

Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

## DISERTAČNÍ PRÁCE



Lucie Svobodová

Studium aktivace a modulace svalových nikotinických acetylcholinových receptorů  
pomocí bodových mutací

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Vedoucí disertační práce: RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Studijní program: Fyzika - biofyzika, chemická a makromolekulární fyzika

Děkuji především RNDr. Janu Krůškovi, CSc. za příkladné vedení při vypracovávání této disertační práce. Dále děkuji prof. Františku Vyskočilovi, DrSc. a MUDr. Ladislavu Vyklickému ml., DrSc. za podnětné připomínky při sepisování práce a paní Magdě Kuntošové za přípravu tkáňových kultur. Děkuji také svým rodičům za podporu při práci na disertaci.

Prohlašuji, že jsem svou disertační práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne



# Obsah

Obsah.....	3
Abstrakt / Abstract.....	6
Seznam zkratek.....	7
1 Úvod .....	8
1.1 CHEMICKY AKTIVOVANÉ IONTOVÉ KANÁLY .....	8
1.2 NIKOTINICKÝ ACETYLCHOLINOVÝ RECEPTOR .....	9
1.2.1 Podjednotkové složení nAChR .....	10
1.2.2 Iontová selektivita nAChR.....	11
1.2.3 Podjednotkové složení svalového nAChR .....	12
1.3 MOLEKULÁRNÍ STRUKTURA SVALOVÉHO nACh RECEPTORU.....	13
1.3.1 Shlukování nAChR, jeho vazba na cytoskelet a interakce s jinými buněčnými proteiny .....	16
1.3.2 N-koncová doména a vazebné místo pro ACh .....	17
1.3.3 Porovnání vazebného místa pro ACh u AChBP, nAChR elektrického orgánu <i>T. californica</i> a myšního svalového nAChR .....	20
1.3.4 Mechanismus otevírání iontového kanálu svalového nAChR.....	22
1.4 FUNKČNÍ VLASTNOSTI nAChR.....	23
1.4.1 Způsoby popisu kinetiky aktivace.....	23
1.4.2 Afinita agonisty a jeho účinnost při aktivaci kanálu nejsou nezávislé .....	26
1.4.3 Modely aktivace ligandem řízených kanálů.....	27
1.4.4 Desensitizace nAChR .....	30
1.4.5 Alosterie a kooperativita.....	33
1.4.6 Interpretace parametrů Hillovy rovnice ve vztahu k mechanismu činnosti receptoru.....	34
1.4.6.1 Vztah mezi Hillovým koeficientem a kooperativitou závisí na konkrétním mechanismu aktivace systému .....	34
1.4.6.2 Vlastnosti $EC_{50}$ a $Y_{max}$ .....	36
1.4.7 Charakteristika ligandů, jejich interakce s receptorem a diagnostika aktivační křivky.....	36
1.4.8 Metody odhadu afinity kompetitivního antagonisty .....	38
1.4.8.1 Metoda Cheng-Prusoffova .....	39
1.4.8.2 Schildova regrese .....	40
1.5 LIGANDY SVALOVÉHO nAChR .....	41
1.5.1 Agonisté .....	41
1.5.2 Kompetitivní antagonisté.....	41
1.5.3 Nekompetitivní antagonisté.....	42

1.5.4	<i>Alosterické modulátory</i> .....	42
1.5.5	<i>Nekompetitivní agonisté</i> .....	43
1.6	ACETYLCHOLINESTERÁZA A nAChR .....	44
1.6.1	<i>Nervosvalový přenos v číslech</i> .....	44
1.6.2	<i>Kation-<math>\pi</math> interakce – společný činitel účastnící se vazby ACh na AChE, AChBP a nAChR</i> .....	44
1.6.3	<i>Inhibitory AChE</i> .....	46
1.6.4	<i>Interakce physostigminu a galanthaminu s nAChR</i> .....	46
2	Cíle práce .....	48
3	Metody .....	49
3.1	METODA TERČÍKOVÉHO ZÁMKU (PATCH CLAMP) .....	49
3.1.1	<i>Elektronika měřicího zařízení metody terčíkového zámku</i> .....	51
3.1.2	<i>Skleněné mikroelektrody</i> .....	51
3.2	EXPRESE REKOMBINANTNÍCH RECEPTORŮ.....	52
3.2.1	<i>Transfekce trvalých linií podjednotkami nAChR</i> .....	52
3.2.2	<i>Tkářové kultury</i> .....	52
3.2.3	<i>Optimalizace transfekce pomocí fluorescenčního měření</i> .....	53
3.3	PODMÍNKY POKUSŮ.....	53
3.4	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	53
3.5	ROZTOKY A CHEMIKÁLIE .....	55
4	Výsledky .....	56
4.1	AKTIVACE A INHIBICE EMBRYONÁLNÍCH A DOSPĚLÝCH SVALOVÝCH nAChR .....	56
4.1.1	<i>Aktivace svalových receptorů acetylcholinem</i> .....	56
4.1.2	<i>Desensitizace proudů aktivovaných acetylcholinem</i> .....	57
4.1.3	<i>Role záporně nabitých aminokyselin D<sup>180</sup> a E<sup>189</sup> F-smyčky <math>\delta</math>-podjednotky při aktivaci dospělého receptoru</i> .....	59
4.1.4	<i>Vliv aminokyselin <math>\delta</math>:D<sup>180</sup> a <math>\delta</math>:E<sup>189</sup> na inhibici dospělých svalových nAChR (+)-tubokurarinem</i> .....	60
4.1.5	<i>Stanovení oblasti kompetitivního působení (+)-Tc a jeho afinity na dospělém nAChR</i> .....	62
4.1.6	<i>Interakce (+)-tubokurarinu s embryonálním receptorem</i> .....	64
4.2	INTERAKCE INHIBITORŮ ACETYLCHOLINESTERÁZY SE SVALOVÝM nAChR .....	68
4.2.1	<i>Vliv physostigminu na funkci svalového embryonální nAChR</i> .....	68
4.2.1.1	<i>Physostigmin zmenšuje odpovědi vyvolané 10 <math>\mu</math>M ACh</i> .....	68
4.2.1.2	<i>Inhibice vyvolaná Phy má i napětově závislou složku</i> .....	71

4.2.1.3	Inhibiční a potenciační účinek physostigminu je závislý na koncentraci ACh .....	72
4.2.1.4	Phy zrychluje a prohlubuje desensitizaci ACh odpovědí.....	74
4.2.1.5	Phy zpomaluje resensitizaci embryonálních receptorů .....	77
4.2.2	<i>Vliv galanthaminu na funkci embryonálního receptoru</i> .....	78
4.2.2.1	Gal inhibuje odpovědi nAChR vyvolané ACh .....	78
4.2.2.2	Způsobuje galanthamin blokádu otevřeného kanálu?.....	78
4.2.2.3	Vliv galanthaminu na desensitizační kinetiku ACh odpovědí .....	80
4.2.2.4	Galanthamin zpomaluje resensitizaci embryonálních nAChR.....	82
5	Diskuse .....	83
5.1	AKTIVACE SVALOVÝCH NIKOTINICKÝCH ACETYLCHOLINOVÝCH RECEPTORŮ .....	83
5.1.1	<i>Popis aktivace a desensitizace rekombinantních svalových nAChR exprimovaných v linii COS-7</i> .....	83
5.1.2	<i>(+)-Tubokurarin patrně působí na dospělém nAChR kromě kompetitivní inhibice i prostřednictvím parciálního agonismu</i> .....	84
5.1.3	<i>Aktivace embryonálního a dospělého nAChR probíhá různými mechanismy</i> ....	86
5.1.4	<i><math>\delta:D^{180}</math> a <math>\delta:E^{189}</math> F-smyčky dospělého receptoru se účastní konformační změny vazebného místa a iniciace otevření iontového kanálu</i> .....	87
5.2	INTERAKCE INHIBITORŮ AChE s nAChR.....	89
5.2.1	<i>Physostigmin způsobuje blokádu otevřeného kanálu a alostericky zvyšuje afinitu otevřeného a desensitizovaného stavu vůči ACh</i> .....	89
5.2.2	<i>Galanthamin alostericky zvyšuje afinitu desensitizovaného stavu</i> .....	92
6	Shrnutí .....	95
7	Příloha .....	97
7.1	ODVOZENÍ VZTAHU PRO SCHILDOVU REGRESI .....	97
8	Vlastní publikace v impaktovaných časopisech .....	99
9	Literatura.....	100

**Název práce: Studium aktivace a modulace svalových nikotinických acetylcholinových receptorů pomocí bodových mutací**

*Autor:* Lucie Svobodová

*Katedra (ústav):* Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

*Vedoucí diplomové práce:* RNDr. Jan Krůšek, CSc., Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

*e-mail vedoucího:* [krusek@biomed.cas.cz](mailto:krusek@biomed.cas.cz)

**Abstrakt:**

Svalový nikotinický acetylcholinový receptor (nAChR) je považován za prototyp chemicky aktivovaných iontových kanálů. Endogenním agonistou nAChR je acetylcholin. Vazebná místa jsou tvořena šesti proteinovými smyčkami. Součástí tzv. F-smyčky  $\delta$ -podjednotky jsou záporně nabitě aminokyseliny Asp<sup>180</sup> a Glu<sup>189</sup>. Předmětem naší práce bylo studium mechanismu působení (+)-tubokurarinu ((+)-Tc) na nAChR a role  $\delta$ :Asp<sup>180</sup> a  $\delta$ :Glu<sup>189</sup> v mechanismu aktivace a inhibice nAChR.

Používali jsme techniku terčického zámku v konfiguraci měření z celé buňky. Roli konkrétních aminokyselin jsme zkoumali pomocí bodových mutací. nAChR byly za použití přechodné transfekce exprimovány v COS liniích.

Potvrdili jsme, že v případě dospělých a embryonálních nAChR působí (+)-Tc mechanismem kompetitivní inhibice. Aminokyseliny  $\delta$ :Asp<sup>180</sup> a  $\delta$ :Glu<sup>189</sup> se zřejmě účastní konformační změny vazebného místa, která předchází efektivnímu otevření kanálu.

Physostigmin (Phy) a galanthamin (Gal) jsou používány v lékařství pro jejich anticholinesterázový účinek. V poslední době se pozornost obrátila k přímé interakci inhibitorů acetylcholinesterázy s nAChR, proto jsme se zaměřili na studium přímého vlivu Phy a Gal na funkci embryonálního nAChR.

Phy působí mechanismem blokády otevřeného kanálu a alostericky zvyšuje afinitu otevřeného a desenzitizovaného stavu. Gal inhibuje nAChR cestou zvyšování afinity desenzitizovaného stavu.

*Klíčová slova:* svalový nikotinický acetylcholinový receptor, aktivace, F-smyčka, inhibitor acetylcholinesterázy, physostigmin, galanthamin

**Title: Study of activation and modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors using point mutations**

*Author:* Lucie Svobodová

*Department:* Institute of Physiology AS CR, v.v.i.

*Supervisor:* RNDr. Jan Krůšek, CSc., Institute of Physiology AS CR, v.v.i.

*Supervisor's e-mail address:* [krusek@biomed.cas.cz](mailto:krusek@biomed.cas.cz)

**Abstract:**

Muscle nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is prototypical ligand gated ion channel protein. Its endogenous agonist is acetylcholine (ACh). The binding sites are formed by six protein loops. F-loop of  $\delta$ -subunit includes negatively charged  $\delta$ :Asp<sup>180</sup> and  $\delta$ :Glu<sup>189</sup>.

The aim of our study was a determination of mechanism of interaction between (+)-tubocurarine ((+)-Tc) and nAChR and possible role of negatively charged  $\delta$ :Asp<sup>180</sup> and  $\delta$ :Glu<sup>189</sup> in activation and inhibition of nAChR.

We used the patch clamp technique in whole cell configuration. The role of particular aminoacids in activation was investigated using point mutations. nAChR was expressed in COS cells.

We sustained (+)-Tc acted via competitive inhibition on adult and embryonic nAChRs. We have also found  $\delta$ :Asp<sup>180</sup> and  $\delta$ :Glu<sup>189</sup> have been involved in conformation change of binding site after which channel opening succeeds.

Physostigmine (Phy) and galanthamine (Gal) are routinely used in treatment for their IACHE effect. Recently the direct interaction of inhibitors of acetylcholinesterase with nAChR has been studied. We targeted the direct interaction of Phy and Gal with embryonic nAChR.

Phy acts via open channel blockade and allosterically increases affinity of opened and desensitized state. Gal inhibits the nAChR function by increasing of desensitized state affinity.

*Keywords:* muscle nicotinic acetylcholine receptor, activation, F-loop, inhibitor of acetylcholinesterase, physostigmine, galanthamine

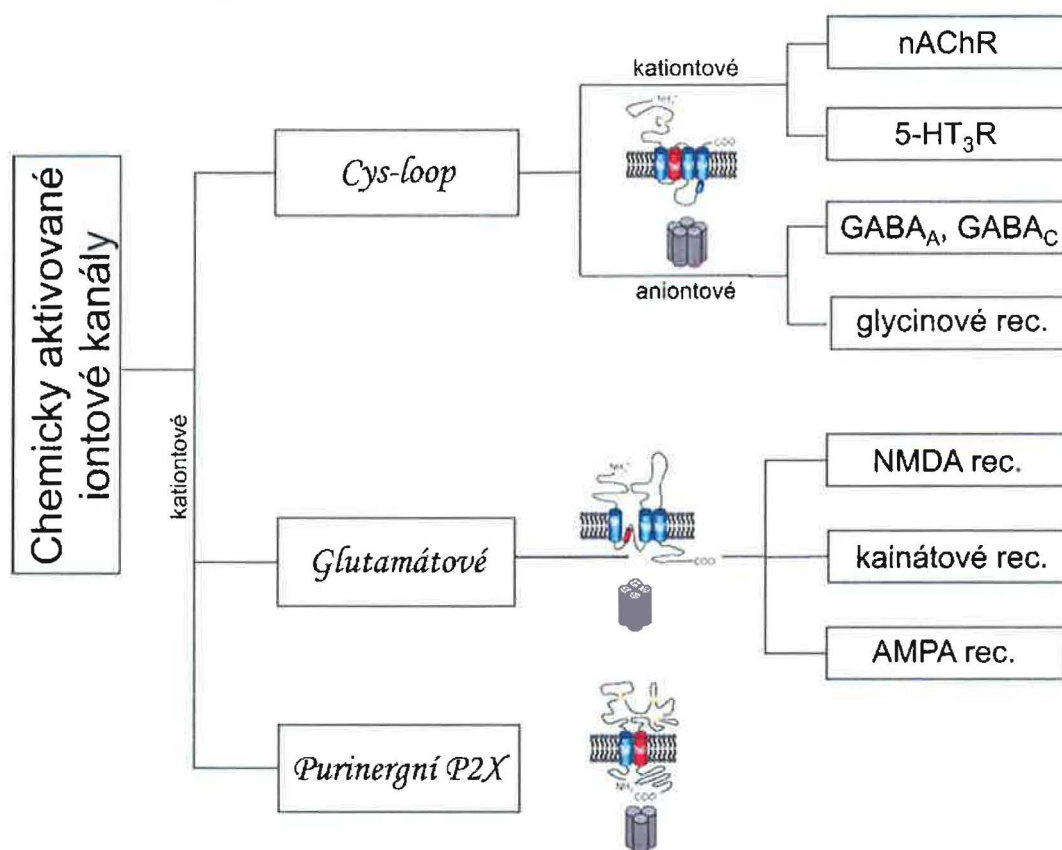
## Seznam zkratek

5-HT <sub>3</sub> R.....	serotoninový receptor, 3.typ
ACh.....	acetylcholin
AChBP.....	acetylcholin vázající protein (zkr. acetylcholine binding protein)
AChE.....	acetylcholinesteráza
AMPA.....	$\alpha$ -amino-2,3-dihydro-5-metyl-3-oxo-4-isoxazolpropanová kys.
APC.....	adenomatous polyposis coli protein
ATP.....	adenosintrifosfát
CNS.....	centrální nervová soustava
D.....	receptor v desensitizovaném stavu
D <sup>číslo</sup> .....	aspartát
DR.....	dose-ratio
E.....	účinnost otevírání iontového kanálu
E <sup>číslo</sup> .....	glutamát
EC <sub>50</sub> .....	koncentrace agonisty vyvolávající odpověď velikosti 50% maximální odpovědi
ECS.....	extracelulární roztok
GABA <sub>A</sub> R, GABA <sub>C</sub> R.....	receptory pro kys. $\gamma$ -aminomáselnou, typ A a C
Gal.....	galanthamin
H.....	Hillův koeficient
IACHE.....	inhibitor acetylcholinesterázy
IC <sub>50</sub> .....	koncentrace inhibitoru redukující odpověď na 1/2
ICS.....	intracelulární roztok
k <sub>D</sub> .....	disociační konstanta
MuSK.....	muscle-specific-kinase
MWC.....	schéma podle Monoda, Wymana a Changeuxho
nAChR.....	nikotinický acetylcholinový receptor (svalový podtyp)
N <sup>číslo</sup> .....	asparagin
NMDA.....	N-methyl d-aspartátová kys.
O.....	receptor v otevřeném stavu
Phy.....	physostigmin
Q <sup>číslo</sup> .....	glutamin
R.....	receptor v klidovém stavu
(+)-Tc.....	(+)-tubokurarin
W <sup>číslo</sup> .....	tryptofan
[ X ].....	molární koncentrace látky X
Y <sup>číslo</sup> .....	tyrosin
Y <sub>max</sub> .....	maximální relativní velikost odpovědi

# 1 Úvod

## 1.1 Chemicky aktivované iontové kanály

Chemicky aktivované iontové kanály jsou proteinové komplexy aktivované specifickými neurotransmitery. Vazba molekuly neurotransmiteru na receptivní část proteinu má za následek otevření centrálního póru (iontového kanálu) a tím aktivaci transmembránových elektrických proudů (nesených malými mono- a divalentními ionty). Struktura skupiny chemicky aktivovaných kanálů je zobrazena na obr. 1.



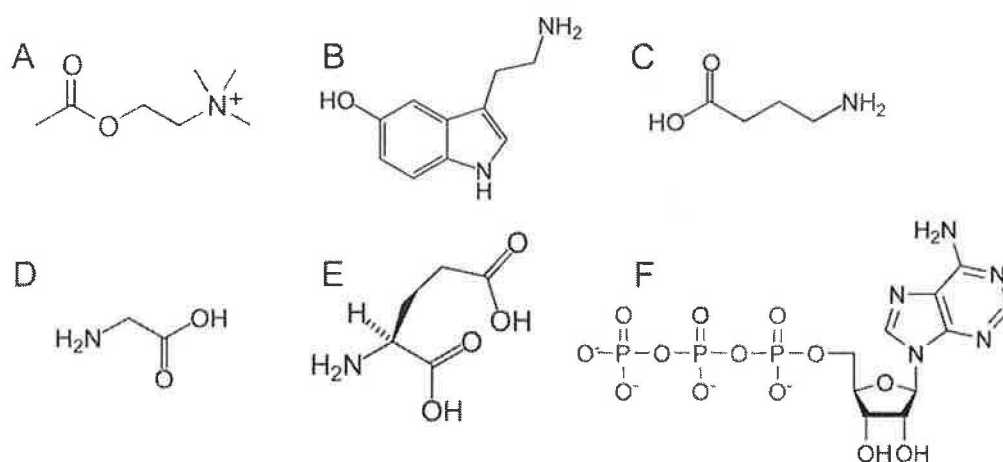
**Obrázek 1 - Schéma skupiny chemicky aktivovaných kanálů:** celá skupina se dělí na 3 rodiny receptorů (Cys-loop, glutamátem aktivované a purinergní P2X receptory). Skupina Cys-loop receptorů zahrnuje pentamerní receptory spojené jak s kationtově, tak aniontově selektivními iontovými kanály. Patří mezi ně nikotinické acetylcholinové receptory (nAChR) a serotoninové receptory (5-HT<sub>3</sub>R), k aniontovým kanálům řadíme receptory aktivované kys.  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA<sub>A</sub>R, GABA<sub>C</sub>R) a glycinové receptory. Receptory dalších dvou skupin (glutamátových a purinergních receptorů) jsou spojeny s kationtovými kanály. Tetramerní glutamátové receptory dělíme do tří podskupin: NMDA receptory (receptory pro N-methyl d-aspartátovou kys.), kainátové receptory a AMPA receptory (receptory pro  $\alpha$ -amino-2,3-dihydro-5-metyl-3-oxo-4-isoxazolpropanovou kys.). Trimerní purinergní P2X receptory jsou aktivované ATP. V obrázku jsou schematicky naznačeny proteiny receptorů s konkrétním vyobrazením podjednotky. Červeně zvýrazněné transmembránové průniky se podílejí na tvorbě iontového kanálu. Podle (G.L. Collingridge a kol., 2009).

Kromě kationtových purinergních P2X receptorů a glutamátových receptorů patří ke skupině ligandem aktivovaných iontových kanálů i tzv. Cys-loop receptory.

Cys-loop receptory, v literatuře též nazývané „acetylcholinovému receptoru podobné“, jsou poměrně neselektivní iontové kanály. Tato skupina zahrnuje jak kationtové, tak aniontové kanály. Mezi kationtové kanály patří nikotinické acetylcholinové receptory (nAChR) a serotoninové receptory (5-HT<sub>3</sub>R), mezi aniontové kanály pak receptory pro kys.  $\gamma$ -



aminomáselnou (GABA<sub>A</sub> a GABA<sub>C</sub>) a glycinové receptory. Zástupci této skupiny jsou sestaveni z pěti stejných nebo navzájem odlišných podjednotek. Jednotlivé podjednotky jsou tvořeny 450-700 aminokyselinami a jsou navzájem částečně homologní napříč celou Cys-loop skupinou (25-60% homologie). Mají i obdobnou distribuci hydrofilních a hydrofobních domén. Každá podjednotka má čtyři silně konzervované transmembránové průniky (M1-M4). Na tvorbě vnitřní stěny iontového kanálu se podílejí druhé transmembránové průniky (M2) všech podjednotek receptorového komplexu. Dále obsahuje každá z podjednotek kratší C-řetězec směřující do extracelulárního prostoru a velký N-koncový řetězec s ligand vázající doménou, množstvím modulačních míst a tzv. cysteinovou smyčkou (Cys-loop), která je společným znakem Cys-loop receptorů. Tato smyčka 13 až 15 poměrně konzervovaných aminokyselin vzniká pomocí disulfidického můstku mezi dvěma Cys rezidui.



**Obrázek 2 – Agonisté chemicky aktivovaných kanálů:** a) acetylcholin, b) serotonin, c) kys.  $\gamma$ -aminomáselná, d) glycin, e) kys. L-glutamová, f) adenosintrifosfát

## 1.2 Nikotinický acetylcholinový receptor

Nikotinické acetylcholinové receptory jsou membránové signální bílkoviny spojené s iontovým kanálem, umístěné jak postsynapticky (s funkcí detekce a přenosu signálu z nervového zakončení na cílovou tkáň; sval, neuron; v centrální -CNS- i periferní nervové soustavě), tak presynapticky (modulace výlevu neurotransmiterů v CNS i v periferní n.s.). Spadají do skupiny ionotropních Cys-loop receptorů. Jakožto ionotropní se tyto receptory účastní rychlého synaptického přenosu, mění chemický signál (acetylcholin - ACh uvolňovaný z nervových zakončení) na elektrický signál (změna propustnosti membrány pro malé mono- a divalentní kationty). Děj počínající vazbou ACh na receptor a vrcholící otevřením iontového kanálu se odehrává v submilisekundové časové škále. nAChR jsou specificky aktivované nikotinem - alkaloidem hojně obsaženým v tabáku.

Podle lokalizace se tyto receptory dělí na svalové a neuronální. Svalové receptory jsou exprimovány na postsynaptické membráně nervosvalové ploténky a neuronální receptory jsou umístěné pre- i postsynapticky na synapsích CNS i v periferní nervové soustavě. Tyto

dvě skupiny se od sebe liší v podjednotkovém složení a s tím spojenou kinetikou či farmakologií (*in vivo* je svalový typ nAChR blokován (+)-tubokurarinem již při nižších koncentracích než neuronální typy; neuronální  $\alpha 7$  receptor je specificky blokován kompetitivním antagonistou metyllykalkonitinem atd).

Kromě nervosvalového přenosu se nAChR účastní mnoha dějů v CNS, jako je např. paměť, pozornost, spánek, bolest, úzkost, sensorické funkce. Genetické abnormality nAChR se projevují jako patologické stavy typu kongenitálního myastenického syndromu, některých druhů epilepsie, schizofrenického syndromu atp. Nikotinické ACh receptory hrají svou roli i u závažných neuropatologií, jako jsou Parkinsonova či Alzheimerova choroba.

Ionotropní nikotinické receptory nejsou jedinými receptory citlivými k ACh. Existují ještě tzv. muskarinové receptory (mAChR) - metabotropní, tedy s G-proteinem spojené receptory. Muskarinové acetylcholinové receptory jsou specificky aktivované muskarinem, alkaloidem obsaženým např. v plodnicích muchomůrky červené (*Amanita muscaria*), a inhibovány atropinem, halucinogenním alkaloidem obsaženým např. v rulíku zlomocném (*Atropa belladonna*). Metabotropní receptory pracují na základě aktivace drah druhých posílů a jejich účinek na nervový přenos je pomalejší než u ionotropních receptorů.

### 1.2.1 Podjednotkové složení nAChR

Podjednotky nikotinického acetylcholinového receptoru jsou glykoproteinové řetězce tvořené přibližně 440-500 aminokyselinami, uspořádané po pěti do kruhu tvoří iontový kanál. Z hlediska primární sekvence i funkce se tyto podjednotky dělí na  $\alpha$ -podjednotky a non- $\alpha$ -podjednotky.

Nyní známe celkem deset podtypů  $\alpha$ -podjednotky ( $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ). Velikost  $\alpha$ -řetězců se pohybuje kolem 440 aminokyselin, tj. 290 kDa ( $\alpha 1$  podjednotka nAChR el. orgánu parejnoka *Torpedo marmorata* má 437 aminokyselin). Jsou tak nejkratšími podjednotkami z rodiny nAChR. Avšak od non- $\alpha$  podjednotek se liší hlavně přítomností dvou charakteristických, po sobě následujících cysteinů velké synaptické N-koncové smyčky, které odpovídají  $\alpha 1:C^{192}$  a  $\alpha 1:C^{193}$  elektrického orgánu parejnoka *T. marmorata* (C. Czajkowski a A. Karlin, 1995). V primární struktuře je tato dvojice cysteinů již blízko prvnímu transmembránovému průniku a spolu s dalšími aminokyselinami N-koncové smyčky se účastní vazby acetylcholinu, resp. jsou pro ni určující (H.R. Arias, 1997). V přírodě pozorujeme receptory pouze se dvěma a více  $\alpha$  podjednotkami. U svalových receptorů, popř. u receptorů elektrických orgánů, můžeme najít podjednotky  $\alpha 1$ , neuronálním receptorům náležejí ostatní  $\alpha$ -podjednotky ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ).



Do skupiny non- $\alpha$ -podjednotek patří  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\varepsilon$ -podjednotky svalových receptorů a nAChR elektrických orgánů a  $\beta$ -podjednotky ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ) neuronálních receptorů. Tyto podjednotky jsou obecně delší a postrádají cysteinový pár zásadní pro vazbu ACh.

Svalové receptory jsou tvořeny dvěma  $\alpha 1$  podjednotkami a třemi non- $\alpha$ -podjednotkami ( $\beta 1$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  resp.  $\varepsilon$ ). Označení podjednotek (pořadí v řecké abecedě) je dáno jejich velikostí, tj.  $\alpha$  podjednotky jsou nejkratší,  $\varepsilon$  podjednotka je nejdelší (podjednotky receptoru el. orgánu parejnoka *T. marmorata* čítají  $\beta 1$ :469,  $\gamma$ :489, resp.  $\delta$ :501 aminokyselin).  $\alpha 1$  podjednotky jsou pro vazbu ACh zásadní, avšak podjednotky  $\delta$ ,  $\gamma$  resp.  $\varepsilon$  se rovněž podílejí na tvorbě ACh vazebného místa, které leží vždy na rozhraní  $\alpha 1$  s těmito podjednotkami.  $\beta 1$ -podjednotka je sice pro tvorbu svalových receptorů důležitá, avšak na vazbě ACh se nepodílí.

U později objevených neuronálních receptorů bylo zavedeno značení pomocí  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ) a  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ) podjednotek. Přehled známých podjednotek a stechiometrie - viz (N.S. Millar, 2003). Neuronální receptory se mohou vyskytovat ve formě homomeru  $\alpha$  podjednotek, např.  $\alpha 7$  či  $\alpha 8$  receptory v kuřecí sítnici (K.T. Keyser a kol., 1993),  $\alpha 9$  v kochleárních vláskových buňkách (A.B. Elgoyhen a kol., 1994), popř.  $\alpha 10$ ; tyto homomery patří k vývojově nejstarším formám nAChRu. Nacházejí se také ve formě heteromerů složených z různých kombinací  $\alpha$  podjednotek ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ) s  $\beta$  podjednotkami ( $\beta 2$ ,  $\beta 4$ ) s nebo bez přispění podjednotek  $\alpha 5$  či  $\beta 3$ . Podjednotky  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$  se nepodílejí na vazbě ACh (P.J. Corringer a kol., 2000). Základním stechiometrickým kriteriem je přítomnost minimálně dvou  $\alpha$  podjednotek první skupiny. Podjednotky  $\alpha 7+\alpha 8$  a  $\alpha 9+\alpha 10$  mohou spolu tvořit také heteromery. Výsledkem těchto kombinací je množství receptorů navzájem se lišících svou farmakologií, kinetikou a  $\text{Ca}^{2+}$  propustností, což přímo souvisí s fyziologickým uplatněním a lokalizací v nervové soustavě.

