1987.tb02733.x

POULIN, Benoit, Adrian BUTCHER, Phillip MCWILLIAMS, et al. The M₃-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2010, 107(20), 9440-9445 [cit. 2023-06-13]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0914801107

ROSIGNOLI, Florencia a Claudia PÉREZ LEIRÓS. Activation of nitric oxide synthase through muscarinic receptors in rat parotid gland. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2002, 439(1-3), 27-33 [cit. 2023-07-31]. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-2999(02)01375-4

PROLE, David L. a Colin W. TAYLOR. Structure and Function of IP₃ Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2019, 11(4) [cit. 2023-07-26]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a035063

SAM, CH. a BORDONI, B.. Physiology, Acetylcholine [online]. StatPearls. University of California, Riverside, April 10, 2023 [cit. 2023-06-11]. ISBN NBK557825. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557825/>

☆ SATERNOS, Hannah C., Daniyah A. ALMARGHALANI, Hayley M. GIBSON, Mahmood A. MEQDAD, Raymond B. ANTYPAS, Ajay LINGIREDDY a Wissam A. ABOUALAIWI. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiological Genomics* [online]. 2018, 50(1), 1-9 [cit. 2023-06-17]. ISSN 1094-8341. Dostupné z: doi:10.1152/physiolgenomics.00062.2017

STRUCKMANN, Nicole, Sandra SCHWERING, Silke WIEGAND, Anja GSCHNELL, Masahisa YAMADA, Wolfgang KUMMER, Jürgen WESS a Rainer V. HABERBERGER. Role of Muscarinic Receptor Subtypes in the Constriction of Peripheral Airways: Studies on Receptor-Deficient Mice. *Molecular Pharmacology* [online]. 2003, 64(6), 1444-1451 [cit. 2023-06-18]. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.64.6.1444

SZCZUROWSKA, Ewa, Eszter SZÁNTI-PINTÉR, Nikolai CHETVERIKOV, Alena RANDÁKOVÁ, Eva KUDOVÁ a Jan JAKUBÍK. Modulation of Muscarinic Signalling in the Central Nervous System by Steroid Hormones and Neurosteroids. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2023, 24(1) [cit. 2023-07-25]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms24010507

THATCHER, Jack D. The Inositol Trisphosphate (IP₃) Signal Transduction Pathway. *Science Signaling* [online]. 2010, 3(119) [cit. 2023-07-25]. ISSN 1945-0877. Dostupné z: doi:10.1126/scisignal.3119tr3

☆ UCHIYAMA, Toshimitsu a Russell CHESSE-WILLIAMS. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *Journal of Smooth Muscle Research* [online]. 2004, 40(6), 237-247 [cit. 2023-06-17]. ISSN 0916-8737. Dostupné z: doi:10.1540/jsmr.40.237

☆ WANG, H., Y. LU a Z. WANG. Function of cardiac M₃ receptors. *Autonomic & Autacoid Pharmacology* [online]. 2007, 27(1), 1-11 [cit. 2023-06-16]. ISSN 1474-8665. Dostupné z: doi:10.1111/j.1474-8673.2006.00381.x

WESSLER, Ignaz Karl a Charles James KIRKPATRICK. Activation of Muscarinic Receptors by Non-neuronal Acetylcholine. In: FRYER, Allison D., Arthur CHRISTOPOULOS a Neil M. NATHANSON, ed. *Muscarinic Receptors* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, 2012-11-03, s. 469-491 [cit. 2023-06-24]. *Handbook of Experimental Pharmacology*. ISBN 978-3-642-23273-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-23274-9_20

WHITE, Nicola a Cheryl B. IGLESIA. Overactive Bladder. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* [online]. 2016, 43(1), 59-68 [cit. 2023-07-27]. ISSN 08898545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ogc.2015.10.002

WILKIE, T M, P A SCHERLE, M P STRATHMANN, V Z SLEPAK a M I SIMON. Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

[online]. 1991, 1991-11-15, 88(22), 10049-10053 [cit. 2023-08-01]. ISSN 0027-8424.
Dostupné z: doi:10.1073/pnas.88.22.10049

YOKOYAMA, Shozo a WilliamT. STARMER. Phylogeny and evolutionary rates of G protein, subunit genes. *Journal of Molecular Evolution* [online]. 1992, 35(3) [cit. 2023-07-31]. ISSN 0022-2844. Dostupné z: doi:10.1007/BF00178599

ZHAO, Jinlong, Yue SU, Yong ZHANG, et al. Activation of cardiac muscarinic M3 receptors induces delayed cardioprotection by preserving phosphorylated connexin43 and up-regulating cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2010, 159(6), 1217-1225 [cit. 2023-07-31]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00606.x