Molekulárně biologické studie potvrdily, že receptory obsažené v hojném množství v elektrických orgánech parejnoků (*Torpedo marmorata*, *T. californica*), elektrických úhořů (*Electrophorus electricus*) a jiných elektrických ryb jsou geneticky i farmakologicky vysoce podobné embryonálnímu svalovému nAChR. Velká homologie podjednotek embryonálního svalového receptoru a receptoru z elektrického orgánu má svůj původ ve fylogenezi. Elektrické orgány těchto paryb (resp. ryb) totiž vznikly transformací svalových buněk a jejich uspořádáním do podoby Voltova sloupce (baterie).

### 1.2.2 Iontová selektivita nAChR

nAChR jsou kationtové nepříliš selektivní iontové kanály. Při aktivaci jsou schopné vést různé typy mono- i divalentních kationtů. Za fyziologických podmínek propouští kationty sodné a vápenaté z extracelulárního prostoru dovnitř buňky a draselné ionty směrem

opačným. Hnací silou pohybu iontů je jako u všech iontových kanálů vyrovnávání gradientů elektrochemických potenciálů jednotlivých iontů vně a uvnitř buňky. Skladba takto vzniklých transmembránových proudů je dána selektivitou, která je jednou z charakteristik daného typu iontových kanálů. Většina kanálů obsahuje tzv. selektivní filtr - intracelulární část M2 průniku a jeho blízkého okolí - jehož aminokyselinové složení rozhoduje o nábojové specifitě transmembránových proudů. Podtypy nAChR se liší zejména v propustnosti pro vápenaté ionty, což se odráží i v konkrétní fyziologické roli těchto receptorů.

### 1.2.3 Podjednotkové složení svalového nAChR

Známe dva typy svalových nACh receptorů:

1. embryonální receptor – s podjednotkovým složením  $\alpha_2\beta\gamma\delta$  je difuzně rozšířen na buněčné membráně vyvíjejícího se svalu. Po inervaci a vzniku synapse se embryonální receptory vytrácejí a jsou nahrazeny dospělými receptory:
2. dospělý receptor – jeho podjednotkové složení je  $\alpha_2\beta\delta\varepsilon$ , tj. od embryonálního receptoru se odlišuje záměnou  $\gamma$  podjednotky za  $\varepsilon$  podjednotku. Vyskytuje se výhradně na postsynaptické membráně.

Exprese jednotlivých typů svalového nAChR výrazně závisí na ontogenetickém stadiu jedince. V raných obdobích vývoje se exprimují výhradně embryonální receptory. Objevují se difuzně rozmístěné po povrchu buněk ještě před zfúzováním myoblastů do myotubů. Po vytvoření myotubů zůstává difuzní lokace až do momentu přiblížení nervového zakončení. Molekuly ACh uvolňované neurony aktivují receptory blízké svalové buňky a tato lokální aktivace transmembránových proudů má za následek shlukování stále ještě embryonálních receptorů a pozdější nastartování celé mašinerie vedoucí k tvorbě vlastní synapse. Na tvořící se synapsi se již objevují dospělé receptory (pouze v oblasti synapse), zatímco exprese embryonálních receptorů je pozastavena (J.R. Sanes a J.W. Lichtman, 1999).

K opětovné expresi embryonálních receptorů dochází pouze v případě denervace svalu. V takové situaci začínají být embryonální receptory exprimovány opět difuzně po celé délce svalového vlákna a dospělé receptory mizí.

Ačkoli jsou obecně podjednotky nAChR receptorů poměrně homologní, má, jak je vidět, záměna  $\gamma$  podjednotky za  $\varepsilon$  velký fyziologický význam. Rozdíl v podjednotkovém složení stojí za poměrně odlišnou kinetikou a vodivostí receptorových kanálů, s čímž souvisí jejich odlišná úloha při tvorbě synapse a výsledná účinnost synapse. Embryonální svalové receptory exprimované v oocytech drápatky vodní (*Xenopus laevis*) vykazují vodivost kanálu pouze 45 pS, ale střední doba otevření kanálu se pohybuje kolem 7 ms. Dospělé svalové receptory mají vyšší vodivost kanálu (60 pS), avšak doba otevření je méně než poloviční ve srovnání s embryonálními receptory (Y. Kidokoro, 1993). Přiblížení nervového zakončení má v daném místě za následek tvorbu synapse, a to tím způsobem, že aktivace transmembránových

proudů na svalové buňce prostřednictvím embryonálních acetylcholinových receptorů v místě kontaktu lokálně zvyšuje koncentraci vápenatých iontů, což je považováno za signál ukončující expresi embryonálních receptorů a zvyšující expresi dospělých receptorů. Rozdílná exprese dospělých a embryonálních nAChR má význam pro správnou tvorbu synapse. Ukázaly to pokusy na transgenních myších, u kterých byly embryonální receptory zaměněny za dospělé již v embryonálním období (M. Koenen a kol., 2005). Výsledkem nebyly změny ve vývoji svalové buňky (fúze myoblastů, tvorba svalu, tvorba ploténky), ale četnost vzniklých synapsí. Záměna embryonálního receptoru za dospělé vedla ke zvýšení počtu shluků postsynaptických receptorů (a obecně plotének) a jejich distribuci do větší oblasti než u kontrolních zvířat. Příčina zřejmě tkví právě v jiných vlastnostech transmembránových proudů (vodivost, kinetika) vedených těmito dvěma typy receptorů při tvorbě synapse (V. Witzemann, 2006).

### 1.3 Molekulární struktura svalového nACh receptoru

Při studiu molekulární struktury receptoru se kromě cross-linking analýzy (G. Biesecker, 1973) a imunochemických metod (J. Lindstrom a kol., 1979) později začaly využívat metody jako krystalografie zkoumající krystal extracelulární části nAChR prostřednictvím acetylcholin vázajícího proteinu - AChBP (T.K. Sixma a A.B. Smit, 2003), dále pak nukleární magnetické rezonance (NMR) a elektronové mikroskopie. Výsledky byly publikovány např. v pracích (A. Miyazawa a kol., 2003, N. Unwin, 1998, 2005, N. Unwin a kol., 1988).

Z pohledu ze synaptického prostoru kolmo k rovině membrány se receptory jeví jako růžice pěti podjednotek, v jejímž středu leží iontový kanál. Podjednotky embryonálního svalového receptoru jsou uspořádány v pořadí  $\delta\alpha1\gamma\alpha1\beta1$ , a to ve směru chodu hodinových ručiček. Ve starších pracích bylo pořadí podjednotek často zaměňováno. Zde uvedený údaj je převzat z monografie (J.P. Changeux a S.J. Edelstein, 2005).

Celková délka proteinu ve směru kolmém na rovinu membrány je cca 110 Å, z toho 55-60 Å zasahuje do extracelulárního prostoru, 30-40 Å připadá na membránovou oblast a přibližně 15 Å je v buněčném prostoru. Ústí póru má šířku okolo 30 Å a vnější průměr receptoru se odhaduje na 70-80 Å. Acetylcholinové vazebné místo se nachází extracelulárně, v kolmé vzdálenosti 30-35 Å od povrchu membrány (přehled viz (H.R. Arias, 2000); schéma receptoru - obr. 3).

Podjednotky mají díky homologii velmi podobné uspořádání, a to i v rámci skupiny Cys-loop receptorů (obr. 1). Každá podjednotka je směrem od N-konce řetězce k jeho C-konci tvořena velkou N-koncovou extracelulární doménou, třemi hydrofobními transmembránovými průniky (M1-M3), větší cytoplazmatickou smyčkou spojující průniky M3 a M4, dále následuje čtvrtý transmembránový průnik a krátký extracelulární C-konec.

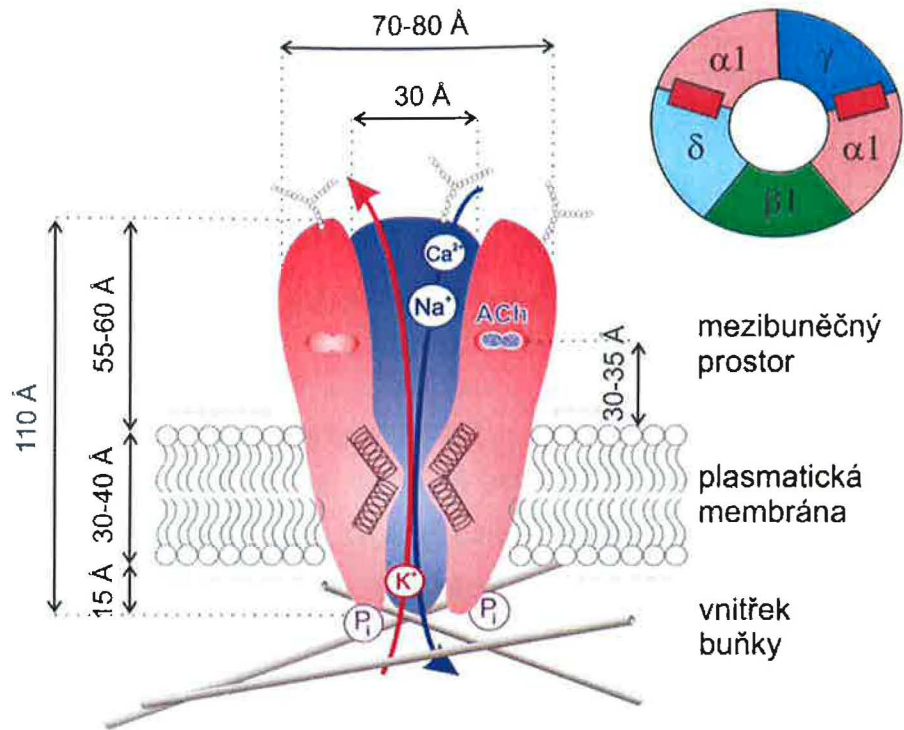
N-koncová doména je tvořena řetězcem s převahou hydrofilních (nabitých) aminokyselin, který dosahuje délky 210-224 aminokyselin. Jeho součástí je Cys-smyčka charakteristická pro Cys-receptory (C<sup>128</sup> - C<sup>142</sup> u  $\alpha 1$  *T. marmorata*). Nejdůležitější funkcí N-domény je vazba ACh molekuly do vazebné kapsy tvořené z jedné strany  $\alpha$  podjednotkou (hlavní část vazebného místa) a z druhé strany sousední podjednotkou ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Vazebná energie se poté uplatňuje při destabilizaci zavřené konformace a transformuje se na rotační pohyb podjednotek (s osou rotace kolmou na plochu membrány) vedoucí k otevření iontového kanálu. Vazby se účastní dříve zmíněná dvojice sousedících cysteinů ( $\alpha 1$ :C<sup>192</sup> a  $\alpha 1$ :C<sup>193</sup> *T. marmorata*) v hlavní části vazebného místa a cca 15 dalších převážně aromatických (hlavní část) či negativně nabitých (komplementární část) aminokyselin. Na N-koncovém řetězci je rovněž množství regulačních míst, jež jsou glykosilovány.

Hydrofobní membránová část podjednotek je tvořena čtyřmi transmembránovými průniky M1-M4. Každý z průníků je složen z 19-27 převážně nenabitých aminokyselin. Vodou vyplněný pór iontového kanálu ohraničují M2 transmembránové průniky každé z podjednotek (A. Miyazawa a kol., 2003) a uvažuje se o přispění části extracelulárního konce M1 transmembránových průníků (M.H. Akabas a A. Karlin, 1995). Původně se mělo za to, že všechny M1-M4 průniky nabývají téměř výlučně  $\alpha$ -helikální konformace, avšak v posledním desetiletí se ukazuje, že minimálně 50 % této oblasti je tvořeno  $\beta$ -listy a snad právě jen u M2 průníků  $\alpha$ -řetězcová konformace převažuje. Avšak informace z různých zdrojů se stále ještě výrazně liší.

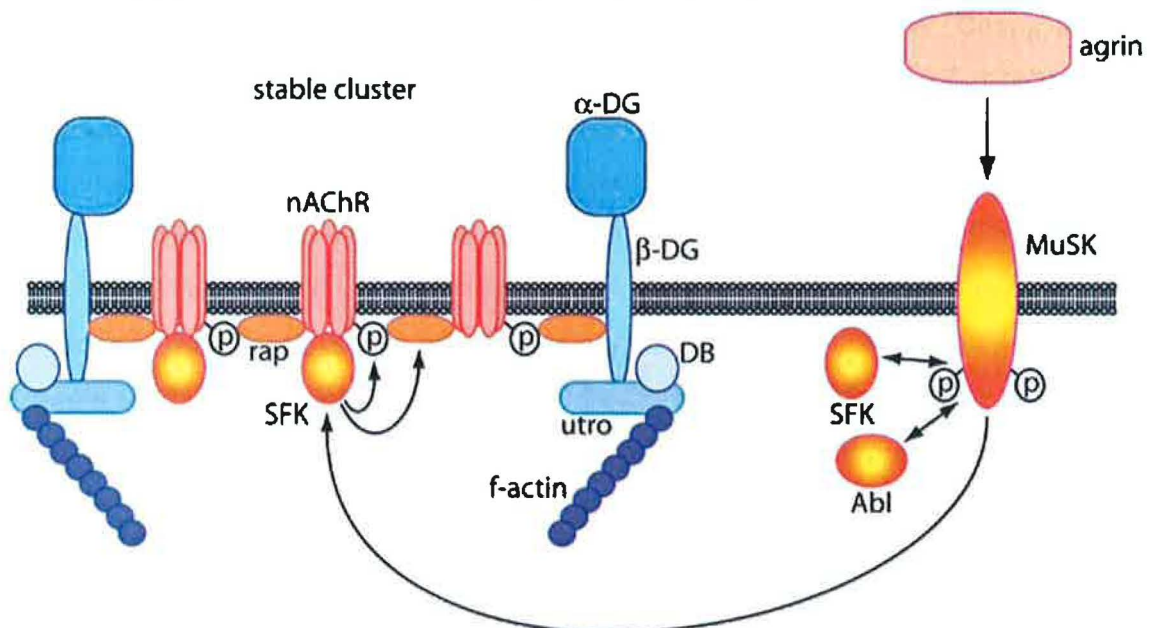
Transmembránová doména podjednotek nAChR je obecně vysoce homologní a stěny iontového kanálu jsou tak tvořeny poschodovitě posazenými kruhy shodných aminokyselin (každá aminokyselina kruhu náleží jedné z podjednotek). Uvnitř vodou naplněného póru můžeme najít serinový, threoninový, valinový či leucinový kruh. Dva posledně jmenované kruhy patrně tvoří vrátka iontového kanálu, neboť  $\alpha$ -šroubovice M2 průníků jsou zalomeny tak, že se právě v této oblasti téměř dotýkají (ale ne úplně, průměr póru je zde 7 Å) konzervovanými leucinovými ( $\alpha 1$ :L<sup>251</sup>) a valinovými ( $\alpha 1$ :V<sup>255</sup>) residui, čímž stericky brání průchodu kationtů. Další silou bránící iontům v průchodu je elektrostatická interakce s nabitými residui v nejužší oblasti póru. Cytoplasmatická část M2 průníků a intracelulární vstupní oblast póru jsou zřejmě zodpovědné za nábojovou selektivitu iontového kanálu. U nAChR receptorů je zde obsaženo množství glutamátů (záporně nabitých aminokyselin, které přitahují kationty) a u glycinových receptorů jsou pozorovány bazické lysiny.

Mezi třetím a čtvrtým transmembránovým průnikem (M3, M4) je z regulačních důvodů velice důležitá cytoplasmatická klička délky 109-146 aminokyselin. Je zde mnoho regulačních míst vázajících fosfátové skupiny. Mutace v této oblasti ovlivňují jak desensitizaci, tak lokalizaci (konkrétně clustering – shlukování) receptoru na postsynaptické membráně (L.S. Borges a kol., 2008).





**Obrázek 3 - Schéma embryonálního svalového nAChR:** Rozměry transmembránového glykoproteinu a lokalizace acetylcholinového vazebného místa jsou naznačeny na obrázku (ACh) a schematicky na vloženém obrázku (obdélníky). Receptor je kromě membrány, již prochází, v interakci s mikrotubuly cytoskeletu, které ho částečně stabilizují na místě. Při aktivaci a typicky negativním membránovém potenciálu propouští kationtově selektivní kanál sodné a vápenaté kationty z extracelulárního prostoru dovnitř buňky a draselné z vnitřku buňky ven na základě vyrovnávání gradientů elektrochemických potenciálů jednotlivých iontů. Na povrchu proteinu je lokalizováno mnoho regulačních míst vázajících např. fosfátové skupiny.



**Obrázek 4 – Schéma postsynaptického seskupování a ukotvení svalových nAChR:** Svalové receptory jsou v synaptické oblasti spřaženy prostřednictvím molekul rapsynu (rap). Interakce rapsynů s nAChR je podmíněna fosforylací velké intracelulární smyčky  $\beta$ -podjednotky receptoru tyrozinkinázami. Tyrozinkinázy MuSK a Abl (viz text), popř. SFK jsou aktivovány agrinem vylučovaným presynaptickým nervovým zakončením, čímž je zaručeno seskupování receptorů v synaptické oblasti. K ukotvení receptoru k buněčnému cytoskeletu dochází rovněž pomocí rapsynu navázaného na komplex dystroglykanu (DG), dystrobrevinu (DB), utrophinu (utro) a f-aktinového vlákna (f-actin). Převzato z (A. Wiesner a C. Fuhrer, 2006).

C-koncová doména se nachází v extracelulárním prostoru (synaptická oblast), je poměrně krátká a funkčně nepříliš významná.

### 1.3.1 Shlukování nAChR, jeho vazba na cytoskelet a interakce s jinými buněčnými proteiny

Receptor je kromě membrány, kterou prochází, v interakci s dalšími buněčnými proteiny a s mikrotubuly cytoskeletu, které ho částečně stabilizují na místě. Zejména u svalových receptorů a receptoru elektrického orgánu parejnoka *Torpedo* byla potvrzena interakce s rapsyny (receptor associated protein of synapse, neboli 43K-protein – podle jeho hmotnosti 43 kDa). Prostřednictvím těchto proteinů dochází k shlukování (angl. coupling, obecněji clustering) receptorů v oblasti synapse (S.C. Froehner a kol., 1990, W.D. Phillips a kol., 1991) a jejich ukotvení k cytoskeletu (M. Colledge a S.C. Froehner, 1998, N.S. Millar a P.C. Harkness, 2008, J.R. Sanes a J.W. Lichtman, 1999). Dimerní forma nAChR tak převažuje v oblastech na receptory hojných postsynaptických membrán. Interakce rapsynu s acetylcholinovými receptory se uskutečňuje prostřednictvím velké M3-M4 intracelulární smyčky  $\beta$  podjednotek nAChR (K.A. Huebsch a M.M. Maimone, 2003). Ve starší literatuře najdeme tvrzení, že dimerní forma se tvoří pomocí disulfidického můstku mezi  $\delta$  podjednotkami sousedících proteinů (S.L. Hamilton a kol., 1977, H.W. Chang a E. Bock, 1977), avšak od toho se nyní upouští. Interakce svalových nAChR s rapsyny je ve skutečnosti výsledkem signální dráhy agrin-MuSK-rapsyn-nAChR.

Agrin vylučovaný nervovým zakončením aktivuje kinázu MuSK (podle angl. muscle-specific-kinase) v postsynaptické membráně, která prostřednictvím dalších kináz (tzv. Abl kinázy – Abelsonovy tyrozinkinázy 1 a 2) fosforyluje tyrozinová rezidua intracelulárních smyček  $\beta$  a  $\delta$  podjednotek. Podmínkou clusteringu (a ukotvení) je fosforylace  $\beta$  podjednotky (L.S. Borges a M. Ferns, 2001), neboť interakce rapsynu s nAChR se uskutečňuje jedině prostřednictvím fosforylovaných oblastí intracelulární smyčky  $\beta$  podjednotky. K fosforylaci nAChR může docházet i pomocí agrinem aktivovaných kináz z rodiny Src (SFK), avšak jiným mechanismem než u Abl kináz.

Rapsyny nezprostředkovávají pouze vazbu receptorů mezi sebou, ale i ukotvení k cytoskeletu. Na účinné stabilizaci nAChR a jeho vazbě k f-aktinovým vláknům se tak podílejí kromě rapsynu i molekuly dystroglykanu, dystrobrevinu a utrophinu (obr. 4).

Přítomnost rapsynu v mechanismu shlukování a ukotvení byla prokázána i v případech, kdy byly svalové nAChR exprimovány v nesvalových buňkách (K.A. Huebsch a M.M. Maimone, 2003). Rapsyny obsahují také neuronální buňky (G. Feng a kol., 1998, S.H. Yang a kol., 1997), avšak nebyla prokázána jejich role v ukotvování neuronálních nAChR.

Pro ukotvení a shlukování neuronálních receptorů pravděpodobně existují obdobné proteiny jako u svalových nAChR. Jak pro svalové, tak pro neuronální typy nAChR byl prokázán podíl APC (adenomatous polyposis coli) proteinu na synaptické lokalizaci receptorů. V případě heteromerních neuronálních receptorů byl přímo popsán celý komplex kotevních proteinů (f-aktin – EB1 – APC – 14-3-3 –  $\alpha$ 3 podjednotka nAChR; (M.M. Rosenberg a kol., 2008)). I zde se vazba 14-3-3 chaperonového proteinu na nAChR uskutečňuje pouze po fosforylaci (serinových reziduí) vazebného místa pomocí fosfokináz PKA či PKC (R. Exley a kol., 2006, E.M. Jeanclous a kol., 2001, V.V. Pollock a kol., 2007). Funkční expresi ovlivňuje dále např. chaperonový periferní membránový protein VILIP-1 (L. Lin a kol., 2002).

Dalším proteinem, u něhož byl prokázán vliv na expresi funkčních receptorů na postsynaptické membráně, a který ovlivňuje maturaci – dozrávání – receptoru, je membránový RIC-3 háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*), který je však silně konzervován napříč skupinou obratlovců i části bezobratlých. Koexprese RIC-3 *C. elegans*, popř. jeho savčího homologu, s rekombinantními receptory se využívá např. při expresi savčích neuronálních nAChR (homomerních  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 8) v savčích buněčných liniích (S.J. Lansdell a kol., 2005). Užití u jiných podtypů nAChR nebo při expresi v jiných než savčích systémech zůstává diskutabilní. Role RIC-3 však zřejmě nespočívá přímo v ukotvování receptorů u buněčné membrány, ale v posttranslačních modifikacích v oblasti endoplasmatického retikula. Jedná se o membránový protein často kolokalizovaný s nAChR, který však nebyl pozorován na povrchu buňky (N.S. Millar, 2008). Tyto posttranslační modifikace nemají valný vliv na rozsah povrchové exprese, ale na správné a funkční prostorové uspořádání receptoru, tzv. folding (M.E. Williams a kol., 2005).

Dá se očekávat, že v případě rekombinantních systémů, např. buněčných linií transfekovaných cizími nACh receptory, může být exprese, lokalizace, struktura i funkce těchto receptorů odlišná od nativního stavu, mimo jiné právě z důvodu jiného proteinového vybavení a chemické skladby membrán modelových systémů.

Bylo zjištěno, že pro správnou funkci a strukturální uspořádání nAChRu je nezbytná přítomnost určitého procenta cholesterolu a záporně nabitých lipidů v okolní membráně (T.M. Fong a M.G. McNamee, 1987).

### 1.3.2 N-koncová doména a vazebné místo pro ACh

N-koncová extracelulární část podjednotek je tvořena několika doménami různé sekundární struktury, a sice N-koncovým helixem, dvěma krátkými  $\alpha$ -helixy a převážnou většinu řetězce tvoří stočený  $\beta$ -sendvič (vnitřní a vnější řetězce  $\beta$ 1- $\beta$ 10), kde je mezi  $\beta$ 6' a  $\beta$ 7-řetězci napříč skupinou konzervovaná hydrofobní Cys-smyčka. Tato smyčka je zásadní pro stabilizaci terciární struktury (P. Blount a J.P. Merlie, 1990).

Acetylcholinové vazebné místo se nalézá na rozhraní tzv. hlavní ( $\alpha$ ) podjednotky a komplementárních podjednotek (u svalových receptorů to jsou podjednotky  $\delta$ ,  $\gamma$ , resp.  $\epsilon$ ). Toto vazebné místo je tvořeno jakousi hydrofobní kapsou o průměru cca 10-12 Å (N. Le Novère a kol., 2002), do které však stejně jako u jiných Cys-loop receptorů (T.W. Mu a kol., 2003) zapadá ACh a další agonisté spíše ve smyslu klínu než jako klíč do zámku (podoba vazebné kapsy je poměrně stálá u všech Cys-loop receptorů). Rozhraní na straně  $\alpha$ -podjednotky je tvořeno hlavně smyčkami, zatímco komplementární strana je tvořena spíše složitějšími  $\beta$ -strukturami s poměrně variabilním obsazením aminokyselin. Díky mírné variabilitě primární struktury podjednotek (a tedy částečně i odlišné architektuře) komplementárních stran vazebných míst mají tato vazebná místa pro ACh různé afinity. Vysokoafinní vazebné místo  $\alpha/\delta$  váže agonistu karchol cca 1000-krát silněji než nízkoafinní místo  $\alpha/\gamma$ , přičemž pořadí afinit pro kompetitivního antagonistu (+)-tubokurarin ((+)-Tc) je opačné (P. Blount a J.P. Merlie, 1989).

Vlastní vazebná místa jsou charakteristická vysokým obsahem konzervovaných aromatických aminokyselin (hlavně tryptofan a tyrozin v hlavní části vazebného místa, viz tab. 1) a několika záporně nabitými aminokyselinami (kys. asparagová a kys. glutamová v komplementární oblasti). Hlavní část vazebného místa je tvořena 3 smyčkami (A, B, C) stejně jako komplementární část (D, E, F). Tab. 1 uvádí aminokyseliny, u nichž byl prokázán podíl na vazbě ACh molekuly (číslování odpovídá receptoru z elektrického orgánu parejnoka *Torpedo californica*).

Pojem smyčka není u těchto oblastí vždy úplně přesný, neboť některé aminokyseliny vázající ACh se nacházejí na jiných sekundárních strukturách. Např. W<sup>55</sup> a E<sup>57</sup> z D-smyčky jsou ve skutečnosti částí  $\beta_2$  řetězce a Y<sup>117</sup> je částí  $\beta_6$  řetězce  $\beta$ -sendviče (N. Unwin, 2005) či sama C-smyčka je ve skutečnosti stočena do  $\beta$ -vlásky (T. Grutter a J.P. Changeux, 2001) a díky rigidnosti slouží při vazbě ACh jako vstupní závora uzamykající obsazené vazebné místo.

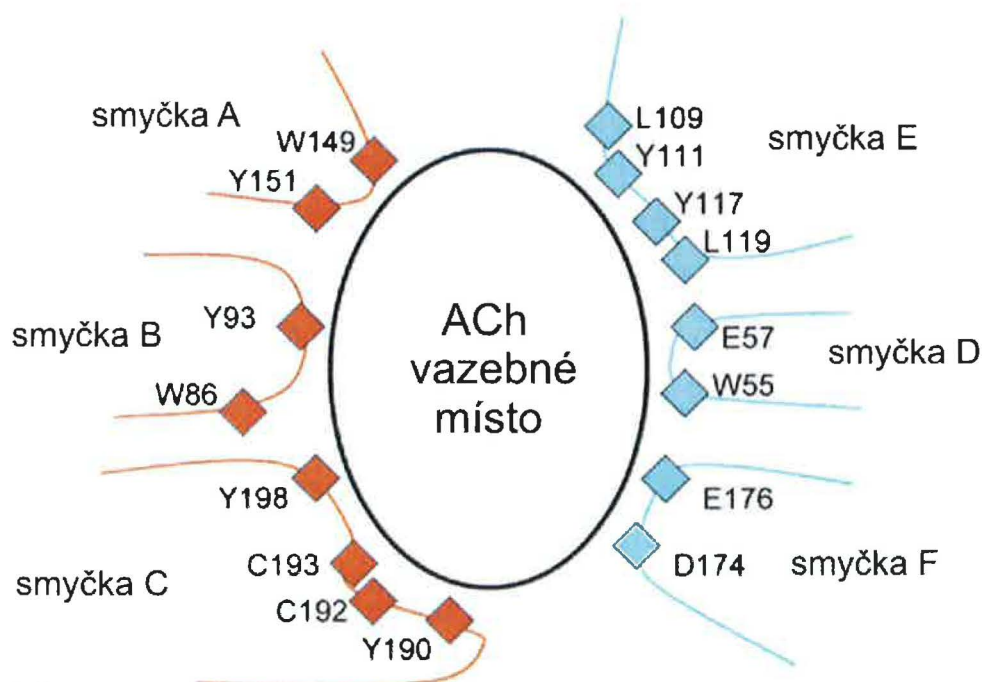
Elektronovou mikroskopií byly v extracelulární doméně rozpoznány tunely vedoucí z ACh-vazebné kapsy do vodou naplněného ústí iontového kanálu (A. Miyazawa a kol., 1999). Jsou ohraničeny stočenými  $\beta$ -řetězci a předpokládá se, že to jsou hlavní přístupové cesty ACh do vazebného místa. Tyto úzké tunely dlouhé 10-15 Å jsou funkčními analogiemi vazebného místa acetylcholinesterázy, u níž pozorujeme 20 Å dlouhou štěrbinu, na jejímž dně leží aktivní místo, tj. místo, na něž se váže a v němž je hydrolyzován ACh.

Strukturální studie jsou podstatně omezeny faktem, že nAChR je membránový protein, a tudíž je velice složité získat krystalografický snímek jeho nativní struktury jako celku. Z hlediska struktury vazebného místa a vůbec celé extracelulární domény synaptické části proteinu tak měla největší přínos krystalografická studie AChBP (T.K. Sixma a A.B. Smit, 2003). AChBP je malý pentamerní protein vylučovaný gliemi sladkovodního plže plovatky bahenní *Lymnaea stagnalis* na cholinergních synapsích. Přínosem pro výzkum nAChR je



Hlavní část vazebného místa ( $\alpha$ -podjednotka)		Komplementární část vazeb. místa ( $\gamma$ -podjednotka)	
A-smyčka	W <sup>86</sup> (Changeux and Taly 2008) Y <sup>93</sup> (Galzi, Revah et al 1990)	D-smyčka	W <sup>55</sup> , E <sup>57</sup> (Chiara and Cohen 1997)
B-smyčka	W <sup>149</sup> (Dennis, Giraudat et al. 1988) Y <sup>151</sup> (Changeux and Taly 2008)	E-smyčka	L <sup>109</sup> , Y <sup>111</sup> , Y <sup>117</sup> , L <sup>119</sup> (Wang, Chiara et al. 2000) (Chiara and Cohen 1997) (Chiara, Xie et al. 1999) (Sine 1997)
C-smyčka	Y <sup>190</sup> , C <sup>192</sup> , C <sup>193</sup> , Y <sup>198</sup> (Dennis, Giraudat et al. 1988) (Kao, Dwork et al. 1984) (Abramson, Li et al.1989)		

**Tabulka 1 - Aminokyseliny účastníci se vazby ACh molekuly u nAChR elektrického orgánu *T. californica*:** Hlavní část vazebného místa se skládá ze smyček A, B a C. Vazby ACh se v těchto smyčkách účastní zejména aromatické aminokyseliny tryptofan a tyrozin. Pro  $\alpha$  podjednotku (hlavní část vazeb. místa) je charakteristická přítomnost sousedících cysteinů (C<sup>192</sup>, C<sup>193</sup>), které mají zásadní význam pro vazbu ACh. Komplementární část vazebného místa je tvořena smyčkami D, E a F. Zejména pro smyčky D a F je příznačná přítomnost záporně nabitých aminokyselin kys. asparagové a kys. glutamové.



**Obrázek 5-Schéma vazebného místa pro ACh:** vazebná kapsa pro ACh je ohraničena šesti proteinovými smyčkami - smyčky A, B, C tvoří hlavní část vazebného místa ( $\alpha$ -podjednotka), smyčky D,E,F tvoří komplementární stranu (u svalového receptoru  $\delta$ ,  $\gamma$ , resp.  $\epsilon$ ). Na obrázku jsou zvýrazněny aminokyseliny u nichž se předpokládá přímá interakce s ACh molekulou, popř. jiná důležitá role v mechanismu otevírání. Iontový kanál je v tomto zobrazení u horní strany obrázku, tj. u smyček A a E. Převzato z (J.P. Changeux a A. Taly, 2008).

jeho homologie (okolo 21%) s podjednotkami nAChR, zejm. s N-koncovou, ligand vázající doménou (N. Le Novère a kol., 2002, T.K. Sixma a A.B. Smit, 2003) a tedy pravděpodobně i podobná struktura. Využívá se jeho rozpustnosti ve vodě a tedy snadnější krystalizace a určení struktury. Stejně jako u AChBP je hlavní silou vázající cholinergní neurotransmitery kation- $\pi$  interakce (přitažlivá interakce mezi kladně nabitou amoniovou skupinou ACh a delokalizovanými  $\pi$ -elektrony aromatických kruhů vazebného místa).

V případě nAChR bylo prokázáno elektrostatické přitahování mezi  $\pi$ -elektrony aromatických aminokyselin a kvarterním (či terciárním) dusíkem přenašeče zejména u  $\alpha 1W^{149}$  (svalový nAChR *Mus musculus*) ležícího v centru vazebné kapsy (D.A. Dougherty, 2007, W. Zhong a kol., 1998), zejména hlavní ( $\alpha$ ) část vazebného místa je bohatá na aromatické aminokyseliny potenciálně schopné kation- $\pi$  interakce. Ale např. nikotin či karbachol se vážou na aromatický  $\alpha 1:W^{149}$  prostřednictvím vodíkové vazby s karbonylovou skupinou místo kation- $\pi$  interakce (P.H. Celie a kol., 2004). Komplementární strana vazebného místa zřejmě přitahuje kladně nabitou část cholinergních ligandů převážně prostřednictvím elektrostatické interakce se záporně nabitými aminokyselinami D a E.

Z dalších experimentů je patrné, že acetátová skupina ACh se váže do blízkosti sousedících cysteinů  $C^{192}$ ,  $C^{193}$   $\alpha$ -podjednotky, avšak povaha příslušné interakce není zatím úplně známa. Uvažuje se o vodíkové vazbě acetátu s  $\gamma Y^{117}$  a  $\delta T^{119}$  E-smyčky (A. Karlin, 2002, S.M. Sine, 1993). Tyto aminokyseliny byly mimo jiné identifikovány fotoafinitním značením (+)-tubokurarinem (D.C. Chiara a kol., 1999) a mohou poskytovat potřebný vodík (P.T. Williamson a kol., 2007).

Bylo prokázáno, že nízkoafinní místo  $\alpha/\gamma$  využívá tzv. dalekodosahovou elektrostatickou interakci (s dosahem až 14 Å - v závislosti na prostředí) mezi aminokyselinami s trvalým nábojem a kvarterním dusíkem větší mírou než místo  $\alpha/\delta$ . Avšak zvýšení afinity u místa  $\alpha/\delta$  při přechodu do desenzitizovaného stavu je přisuzováno posílení tzv. krátkodosahových elektrostatických interakcí, jako jsou např. van der Waalsovy interakce, tvorba iontových párů, dehydratace, aj. (R.H. Meltzer a kol., 2006).

### 1.3.3 Porovnání vazebného místa pro ACh u AChBP, nAChR elektrického orgánu *T. californica* a myšího svalového nAChR

Vzhledem k vysoké homologii aminokyselinové sekvence (79 %)  $\alpha$  podjednotek receptoru z elektrického orgánu *T. californica* s podjednotkami svalových receptorů myši domácí (*Mus musculus*) odpovídají v literatuře identifikovaným aminokyselinám vazebného místa receptoru *T. californica* aminokyseliny myších svalových podjednotek (tab. 2; porovnáno metodou Clustal-V programu MegAlign programového balíku DNASTAR Lasergene 7).

V tab. 2 jsou zároveň uvedeny strukturálně a zřejmě i funkčně odpovídající aminokyseliny AChBP z plže *Limnaea stagnalis* (u aminokyselin v závorce nebyl prozatím podíl na vazbě ACh plně prokázán).

hlavní část vazeb. místa				komplementární část vazeb. místa					
smyčka	L.stagnalis AChBP	T.califor. $\alpha$	M.musc. $\alpha$	smyčka	L.stagnalis AChBP	T.califor. $\gamma$	M.musculus		
							$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$
A	W <sup>81</sup>	W <sup>86</sup>	W <sup>86</sup>	D	W <sup>51</sup>	W <sup>55</sup>	W <sup>55</sup>	W <sup>57</sup>	W <sup>54</sup>
	Y <sup>88</sup>	Y <sup>93</sup>	Y <sup>93</sup>		Q <sup>53</sup>	E <sup>57</sup>	E <sup>57</sup>	D <sup>59</sup>	G <sup>56</sup>
B	W <sup>142</sup>	W <sup>149</sup>	W <sup>149</sup>	E	(R <sup>103</sup> )	L <sup>109</sup>	L <sup>109</sup>	L <sup>111</sup>	L <sup>108</sup>
	(H <sup>144</sup> )	Y <sup>151</sup>	Y <sup>151</sup>		-	Y <sup>111</sup>	Y <sup>111</sup>	Y <sup>113</sup>	Y <sup>110</sup>
C	Y <sup>184</sup>	Y <sup>190</sup>	Y <sup>190</sup>	E	L <sup>111</sup>	Y <sup>117</sup>	Y <sup>117</sup>	T <sup>119</sup>	S <sup>116</sup>
	C <sup>186</sup>	C <sup>192</sup>	C <sup>192</sup>		M <sup>113</sup>	L <sup>119</sup>	L <sup>119</sup>	L <sup>121</sup>	L <sup>118</sup>
	C <sup>187</sup>	C <sup>193</sup>	C <sup>193</sup>	F	(D <sup>160</sup> )	D <sup>174</sup>	D <sup>174</sup>	D <sup>180</sup>	D <sup>174</sup>
	Y <sup>191</sup>	Y <sup>198</sup>	Y <sup>198</sup>		(E <sup>162</sup> )	E <sup>176</sup>	E <sup>176</sup>	E <sup>182</sup>	A <sup>176</sup>

**Tabulka 2-Porovnání aminokyselinového složení vazebních míst pro ACh u a) acetylcholin vázajícího proteinu plovatky bahenní (*Limnaea stagnalis*), b) nikotinického acetylcholinového receptoru z elektrického orgánu parejnoka *Torpedo californica* a c) svalového nAChR myši domácí (*Mus musculus*):** Zatímco u vybraných aminokyselin smyček A-C (hlavní část vazebního místa) nacházíme téměř vždy u těchto proteinů stejné aminokyseliny, u smyček D-F komplementární části vazebního místa je situace složitější. Zejména u E-smyčky AChBP nenalzáme v ekvivalentních pozicích žádnou shodu mezi vazebným proteinem a oběma receptory (což potvrzuje bližší příbuznost AChBP podjednotek k  $\alpha$ -podjednotkám receptorů než k tzv. non- $\alpha$ -podjednotkám tvořících komplementární část vazebního místa svalových receptorů). Ve smyčce D nalzáme stoprocentně konzervovaný aromatický tryptofan, avšak druhá aminokyselina v pořadí je již variabilní. Výrazně (téměř stoprocentně) konzervované jsou záporně nabitě aminokyseliny F-smyčky komplementární části vazebního místa (odpovídají aspartátu D<sup>174</sup> a glutamátu E<sup>176</sup>  $\gamma$ -podjednotky myšního receptoru) mezi svalovými podjednotkami. U AChBP nalzáme stejné aminokyseliny, avšak umístěné v primární struktuře blíže N-konci než u svalových podjednotek a zůstává tak otázkou, zda vzhledem k umístění plní stejnou funkci.

Z tab. 2 je patrné, že všechny vybrané aminokyseliny hlavní části vazebního místa receptoru *T. californica* mají své ekvivalenty u myšního svalového receptoru. Jinak je tomu u části komplementární. U  $\gamma$  podjednotek *T. californica* a myši je ještě shoda 100 %, avšak srovnáme-li  $\gamma$  podjednotku *T. californica* s myší  $\delta$  nebo dokonce  $\epsilon$  svalovou podjednotkou, vidíme, že některé důležité aminokyseliny jsou buď nahrazeny aminokyselinami s podobnými chemickými vlastnostmi (glutamát E<sup>57</sup> D-smyčky receptoru *T. californica* je u myši  $\delta$  podjednotky nahrazen rovněž záporně nabitým aspartátem D<sup>59</sup>) nebo jsou nahrazeny aminokyselinami jiné chemické povahy, u kterých se nedá očekávat stejný typ vazebné interakce s ACh molekulou (tentýž glutamát E<sup>57</sup> *T. californica* je u myši  $\epsilon$  podjednotky nahrazen dokonce nepolárním glycinem G<sup>56</sup>; v případě glutamátu E<sup>176</sup> *T. californica* se u myši  $\epsilon$  podjednotky setkáváme s rovněž nepolárním alaninem A<sup>176</sup>).

Přes poměrně velkou homologii vyvstává otázka, zda aminokyseliny, které zaujímají podobnou pozici v primární struktuře, mají i u svalových receptorů podobnou pozici v architektuře vazebné kapsy a podobný podíl na vazbě ACh molekuly. Jejich reaktivita

může být ovlivněna stericky blízkými aminokyselinami částí řetězců, jež nejsou vždy plně homologní.

Aspartát D<sup>180</sup> F-smyčky  $\delta$  podjednotky dospělého svalového receptoru je mezi podjednotkami svalového receptoru plně konzervován, avšak jeho bezprostřední okolí je poměrně variabilní. Glutamát E<sup>189</sup> též podjednotky (není uveden v tabulce) leží v blízkosti F-smyčky, která je rovněž konzervována. Žhavým kandidátem pro sílu interakce mezi těmito aminokyselinami a ACh je elektrostatická interakce záporného náboje aminokyseliny a kladně nabitě amoniové skupiny ACh.

### 1.3.4 Mechanismus otevírání iontového kanálu svalového nAChR

$\alpha$ -podjednotka je v uzavřené konformaci stabilizována mezipodjednotkovými a vnitromolekulárními interakcemi, které ji udržují v tenzním stavu. Vazba ACh a následné konformační změny vedou k rozvolnění těchto interakcí a přechodu  $\alpha$ -podjednotky do energeticky výhodnějšího stavu umožňujícího otevření iontového kanálu.

Při vazbě ACh dochází k významnému pohybu C-smyčky, která ligand uzamkne ve vazebném místě (obr. 6). V závislosti na tom, zda se jedná o agonistu či kompetitivního antagonistu, může být tento pohyb až v rámci 11 Å (S.B. Hansen a kol., 2005). K pohybu ve smyslu uzavření vazebného místa dochází i u B-smyčky (rotace) a v malé míře i u A-smyčky. B-smyčka se tak spojí s  $\beta$ 8-řetězcem vnitřní části  $\beta$ -sendviče, jeho prostřednictvím se přenesou rotační pohyby na  $\beta$ 1- $\beta$ 2 smyčku na druhé straně podjednotky. Tento pohyb rozvolní interakce zabraňující současné rotaci segmentů M2 všech podjednotek. Průniky M2 tak destabilizují slabé hydrofobní interakce držící pohromadě vrátka iontového kanálu. Kanál se otevírá (N. Unwin, 2005). Na přenosu informace o vazbě ACh vedoucí k otevření se podílí i další části  $\beta$ -sendviče jako např. smyčka mezi  $\beta$ 8- $\beta$ 9 řetězci nebo Cys-smyčka, konečný pohyb je výsledkem celkového rozložení elektrostatické interakce na rozhraní extracelulární domény a transmembránové části receptoru spíše než výsledkem působení mezi konkrétními nabitými skupinami (X. Xiu a kol., 2005). Další popis mechanismu otevírání je možné najít např. v (E.A. Gay a J.L. Yakel, 2007, H.A. Lester a kol., 2004).

Zdá se tedy, že  $\alpha$ -podjednotka je zásadním hybatelem konformačních změn vedoucích k otevření iontového kanálu. Úloha komplementárních podjednotek spočívá zejména ve vazbě ACh a stabilizaci  $\alpha$ -podjednotky v tenzním (uzavřeném) stavu, avšak v průběhu aktivace dochází též ke konformačním změnám části vazebné domény příslušející komplementárním podjednotkám.

## 1.4 Funkční vlastnosti nAChR

### 1.4.1 Způsoby popisu kinetiky aktivace

Účinky agonisty na aktivitu receptoru na úrovni celé buňky popisuje aktivační křivka, která určuje závislost míry aktivace na koncentraci aplikovaného ligandu. V případě ionotropních receptorů je míra aktivace charakterizována velikostí proudové odpovědi. Křivka má v logaritmické škále koncentrací sigmoidální tvar (obr. 7b). Většinou se vynáší v normalizovaném tvaru jako množství aktivovaných receptorů dělené celkovým množstvím receptorů.

Základním farmakokinetickým modelem je tzv. Langmuirova izoterma, navržená roku 1916 Irvingem Langmuirem (I. Langmuir, 1916). Popisuje adsorpci molekul ligandu na povrch s konečnou plochou (z čehož vyplývá saturační charakter funkce), přičemž rychlost adsorpce závisí na koncentraci ligandu (obr. 7a).

V současné farmakologické literatuře se Langmuirova rovnice zapisuje ve tvaru:

$$Y = \frac{[AR]}{[R_t]} = \frac{[A]}{[A] + K_D} \quad (1)$$

kde  $[AR]$  určuje množství komplexu ligand-receptor,  $[R_t]$  celkové množství receptorových vazebných míst,  $[A]$  molární koncentraci ligandu a  $K_D$  rovnovážnou disociační konstantu (jednotkou je  $\text{mol.l}^{-1}$ ).

Bližší analýzou účinku agonistů na receptory se však zjistilo, že tato jednoduchá aktivační funkce pro značné množství typů receptorů nepopisuje přesně tvar aktivační křivky.

Ukazuje se, že naměřeným datům mnohem lépe odpovídá funkce, která byla původně navržena k popisu vazby molekul kyslíku na hemoglobin a formuloval ji roku 1910 Archibald Vivian Hill (A.V. Hill, 1910), tj. dokonce o šest let dříve, než byla Irvingem Langmuirem popsána Langmuirova adsorpční izoterma.

V současné farmakologické literatuře se používají různé varianty Hillovy rovnice (které ve skutečnosti nejsou zcela ekvivalentní), jako například:

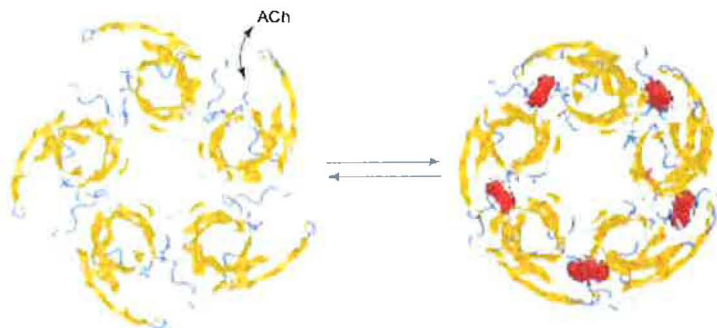
$$Y(A) = \frac{[A]^H}{[A]^H + K_D^H} \quad (2)$$

$$\text{nebo} \quad Y(A) = \frac{Y_{\max}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{[A]}\right)^H} \quad (3)$$

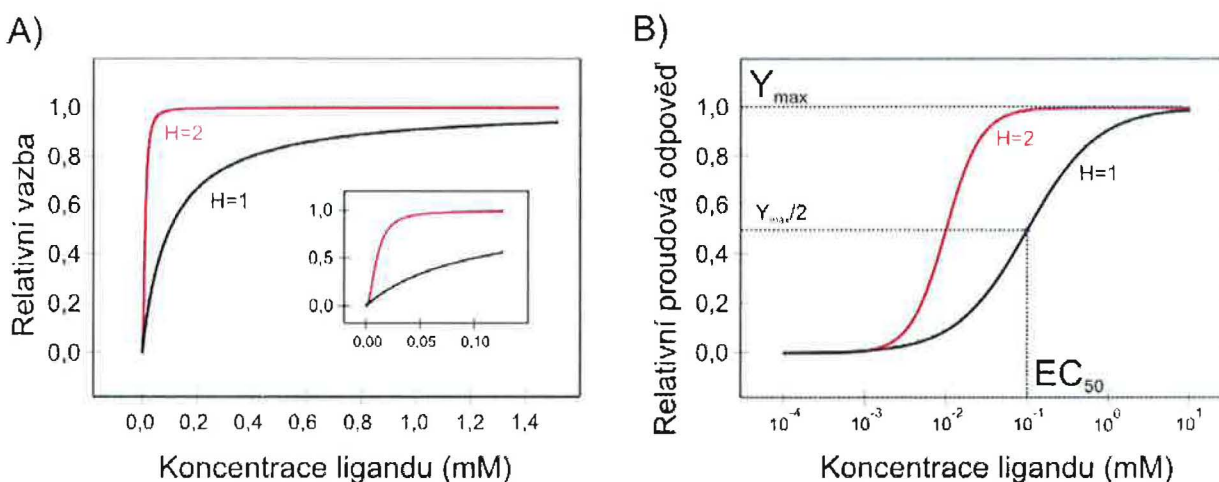
Tyto tvary Hillovy rovnice popisují míru aktivace receptoru  $Y(A)$  pomocí vazby obecně n molekul ligandu na receptorový protein R, kde  $[A]$  je koncentrace ligandu,  $K_D$  je efektivní disociační konstanta zahrnující celý děj od vazby ligandů po případné otevření iontového kanálu,  $EC_{50}$  je koncentrace agonisty vyvolávající odpověď velikosti  $\frac{1}{2}$  maximální odpovědi a  $H$  je Hillův koeficient (obr. 7b). V současné době se hodnota  $H$  používá jako ukazatel



vzájemné interakce mezi více vazebnými místy, ale tato interpretace je silně zjednodušená (D. Colquhoun, 1998).



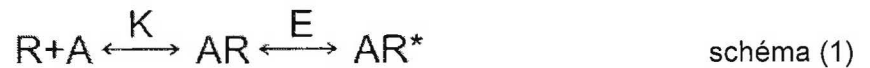
**Obrázek 6 - Konformační změna vyvolaná vazbou agonisty:** vazba ACh na nAChR způsobuje částečnou rotaci všech podjednotek kolem osy kolmé k povrchu membrány a uzamknutí ligandu ve vazebné kapse. Převzato z (T. Grutter a J.P. Changeux, 2001)



**Obrázek 7 – Srovnání vazebné křivky podle Langmuirovy adsorpční izotermy s aktivační Hillovou křivkou:** a) graf relativního obsazení vazebných míst receptoru v závislosti na koncentraci agonisty: Křivka  $H=1$  odpovídá klasické Langmuirově izotermě, křivka  $H=2$  popisuje vazbu v kooperativním systému. Vyneseno v lineárních škálách přechází původně hyperbolický tvar Langmuirovy izotermy (černě,  $H=1$ ) na sigmoidální (červeně,  $H=2$ ). Tento přechod je patrný v detailu nízkých koncentrací (viz výšeč obrázku), přičemž je možné hyperbolickou závislost Langmuirovy izotermy v oblasti malých koncentrací nahradit lineární závislostí, b) aktivační křivka proložená Hillovou funkcí: Aktivační křivky se často vynášejí v semilogaritmické škále. Křivka s Hillovým koeficientem  $H=1$  pak odpovídá stejné označené křivce grafu a), stejně jako křivka  $H=2$  kooperativního systému. V tomto vynesení vykazují sigmoidální tvar obě závislosti.  $Y_{max}$  je hodnota maximální relativní odpovědi systému a  $EC_{50}$  je koncentrace agonisty vyvolávající odpověď o velikosti poloviny  $Y_{max}$ .

Hillova rovnice (vztah 2, 3) je často používána v enzymové kinetice a slouží i farmakologům při popisu vazby ligandů na proteiny. Pro formální podobnost obsazování receptorů ligandy s mechanismem kinetiky enzymů se používá i k popisu aktivace chemicky aktivovaných iontových kanálů (ale i receptorů spojených s G-proteiny), avšak původní interpretace Hillova koeficientu  $H$  vystupujícího v této rovnici jako počtu vazebných míst byla opuštěna, neboť o konkrétní hodnotě  $H$  rozhoduje kromě počtu ligandů i rozdíl afinit (neekvivalence) vazebných míst, interakce mezi nimi a účinnost otevírání kanálu studovaným agonistou. Hillova rovnice ve všech svých tvarech popisuje aktivaci čistě empiricky, aniž by byla přímo spojena se skutečnými mechanismy aktivace.

I na jednoduchém schématu receptoru s jedním vazebným místem je možné ukázat, že hodnoty  $EC_{50}$  a  $Y_{max}$  závisejí nejenom na asociační konstantě vazby ligandu a počtu receptorů, ale i na konstantě konformační přeměny receptoru. Uvažujme zjednodušený případ receptoru R aktivovaného jednou molekulou agonisty A, jehož mechanismus aktivace se řídí lineárním schématem:



kde  $K = \frac{[A][R]}{[AR]}$  je disociační konstanta vazby ligandu A a  $E = \frac{[AR^*]}{[AR]}$  je rovnovážná konstanta konformační přeměny receptoru (ze zavřené konformace AR do otevřené AR\*). Aktivační funkce je v tomto případě:

$$Y(A) = \frac{\text{aktivované receptory}}{\text{všechny stavy R}} = \frac{[AR^*]}{[AR^*] + [AR] + [R]} \quad (4)$$

Vyjádríme-li v této rovnici koncentrace populací jednotlivých stavů pomocí vztahů pro  $K$  a  $E$ , pak jednoduchými úpravami dojdeme k:

$$Y(A) = \frac{1}{1 + \frac{1}{E} + \frac{K}{E \cdot A}} \quad (5)$$

Ze vztahu (5) vyplývá že i při maximální (nekonečné) koncentraci agonisty A nebudou aktivovány všechny receptory:

$$\lim_{A \rightarrow \infty} Y(A) = \frac{E}{E+1} \quad (6)$$

Maximální odpověď je tedy omezena hodnotou  $\frac{E}{E+1}$ , tj. pro žádnou koncentraci A nenabývá  $Y(A)$  hodnoty 1. Této limitní hodnotě se lze pouze přiblížit, a to v případě receptorů s vysokou účinností  $E$ . Tento vztah je důležitý pro další parametr Hillova vynesení,  $EC_{50}$ .  $EC_{50}$  je definována jako koncentrace agonisty vyvolávající odpovědi o velikosti  $\frac{1}{2}$  maximální aktivace, tj.:

$$Y(EC_{50}) = (\lim_{A \rightarrow \infty} Y(A)) / 2 = \frac{E}{2(E+1)} \quad (7)$$

Porovnáním výrazu (5) s definicí (7) pak získáme vztah pro velikost  $EC_{50}$ :

$$EC_{50} = \frac{K}{E+1} \quad (8)$$

Z posledního vztahu je vidět, že makroskopický (měřitelný) parametr  $EC_{50}$  (resp. poloha aktivační křivky v koncentrační škále) je závislý na obou vnitřních rovnovážných konstantách - vazebné rovnováze i účinnosti otevírání kanálu. Při analýze účinků některých modulátorů na receptor pomocí aktivačních křivek tak není snadné určit, zda je posun aktivační křivky

(změna  $EC_{50}$ ) způsoben tím, že modulátor ovlivňuje vazbu agonisty, nebo tím, že mění pravděpodobnost otevírání kanálu. Často se používá efektivní konstanta ( $K_D$ ) zahrnující všechny děje vazby, resp. disociace ligandů (v případě, kdy je receptor aktivován více molekulami ligandu).

Souvislost mezi navázáním ligandů a otevřením iontového kanálu pro receptor se dvěma vazebnými místy se často popisuje lineárním sekvenčním schématem:



Ve složitějších aktivačních schématech je řada reakčních kroků a jim odpovídajících konstant a Hillova rovnice takovou situaci buď není schopna popsat vůbec nebo nedostatečně podrobně. Proto jsou k popisu složitějších reakčních schémat vhodnější tzv. aktivační funkce vycházející z konkrétního reakčního schématu. Aktivační funkce popisují křivky, které empirické Hillově funkci odpovídají jen přibližně. Přesto se Hillova rovnice velmi často používá při popisu a rozboru aktivace receptorů. Především proto, že experimentálně získané křivky jsou v důsledku chyb měření natolik nepřesné, že neumožňují určit všechny konstanty potřebné k popisu složitějších modelů. Hillova rovnice obsahuje jen 2-3 volné parametry, jejichž určení je spolehlivé i z omezeně přesných experimentálních dat.

### 1.4.2 Afinita agonisty a jeho účinnost při aktivaci kanálu nejsou nezávislé

Vztah mezi vazbou ligandu a aktivací iontového kanálu můžeme popisovat i z hlediska termodynamiky chemických reakcí. Ve zjednodušeném modelu si vazbu ligandu můžeme představit jako první z reakcí lineárního schématu (1), na niž navazuje děj aktivace kanálu.

Změna volné Gibbsovy energie  $\Delta G$  při vazbě ligandu popsané rovnovážnou disociační konstantou  $K_D$  je:

$$G_2 - G_1 = \Delta G = RT \ln K_D \quad (9)$$

kde  $R$  je molární plynová konstanta a  $T$  je teplota v Kelvinech.  $G_1$  a  $G_2$  jsou hodnoty Gibbsovy volné energie složek na začátku a na konci reakce, rovnovážná konstanta v sobě nese pouze informaci o rozdílu hladin Gibbsovy energie krajních stavů reakce, tj. může pouze charakterizovat rovnovážný stav (obsazení jednotlivých stavů v rovnovážném stavu), ale nevypovídá nic o rychlostech reakcí v jednotlivých větvích.

Představme si zjednodušený případ chemicky aktivovaného kanálu s jedním vazebným místem pro agonistu, přecházejícího pouze mezi uzavřenou (C) a otevřenou (O) konformací. Podle alosterického kinetického schématu je možné otevření jak ligandovaného receptoru, tak spontánní otevření neligandovaných receptorů. Schéma je zobrazeno na obr. 8. Konformační přechody mezi uzavřeným a otevřeným stavem jsou charakterizovány



rovnovážnou („asociační“) konstantou  $E_0$  pro neligandovaný a  $E_1$  pro jednou ligandovaný receptor a vazba agonisty (vnitřní afinita stavu) je popsána *disociační* konstantou  $K_C$  pro zavřenou konformaci a  $K_O$  pro otevřený kanál.

Gibbsova volná energie je stavová funkce, proto platí, že její změna mezi počátečním a koncovým stavem je vždy stejná, nezávisle na tom, kterou cestou (přes které stavy) k přechodu došlo. Pro přechod  $C_0 \rightarrow O_1$  potom vyplývá:

$$\Delta G(C_0 \rightarrow C_1) + \Delta G(C_1 \rightarrow O_1) = \Delta G(C_0 \rightarrow O_0) + \Delta G(O_0 \rightarrow O_1), \text{ tj.} \\ RT \ln K_C - RT \ln E_1 = -RT \ln E_0 + RT \ln K_O \quad (10)$$

Jednoduchými úpravami získáme vzájemný vztah mezi vazebnými konstantami a konstantami konformačních změn:

$$\frac{K_C}{E_1} = \frac{K_O}{E_0}, \text{ resp. } \frac{K_C}{K_O} = \frac{E_1}{E_0} \quad (11)$$

Vazba a změna konformace jsou na sobě tudíž závislé. Pokud je afinita otevřeného stavu  $x$ -krát vyšší (tj. disociační konstanta  $x$ -krát nižší) než afinita zavřené konformace  $K_C = x \cdot K_O$ , potom tentýž vztah platí pro poměr konformačních rovnováh ligandovaných a neligandovaných receptorů:  $E_1 = x \cdot E_0$ . Je to způsob, kterým vazba ligandu usnadňuje přechod receptoru do otevřeného stavu.

Je třeba zdůraznit, že vztah (11) charakterizuje rovnovážný stav. To, kterou „cestou“ bude nejpravděpodobněji docházet k aktivaci receptorů (zda spontánní aktivací neligandovaných receptorů či jako důsledek vazby ligandu), je dáno poměrem absolutních velikostí rychlostních konstant otevírání receptoru v neligandovaném a ligandovaném stavu.

### 1.4.3 Modely aktivace ligandem řízených kanálů

V zásadě jsou známy dva základní náhledy na mechanismus aktivace ligandem řízených ionotropních receptorů. Prvním je lineární schéma Del Castilla a Katze (J. Del Castillo a B. Katz, 1957), tzv. sekvenční model, jehož mechanismus je pro receptor podobný svalovému nAChR (aktivovaný dvěma molekulami agonisty) popsán ve schématu (2). V tomto schématu se ligand vždy váže na receptor v klidovém stavu R a otevření následuje až v důsledku navázání agonisty. Mluví se o tzv. izomerizaci, tj. konformační změně části proteinu (např. vrátek kanálu), jež je vyvrcholením přenosu informace o vazbě ligandu na vzdálenou vazebnou doménu (J. Krusek, 2004). V literatuře se též mluví o Koshland-Némethy-Filmerově (D.E. Koshland, Jr. a kol., 1966) instruktivním modelu, podle něhož navázaný ligand instruuje receptor ke změně konformace na stericky a energeticky vyhovující novému komplexu ligand-receptor.

Původní myšlenka druhého modelu je o šest let starší (J. Wyman, Jr. a D.W. Allen, 1951), avšak přijata byla až v přepracované podobě Monod-Wyman-Changeuxho mechanismu

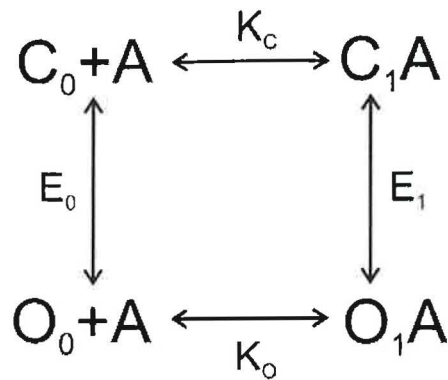
kooperativních enzymů (J. Monod a kol., 1965); MWC schéma). Na rozdíl od lineárního schématu předpokládá existenci spontánních konformačních změn proteinu (a tedy i aktivaci receptoru) v nepřítomnosti ligandu, přičemž u oligomerních proteinů dochází k současné konformační změně všech podjednotek najednou. Tato spontánní otevření byla skutečně potvrzena v rámci elektrofyziologického snímání jednotlivých kanálů (M.B. Jackson, 1984), ale jejich zastoupení je velmi malé. Afinita k ligandu v tomto schématu závisí na konkrétním stavu proteinu a může nabývat rozmanitých hodnot. Mluví se o tzv. přednastavené (preformed) rovnováze. O četnosti navázání ligandu zde rozhoduje afinita dané konformace receptoru k ligandu. Agonisté nAChR receptorů mají vysokou afinitu k aktivovanému a jak vyplývá z práce (T. Heidmann a J.P. Changeux, 1979) ještě vyšší k tzv. desenzitizovanému receptoru, komplexy receptorů s navázaným ligandem tudíž pozorujeme nejčastěji v těchto stavech. Naopak afinita antagonistů je na konformaci receptoru nezávislá (a například tzv. inverzní agonisté mají vyšší afinitu k uzavřeným kanálům). Na obr. 9 je MWC schéma pro receptor podobný nAChR aktivovaný dvěma molekulami agonisty.

Přínos MWC modelu tkví ve vysvětlení experimentálních pozorování spontánní aktivity v nepřítomnosti agonisty při snímání jednotlivých kanálů metodou terčíkového zámku (M.B. Jackson, 1984). Rozšíříme-li model o třetí, tj. desenzitizovaný stav, pak MWC model vysvětluje i pozorování významné populace až 20% receptorů elektrického orgánu rejnoka *T. marmorata* ve vysokoafinitním desenzitizovaném stavu v nepřítomnosti ligandu (J.P. Changeux a kol., 1984).

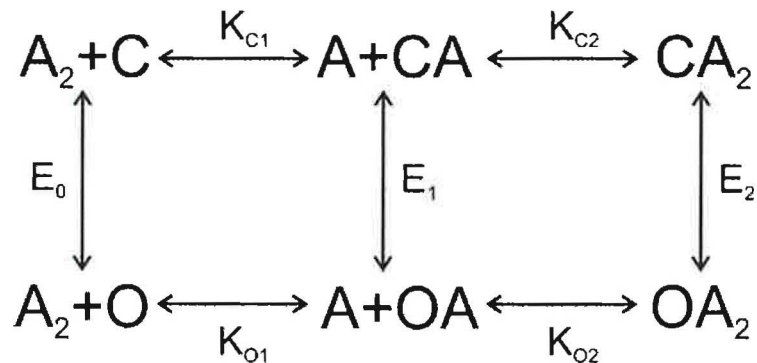
Základní předpoklad celého modelu je zároveň jeho největší slabina, a sice předpokládaný *současný* přechod všech podjednotek receptorového multimeru mezi různými stavy a tudíž nekonečná interakční energie mezi podjednotkami. Srovnáme-li tento aspekt s lineárním modelem, zdá se, že sekvenční schéma, ač na první pohled výrazně zjednodušující, právě z energetického hlediska více odpovídá realitě. Receptor v lineárním schématu bývá přirovnáván k plastické kouli postupně měnící konformaci ze zavřeného do otevřeného stavu. V případě multimerního receptoru se tak vyhýbá potížím se skokovým přechodem konformace celého receptoru.

Skutečně reálný mechanismus zřejmě neodpovídá přesně ani jednomu ze jmenovaných systémů. Sekvenční a MWC schéma je třeba brát jako dva extrémy obecnějšího modelu. Na obr. 10 je tento zobecněný model znázorněn pro případ receptoru se dvěma vazebnými místy pro agonistu (reprezentující např. dvě podjednotky receptoru). Čtverec zde odpovídá uzavřené a kolečko otevřené konformaci, zatímco barevně je odlišeno obsazení vazebného místa agonistou (žlutě bez agonisty, červeně s navázaným agonistou).

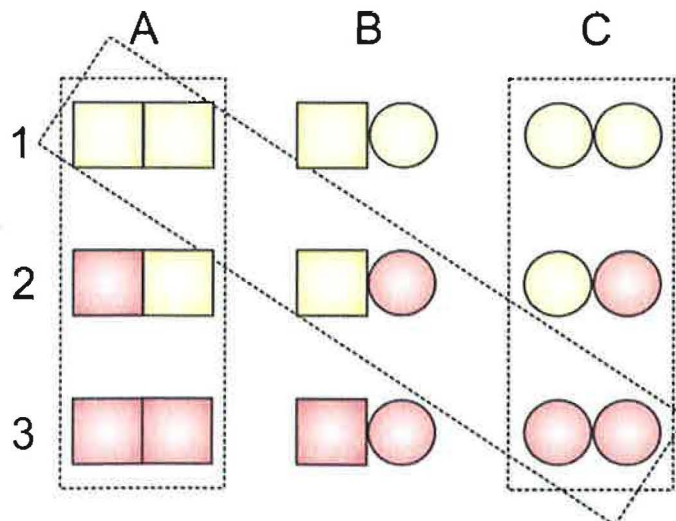
Zmíněnému sekvenčnímu schématu zde odpovídá „diagonální cesta“ a MWC model lze spatřit ve vertikálních seskupeních. Při hledání mechanismu aktivace konkrétního receptoru je třeba vycházet z experimentálních pozorování za použití různých technik. Pro svalový nAChR se jako nejpravděpodobnější mechanismus jeví cesta  $A1 \rightarrow A2 \rightarrow A3 \rightarrow C3$ . Není to ale



**Obrázek 8 - Alosterické kinetické schéma receptoru s jedním ligandem:** podle zjednodušeného kinetického schématu přechází jak neligandovaný ( $C_0$ ), tak jednou ligandovaný ( $C_1$ ) uzavřený receptor spontánně do otevřeného stavu ( $O_0$  a  $O_1$ ) avšak s různou pravděpodobností. Asociační konstanty konformačního přechodu a disociační vazebné konstanty, schématicky znázorněné u patřičného děje však nejsou navzájem nezávislé a jsou svázány díky stavovému charakteru Gibbsovy energie vztahem (11).



**Obrázek 9 - MWC schéma aktivace receptoru vázajícího dvě molekuly ligandu:** konformace receptoru spontánně přechází (v tomto zjednodušeném schématu) mezi dvěma stavy - uzavřeným (C) a otevřeným (O) s rovnovážnými konstantami izomerizace  $E$  ( $E_0$ ,  $E_1$ ,  $E_2$ , v závislosti na počtu navázaných molekul agonisty). Agonistova (A) afinita  $K_{C1}$ ,  $K_{C2}$ , resp.  $K_{O1}$ ,  $K_{O2}$  určuje pravděpodobnost navázání agonisty a je určována konformací receptoru.



**Obrázek 10- Zobecněný model aktivace kanálu s vazbou dvou agonistů:** Každý čtverec či kolečko odpovídá jednomu vazebnému místu (podjednotce s vazebným místem) pro agonistu. Čtverec představuje uzavřenou, kolečko otevřenou konformaci podjednotky. Barevně je odlišena vazba agonisty: žlutě neligandovaná podjednotka, červeně podjednotka s navázaným agonistou. Mechanismus aktivace závisí na daném typu receptoru a je třeba vycházet z konkrétních experimentálních pozorování, přičemž u jednoho typu receptoru pozorujeme zároveň několik možných „cest“ navzájem různě pravděpodobných.

jediný možný způsob aktivace. Právě pozorování spontánních otevření podporují alternativu skoku  $A1 \rightarrow C1$  a otevření s jedním ligandem  $A2 \rightarrow C2$ .

#### 1.4.4 Desensitizace nAChR

Desensitizace je ztráta nebo snižování citlivosti receptorů při dlouhé nebo opakované stimulaci. Probíhá v časové škále od milisekund až po hodiny a může zahrnovat řadu mechanismů, jako je vratná konformační změna receptoru, dlouhodobější modulace receptoru například fosforylací nebo pokles počtu receptorů v membráně.

V našich experimentech za desensitizaci považujeme vratné snížení odpovědi vznikající jako reakce na kontinuální aplikaci agonisty (R. Giniatullin a kol., 2005). Charakteristická je pro tento stav vysoká afinita k agonistovi (N.D. Boyd a J.B. Cohen, 1980, R. Giniatullin a kol., 2005, T. Heidmann a J.P. Changeux, 1979), přičemž tato afinita je vodítkem k rozpoznání desensitizovaných stavů v méně obvyklých situacích, jako např. v nepřítomnosti agonisty (N.D. Boyd a J.B. Cohen, 1980). Tento jev má velký význam pro správnou funkci synapse (moduluje účinnost přenosu, popř. se podílí na tvaru buněčných odpovědí), podílí se na procesu učení a paměti, zároveň chrání organismus při patologických stavech spojených s vysokou excitabilitou (J.R. Wooltorton a kol., 2003). V krátkodobých časových škálách (v řádu sekund až minut) se desensitizace uplatňuje např. při paralýze kosterního svalstva vyvolané sukcinylcholinem v průběhu celkové anestezie (Z. Tuba a kol., 2002).

Velký význam pro fyziologickou funkci má desensitizace zejména neuronálních receptorů. Výrazná a rychlá desensitizace se projevuje u homomerních  $\alpha 7$  receptorů (desensitizují v řádu milisekund), ostatní neuronální receptory desensitizují pomaleji (v řádu sekund) (P.J. Corringer a kol., 2000, D.S. McGehee a L.W. Role, 1995). U svalových receptorů je situace poněkud odlišná; desensitizace se u nich sice dostavuje podobně jako u neuronálních non- $\alpha 7$  receptorů, avšak nemá vliv na tvar postsynaptických proudů (*in vivo*), které mají velmi rychlý průběh daný dobou setrvání molekuly agonisty na receptoru (A. Auerbach a G. Akk, 1998). U svalových receptorů se desensitizace projevuje až po opakované stimulaci, kdy se nahromadí receptory v desensitizovaném stavu po předešlých stimulacích z důvodu pomalé kinetiky návratu z desensitizace (R.A. Giniatullin a kol., 2001).

Většina krystalografických studií je *de facto* prováděna na desensitizovaných receptorech – při dlouhodobém působení agonisty (N. Unwin, 2005). Přestože jsou již popsány některé dílčí změny konformace, mechanismus přechodu receptoru do desensitizovaného stavu stále není znám dopodrobna. Na kinetiku desensitizace nAChR má vliv mnoho faktorů jako např. a) podjednotkové složení receptoru či (přirozené nebo uměle vyvolané) mutace receptoru, b) typ agonisty, popř. modulátorů (C.A. Briggs a D.G. McKenna, 1998, C.P. Fenster a kol., 1997, J. Lindovsky a kol., 2008, R.L. Papke a J.K. Porter Papke, 2002, L. Svobodova a kol., 2006), c) chemické složení okolí receptoru (J.E. Baenziger a kol., 2000,

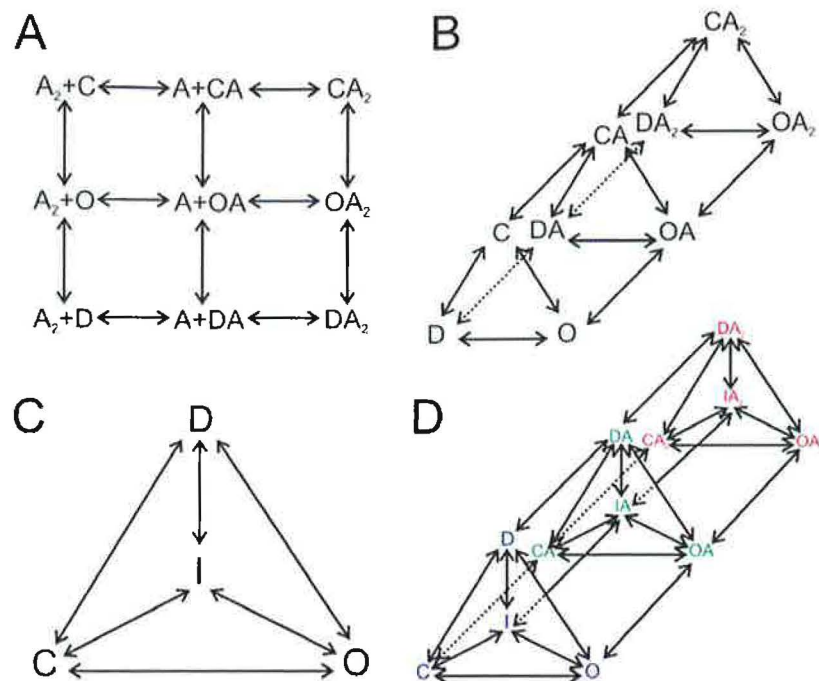
L.G. Magazanik a F. Vyskocil, 1970, S.E. Rankin a kol., 1997, F. Vyskocil a L.G. Magazanik, 1972), d) fyzikální podmínky (teplota, membránový potenciál, atp.). Rychlost návratu z desensitizace je ovlivněna např. i koncentrací intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  (X. Guo a R.A. Lester, 2007). Souvislost  $\text{Ca}^{2+}$  s desensitizací však není přímá, neboť zvýšený intracelulární vápník nejprve aktivuje proteinkinázy PKA či PKC, které fosforylují intracelulární smyčky (hlavně neuronálních) nAChR, což se projeví změnou rychlosti návratu z desensitizace (T. Nishizaki a K. Sumikawa, 1998, M.W. Quick a R.A. Lester, 2002). Není jisté zda změna kinetiky desensitizace vyvolaná vzestupem vápníku a fosforylací nesouvisí ještě spíše se změnami vyvolanými interakcí nAChR s cytoskeletem, neboť právě fosforylace intracelulární smyčky receptoru je podmínkou ukotvení receptoru na cytoskelet a jeho intracelulární doména je často spojována s desensitizací.

Kinetika nástupu desensitizace je funkcí vazby agonisty na receptor a aktivace tímto agonistou, což nevylučuje existenci vysokoafinních zavřených desensitizovaných receptorů bez přítomnosti agonisty (T. Heidmann a J.P. Changeux, 1979). MWC schéma z obr. 9 tak můžeme rozšířit vždy o jeden desensitizovaný stav pro každé obsazení agonistou (obr. 11a). Tento model je v souladu s pozorováním, kdy v populaci receptorů (el. orgánu rejnoka *Torpedo*) bez agonisty přetrvává cca 20 % v desensitizovaném stavu (N.D. Boyd a J.B. Cohen, 1980, T. Heidmann a J.P. Changeux, 1979). V tomto modelu se předpokládá, že návrat z desensitizace probíhá přes otevřený stav.

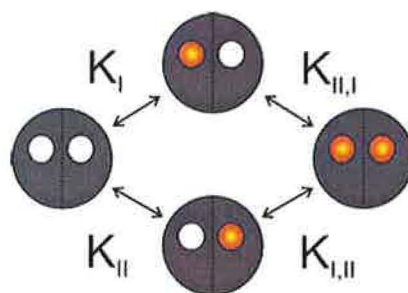
Ještě blíže realitě je u svalového nAChR zřejmě model (obr. 11b) publikovaný např. v (S. Elenes a kol., 2006) právě pro myší svalový receptor. V tomto třídídimenzionálním modelu přicházejí v úvahu i další přechody včetně přímého přechodu z desensitizovaného stavu (ať už ligandovaného nebo i v nepřítomnosti agonisty) do klidového (uzavřeného, angl. resting) stavu.

Z analýz kinetiky svalového receptoru však vyplývá možnost existence více desensitizovaných stavů. Např. Changeux (J.P. Changeux a S.J. Edelstein, 1998) zavádí pro každý vazebný stav dvojici desensitizovaných stavů: *I* a *D* (obr. 11c). *I* označuje přechodný desensitizovaný stav, v němž receptor setrvává pouze krátkou dobu, zatímco *D* je vysokoafinitní dlouhotrvající desensitizovaný stav. Schéma 11c lze po vzoru (S. Elenes a kol., 2006) rozšířit na všechny stavy obsazení svalového receptoru (obr. 11d), avšak v reálné situaci na synapsi (zejména z hlediska časové škály) se uplatňují pravděpodobně pouze dvakrát ligandované desensitizované stavy. Mnohé práce však uvažují o ještě vyšším počtu desensitizovaných stavů připadajících na určité obsazení receptoru. Např. práce (S. Elenes a A. Auerbach, 2002) navrhuje celkem 5 desensitizovaných stavů vycházejících z otevřené konformace, tj. pravděpodobně dvakrát ligandovaného receptoru. Není však jasné, jaké je konkrétní uspořádání a vztahy mezi jednotlivými desensitizovanými stavy u různých nikotinických receptorů. Při eletrofyzilogických měřeních navíc nelze přesně vyčíslit velikost populace receptorů desensitizovaných bez přítomnosti agonisty.





**Obrázek 11 – Návrhy kinetických schémat svalového nAChR zahrnující desenzitizované stavy:** a) klasické MWC schéma zahrnující desenzitizované stavy, b) komplexnější kinetické schéma podle (S. Elenes a kol., 2006) zahrnuje i přechody mezi desenzitizovaným a klidovým (uzavřeným) stavem, c) kinetické schéma podle (J.P. Changeux a S.J. Edelstein, 1998) zavádí další, avšak přechodný desenzitizovaný stav *I*, ze kterého receptor přechází do vysokoafinitního dlouhotrvajícího desenzitizovaného stavu *D*, d) rozšíření Changeuxho modelu na všechny stavy obsazení svalového nAChR podle vzoru (S. Elenes a kol., 2006).



**Obrázek 12 - Mikroskopické kinetické schéma obsazování dvou vazebných míst dimerního proteinu:** v tomto přístupu jsou dvě vazebná místa (proteinové monomery) navzájem odlišitelná (první, resp. druhé vazebné místo) a tudíž rozeznáváme celkem čtyři vazebné mikroskopické konstanty. Konstanta  $K_I$ , resp.  $K_{II}$  popisuje vazbu první molekuly ligandu na první, resp. druhé vazebné místo, zatímco konstanty  $K_{I,I}$  a  $K_{I,II}$  charakterizují vazbu druhého ligandu na druhé, resp. první vazebné místo.

Časový průběh desenzitizace je závislý na druhu a koncentraci agonisty. Z toho vyplývá, že i mutace ovlivňující vazbu agonisty či aktivační mechanismus se může ve výsledku projevit výraznou změnou kinetiky desenzitizace (S. Elenes a kol., 2006).

Za nástup, trvání a návrat z desenzitizace jsou odpovědné různé části receptoru (D.G. Hill a J.E. Baenziger, 2006), přičemž tato „topologie desenzitizace“ je výrazně závislá na podjednotkovém složení (A. Kuryatov a kol., 2000, A.N. Placzek a kol., 2004).

Na typu agonisty závisí i kinetika návratu z desenzitizace (K.G. Paradiso a J.H. Steinbach, 2003, R. Reitstetter a kol., 1999).

## 1.4.5 Alosterie a kooperativita

Modely aktivace z minulé kapitoly se liší zejména různou mírou alosterie. Pojem alosterie byl poprvé užit v našem kontextu r. 1963 (J. Monod a kol., 1963). Vlastní termín vznikl o dva roky dříve složením řeckých  $\alpha\lambda\lambda\omicron\sigma$  - jiný, odlišný a  $\sigma\tau\epsilon\rho\epsilon\omicron\sigma$  - pevný, jednolitý. Zobecňující definici alosterie můžeme najít např. u Colquhouna (D. Colquhoun, 1998), podle něhož je alosterický takový mechanismus, kde může protein koexistovat ve 2 nebo více rozdílných konformacích, které se liší ve velikosti afinity pro ligand. Přičemž alosterický modulátor je takový ligand, jenž se na určitou konformaci váže lépe než na ostatní konformace.

Přestože lze alosterii pozorovat i u receptorů tvořených jednou podjednotkou, tento jev je patrný zejména v případech oligomerních proteinů s několika podjednotkami. Alosterie zde znamená, že informace o změně konformace jedné podjednotky (způsobené interakcí s ligandem) se různou měrou předává ostatním podjednotkám a ovlivňuje jejich konformaci.

Práce (D.E. Koshland, Jr. a kol., 1966) naráží na problém vzájemného působení mezi podjednotkami a navrhuje obecné řešení zahrnující v limitním případě absolutně kooperující MWC proteiny (příklad extrémně symetrického proteinu, kdy se funkční stav celého systému mění najednou) a na druhé straně proteiny s negativní kooperativitou. Kooperativitu si můžeme vysvětlit jako druh alosterického chování, kdy změna konformace jedné podjednotky (nebo obsazení vazebného místa) způsobuje stejnou konformační změnu ostatních podjednotek (či zvýšení afinity ostatních míst). Původ kooperativity vidí v interakci mezi sousedními podjednotkami a zavádí termín interakční energie ( $G$ ). Současná změna konformace všech podjednotek u absolutně kooperativních MWC systémů (obr. 9) by v tomto pojetí vedla k nekonečně velkým hodnotám interakční energie. Velikost interakční energie lze tudíž brát jako míru kooperativity mezi podjednotkami. Definice kooperativity pomocí Gibbsovy volné energie je (i pro svou názornost a snadné ověření) obecně přijímána. Inspirováni tímto přístupem zavádějí Forsén a Linse ve svém článku (S. Forsen a S. Linse, 1995) kooperativitu pomocí jednoduchého myšlenkového pokusu. Představme si dimerní protein tvořený dvěma podjednotkami, každá s jedním vazebným místem pro agonistu. Situace je naznačena na obr. 12.

Vazba agonisty na jednotlivá místa je popsána *mikroskopickými* vazebnými konstantami  $K_I$ ,  $K_{II}$ ,  $K_{I,I}$ ,  $K_{I,II}$ . Kooperativita mezi vazebnými místy je pak definována takto:

$$\Delta\Delta G = -RT\left(\frac{K_{I,II}}{K_I}\right) = -RT\left(\frac{K_{II,I}}{K_{II}}\right) \quad (12)$$

Symbol  $\Delta\Delta G$  popisuje *změnu* afinity, přičemž afinita sama o sobě je popisována pomocí rovnovážné konstanty vazby ligandu, které podle vztahu (9) odpovídá změna Gibbsovy energie  $\Delta G$ . Pozitivní kooperativita ( $\Delta\Delta G < 0$ ) se projevuje tehdy, když afinita jednoho místa roste následkem obsazení druhého vazebného místa. Jak je vidět, parametr  $\Delta\Delta G$  *přímo* popisuje kooperativitu mezi vazebnými místy.

## 1.4.6 Interpretace parametrů Hillovy rovnice ve vztahu k mechanismu činnosti receptoru

Aktivační křivku systému popsaného schématem (2) lze proložit Hillovou funkcí (3). Pro diagnostiku účinku ligandů tak můžeme použít tři již zmíněné parametry: Hillův koeficient  $H$ ,  $EC_{50}$  a  $Y_{max}$ .

### 1.4.6.1 Vztah mezi Hillovým koeficientem a kooperativitou závisí na konkrétním mechanismu aktivace systému

Kooperativita proteinu je např. pro chemickou signalizaci v organismu výhodná, neboť zefektivňuje recepční účinky chemicky aktivovaných kanálů, tj. malé zvýšení koncentrace ligandu vyvolává důraznější fyziologickou odpověď a aktivační křivka získává vyšší strmost (obr. 7b). Strmost aktivačních křivek se odráží v hodnotě Hillova koeficientu  $H$ , tj. zdálo by se, že u chemicky aktivovaných kanálů vypovídá hodnota  $H$  o míře kooperativity mezi vazebnými místy. V dřívějších studiích se také hodnota  $H$  zjištěná z aktivační (nebo vazebné) křivky zaokrouhlená na nejbližší vyšší celé číslo interpretovala jako dolní odhad počtu *kooperujících* vazebných míst v proteinu. Podíváme-li se na věc detailněji, zjistíme, že situace je složitější, neboť přímá souvislost mezi  $H$  a kooperativitou v některých případech selhává.

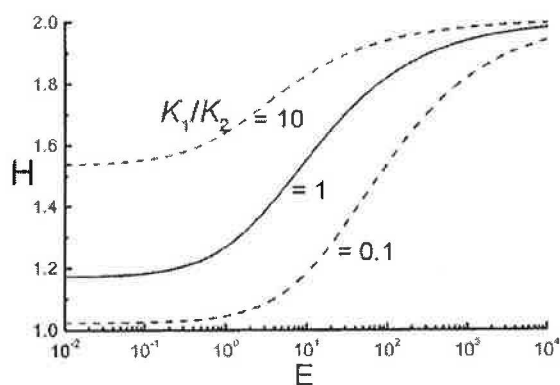
Sledování pouze změn Hillova koeficientu aktivační nebo vazebné křivky může např. u studií využívajících bodových mutací či farmakologických studií vést k mylným úsudkům ohledně vlivu dané mutace (nebo vazby dalšího alosterického ligandu) na kooperativitu. Znamená to, že Hillův koeficient nemůžeme brát jako přímý kvantifikátor kooperativity. Jako spolehlivější se v tomto směru jeví definice kooperativity pomocí  $\Delta\Delta G$  (12), jež je však často hůře měřitelná.

Zajímavým směrem jde například práce Spivaka (C.E. Spivak, 1995), který parametry Hillovy rovnice  $H$  a  $K$  ve tvaru 2 používá k určení mechanismu, jenž je poškozen příslušnou mutací, tj. zda je poškozen alosterický přenos informace mezi vazebnými místy či mechanismus otevírání kanálu. Používá k tomu vynesení  $H$  oproti  $\log K$ , přičemž srovnává experimentálně získané body odpovídající jednotlivým mutacím s teoreticky vytvořenou sítí křivek závislosti  $H$  na  $\log K$  pro vybrané kombinace parametrů studovaného modelu. Pro model nikotinického receptoru se ukázala vhodná síť křivek konstantní hodnoty  $E$ , tj. konstantní účinnosti otevírání kanálu, nebo konstantní  $\alpha$  (koeficient alosterického spřažení, odpovídá kooperativě mezi vazebnými místy). Tento přístup je rozveden v publikaci (J. Krusek a F. Vyskocil, 2003).

V případě nAChR a ostatních chemicky aktivovaných kanálů následuje podle sekvenčního schématu 2 za vazbou agonisty konformační přechod proteinu do otevřeného stavu.



Konstanty  $K_1$  a  $K_2$  jsou afinity vazebných míst (v případě nerozlišitelnosti vazebných míst, tj. jsou efektivními konstantami vazby prvního a druhého agonisty) a  $E$  je konstanta konformační přeměny mezi zavřeným a otevřeným stavem. Na případě receptoru aktivovaného jedním agonistou jsem ukázala vzájemnou závislost vazebných konstant a konstant konformační přeměny (obr. 8, vztah 11). V literatuře je však popsán vliv účinnosti otevírání  $E$  i na velikost Hillova koeficientu aktivačních křivek kooperativních systémů popsaných schématem 2 (D. Colquhoun, 1998). Pro nízké účinnosti ( $E < 1$ ) je sice Hillův koeficient na  $E$  nezávislý, se zvyšujícím se  $E$  (v logaritmické škále) se však  $H$  rychle blíží maximu (v tomto případě 2) a naopak se přestává projevovat závislost  $H$  na kooperativitě mezi vazebnými místy. Za touto oblastí už prakticky nemá smysl další zvyšování účinnosti receptoru  $E$ , neboť strmost aktivační křivky se už prakticky nemění (dosáhla svého maxima). Velká změna účinnosti otevírání za touto hranicí vyvolá jen malou změnu Hillova koeficientu. Zároveň mizí vliv kooperativity vazebných míst a pro tyto receptory je prakticky nemožné stanovení vnitřních vazebných konstant z funkčních studií (křivky  $H(E)$  se pro jednotlivé poměry afinit v rámci přesnosti měření překrývají). Závislost  $H(E)$  pro systémy s různou mírou kooperativity ( $\sim K_1/K_2$ ) je znázorněna na obr. 13.



**Obrázek 13 – Závislost Hillova koeficientu na účinnosti otevírání kanálu:** Velikost  $H$  je závislá i na hodnotě konstanty konformační přeměny  $E$ . Mírou, s jakou se tato závislost projeví, určuje konkrétní poměr afinit vazebných míst a absolutní velikost  $E$ . Pro kladně kooperativní vazbu je  $H$  už samo o sobě vysoké a zvyšováním účinnosti receptoru se dosáhne jen malého zvýšení k limitní hodnotě (která pro 2 vazebná místa činí 2). Pro nezávislá vazebná místa dochází při vyšších hodnotách  $E$  k poměrně rychlému lokálnímu růstu Hillova koeficientu a u záporně kooperativních vazebných míst může vzestup  $E$  znamenat zásadní (a opět poměrně skokovou) změnu (z 1 až k maximální hodnotě, zde 2). Jak je z obrázku patrné, pro proteiny s dostatečně velkou účinností  $E$  bude koncentrační závislost biologické odpovědi maximálně strmá (s maximálním  $H$ ) i v případě neinteragujících vazebných míst nebo dokonce záporné kooperativity. U těchto proteinů je prakticky nemožné z aktivační křivky nebo vazebné analýzy určit parametry vazby a účinnosti. Přejato z (D. Colquhoun, 1998).

Pro účinnou signalizaci prostřednictvím chemicky aktivovaných kanálů jsou tedy možné dvě základní cesty (nebo jejich kombinace), a sice vysoká kooperativita mezi vazebnými místy (velký poměr  $\frac{K_1}{K_2}$ ), popř. agonista s vysokou účinností konformačního přechodu ze zavřeného do otevřeného stavu  $E$ .

### 1.4.6.2 Vlastnosti $EC_{50}$ a $Y_{max}$

Hodnota  $EC_{50}$  určuje umístění aktivační křivky v koncentrační škále, mimo jiné určuje oblast koncentrací agonisty, v nichž dochází k efektivní aktivaci. Zvýšení  $EC_{50}$  čili posun aktivační křivky směrem doprava může být způsobeno jak snížením afinity receptoru k ligandům (zvýšení vnitřních disociačních konstant vazby ligandů  $K_i$ ), tak snížením účinnosti přechodu do otevřeného stavu  $E$  ligandu .

Hodnota  $Y_{max}$  udává maximální velikost odpovědi, kterou lze vyvolat daným ligandem. Lze ji vztáhnout k počtu všech přítomných receptorů, avšak v praxi se často srovnává s maximální odpovědí plného agonisty. Závisí přímo na účinnosti otevírání  $E$  podle rovnice (6). U ligandů s malým  $E$  může dosahovat pouze zlomků procent (ačkoliv je populace receptorů plně obsazena, konformační přechod do aktivního stavu je málo pravděpodobný) a na druhé straně pro  $E > 10$  dochází k saturaci a s dalším zvyšováním  $E$  se maximální odpověď mění jen velmi málo. Účinnost otevírání je charakteristikou konkrétního ligandu a na základě hodnoty  $E$  lze zavést klasifikaci ligandů na plné a parciální agonisty.

### 1.4.7 Charakteristika ligandů, jejich interakce s receptorem a diagnostika aktivační křivky

Činnost chemicky aktivovaných kanálů je výrazně ovlivněna typem konkrétního ligandu, s nímž receptorový protein interaguje. Ligandy dělíme na:

- 1) kompetitivní ligandy (působící ze stejného místa jako endogenní agonista):
  - agonisté (způsobují efektivní otevření kanálu)
  - parciální agonisté (aktivátory s menší účinností otevírání)
  - kompetitivní antagonisté (vazbou na vazebné místo pro agonistu stericky brání aktivaci receptoru, nezpůsobují aktivaci kanálu ani neovlivňují pravděpodobnost spontánního otevření kanálu)
  - inverzní agonisté (ligandy, které svým navázáním snižují pravděpodobnost spontánní aktivace či otevření iontového kanálu z jiného místa)
- 2) nekompetitivní ligandy (působící z jiného místa než endogenní agonista):
  - nekompetitivní inhibitory (zejména blokátory iontového kanálu; vazbou dovnitř iontového póru zabraňují průchodu iontů kanálem)
  - alosterické modulátory (váží se na odlišné místo než agonisté nebo kompetitivní antagonisté a jsou schopny ovlivnit afinitu k agonistovi nebo účinnost otevírání kanálu agonistou z tohoto vzdáleného místa)
  - nekompetitivní agonisté (aktivátory, jež jsou schopny otevírat iontový kanál z jiného vazebného místa než klasičtí agonisté)

Charakter ligandu působícího na receptor můžeme diagnostikovat podle jeho vlivu na tvar a polohu aktivační křivky.

Dělení kompetitivních ligandů na agonisty, parciální agonisty, kompetitivní inhibitory a inverzní agonisty přímo souvisí s hodnotami  $Y_{max}$ , resp.  $E$ . Klasičtí („plní“) agonisté jsou schopni aktivovat téměř 100 % přítomných receptorů (viz vztah 6) nebo alespoň velmi blízkou hodnotu.

Aktivační křivky parciálních agonistů mají oproti klasickým agonistům snížené maximum a zvyšováním koncentrace již nelze dosáhnout vyšší aktivace receptorů.

Vazba kompetitivního antagonisty nevyvolává aktivaci ( $Y_{max}=0$ ) receptoru, v ideálním případě vazbou na vazebné místo pro agonistu pouze stericky brání aktivaci receptoru.

Činnost inverzního agonisty je možné pozorovat zejména u receptorů s konstitutivní (samovolnou, nevyvolanou agonistou) aktivitou, neboť inverzní agonista tuto konstitutivní aktivitu potlačuje ( $Y_{max}<0$ ).

Na obr. 14 jsou uvedeny aktivační křivky pro jednotlivé typy kompetitivních ligandů.

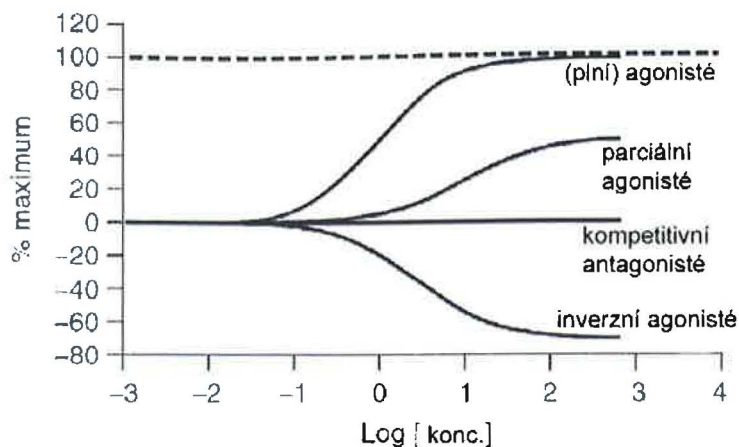
Místo vazby ligandu, resp. jeho relativní vzdálenost od místa působení agonisty, je rovněž možné zjistit z tvaru a polohy aktivační křivky, resp. z charakteru deformace aktivační křivky tímto ligandem. Na obr. 15 jsou uvedeny příklady vlivů různých typů ligandů na aktivační křivku agonisty.

Vzhledem k tomu, že „čistý“ kompetitivní antagonist působí ze stejného vazebného místa jako agonista, je tento agonista (v závislosti na poměru afinit agonisty a komp. antagonisty) schopen při zvýšení koncentrace účinek kompetitivního antagonisty potlačit a aktivační křivka se pouze posune k vyšším koncentracím. Ve vyjádření aktivační funkce pomocí Hillovy rovnice se tak změní pouze hodnota  $EC_{50}$  (zvýší se), bez snížení maximální účinnosti agonisty  $Y_{max}$  nebo Hillova koeficientu  $H$ .

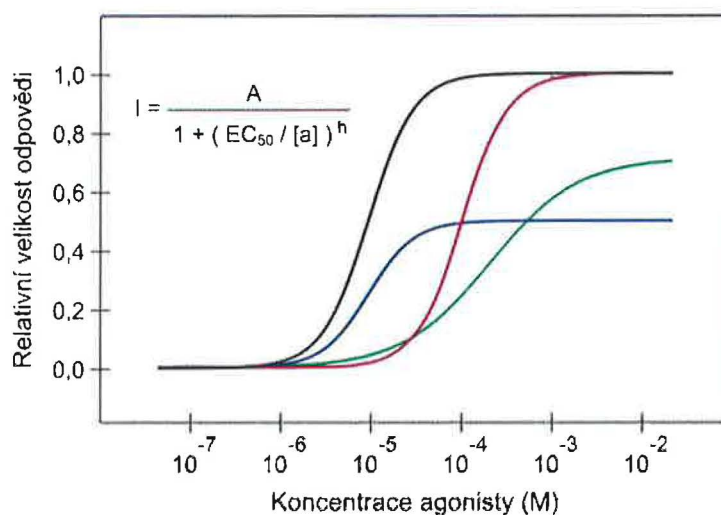
Naproti tomu nekompetitivní antagonist díky tomu, že působí odjinud než agonista, může ovlivnit jak  $EC_{50}$ , tak  $Y_{max}$  a nadbytek agonisty většinou není schopen potlačit účinek nekompetitivního antagonisty.

Alosterický modulátor je schopen pozměnit všechny tři parametry Hillovy rovnice, tj.  $EC_{50}$ ,  $Y_{max}$  i  $H$ . Působí odjinud než agonista a alosterie je charakterizována právě tímto působením na dálku, které ovlivňuje děj přenosu informace o vazbě agonisty či mechanismus otevírání iontového kanálu.

U reálných ligandů často není působení spojeno jen s jedním mechanismem a např. kompetitivní inhibitor může působit i napětově závislou blokádu otevřeného kanálu.



**Obrázek 14 - Aktivační křivky různých typů kompetitivních ligandů - rozdělení podle maximální míry aktivity:** (plní) agonisté jsou schopni aktivovat až 100 procent přítomných receptorů. Maximální účinnost parciálních agonistů je oproti klasickým agonistům výrazně snížena. Kompetitivním ligandem s nulovou účinností otevírání kanálu je kompetitivní antagonist, jenž pouze stericky brání nasednutí případného agonisty. Poslední, inhibiční křivka popisuje účinek inverzního agonisty se zápornou účinností otevírání. Převzato z (T. Kenakin, 2006).



**Obrázek 15 - Příklady ovlivnění tvaru a polohy aktivační křivky působením různých typů ligandů:** černě je znázorněna aktivační křivka agonisty ( $Y_{max}=1$ ,  $EC_{50}=10^{-5}M$  a  $H=2$ ). Červená křivka popisuje aktivaci ovlivněnou kompetitivním antagonistou. Došlo pouze k posunutí aktivační křivky směrem k vyšším koncentracím, tj.  $EC_{50}=10^{-4}M$ . Modrou barvou je znázorněna aktivace pod vlivem nekompetitivního antagonisty. Je možná změna jak  $EC_{50}$ , tak maximální účinnosti  $Y_{max}$  (zde  $Y_{max}=0,5$ ). Zelená aktivační křivka popisuje aktivaci ovlivněnou alosterickým modulátorem, jenž je schopen působit na různé části aktivačního procesu a měnit tak všechny tři parametry Hillova vynesení ( $EC_{50}$ ,  $Y_{max}$  i  $H$ ; zde  $H=1$ ).

#### 1.4.8 Metody odhadu afinity kompetitivního antagonisty

Afinita kompetitivních antagonistů ve velké míře vypovídá o schopnosti těchto látek blokovat činnost kanálu. Vyjadřuje se pomocí rovnovážné disociační konstanty  $K_B$ . Tento parametr je spojený s chemickými silami reversibilní interakce mezi antagonistou a receptorem a v ideálním případě je nezávislý na lokalizaci receptorů a jejich funkci (T.P. Kenakin, 1984). Nejčastěji se pro určení  $K_B$  používají dvě metody: Schildova regrese (O. Arunlakshana a H.O. Schild, 1959) nebo Cheng-Prusoffova analýza (Y. Cheng a W.H. Prusoff, 1973)

Schildova metoda vyžaduje kompletní aktivační křivku agonisty a několik hodnot velikosti relativní odpovědi v přítomnosti inhibitoru (díky Schildově směrnici nejsou aktivační křivky v přítomnosti inhibitoru potřeba kompletní, neboť se kompetitivnost dokazuje pomocí směrnice Schildova vnesení - nemusí být několik paralelně posunutých aktivačních křivek). V některých případech však bývá technicky schůdnější měření inhibiční křivky antagonisty a zde se uplatňuje analýza Cheng-Prussofa. Tato metoda však s sebou nese nebezpečí stanovení zdánlivých disociačních konstant, které však postrádají reálný smysl. Prostřednictvím Cheng-Prussofova postupu nelze spolehlivě stanovit charakter antagonisty a zejména v případě smíšeného mechanismu působení ligandu na receptor tak metoda selhává - vztah je odvozován pro „čistý“ kompetitivní antagonismus.

#### 1.4.8.1 Metoda Cheng-Prussofova

Původní Cheng-Prussofova rovnice (Y. Cheng a W.H. Prusoff, 1973) určovala afinitu inhibitoru enzymatické reakce z experimentální hodnoty tzv.  $I_{50}$  (koncentrace inhibitoru způsobující pokles rychlosti enzymatické reakce na polovinu rychlosti reakce v nepřítomnosti inhibitoru, a to při konstantní koncentraci substrátu  $S$ ). Tato metoda vyžaduje znalost afinity substrátu vzhledem k enzymu ( $K_m$ ):

$$K_i = \frac{I_{50}}{1 + \frac{S}{K_m}} \quad (13)$$

Velice rychle byla přejata farmakology a používána ve funkčních studiích na ligandem aktivovaných receptorech. Ve formalizmu popisujícím interakci receptorů a jejich ligandů nabývá tato rovnice následujícího tvaru:

$$K_B = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{A}{EC_{50}}} \quad (14)$$

kde  $K_B$  je afinita (disociační konstanta) kompetitivního inhibitoru,  $IC_{50}$  koncentrace inhibitoru způsobující pokles odpovědi receptoru při koncentraci agonisty  $A$  na polovinu.  $EC_{50}$  je koncentrace agonisty vyvolávající odpověď rovnou 50% maximální odpovědi. Podrobné odvození tohoto tvaru lze najít např. v (D.A. Craig, 1993).

Avšak, jak se ukázalo, rovnici v této formě lze užít pouze ve velice omezeném množství případů. Platí pouze pro případ kompetitivního inhibitoru působícího na systém agonista-receptor s Hillovým koeficientem aktivační křivky agonisty rovným jedné (P. Leff a I.G. Dougall, 1993). Vzhledem k tomu, že většina ligandem řízených kanálů je aktivována více než jednou molekulou agonisty a z funkčních důvodů je výhodná kooperativní vazba, je pak uplatnění rovnice (14) značně omezené. Pro obecnější případ kompetice inhibitoru



s agonistou, jehož aktivační funkce má Hillův koeficient různý od 1, pak platí modifikovaný tvar rovnice Cheng-Prusoffovy odvozený Leffem a Dougalem (P. Leff a I.G. Dougall, 1993):

$$K_B = \frac{IC_{50}}{\sqrt[H]{2 + \left(\frac{[A]}{EC_{50}}\right)^H} - 1} \quad (15)$$

Význam znaků je stejný jako u původního vztahu (14). Navíc zde vstupuje do hry Hillův koeficient aktivační křivky agonisty  $H$  (pro  $H=1$  přechází na tvar 14).

#### 1.4.8.2 Schildova regrese

Schildova metoda je historicky první metoda, podle níž bylo možné provést odhad afinity kompetitivních antagonistů (O. Arunlakshana a H.O. Schild, 1959). Vychází z míry posunutí aktivačních křivek agonisty pod vlivem různých koncentrací kompetitivního agonisty (D. Colquhoun, 2007, F.J. Ehlert, 1988, T. Kenakin, 2006, D.J. Wyllie a P.E. Chen, 2007). V praxi funkčních studií to znamená, že aktivační křivky pro agonistu se pod vlivem různých koncentrací antagonisty sice posunují směrem k vyšším koncentracím (posunutí je charakterizováno hodnotou  $DR$ , tzv. „dose ratio“, které vyjadřuje poměr koncentrací agonisty schopného kompenzovat změnu aktivační křivky vyvolané přítomností antagonisty), avšak jejich tvar (Hillův koeficient) a výška maxima zůstávají zachovány.

Základní vztah Schildovy regrese má tvar:

$$\log(DR - 1) = \log[B] - \log K_B \quad (16)$$

V Schildově regresi se vynášejí hodnoty  $\log(DR - 1)$  na osu  $y$  a  $\log[B]$  na osu  $x$ . Průsečík lineárního vynesení s osou  $x$  určuje hodnotu disociační konstanty kompetitivního inhibitoru:

$$\log[B] = \log[K_B] \quad (17)$$

Důležitou, ale ne postačující podmínkou platnosti (17) je hodnota směrnice vynesení. Proložíme-li graf lineární funkcí  $y = y_0 + ax$ , pak  $a$  musí být v případě kompetice rovno jedné. Fakt, že  $a$  je odlišné od 1, pak znamená, že je inhibitor nekompetitivní nebo není čistě kompetitivní, popř. mohou nastávat další situace jako např. kooperativní jevy. Jak jsem naznačila, nelze užít opačné implikace, tj. hodnota směrnice rovna jedné ještě nezaručuje kompetitivnost inhibitoru.

Obecně se má za to, že právě Schildova metoda podává poměrně přesný odhad afinity kompetitivního antagonisty. Pro podrobné odvození vztahu (16) a (17) viz kapitolu 7.1.

## 1.5 Ligandy svalového nAChR

### 1.5.1 Agonisté

Endogenním plným agonistou nAChR je acetylcholin (ACh, obr. 16a), neuropřenašeč na cholinergních synapsích jak v mozku, tak na nervosvalové ploténce. ACh a další agonisté se zpravidla váží do proteinové kapsy na rozhraní  $\alpha/\delta$  a  $\alpha/\epsilon$  (resp.  $\alpha/\gamma$  v případě embryonálních nAChR) podjednotek se zásadním přispěním dvojice sousedících cysteinů  $\alpha:C^{192}C^{193}$ . Tato dvě vazebná místa jsou afinitně neekvivalentní. Vazba agonistů výrazně zvyšuje dobu otevření iontového kanálu. Způsob, jakým se tak stává, je dosud ne zcela uspokojivě popsán. Existuje několik modelů aktivace. Mezi agonisty svalového nAChR patří dále např. karchol, suberyldicholin (S.M. Sine a J.H. Steinbach, 1984), nikotin zobrazený na obr. 16b (P. Gardner a kol., 1984) a u svalových nAChR málo efektivní epibatidin zobrazený na obr. 16d (H.R. Arias, 2000, J.C. Cooper a kol., 1996). Ačkoliv můžeme mezi agonisty najít chemicky rozdílné sloučeniny, zdá se, že výhodou pro potenciální aktivační účinek je přítomnost kationtové hlavičky (např. kvarterního dusíku) vzdáleného 5,9 Å od akceptoru vodíkové vazby, např. acetátu (W.H. Beers a E. Reich, 1970).

### 1.5.2 Kompetitivní antagonisté

Mezi kompetitivní antagonisty řadíme všechny látky působící z ACh místa, které nejsou schopny vyvolat otevření kanálu. Aktivace kanálu může být inhibována chemicky různorodými ligandy, které kompetují (soutěží o vazebné místo, stericky brání nasednutí) o vazebné místo. O tom, zda se jedná o kompetitivní antagonismus, je možné se přesvědčit užitím elektrofyziologických či vazebných technik s použitím analýzy aktivačních křivek. Příkladem kompetitivních antagonistů jsou (+)-tubokurarin (obr. 16c) (G.J. Strecker a M.B. Jackson, 1989), u kterého však byl na svalovém nAChR pozorován i účinek prostřednictvím dalších mechanismů. Nejčastěji byla pozorována funkce kompetitivního inhibitoru nAChR (R.R. Neubig a J.B. Cohen, 1979, S.M. Sine a P. Taylor, 1981), avšak také funkce blokátoru otevřeného kanálu (D. Colquhoun a kol., 1979). (+)-Tc je také schopný slabé aktivace, resp. parciálního agonismu (J.H. Steinbach a Q. Chen, 1995, K. Takeda a A. Trautmann, 1984, L. Ziskind a M.J. Dennis, 1978).

Dále patří mezi kompetitivní antagonisty pankuronium (G.H. Fletcher a J.H. Steinbach, 1996, M. Liu a J.P. Dilger, 2009). Někdy se mezi ně řadí i  $\alpha$ -bungarotoxin (H.R. Arias, 1997), velký polypeptidový  $\alpha$ -toxin hada *Bungarus multicinctus*, jenž se pseudo-ireverzibilně (vykazuje velice pomalou disociační kinetiku) váže na  $\alpha$  podjednotku nAChR a jeho radioaktivní deriváty jsou tak používány ke značení a kvantifikaci receptorů.

To, zda bude nasednutý ligand působit cestou aktivace kanálu, aktivně bránit otevření kanálu (tzv. inverzní agonista) nebo pouze jako sterická „záplata“ bránit nasednutí účinných agonistů, je zřejmě závislé na množství strukturálních detailů, které zatím dobře neznáme. Interakce (či nepřítomnost této interakce) s konkrétními aminokyselinami vazebného místa tak může ovlivnit přenos informace o vazbě vedoucí k otevření iontového kanálu a tím rozhodnout o výsledné účinnosti otevírání  $Y_{max}$ .

### 1.5.3 Nekompetitivní antagonisté

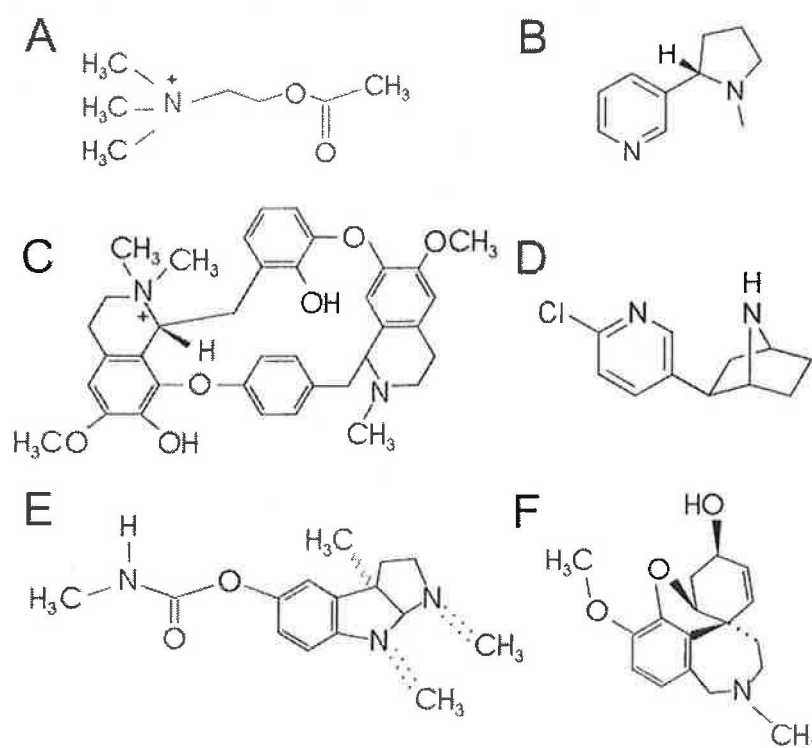
Tyto ligandy inhibují proudovou aktivitu vyvolanou agonistou, aniž by mu bránily v nasednutí. Jedná se o strukturálně i chemicky velice různorodou skupinu s různou lokalizací vazebného místa. Často se jedná o blokátory otevřeného kanálu. Vzhledem k nábojové selektivitě nAChR a typickému negativnímu membránovému potenciálu je vyžadován kladný náboj tohoto blokátoru. Ze stejného důvodu je možné klasifikovat blokádu iontového kanálu podle napěťové závislosti tohoto jevu. Příkladem nekompetitivního inhibitoru nAChR je neuroleptikum chlorpromazin (M.O. Ortells a G.G. Lunt, 1994), šípový toxin z kůže kolumbijské žáby pralesničky ohnivé (*Dendrobates histrionicus*) histrionikotoxin (T. Heidmann a kol., 1983), quinakrin (H.R. Arias, 1998, M. DiPaola a kol., 1990) nebo filantotoxin, toxin hmyzu květoliba včelího (*Philanthus triangulum*) (V. Jayaraman a kol., 1999), jenž je schopen blokovat i AMPA receptory.

### 1.5.4 Alosterické modulátory

Negativní alosterické modulátory se někdy řadí mezi nekompetitivní blokátory. Inhibují iontový kanál z místa odlišného od vazebné domény agonisty, odkud ovlivňují kinetické vlastnosti kanálu, jako je rychlost otevírání, popř. přechod do desensitizovaného stavu. Kromě negativních modulátorů je pozorováno i množství pozitivních alosterických modulátorů zvyšujících pravděpodobnost otevření, popř. snižujících afinitu desensitizovaného stavu. Příkladem alosterického modulátoru jsou některé steroidy působící zejména v transmembránové části receptoru (C.H. Kindler a kol., 2000), ATP (V.A. Eterovic a kol., 1990) nebo exogenní lokální anestetika (S.M. Sine a P. Taylor, 1982). U neuronálních receptorů je pozorována modulační funkce  $Ca^{2+}$  kationtů vázaných na F-smyčku (J.L. Galzi a kol., 1996). Obecně stojí za zmínku, že část ligandů je schopna ovlivňovat (rozdílnými mechanismy) funkci celé škály chemicky aktivovaných receptorů, ať už je jejich lokalizace a fyziologická funkce jakkoli odlišná (H.R. Arias, 1999).

## 1.5.5 Nekompetitivní agonisté

Hlavním znakem nekompetitivních agonistů je schopnost aktivovat receptor z jiného místa než klasičtí agonisté. Často se nekompetitivní agonisté projevují i jako pozitivní alosterické modulátory. Tímto způsobem mohou posilovat synaptický přenos u některých forem dědičných myasthenických syndromů s poškozením ACh vazebného místa nAChR, popř. potencovat cholinergní přenos oslabený jinými mechanismy. Mezi důležité nekompetitivní agonisty počítáme inhibitory acetylcholinesterázy (AChE) physostigmin zobrazený na obr. 16e (A. Maelicke a kol., 1993, E.F. Pereira a kol., 1993a, A. Schrattenholz a kol., 1993a) a galanthamin jehož strukturu můžeme vidět na obr. 16f (E.F. Pereira a kol., 1994). Jejich terapeutický účinek je způsoben hlavně inhibicí acetylcholinesterázy (AChE) a nekompetitivní agonistický účinek je pozorovatelný jen při vyšších koncentracích (vzhledem k účinku na AChE) a v experimentálních modelech, kde se inhibiční účinek na cholinesterázu neuplatňuje. Slabý aktivační účinek byl nalezen i u bojové látky somanu, avšak v poměrně vysokých koncentracích ( $K_D$  v řádu mM), které jsou již pro jeho AChE inhibici pro organismus fatální. Dalšími nekompetitivními agonisty jsou kodein, edrophonium a další.



Obrázek 16 – Struktura ligandů nikotinického acetylcholinového receptoru: a) acetylcholin, b) nikotin, c) (+)-tubokurarin, d) epibatidin, e) physostigmin, f) galanthamin.

## 1.6 Acetylcholinesteráza a nAChR

### 1.6.1 Nervosvalový přenos v číslech

Při kvantovém výlevu doprovázejícím nervosvalovou signalizaci se z nervových zakončení motorických neuronů vylije do synaptické štěrbině cca 10 000 molekul ACh (S.W. Kuffler a D. Yoshikami, 1975). Poté ACh difunduje přes štěrbinu k postsynaptické membráně s nAChR. Musí projít přes tzv. bazální laminu (součást extracelulární matrix kolem nervových zakončení, svalových a Schwannových buněk) obsahující enzym acetylcholinesterázu (enzym štěpící v synaptické štěrbině ACh na cholin a acetát, zabraňující dlouhodobé stimulaci postsynaptických receptorů acetylcholinem).

Doba difuze přes štěrbinu je v řádu  $\mu\text{s}$ . Vazba ACh na receptor a AChE trvá okolo 20  $\mu\text{s}$  (odvozeno z rychlostních konstant), avšak doba aktivačních salv se pohybuje v průměru okolo 11 ms pro embryonální a 1 ms pro dospělý receptor (Y. Gu a kol., 1990). Po několika desetínách ms klesá koncentrace ACh v synaptické štěrbině vlivem rozkladu pomocí AChE pod hodnotu schopnou efektivně aktivovat nAChRy (navázat najednou 2 molekuly ACh) a vyvolat stah svalu, tj. doba aktivace nAChR je limitována dobou setrvání agonisty na vazebném místě nAChR. S tím také souvisí fakt, že ve fyziologických podmínkách se u svalových receptorů prakticky neprojeví desensitizace – ztráta aktivity receptorů většinou následující po delším působení agonisty na receptor. K desensitizaci totiž dochází teprve po 20 ms kontinuální přítomnosti ACh (N. Matsubara a kol., 1992), což se ve světle zde popsaných kalkulací jeví poměrně nepravděpodobné. Jev desensitizace si tak vysvětlují jako účinnou obranu organismu před excitotoxicitou způsobenou různými patologickými stavy.

### 1.6.2 Kation- $\pi$ interakce – společný činitel účastnící se vazby ACh na AChE, AChBP a nAChR

Aktivní centrum AChE, které je umístěno na dně jícnu (aromatické kapsy) uvnitř elipsoidního proteinu AChE, se skládá z tzv. anionického místa a esterického místa. Anionické místo (charakteristické přítomností E<sup>327</sup>, číslování aminokyselin podle AChE *T. californica*) váže kvarterní dusík ACh molekuly a směřuje ji tak do esterického místa (S<sup>200</sup>, H<sup>440</sup>), kde se váže acetát ACh a probíhá vlastní hydrolýza. Aminokyseliny S<sup>200</sup>, H<sup>440</sup> a E<sup>327</sup> se nazývají katalytická triáda a jsou konzervovány napříč celou skupinou serinových hydroláz. Stěny jícnu vedoucího k aktivnímu centru jsou obloženy 14 vysoce konzervovanými aromatickými aminokyselinami (W, Y). Kromě elektrostatické interakce mezi kvarterním dusíkem ACh a zápornými náboji D či E anionického místa tak udržuje ACh v aktivním centru i kation- $\pi$  interakce mezi kvarterním dusíkem ACh a  $\pi$ -elektrony aromatických aminokyselin stěn aktivního centra. V případě AChE se sice důležitost aromatických residuí klade zejména na jejich funkci při



usnadnění difuze ACh molekul dovnitř jícnu aktivního centra, avšak je prokázáno, že kation- $\pi$  interakce ACh s W<sup>84</sup> se účastní také přímo vazby v anionickém místě (J.L. Sussman a kol., 1993).

Tuto „aromatickou kapsu“ můžeme najít také u AChBP, kde se aromatické aminokyseliny rovněž účastní vazby ACh. V hlavní části vazebného místa jsou to W<sup>143</sup> (J.L. Galzi a kol., 1991a), Y<sup>185</sup> a Y<sup>192</sup> (R.E. Middleton a J.B. Cohen, 1991), na komplementární straně pak W<sup>53</sup> (Y. Xie a J.B. Cohen, 2001).

Vzhledem k tomu, že AChBP a nAChR měly společného předka (P.H. Celie a kol., 2005), nepřekvapí, že u nAChR podjednotek najdeme aromatické aminokyseliny ekvivalentní aminokyselinám účastnících se vazby u AChBP, přičemž u nich byla potvrzena úloha při aktivaci kanálu (tab. 3).

Obecně u všech Cys-loop receptorů nacházíme účast aromatických aminokyselin na vazbě neurotransmiterů. Ačkoliv tyto přenašeče neobsahují přímo kvarterní dusík, často nesou alespoň koncový atom dusíku s kladným nábojem schopným kation- $\pi$  interakce (D.L. Beene a kol., 2002, S. Lummis a kol., 2005). Analýza dvou typů ionotropních serotoninových receptorů ukázala, že aromatické aminokyseliny podílející se na vazbě 5-HT jsou posazeny na odlišných místech aromatického boxu (T.W. Mu a kol., 2003), což vede k myšlence, že minimálně část neurotransmiterů či dalších kompetitivních ligandů nenesedá do vazebných míst jako klíč do zámku, nýbrž jako klín - je zde větší sterická volnost.

Je možné, že k výhodnosti kation- $\pi$  interakce při vazbě ACh a jiných látek s terciárním či kvarterním dusíkem došla příroda nezávisle konvergencí jako u mnoha dalších proteinů, avšak podobnost mezi vazbou ACh na AChE, AChBP a nAChR u těchto strukturálních prvků nezůstává.

AChBP	nAChR
	hlavní část vazeb. místa ( $\alpha$ 1)
W <sup>143</sup> (Galzi, Bertrand et al. 1991)	W <sup>149</sup> (Galzi, Bertrand et al. 1991) (Zhong, Gallivan et al. 1998)
Y <sup>185</sup> (Middleton and Cohen 1991)	Y <sup>190</sup> (Chen, Zhang et al. 1995)
Y <sup>192</sup> (Middleton and Cohen 1991)	Y <sup>198</sup> (Sine, Quiram et al. 1994)
	komplementární část vazeb. místa ( $\gamma$ )
W <sup>53</sup> (Xie and Cohen 2001)	W <sup>55</sup> (Corringer, Galzi et al. 1995)

**Tabulka 3 - Aromatické aminokyseliny účastnící se vazby ACh v AChBP a nAChR.** AChBP a nAChR mají společného předchůdce, proto lze (nejen v případě aromatických ACh vazných aminokyselin) najít velkou podobnost mezi jejich ACh vazebným místem.

### 1.6.3 Inhibitory AChE

Pro nás významnou skupinou IChE jsou látky způsobující inhibici činnosti AChE přímo v jejím aktivním centru, tzv. karbamáty. Jsou to estery karbamové kyseliny s alkoholy, obsahující terciární (physostigmin – Phy, galanthamin - Gal) nebo kvarterní dusík (pyridostigmin). Vážou se na obě místa aktivního centra AChE, v anionickém místě jsou poměrně silně vázány nabitým dusíkem pomocí kation- $\pi$  interakce (E. Gavuzzo a M. Pomponi, 2002), zatímco esterová část molekuly blokuje katalytickou triádu (zejména  $S^{200}$ ). Karbamáty se tak v AChE aktivním centru vážou podobným mechanismem jako molekula ACh. Vzhledem k podobnosti interakce mezi ACh s AChE, resp. ACh s nAChR tak vyvstává otázka, zda nemohou karbamáty interagovat také s acetylcholinovým vazebným místem u svalových nAChR.

### 1.6.4 Interakce physostigminu a galanthaminu s nAChR

Již delší dobu se některé IChE používají v léčbě chorob jako např. Alzheimerova choroba či myastenia gravis. Mezi ně patří i Phy a Gal. Dříve se mělo za to, že tyto sloučeniny působí na cholinergní transmissi pouze prostřednictvím blokády AChE (zvyšují koncentraci ACh na synapsích). Bylo však prokázáno, že tyto látky mohou interagovat i přímo s nAChR. Nejprve byla potvrzena funkce Phy a Gal jakožto slabých nekompetitivních agonistů nAChR receptorů. Bylo zjištěno, že Phy se váže na sekvenci  $\alpha 1:109-151$ , konkrétně na  $\alpha 1:K^{125}$  (číslování podle nAChR elektrického orgánu *T. marmorata*; (A. Schratzenholz a kol., 1993b). Vazebné místo pro Phy se částečně překrývá s vazebným místem pro monoklonální protilátku FK1 (E.F. Pereira a kol., 1994). Z analýzy hydrofobicity vyplývá, že toto vazebné místo leží v amfipatické oblasti extracelulární N-koncové domény. Za zmínku stojí, že  $\alpha 1:K^{125}$  je konzervovaný u většiny  $\alpha$  podjednotek nAChR, avšak v ostatních non- $\alpha$ -podjednotkách, se nenachází, jak píše Galzi a kol. (J.L. Galzi a kol., 1991b).

Elektrofyzilogickou metodou snímání jednotlivých kanálů bylo potvrzeno, že otevření způsobená aplikací Phy vykazují stejnou vodivost jako otevření způsobená ACh, avšak aktivace physostigminem nevedla ke clusteringu (shlukování jednotlivých otevření iontového kanálu) typickému pro odpovědi na ACh (J.C. Cooper a kol., 1996, K.P. Shaw a kol., 1985, R.E. Wachtel, 1993). Kromě slabých agonistických účinků byla při vyšších koncentracích Phy pozorována i inhibice nAChR a blokáda otevřeného kanálu (E.X. Albuquerque a kol., 1984, J. Bufler a kol., 1996, K.O. Okonjo a kol., 1991, R. Zwart a kol., 2000). Na některých podtypech neuronálních nAChR se Phy chová jako pozitivní alosterický modulátor. Právě tento účinek (vedle funkce IChE) by mohl být využit při léčbě chorob spojených s nedostatkem cholinergního přenosu (A. Maelicke a E.X. Albuquerque, 2000). Konkrétně u Phy je však situace složitější, neboť má velice úzké terapeutické rozmezí (rozmezí

koncentrací, kde již je patrný farmakologický účinek a zároveň ještě nepůsobí na organismus toxicky). Z tohoto důvodu se v klinické praxi využívají deriváty Phy jako neostigmin, pyridostigmin, apod.

Galanthamin, alkaloid ze sněženky podsněžníku *Galanthus nivalis*, byl poprvé izolován r. 1959. Bylo prokázáno, že submikromolární koncentrace Gal potencují odpovědi nAChR na 0,1 mM ACh. Gal rovněž alostericky zvyšuje afinitu ACh k receptorům (A. Maelicke a kol., 2000). Vyšší než mikromolární koncentrace Gal naopak odpovědi pravděpodobně mechanismem blokády otevřeného kanálu snižují. Dále byl pozorován vliv Gal na snížení míry desensitizace nAChR aktivovaných acetylcholinem (A. Maelicke a kol., 2001).

## 2 Cíle práce

### Vliv záporně nabitých aminokyselin $\delta:D^{180}$ a $\delta:E^{189}$ F-smyčky na aktivaci a inhibici svalových nAChR

1. Porovnat aktivaci embryonálního a dospělého svalového nikotinického receptoru exprimovaného v COS buňkách a pokusit se o interpretaci rozdílů.
2. Popsat způsob interakce (+)-Tc s dospělými a embryonálními nAChR exprimovanými v liniích COS.
3. Určit roli záporně nabitých aminokyselin glutamátu  $D^{180}$  a aspartátu  $E^{189}$  F-smyčky  $\delta$ -podjednotky v mechanismu aktivace a inhibice dospělého svalového receptoru.

### Interakce inhibitorů acetylcholinesterázy se svalovým nAChR

1. Prostudovat působení physostigminu na embryonální svalový nAChR.
2. Prostudovat působení galanthaminu na embryonální svalový nAChR.

## 3 Metody

### 3.1 Metoda terčíkového zámku (patch clamp)

Ke snímání transmembránových proudů procházejících iontovými kanály aktivovaných acetylcholinových receptorů jsme použili metodu terčíkového zámku (patch clamp) v konfiguraci snímání z celé buňky (whole cell) (O.P. Hamill a kol., 1981). Jedná se o jednoelektrode snímání celkových proudů vedoucích přes membránu vybrané buňky, kdy se toutéž elektrodou vkládá požadovaný transmembránový potenciál a zároveň měří proud přes membránu (konfigurace voltage-clamp). Tato metoda je vhodná pro snímání z malých buněk, u kterých proudy dosahují maximálně 10 nA. Patch clamp také dovoluje měřit membránové potenciály buněk (konfigurace current-clamp).

Naše aparatura se skládala z optického zařízení (inverzní mikroskop Olympus CKX 41, Tokyo, Japonsko; zvětšení objektivů 10x a 40x), antivibračního stolu (MICRO-g 63-530, Technical Manufacturing Company, Peabody, USA), Faradayovy klece pro odstínění vnějších elektrických signálů, mikromanipulátoru s dostatečně jemným posunem; přesnost < 1 μm (MP225, Sutter Instrument Co., Novato, CA USA) a soustavy pro měření metodou terčíkového zámku (obr. 17).

Elektrické zařízení pro vkládání požadovaného membránového potenciálu, aplikaci receptorových ligandů, snímání transmembránových proudů (pA až nA) a následné ukládání a zpracování naměřených dat, se skládá z:

- i. mikropipety z borosilikátového skla naplněné intracelulárním roztokem (ICS). ICS splňuje funkci vodivého spojení vnitřku mikropipety, resp. buňky se sondou.
- ii. sondy, jejíž měřicí elektroda je ponořena do intracelulárního roztoku mikropipety a referenční elektroda je ponořena do extracelulárního roztoku (ECS). Obě tyto elektrody jsou tvořeny stříbrnými drátky pokrytými AgCl. Funkci sondy můžeme popsat zjednodušeným náhradním schématem (obr. 18). Podstatnou částí je hybridní operační zesilovač s vysokým vstupním odporem, který je zapojen jako převodník proud-napětí, a další operační zesilovač zapojený jako sledovač určený k odečtení polarizačního napětí a obrácení polarity signálu.
- iii. vlastního zesilovače (Axopatch 200A, Axon Instruments, Union City, USA) dále zesilujícího a upravujícího napěťový signál. Zesilovač dále obsahuje obvody ke kompenzacím vlastního odporu skleněné mikroelektrody, kapacity mikroelektrody a buňky, a obvody ke generování polarizačního napětí a filtry.
- iv. analogo-digitálního (A/D) a digitálně-analogového (D/A) převodníku (DIGIDATA 1320A, Axon Instruments, Foster City, USA) převádějícího hodnoty měřeného proudu (napětí) do binární formy a polarizačního napětí řízeného počítačem do analogové formy.

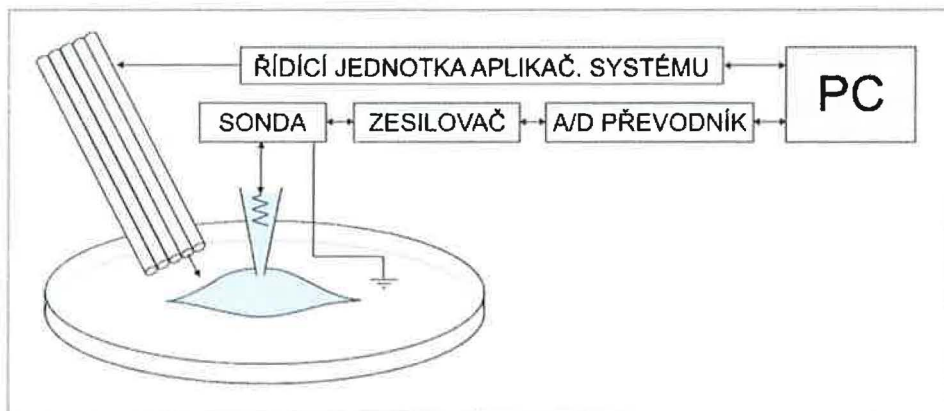


- v. osobního počítače s příslušným softwarovým vybavením (pCLAMP 9.0, Axon Instrument, Union City, USA)

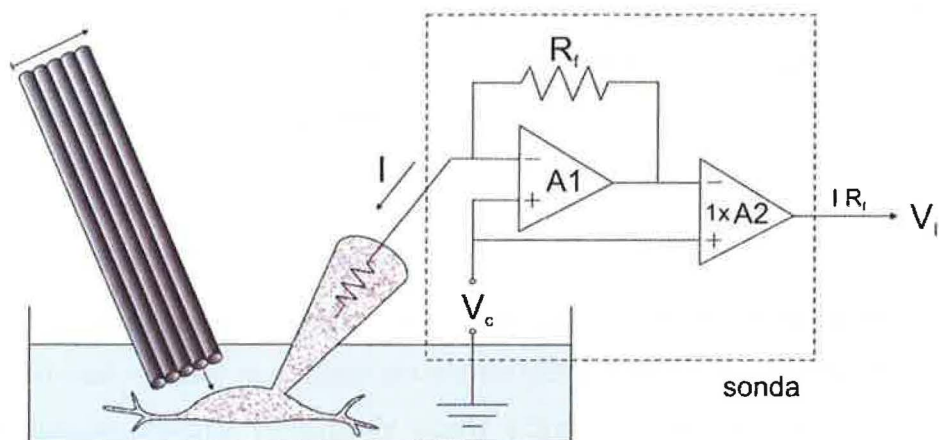
Aplikace aktivačních, popř. modulujících roztoků byla řízena

- vi. řídicí jednotkou aplikačního systému (vyvinuto na odd. Buněčné neurofyzologie AV ČR; Dittert a kol., 2006) umožňující tvorbu programů pro aplikace různých roztoků na povrch měřených buněk (nástup aplikace roztoku je cca 40 ms).

Konkrétní tvar programů se zadává do jednotky přes počítačové rozhraní. V průběhu pokusu vydává jednotka příkazy aplikačnímu systému k pohybu trubiček a aplikaci roztoků, a zároveň počítači k snímání a ukládání dat z A/D převodníku.



**Obrázek 17 – Schéma el. soustavy pro měření metodou terčíkového zámku:** signály ve formě změn membránového proudu se snímají prostřednictvím sondy vodivě spojené s vnitřkem buňky pomocí skleněné mikroelektrody. Tento signál je dále zesilován operačním zesilovačem a digitalizován A/D převodníkem. Digitalizovaný signál je možné dále zpracovávat pomocí softwaru připojeného osobního počítače. Rychlá aplikace roztoků je ovládána přes počítač prostřednictvím řídicí jednotky aplikačního systému.



**Obrázek 18 - Elektrické schéma sondy (headstage):** měřicí sonda se v zásadě skládá ze dvou elektrod (měřicí a referenční) a dvou operačních zesilovačů. Měřicí elektrodou je do buňky aplikován prostřednictvím gigaohmového zpětnovazebného rezistoru proud úměrný výstupnímu napětí operačního zesilovače A1. Napětový signál vycházející ze soustavy je pak úměrný (aplikovanému) transmembránovému proudu zesílenému koeficientem hodnoty odporu rezistoru.

### 3.1.1 Elektronika měřicího zařízení metody terčíkového zámku

Schéma měřicího systému je uvedeno na obr. 18. Referenční elektrodou jsme vkládali do ECS (resp. na membránu buňky) polarizační napětí  $V_c$  a měřicí elektrodou spojenou s invertovaným vstupem operačního zesilovače (OZ) sondy jsme snímali proudy procházející membránou buňky  $I$ . Zásadní součástí sondy jsou dva OZ. První zesilovač A1 plní funkci převodníku proud-napětí. Druhý, diferenciální zesilovač A2 signál invertuje a odečítá od něj hodnotu vkládaného polarizačního napětí. Funkce zapojení je v krátkosti taková, že z vnějšku (ze zesilovače řízeného počítačem) je na referenční elektrodu vkládáno polarizační napětí  $V_c$ , které přichází na neinvertovaný vstup A1. A1 tak tvoří na zpětnovazebné smyčce takový proud, aby napětí na invertovaném vstupu bylo stejné jako  $V_c$ . Tímto způsobem se registruje proud, který je potřeba k udržení buňky na předem nastaveném napětí  $V_c$ . Proudové podmínky na A1 lze podle Ohmova zákona popsat takto:

$$-I = I_f = \frac{V_{A1} - V_c}{R_f} \quad (18)$$

kde  $I$  je proud procházející měřicí elektrodou, resp. membránou buňky,  $I_f$  je proud procházející zpětnovazební smyčkou A1,  $V_{A1}$  je výstupní napětí A1 (napětí na invertovaném vstupu A2) a  $R_f$  je velikost zpětnovazebního odporu A1.

Po úpravě dostáváme tvar výstupního napětí  $V_{A1}$  jako:

$$V_{A1} = -I \cdot R_f + V_c \quad (19)$$

To znamená, že až na konstantní člen  $V_c$  a znaménko odpovídá napětí na výstupu A1 hodnotě proudu procházejícího membránou buňky násobené odporem ve zpětné vazbě  $R_f$ . Diferenciální zesilovač A2 se zesílením 1, na jehož neinvertovaný vstup přichází napětí  $V_c$ , tedy signál  $V_{A1}$  upravuje tak, že dostáváme napětí odpovídající membránovému proudu) správné polarity.

### 3.1.2 Skleněné mikroelektrody

Pro snadné vytvoření těsného spojení mezi mikropipetou a membránou buňky a ideální elektrické vlastnosti spojení je potřeba standardizovaný tvar pipety, průměr a povrch hrotu. Naším požadavkům nejlépe vyhovovaly pipety s hrotem o průměru cca 2  $\mu\text{m}$ . Skleněné mikropipety jsme vyráběli z trubiček se skleněným vláknem (borosilikátové sklo, vnější/vnitřní průměr 1,6 mm/1,2 mm) na horizontálním tahači Flaming/Brown micropipette puller, model P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA USA) Tento přístroj umožňuje získávat mikropipety s poměrně stabilními parametry. Základem tahače je platinový žhavicí plíšek definovaně zahříváný elektrickým proudem. Průběh vlastního procesu tahání se zadává jako řada cyklů s definovanou: rychlostí tahání, intenzitou žhavení tavicího plíšku, času a silou tahu.

Výsledný efekt, čili tvar a tloušťka elektrody, významně závisí na konkrétní geometrii žhavicího plíšku.

Z důvodu lepšího kontaktu s membránou se špička mikropipety vysokou teplotou otavuje (Narishge, Japonsko), čímž se lze zbavit nerovností a hlavně případných nečistot zachycených na hrotu. Výsledný odpor takto upravených mikropipet se v našich pokusech pohyboval od 2 do 6,5 MΩ.

## 3.2 Exprese rekombinantních receptorů

### 3.2.1 Transfekce trvalých linií podjednotkami nAChR

Měření byla prováděna na COS-7 nebo COS-1 liniích, které endogenně neexprimují žádné nikotinické receptory; ani u nich nebyla zjištěna exprese muskarinových receptorů. Tyto linie vznikly transformací mutantem opičího viru SV40 kódujícího T-antigen. Tento antigen je schopen rozpoznávat a umožnit přednostní expresi plasmidů obsahujících promotor viru SV40. Proto jsme COS linie transfekovali plasmidy tvořenými SV40 expresním vektorem pSM a cDNA jednotlivých podjednotek myších (*Mus musculus*) rekombinantních embryonálních ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) i dospělých ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) svalových nAChR (přirozených i bodově mutovaných). Plasmidy s cDNA přirozených podjednotek jsme získali od Dr. J. P. Merlieho (Washington University, St. Louis) (A. Buonanno a kol., 1986) a Dr. N. Davidsona (California Institute of Technology, Pasadena) (L. Yu a kol., 1986). Plasmidy obsahující cDNA mutovaných podjednotek jsme získali spoluprací s Dr. Z. W. Hallem (University of California, San Francisco). Plasmidy byly uchovávány a pěstovány v kompetentních buňkách *E. coli* JM 109 a poté izolovány standardní procedurou za použití QIAGEN® Plasmid Midi Kit (25) (Qiagen). Takto získanou DNA jsme přechodně transfekovali zmíněné COS-7, resp. COS-1 linie pomocí činidla Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA USA).

Kontrola transfekce byla prováděna pomocí kotransfekce COS buněk plasmidovou DNA nAChR podjednotek a plasmidy kódující CD4 membránové proteiny. Koexprimované CD4 proteiny lze detekovat pomocí Dynabeads® M-450 CD4 (DynaL Biotech ASA, Oslo, Norsko), což jsou superparamagnetické polystyrenové kuličky pokryté primární monoklonální protilátkou proti CD4 proteinům. Předpokládá se, že buňky s efektivně exprimovanými CD4 proteiny a nasedlými kuličkami, které lze pod optickým mikroskopem přímo pozorovat, budou vykazovat expresi nAChR receptorů.

### 3.2.2 Tkáňové kultury

COS-7 (COS-1) buňky byly před transfekcí pasážovány a inkubovány v D-MEM s 10% FCS. Transfekce byla prováděna 2.-4. den po pasáži (v závislosti na hustotě nasazených buněk) na 24jamkové destičce. Při transfekci se používalo medium Optimem, na disociaci buněk

pak roztok versenu s trypsynem. Po transfekci byly buňky opět kultivovány v D-MEM s 10% FCS, tentokrát se 4% roztokem FUDR. FUDR se přidával z důvodu zamezení dalšího dělení, neboť se u netransfekovaných buněk pozorovala vyšší rychlost dělení a populace buněk bez nAChR tak převážila nad transformovanými buňkami.

### 3.2.3 Optimalizace transfekce pomocí fluorescenčního měření

Svalové nAChR receptory jsou z cca 4 % propustné pro vápenaté ionty  $Ca^{2+}$ . Proto mohl být postup transfekce optimalizován pomocí mikrofluorometrických měření vtoku vápníku. U úspěšně transfekovaných COS buněk se po aplikaci ACh nebo jiného účinného agonisty otevírá velké množství nAChR a do buněk z vnějšího media (ECS) vtékají  $Ca^{2+}$  ionty. Ionty  $Ca^{2+}$  mohou být uvnitř buňky chelátovány sondou FURA-2 (Invitrogen, Eugene, USA), jejíž excitační spektrum je závislé na stavu obsazení sondy ionty  $Ca^{2+}$ . Vrchol excitace volné sondy (363 nm) se vazbou na  $Ca^{2+}$  přesouvá ke kratším vlnovým délkám (335 nm). Rychlá změna koncentrace  $Ca^{2+}$  uvnitř buňky, způsobená např. aktivací nAChR, tak může být registrována pomocí poměrového měření excitace, resp. emise sondy FURA-2.

Buňky kultivované na sklíčkách byly inkubovány v misce s 1 ml ECS obsahující 2  $\mu$ M FURA-2 po dobu 45 min při pokojové teplotě. Měření byla prováděna na Cell<sup>^</sup>R imaging systému (Olympus, Hamburg, Německo) obsahujícím invertovaný mikroskop Olympus IX81 (Olympus, Tokyo, Japonsko). Excitační signál (340 nm, resp. 380 nm) byl vytvářen polychromátorem Polychrome V (Till Photonics, Grafelfing, Německo), fluorescenční emise (510 nm) byla detekována kamerou Hamamatsu Orca ER (Herrsching am Ammersee, Německo). Pro rychlou aplikaci roztoků ECS, resp. ECS s agonisty jsme použili sedmikanálový systém s magnetickými ventily (vyrobený na našem oddělení).

## 3.3 Podmínky pokusů

Elektrofyzilogické i fluorescenční pokusy, které následovaly 48-96 hodin po transfekci, byly prováděny při teplotě 22-26 °C. Při elektrofyziologických měřeních jsme skleněné mikroelektrody plnili intracelulárním roztokem ICS. Buňky byly v průběhu měření uchovávány v ECS. Agonisté, inhibitory a modulátory nAChR byly při elektrofyziologických i fluorescenčních měřeních v požadované koncentraci rozpuštěny v ECS a krátkodobě aplikovány na buňky.

## 3.4 Statistické zpracování

Aktivační křivky dávka-odpověď byly prokládány Hillovou rovnicí ve tvaru

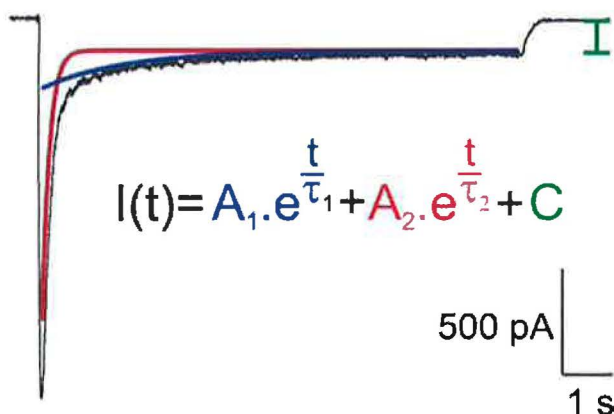
$$I(C) = \frac{C^H}{C^H + EC_{50}^H} \quad (20)$$

kde  $C$  je koncentrace agonisty,  $I(C)$  je relativní hodnota transmembránového proudu (vztažená k maximálnímu dosaženému proudu),  $EC_{50}$  je koncentrace vyvolávající odpověď o velikosti 50% maximální odpovědi – jinak také zdánlivá disociační konstanta agonisty,  $H$  je Hillův koeficient.

Přestože je desensitizační pokles odpovědi zřejmě složen z více exponenciálních komponent, důvody technického rázu (nepřesnost měření, problémy s určením většího počtu volných parametrů) nás vedly k omezení počtu exponenciálních složek na dvě. Desensitizační fázi odpovědi jsme tedy pomocí programu Clampfit 9 (Axon Instruments, Union City, USA) prokládali dvouexponenciální funkcí s konstantním platem:

$$A(t) = A_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + C \quad (21)$$

kde  $A_1$ ,  $\tau_1$  a  $A_2$ ,  $\tau_2$  jsou amplitudy a časové konstanty obou exponenciálních komponent a  $C$  je hodnota konstantního plata nedesensitizující složky odpovědi. Na obr. 19 je uveden příklad proložení reálné odpovědi na 10  $\mu$ M ACh.



**Obrázek 19 -** Příklad odpovědi embryonálního receptoru na 10  $\mu$ M ACh se zobrazením složek proložené dvouexponenciální funkcí: z obrázku je patrný obvyklý poměr velikostí amplitudy složek  $A_1$  (pomalejší, nižší) vůči  $A_2$  (rychlejší, vyšší), resp. jejich časových konstant  $\tau_1$  a  $\tau_2$  pro odpověď embryonálního receptoru na 10  $\mu$ M ACh.

Amplitudy a plato jsme pro další použití normalizovali vzhledem k maximu:  $a_1 = A_1/A_{max}$ ;  $a_2 = A_2/A_{max}$ ;  $c = C/A_{max}$ . Nástup jsme považovali za natolik rychlý (změřená doba nástupu se pohybovala kolem 40 ms), že není výrazně ovlivněn desensitizací, a za velikost odpovědi považovali buď maximum proudové odpovědi odečtené přímo z grafu nebo součet konstant  $A_1 + A_2 + C$  získaných z proložení desensitizační fáze.

Inhibiční křivky byly prokládány inhibiční Hillovou funkcí:

$$I(B) = 1 - \frac{B}{B + IC_{50}} \quad (22)$$



kde  $B$  je koncentrace antagonisty,  $I(B)$  je relativní hodnota membránového proudu a  $IC_{50}$  je koncentrace antagonisty, která z 50 % inhibuje odpověď na danou koncentraci agonisty. Z  $IC_{50}$  lze v případě kompetice použitím modifikovaného Cheng-Prusoffova vzorce (15) získat hodnotu inhibiční konstanty  $K_B$ , která má význam zdánlivé afinity antagonisty a která je nezávislá na zdánlivé afinitě a koncentraci agonisty. Alternativní metodou pro získání hodnoty afinity antagonisty je metoda Schildova užívající vztahu (16). Statistická analýza byla prováděna po převedení hodnot do formy záporného logaritmu  $pK_B$ , u něhož distribuce odchylek lépe odpovídá Gaussovu rozložení. Odchytky byly uváděny ve formě S.E.M. V případech, kdy byly porovnávány hodnoty parametrů stejného typu jsme používali párový t-test ( $P < 0,05$ ).

### 3.5 Roztoky a chemikálie

#### roztoky pro tkáňové kultury:

D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA)

FCS (Fetal Calf Serum, Gibco, USA)

Optimem (Gibco, USA)

PBS (mM): NaCl 138; KCl 5,4;  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  7,8;  $KH_2PO_4$  1,4; pH 7,2-7,3

Roztok trypsinu s versenem: 0,05% trypsin, 10 mg EDTA v 50 ml PBS; pH 7,3

FUDR : 7,5 mg 5-fluoro-2-deoxyuridinu (Sigma, Saint Louis, USA), 17,5 mg uridinu v 20 ml PBS

#### roztoky pro elektrofyziologická a fluorescenční měření:

ICS (mM): CsF 110; CsCl 30;  $MgCl_2$  7; EGTA 2; HEPES-CsOH 10;  $Na_2ATP$  5; pH 7,4

ECS (mM): NaCl 160; KCl 2,5;  $CaCl_2$  1;  $MgCl_2$  2; HEPES-NaOH 10; glukóza 10; pH 7,3

#### agonisté, antagonisté a modulátory nAChR:

acetylcholin chlorid (S.A.F.Hoffmann-La Roche & Co., Basilej, Švýcarsko)

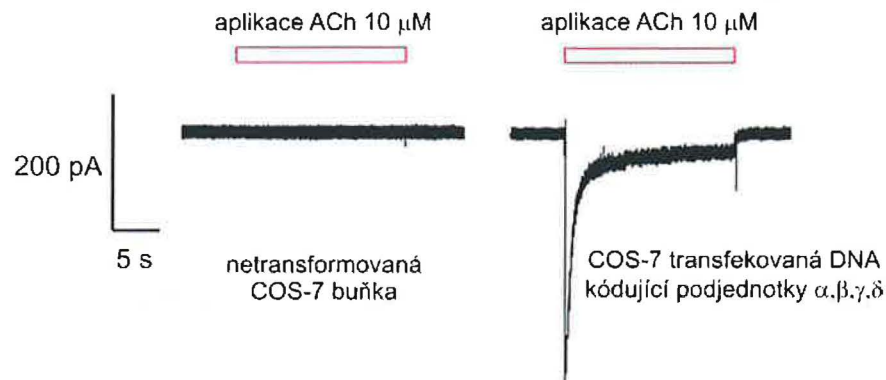
(+)-tubokurarin chlorid (Burroughs Wellcome & Co., Londýn, VB)

physostigmin hemisulfát (Sigma, Saint Louis, USA)

galanthamin hydrobromid (Tocris, Northpoint, VB)

## 4 Výsledky

V řadě kontrolních pokusů byl zkoumán vliv ACh, Phy, Gal a (+)-Tc ve velkém rozmezí koncentrací na velikost transmembránového proudu u netransformovaných buněk COS-7 a COS-1 linií, tedy u buněk, u nichž se nepředpokládá přítomnost nAChR ani jiných ionotropních receptorů potenciálně citlivých k použitým sloučeninám. Při elektrofyziologickém měření v konfiguraci snímání z celé buňky (whole cell patch clamp) nevyvolávaly aplikace zmíněných látek u netransformovaných buněk žádné odpovědi (obr. 20).



**Obrázek 20 - Ukázky záznamů při měření z celé buňky:** oba obrázky jsou záznamy 25 s proudového snímání z celé buňky s 15sekundovou aplikací 10 μM ACh. Zatímco levý záznam byl snímán na netransformované buňce COS-7 linie, pravý záznam ukazuje proudovou odpověď buňky COS-7 transfekované embryonálním nAChR.

Při aplikaci ligandů nAChR obě linie (COS-1 a COS-7) poskytovaly standardní a navzájem ekvivalentní proudové odpovědi.

Pokud není uvedeno jinak, embryonálním receptorem je napříště míněn embryonální svalový nAChR  $\alpha_2\beta\gamma\delta$  exprimovaný v COS-7, popř. COS-1 linii. Obdobně dospělým receptorem míním svalový nAChR, dospělý podtyp  $\alpha_2\beta\delta\epsilon$  exprimovaný tamtéž.

Kromě případů měření napěťových závislostí byla většina experimentů buď z důvodu minimalizace blokády iontového kanálu kladně nabitými inhibitory nebo z technických důvodů (proudy, které je v daném uspořádání aparatury možné spolehlivě měřit jsou omezeny 10 nA, resp. ještě méně) měřena na membránovém potenciálu -10 mV.

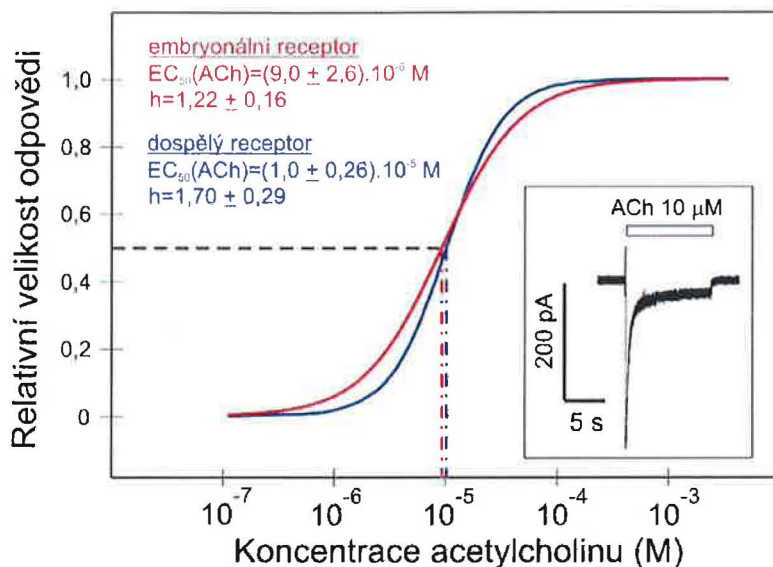
### 4.1 Aktivace a inhibice embryonálních a dospělých svalových nAChR

#### 4.1.1 Aktivace svalových receptorů acetylcholinem

Rychlá aplikace ACh na těchto receptorech vyvolávala v závislosti na jeho koncentraci desenzitizující kationtový proud, který při negativnějších membránových potenciálech, než je reverzní potenciál svalového nAChR ( $V_{rev} \approx +10\text{mV}$ ; dáno selektivitou kanálu a složením použitých ECS a ICS roztoků), směřoval dovnitř buňky.

Účinek ACh byl koncentračně závislý. Na obr. 21 je znázorněna aktivační křivka pro ACh na embryonálním a dospělém svalovém receptoru exprimovaném v COS-7 línii. Parametry těchto křivek jsou charakteristické pro typ receptoru, systém, v němž je receptor exprimován a membránový potenciál. Jak je vidět z obrázku, aktivační křivka dospělého receptoru má strmější průběh a užší koncentrační rozmezí, v rámci něhož je receptor efektivně aktivovatelný. Aktivaci dospělého receptoru popisuje Hillova funkce s vyšším Hillovým koeficientem  $H_{adult} = 1,70 \pm 0,29$  (v porovnání s Hillovým koeficientem embryonálního receptoru  $H_{emb} = 1,22 \pm 0,16$ ). Dalším parametrem těchto křivek je  $EC_{50}$ , jehož hodnoty jsou v našem případě pro oba podtypy myších svalových receptorů velice podobné:

$$EC_{50emb} = (0,9 \pm 0,26) \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad \text{oproti} \quad EC_{50adult} = (1,0 \pm 0,26) \cdot 10^{-5} \text{ M}$$



**Obrázek 21- Porovnání ACh křivky dávka-odpověď embryonálního a dospělého nAChR:** Střed aktivační křivky pro ACh dospělého receptoru (modře) nebyl vůči křivce pro embryonální receptor (červeně) prakticky posunut. Potvrzují to hodnoty  $EC_{50}$ :  $(9,0 \pm 2,6) \cdot 10^{-6} \text{ M}$  pro embryonální receptor oproti  $(10,0 \pm 2,6) \cdot 10^{-6} \text{ M}$  pro dospělého receptor. Schopnost aktivace receptorů je také určena sklonem těchto křivek. Dospělý receptor tak díky vyššímu Hillovu koeficientu ( $1,70 \pm 0,29$  oproti  $1,22 \pm 0,16$ ) dosahuje maximální odpovědi dříve než embryonální receptor. Ve vloženém obrázku je zobrazen příklad odpovědi embryonálních receptorů na  $10 \mu\text{M}$  ACh měřený v konfiguraci snímání z celé buňky.

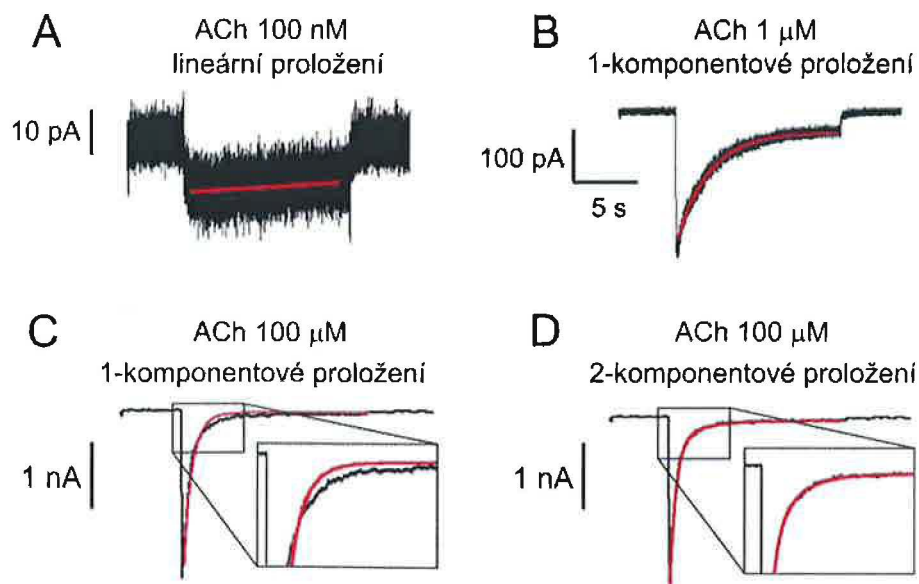
Odpovědi na ACh jsou nejen na svalových, ale i na neuronálních nAChR většinou relativně rychle desenzitizující, tzn. že bezprostředně poté, co odpověď dosáhne maxima (a podle poměru rychlostních konstant nástupu a desenzitizace nezřídka i v průběhu vzrůstu odpovědi), se začíná uplatňovat rychlý přechod do desenzitizovaného stavu a velká část receptorů je po dobu působení ACh dále neaktivovatelná (obr. 21, vložený obrázek).

#### 4.1.2 Desenzitizace proudů aktivovaných acetylcholinem

Desenzitizační pokles odpovědi embryonálních receptorů na  $10 \mu\text{M}$  ACh (obdobné příkladu ve výřezu obrázku 21) jsme prokládali dvouexponenciální funkcí (21). Je-li  $A_1$  amplituda pomalejší z exponenciál a  $A_2$  amplituda rychlejší složky, pak pro kontrolní odpověď na  $10 \mu\text{M}$  ACh platilo, že poměr amplitudy rychlejší složky ku pomalejší leží v intervalu  $A_2/A_1 = 7,7 \pm 1,4$



a poměr rychlostních konstant (pomalejší ku rychlejší) je  $\tau_1/\tau_2=11,3\pm 1,4$ . Absolutní hodnota časové konstanty pomalejší fáze se pro 90 % měřených odpovědí pohybovala v intervalu (1,3; 4,4) s a rychlejší fáze byla v řádech stovek (150; 600) ms. Parametry desensitizační fáze dospělých receptorů byly obdobné. Míra a rychlost desensitizace je však velmi závislá na koncentraci aplikovaného ACh (a tedy i na výsledném maximu odpovědi). Na obr. 22 jsou ukázky odpovědí vyvolaných sérií aplikací rostoucí koncentrace ACh. Záznam na obr. 22a představuje odpověď vyvolanou 100 nM ACh. Odpověď na takto nízkou koncentraci prakticky nedesensitizuje, resp. pokles je tak nepatrný, že ho lze prokládat nanejvýše pomalu klesající lineární funkcí (proložení exponenciálou je z technických důvodů nemožné – výsledkem je nesmyslný rozptyl kinetických parametrů). Na druhou stranu koncentrace ACh jen o jeden řád vyšší (1  $\mu$ M, obr. 22b) již dává daleko spolehlivější odpovědi s ustálenější kinetikou. Tyto odpovědi bylo možné rutinně prokládat jednoexponenciální funkcí s konstantním členem. U 10  $\mu$ M a vyšších ACh jsme již s jednoexponenciální funkcí nevystačili, neboť se zřejmě uplatňují nejméně dva děje s rozdílnou kinetikou s časovými konstantami v řádu stovek ms a jednotek sekund, které není jednoexponenciální funkce schopna obsáhnout. Na obr. 22c vidíme příklad odpovědi na 100  $\mu$ M ACh proložené jednoexponenciální funkcí, která zejména v patě poklesu evidentně nevyhovuje. Proto jsme odpovědi na 10  $\mu$ M a vyšší koncentrace ACh (až do 1 mM; u vyšších koncentrací se situace komplikuje případnou blokadou otevřeného kanálu a nespecifickými interakcemi) prokládali již zmíněnou dvouexponenciální funkcí (obr. 22d).



**Obrázek 22-Porovnání tvaru odpovědí na různé koncentrace ACh:** obrázky a)-d) ukazují postupně záznamy odpovědí na ACh o koncentracích 100 nM (a), 1  $\mu$ M (b) a 100  $\mu$ M (c a d). Při prokládání desensitizační fáze ACh odpovědi se s rostoucí koncentrací ACh objevuje potřeba zvyšovat počet exponenciálních komponent proložení. Je to dáno zejména potenciálem dané koncentrace agonisty aktivovat receptory najednou a poměru afinit jednotlivých stavů zapojených do kinetiky odpovědi vzhledem k použité koncentraci ACh.

### 4.1.3 Role záporně nabitých aminokyselin D<sup>180</sup> a E<sup>189</sup> F-smyčky $\delta$ -podjednotky při aktivaci dospělého receptoru

Měli jsme k dispozici tři konstrukty: jednoduché mutace  $\delta$ :D180N,  $\delta$ :E189Q a dvojitou mutaci  $\delta$ :D180N|E189Q. V těchto konstruktech byly záporně nabitě aminokyseliny aspartát  $\delta$ :D<sup>180</sup> a glutamát  $\delta$ :E<sup>189</sup>  $\delta$ -podjednotky v oblasti F-smyčky a jejím blízkém okolí zaměněny za neutrální analogy. Tato oblast je částí vazebné domény ACh vysokoafinitního vazebného místa. Záměnou záporně nabitých aminokyselin jsme se snažili zredukovat případnou elektrostatickou interakci jakožto nejpravděpodobnější způsob interakce těchto aminokyselin s nabitými (třeba jen parciálním nábojem) ligandy.

zaměněny za neutrální analogy z důvodu eliminace možné elektrostatické interakce. Konstrukty byly exprimovány spolu s přirozenými (nemutovanými) podjednotkami dospělého svalového receptoru  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  a  $\epsilon$  v linii COS-7. U takto pozměněných receptorů jsme měřili aktivační křivky pro ACh a zkoumali vliv mutací na činnost receptoru. Průměrné aktivační křivky jsou znázorněny na obr. 23. Pro porovnání jsou uvedeny parametry křivek určené proložení experimentálních bodů Hillovou funkcí pro všechny čtyři varianty studovaných receptorů:

divoký dospělý receptor  $\alpha_2\beta\delta\epsilon$ :

$$EC_{50}=(1,00 \pm 0,26) \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad H=1,70 \pm 0,29$$

jednou mutovaný dospělý receptor  $\delta$ :E189Q:

$$EC_{50}=(10,00 \pm 2,60) \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad H=1,44 \pm 0,13$$

jednou mutovaný dospělý receptor  $\delta$ :D180N:

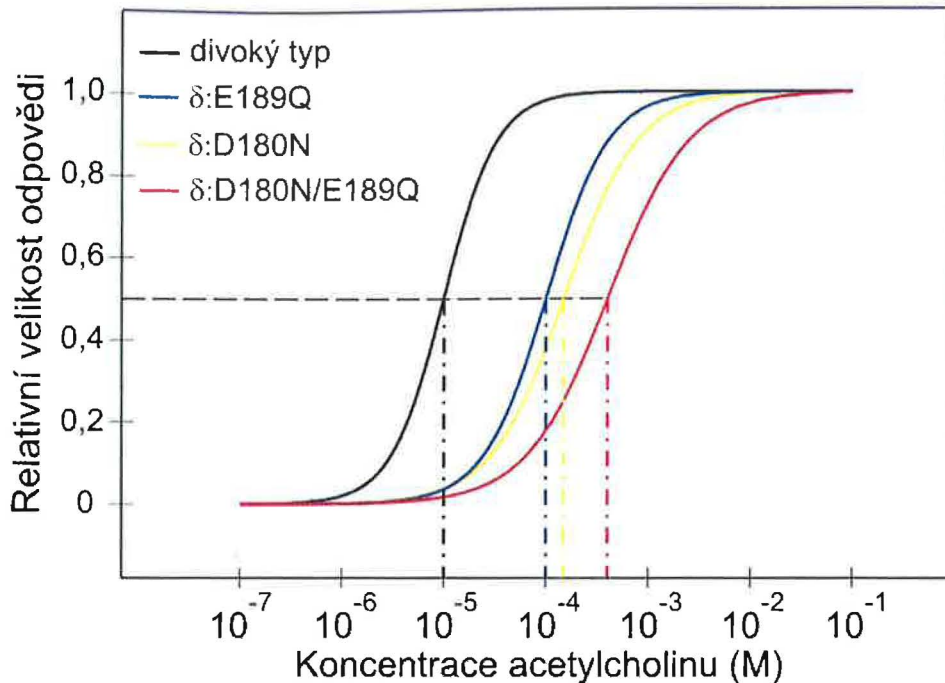
$$EC_{50}=(14,90 \pm 4,50) \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad H=1,22 \pm 0,13$$

dvakrát mutovaný dospělý receptor  $\delta$ :D180N|E189Q:

$$EC_{50}=(40,10 \pm 10,30) \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad H=1,10 \pm 0,07$$

Vlivem mutací docházelo postupně ke zvýšení hodnoty  $EC_{50}$  a snížení Hillova koeficientu. Nejmenší změny byly pozorovány pro parametry jednoduché mutace glutamátu  $\delta$ :E189Q, a to jak  $EC_{50}$  (bylo zvýšeno 10x), tak Hillův koeficient (snížil se o 15,3 %). Následuje jednou mutovaný receptor  $\delta$ :D180N (15násobné zvýšení  $EC_{50}$  a 28% pokles Hillova koeficientu) a nejvíce byly pozměněny charakteristiky aktivační křivky u dvojnásobně mutovaného dospělého receptoru  $\delta$ :D180N|E189Q, u kterého se  $EC_{50}$  zvýšilo přibližně 40x a Hillův koeficient klesl téměř k jedné. Přestože měla záměna glutamátu  $\delta$ :E<sup>189</sup> za glutamin ( $\delta$ :E189Q) na parametry aktivační křivky menší vliv, než tomu bylo u receptoru s mutací v aspartátu  $\delta$ :D<sup>180</sup> ( $\delta$ :D180N), rozdíl v posunutí jejich aktivačních křivek není příliš veliký. Jiná situace je u dvojnásobné mutace, kde došlo ke 40násobnému zvýšení  $EC_{50}$  oproti druhému

typu nAChR. Zvýšení  $EC_{50}$  u jednotlivých mutací bylo provázeno poklesem Hillova koeficientu z 1,7 u divokého receptoru k 1,1 u receptoru dvakrát mutovaného.



**Obrázek 23**-Porovnání aktivačních ACh křivek pro přirozený dospělý receptor (černě), receptory pozměněné jednoduchými mutacemi v  $\delta:E189Q$  (modře) a  $\delta:D180N$  (žlutě), resp. dvojnásobně mutovaný dospělý receptor (červeně): mutace glutamátu  $\delta:E189Q$  způsobila pokles citlivosti receptoru na ACh, tj. posun aktivační křivky ve směru vyšších ACh koncentrací ( $EC_{50}$  z  $1,0 \cdot 10^{-5}$  M na  $10,0 \cdot 10^{-5}$  M), ale i pokles Hillova koeficientu (z 1,70 na 1,44). Mutace aspartátu  $\delta:D180N$  měla za následek pouze o málo výraznější změny parametrů ( $EC_{50}=14,9 \cdot 10^{-5}$  M,  $H=1,22$ ). Největší posun aktivační křivky jsme zaznamenali u dvojnásobné mutace  $\delta:D180N|E189Q$ , kde  $EC_{50}$  dosahuje hodnoty  $40,1 \cdot 10^{-5}$  M, a zároveň Hillův koeficient klesnul k hodnotě 1,10. Všechny závislosti byly měřeny na membránovém potenciálu -10mV.

#### 4.1.4 Vliv aminokyselin $\delta:D^{180}$ a $\delta:E^{189}$ na inhibici dospělých svalových nAChR (+)-tubokurarinem

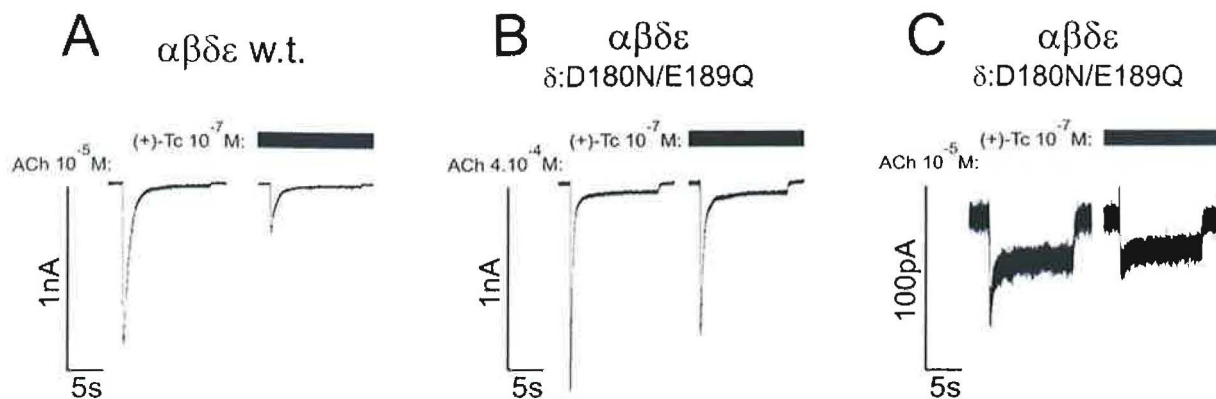
Mutace  $\delta:D180N|E189Q$ , která již byla zmíněna v předešlém oddílu je částí vazebné domény ACh vysokoafinitního vazebného místa s předpokládanou nižší afinitou pro (+)-Tc. Pozorovali jsme změny míry inhibice (+)-Tc způsobené touto mutací a podle nich se snažili interpretovat mechanismus interakce (+)-Tc s dospělým receptorem obecně, resp. konkrétně se zmíněnými aminokyselinami.

Záznamy ACh odpovědi získaných na přirozeném a mutovaném receptoru jsou uvedeny na obr. 24. Jak je z obrázku patrné, (+)-Tc v  $0,1 \mu\text{M}$  koncentraci účinně inhiboval odpovědi na  $10 \mu\text{M}$  ACh na přirozeném dospělém receptoru i u jeho mutované formy.

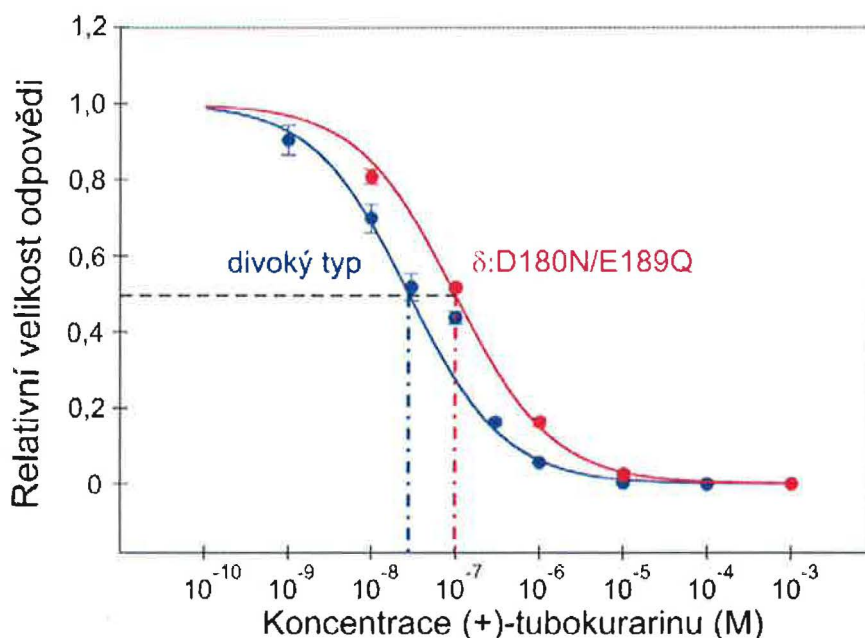
V prvních pokusech jsme se snažili porovnat míru ovlivnění účinnosti ACh a (+)-Tc způsobeného dvojitou mutací. Na obr. 23 jsou vyneseny aktivační ACh křivky, mimo jiné i pro divoký a dvakrát mutovaný dospělý receptor. Je zřejmé, že mutace silně oslabila schopnost



ACh vyvolat odpověď (40násobné zvýšení  $EC_{50}$  a zároveň podstatné snížení Hillova koeficientu).



Obrázek 24 - Záznamy odpovědí a) dospělého přirozeného receptoru na 10  $\mu$ M ACh (kontrolní a ovlivněný pre- a koaplikací 0,1  $\mu$ M (+)-Tc), b) dospělého dvakrát mutovaného receptoru ( $\delta$ :D180N/E189Q) na 0,4 mM ACh (kontrolní a ovlivněný pre- a koaplikací 0,1  $\mu$ M (+)-Tc), c) dospělého 2x mutovaného receptoru na 10  $\mu$ M ACh (kontrolní a ovlivněný pre- a koaplikací 0,1  $\mu$ M (+)-Tc). Ve všech případech způsobil (+)-Tc pokles amplitudy kontrolních ACh odpovědí.



Obrázek 25 - Porovnání (+)-Tc inhibičních křivek dospělého divokého a mutovaného ( $\delta$ :D180N/E189Q) receptoru pro 10  $\mu$ M ACh: Dvojitá mutace v blízkosti vysokoafinitního vazebného místa pro ACh vede k posunutí křivky dávka-odpověď ve směru k vyšším koncentracím (+)-Tc. Hodnota  $IC_{50}$  se mutací 2,6x zvýšila z  $(3,86 \pm 0,77) \cdot 10^{-8}$  M na  $(9,91 \pm 1,06) \cdot 10^{-8}$  M a Hillův koeficient zůstal nezměněn ( $0,67 \pm 0,08$  vers.  $0,68 \pm 0,04$ ).

Na obr. 25 jsou uvedeny inhibiční křivky pro (+)-Tc stejných typů receptoru (přirozený a dvakrát mutovaný dospělý nAChR) měřené na odpovědích vyvolaných 10  $\mu$ M ACh. I zde došlo mutací k posunutí křivek směrem k vyšším koncentracím (+)-Tc, čili zvýšením  $IC_{50}$ , avšak změna nebyla tak výrazná jako u ACh ( $IC_{50}$  změřená na mutovaném receptoru byla pouze 2,6x vyšší v porovnání s přirozeným receptorem):

$$IC_{50}(w.t.) = (3,86 \pm 0,77) \cdot 10^{-8} \text{ M} \quad \text{vers.} \quad IC_{50}(mut) = (9,91 \pm 1,06) \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

$$H(w.t.) = 0,67 \pm 0,08 \quad \text{vers.} \quad H(mut) = 0,68 \pm 0,04.$$

Účinnost (+)-Tc jako antagonisty byla mutací ovlivněna méně než tomu bylo u ACh. Je však potřeba si uvědomit, že hodnota  $IC_{50}$  je významně závislá na koncentraci agonisty, na jehož odpovědích se funkce inhibitoru testuje. V našem případě byla zvolena poměrně vysoká 10  $\mu\text{M}$  koncentrace ACh (hodnota  $EC_{50}$  pro ACh na přirozeném dospělém nAChR). Tento poměrně nízký membránový potenciál jsme zvolili pro minimalizaci případné napětově závislé blokády otevřeného kanálu molekulou (+)-Tc.

#### 4.1.5 Stanovení oblasti kompetitivního působení (+)-Tc a jeho afinity na dospělém nAChR

Pokusili jsme se stanovit koncentrační rozmezí, kde by převažovala kompetitivní inhibice (+)-Tc, neboť právě v tomto mechanismu by se mohly nejlépe uplatnit záporně nabitě aminokyseliny F-smyčky, jež se prokazatelně účastní aktivace acetylcholinem.

Pro určení oblasti kompetice (+)-Tc s ACh a případný výpočet  $K_B$  jsem použila Schildovy metody, která vyžaduje spolehlivě naměřenou aktivační křivku ACh a inhibiční křivku (+)-Tc naměřenou na odpovědích vhodně zvolené koncentrace ACh. V horní části obr. 26 vidíme inhibiční křivku (+)-Tc pro dospělý přirozený receptor. Inhibice byla naměřena pro odpovědi na 10  $\mu\text{M}$  ACh, membránový potenciál byl roven -10mV. Překvapivá je inhibice pozorovaná u nejnižší 0,1 nM koncentrace (+)-Tc. Ve vloženém grafu je pro porovnání absolutní velikosti odpovědí uvedena aktivační ACh křivka spolu s inhibiční (+)-Tc křivkou měřenou pro 10  $\mu\text{M}$  ACh. V dolní části obr. 26 je uveden graf Schildova vnesení. Základem je graf vnesení  $\log(DR-1)$  na osu y, přičemž  $DR$  je poměr koncentrací ACh vyvolávajících odpověď o stejné velikosti s a bez (+)-Tc:

$$DR = \frac{[ACh]_{dtc}}{[ACh]_0}$$

Na osu x jsem vynášela logaritmus koncentrace inhibitoru, tj. (+)-Tc. Proložíme-li body Schildova vnesení lineární funkcí, směrnice přímky pak napovídá o mechanismu působení (+)-Tc. V tomto případě dospělého receptoru vychází jako adept na kompetitivní působení (směrnice lineárního proložení  $a$  byla nejbližší 1) oblast koncentrací (+)-Tc od 0,1 do 10  $\mu\text{M}$ . Při proložení těchto bodů funkcí  $y=ax+y_0$  byla směrnice  $a=0,81\pm 0,19$ . Pro tyto body jsem počítala odhad střední hodnoty afinity (+)-Tc k vazebným místům pro ACh. V zásadě je možné tuto hodnotu získat dvěma způsoby:

- prodloužením lineární funkce jež je proložení všemi body vyhovujícími podmínce  $a=1$  (v rámci statistické chyby) a odečtením jejího průsečíku s x-ovou osou. Zde vyšla hodnota afinity (+)-Tc rovna :

$$K_B=8,56 \cdot 10^{-8}\text{M}; pK_B=7,07 \pm 0,11$$

b) správnější postup je proložení body vyhovujícími podmínce  $a=1$  pokaždé samostatnou přímkou se směrnici 1 a výslednou hodnotu afinity počítat jako střední hodnotu takto získaných bodů:

$$K_B=1,38 \cdot 10^{-7} \text{M}; pK_B=6,86 \pm 0,10$$

Ve vloženém grafu Schildova vynesení na obr. 26 je znázorněn detail průsečíků těchto přímk.

Obr. 27 popisuje situaci na dospělém dvakrát mutovaném ( $\delta$ :D180N|E189Q) receptoru. V horní části obrázku je opět uvedena inhibiční křivka (+)-Tc měřená na odpovědích vyvolaných 10  $\mu\text{M}$  ACh. Z parametrů této křivky vidíme, že mutace posunula  $IC_{50}$  tubokurarinu 2,6x směrem k vyšším koncentracím (+)-Tc, citlivost k (+)-Tc se tedy o něco snížila, avšak Hillův koeficient se podle t-testu signifikantně nezměnil. I zde pozorujeme pokles odpovědi při poměrně nízké (nM) koncentraci (+)-Tc. Ve vloženém grafu k tomuto grafu je uvedeno porovnání aktivační ACh křivky s inhibiční křivkou (+)-Tc pro 10  $\mu\text{M}$  ACh. Vzhledem k tomu, že citlivost mutovaného receptoru vzhledem k ACh rapidně klesla, inhibiční křivka v porovnání s aktivační téměř zaniká. Zdálo by se, že rapidně klesne i přesnost měření, avšak, jak můžeme vidět jak na inhibiční křivce, tak na hodnotě  $IC_{50}$ , odchylky dat zůstaly v rozumném rozmezí. Bylo to způsobeno vysokou expresí mutovaných receptorů v použité COS linii. 10  $\mu\text{M}$  ACh jsme zvolili z toho důvodu, že ACh v oblasti  $K_D$  vyvolával odpovědi s příliš velkou amplitudou, které by byly zatížené chybami měřicí aparatury (a 10  $\mu\text{M}$  ACh vyvolával odpovědi o dostatečné velikosti, tj. v oblasti desítek až sta pA).

Spodní část obr. 27 opět popisuje oblast Schildova plotu, kde  $a=1$  spadalo do intervalu neurčitosti naměřených hodnot ( $a=0,75 \pm 0,33$ ). I zde se případná kompetice projevuje v koncentračním rozmezí 0,1 - 10  $\mu\text{M}$ . Z průsečíku lineárního proložení  $a=0,75$  (tedy se střední hodnotou směrnice) s osou x získáváme hodnotu afinity:

$$K_B=1,24 \cdot 10^{-7} \text{M}; pK_B=6,91 \pm 0,17$$

Proložením každého bodu přímkou se směrnici  $a=1$  (detail křížení s x-ovou osou je zobrazen ve vloženém grafu) získáváme hodnotu afinity:

$$K_B=2,31 \cdot 10^{-7} \text{M}; pK_B=6,63 \pm 0,15$$

Ve srovnání s vypočítanou afinitou (+)-Tc k přirozenému typu dospělého receptoru se tedy afinita mírně snížila.

Výsledky získané Schildovou metodou jsme se rozhodli porovnat s výpočty afinity podle často užívané metody Cheng-Prusoffovy. Podle modifikovaného Cheng-Prusoffova vzorce (15) vychází hodnota afinity (+)-Tc vůči ACh vazebnému místu rovna:

$$K_B=4,25 \cdot 10^{-8} \text{M}; pK_B=7,37 \pm 0,10 \text{ pro dospělý přirozený nAChR}$$

$$K_B=1,11 \cdot 10^{-7} \text{M}; pK_B=6,95 \pm 0,14 \text{ pro dospělý } \delta\text{:D180N/E189Q nAChR.}$$

I v tomto případě je velikost afinity (+)-Tc pro mutovaný receptor nižší než pro receptor divoký. Pro přehlednost jsou hodnoty afinity získané oběma metodami (Schild i Cheng-Prusoff), jak pro dospělý (přirozený i mutovaný), tak pro embryonální receptor (viz dále) uvedeny v tab. 4. Ve všech případech je hodnota získaná podle Cheng-Prusoffova vzorce nižší než hodnoty získané Schildovým postupem.

Hodnoty $K_B$ (+)-tubokurarinu získané různými metodami				
model	metoda	modifikovaný Cheng-Prusoff*	Schild**	
			$a \neq 1$	$a = 1$
$\alpha_2\beta\delta\varepsilon$ dospělý w.t.		$K_B = 4,25 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ $pK_B = 7,37 \pm 0,10$	$K_B = 8,56 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ $pK_B = 7,07 \pm 0,11$ $a = 0,81 \pm 0,19$	$K_B = 1,38 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ $pK_B = 6,86 \pm 0,10$
$\alpha_2\beta\delta\varepsilon$ $\delta$ :D180N/E189Q		$K_B = 1,11 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ $pK_B = 6,95 \pm 0,14$	$K_B = 1,24 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ $pK_B = 6,91 \pm 0,17$ $a = 0,75 \pm 0,33$	$K_B = 2,31 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ $pK_B = 6,63 \pm 0,15$
$\alpha_2\beta\gamma\delta$ embryonální w.t.		$K_B = 2,45 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ $pK_B = 7,61 \pm 0,19$	$K_B = 1,12 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ $pK_B = 6,95 \pm 0,10$ $a = 0,88 \pm 0,16$	$K_B = 1,54 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ $pK_B = 6,81 \pm 0,10$

**Tabulka 4 - Hodnoty afinity (+)-Tc na dospělém přirozeném a mutovaném ( $\delta$ :D180N/E189Q) receptoru a na embryonálním přirozeném receptoru:** Hodnoty  $K_B$  byly vyhodnocovány pomocí metody Cheng-Prusoffovy (15)\* a pomocí Schildovy metody (16)\*\*. V Schildově metodě byly užity pouze body Schildova plotu, u kterých byla směrnice po proložení lineární funkcí rovna 1 (v rámci odchylky), tzn. v příslušném koncentračním rozmezí přichází v úvahu kompetitivní inhibice (+)-Tc. Sloupeček  $a \neq 1$  uvádí hodnoty  $K_B$  získané přímo průsečíkem lineárního proložení (tj. obecně  $a \neq 1$ ) s osou x Schildova plotu. Ve sloupečku  $a = 1$  jsou uvedeny střední hodnoty  $K_B$  získané odpovídající průsečíkům lineární funkce ( $a = 1$ ) s osou x vedené každým bodem vybraného koncentračního rozmezí.

#### 4.1.6 Interakce (+)-tubokurarinu s embryonálním receptorem

Další sada pokusů byla zaměřena na studium působení (+)-Tc na embryonálním receptoru. I zde jsme se snažili pochopit mechanismus působení (+)-Tc a případně stanovit afinitu k vazebnému místu. Dvojice grafů na obr. 28 popisuje situaci na embryonálním přirozeném receptoru. V horní části obrázku je opět vynesena inhibiční křivka (+)-Tc naměřená na odpovědích vyvolaných  $10 \mu\text{M}$  ACh, kterou můžeme popsat následujícími parametry:

$$IC_{50} = (6,52 \pm 4,51) \cdot 10^{-8} \text{ M} \quad H = 0,51 \pm 0,09$$

Ve vloženém grafu horního obrázku můžeme porovnat inhibiční křivku (+)-Tc (inhibice odpovědí na  $10 \mu\text{M}$  ACh).

Ve spodní části obr. 28 je uvedeno Schildovo vynesení pro body, jež splňovaly podmínku směrnice proložení  $a = 1$  (v rámci statistické chyby). I u embryonálního receptoru splňují podmínku kompetice koncentrace (+)-Tc v intervalu  $0,1 - 10 \mu\text{M}$ , kde byla směrnice lineárního proložení rovna  $a = 0,88 \pm 0,16$ . Průsečíkem této přímky s osou x získáváme hodnotu afinity:

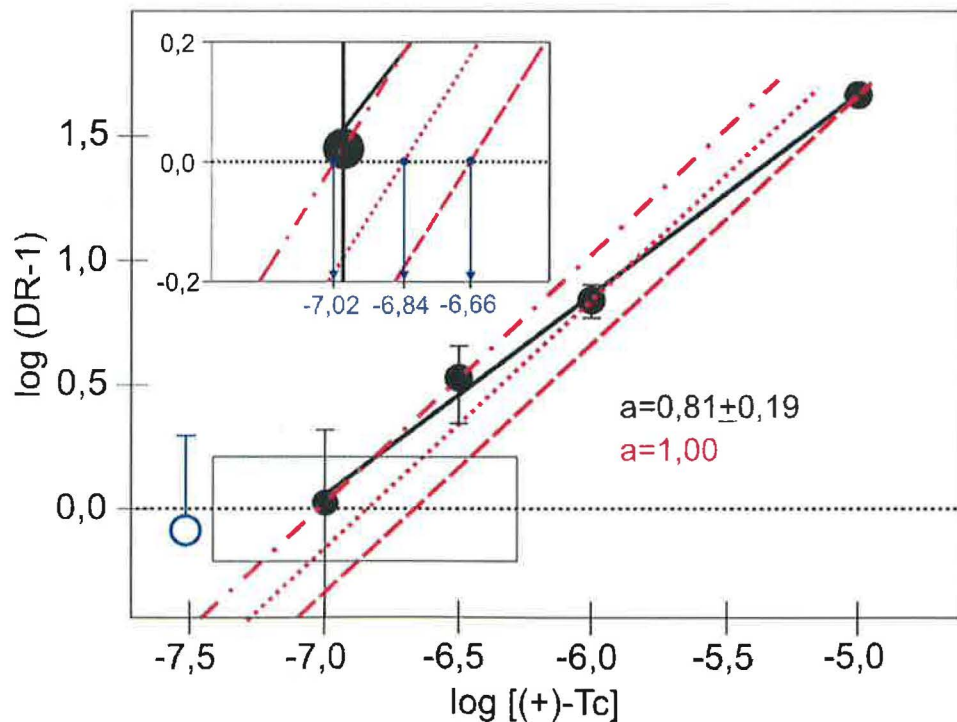
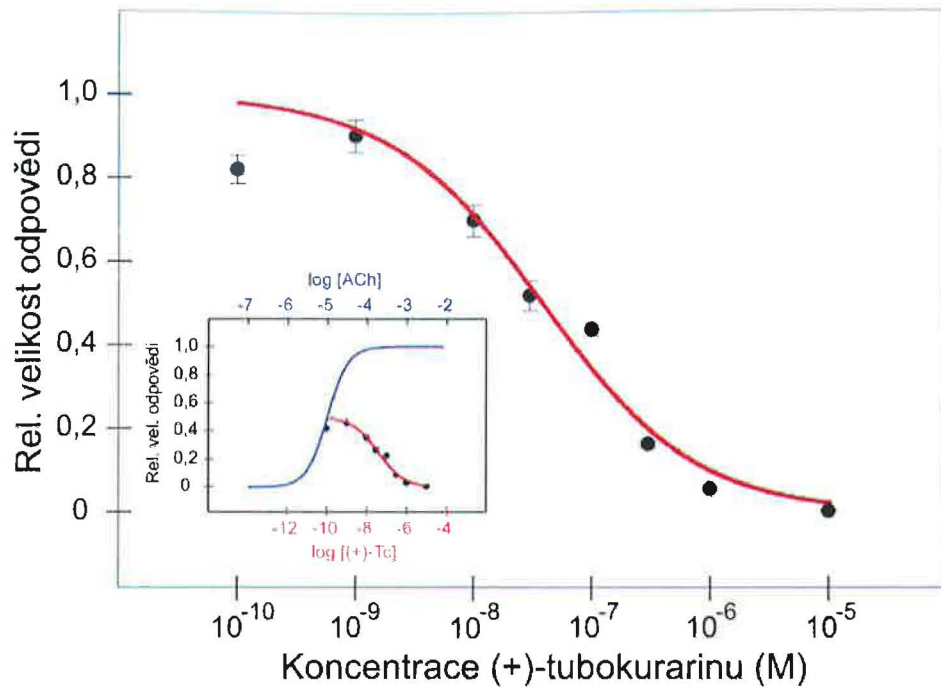
$$K_B = 1,12 \cdot 10^{-7} \text{ M}; pK_B = 6,95 \pm 0,10$$



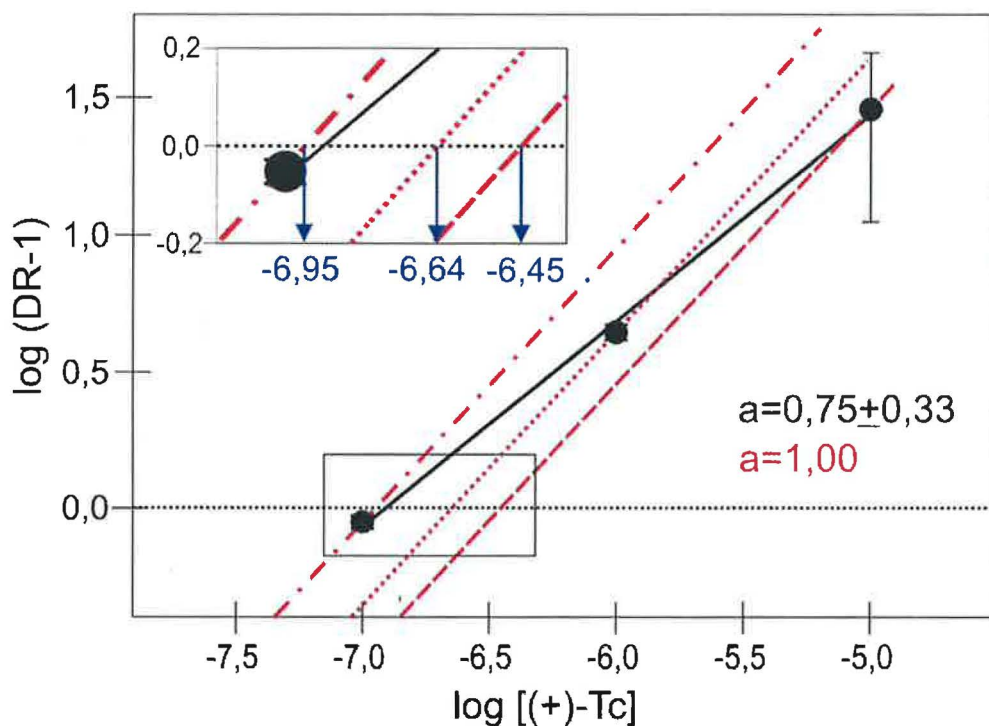
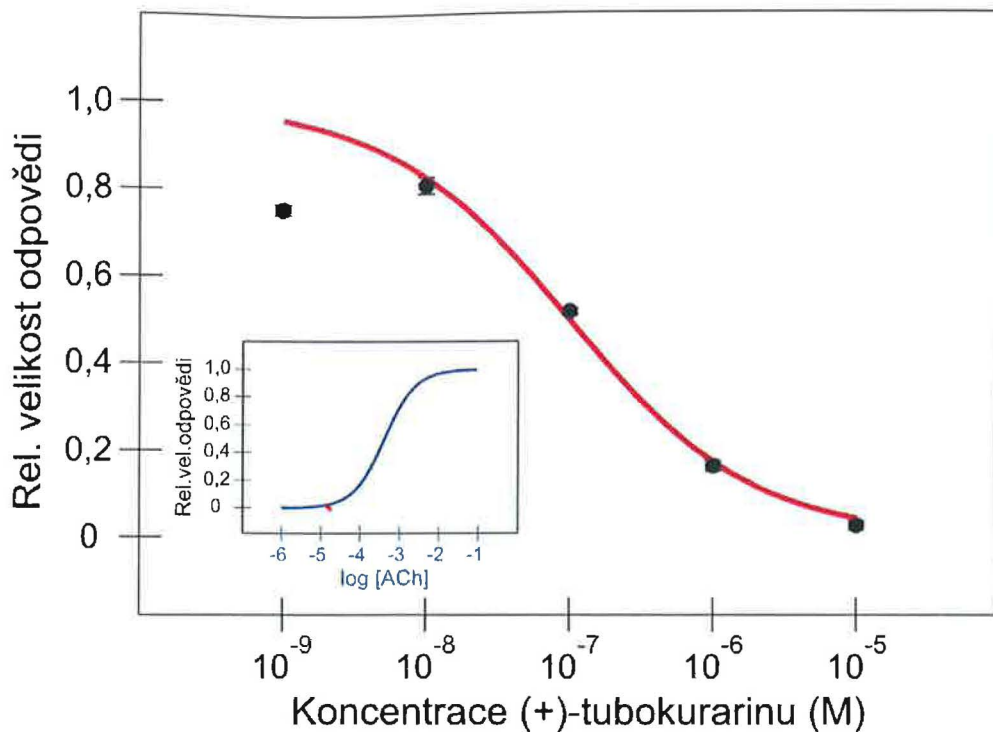
a proložením bodů daného koncentračního rozmezí přímkami se směrnicí jedna získáváme:

$$K_B = 1,54 \cdot 10^{-7} \text{ M}; \text{ p}K_B = 6,81 \pm 0,10$$

V obou případech je hodnota  $K_B$  (+)-Tc vyšší než v případě dospělého recepturu (tj. afinita je nižší).

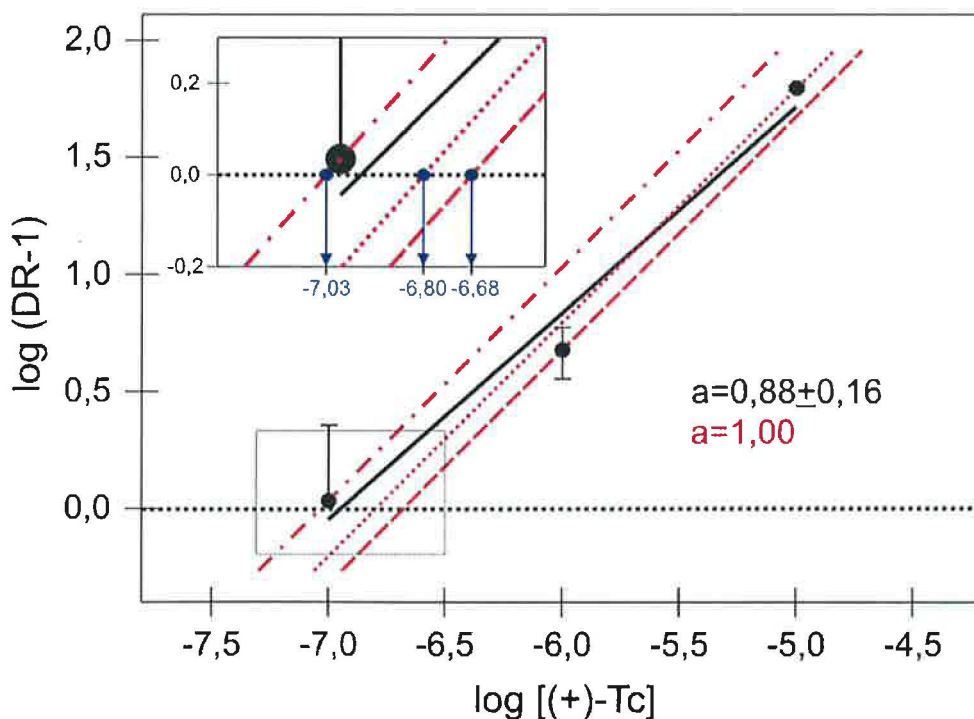
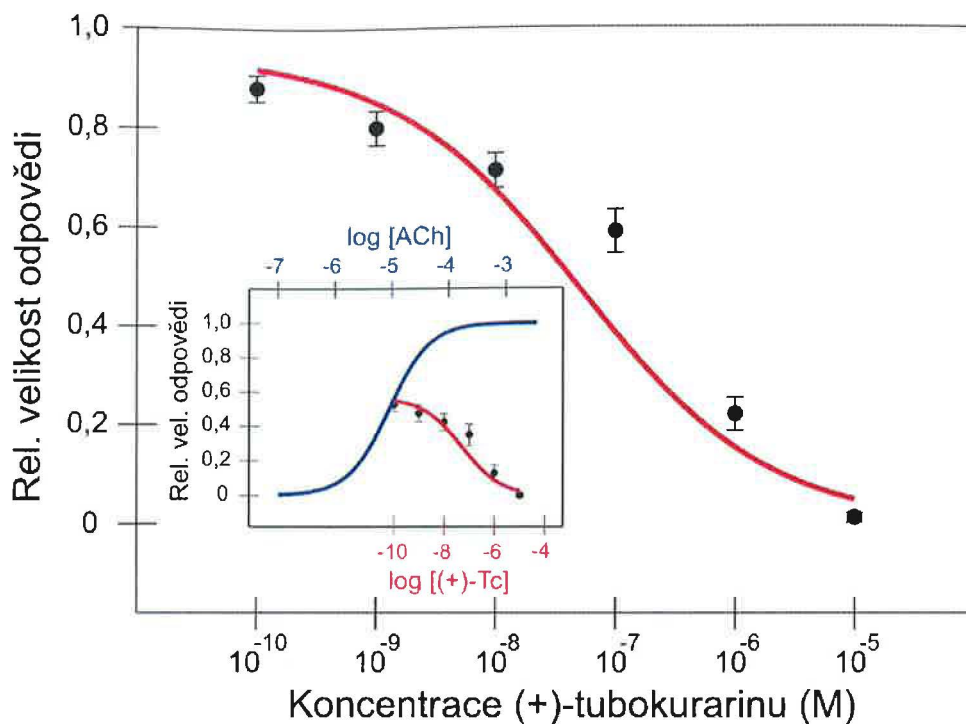


Obrázek 26 - Inhibiční křivka dospělého přirozeného recepturu pro (+)-Tc měřená na odpovědích pro  $10 \mu\text{M}$  ACh (nahore) v porovnání s ACh aktivační křivkou stejného recepturu (modrá křivka grafu vloženého do horního grafu; červená křivka odpovídá zmíněné inhibici). Schildova regrese inhibice ACh odpovědí (+)-tubokurarinem dospělého přirozeného recepturu (spodní graf): černé body Schildova grafu ( $1 \cdot 10^{-5}$ ;  $1 \cdot 10^{-6}$ ;  $3 \cdot 10^{-7}$  a  $1 \cdot 10^{-7}$  M) odpovídají koncentrační oblasti (+)-Tc, kde směrnice lineárního proložení spadala v rámci statistické odchylky do oblasti  $a=1$  ( $a=0,81 \pm 0,19$ ), tj. je možné uvažovat o kompetitivním působení. Vložený obrázek spodního grafu zobrazuje detail průsečíků funkcí  $y=1 \cdot x + y_0$  s  $x$ -ovou osou, tj. hodnoty logaritmů případné afinity (+)-Tc k vazebnému místu pro ACh.



Obrázek 27 - Inhibiční křivka dospělého dvakrát mutovaného  $\delta$ :D180N|E189Q receptoru pro (+)-Tc měřená na odpovědích pro  $10\mu\text{M}$  ACh (nahore) v porovnání s ACh aktivační křivkou stejného receptoru (modrá křivka vloženého obrázku horního grafu; naznačená červená křivka odpovídá zmíněné inhibici. Inhibice byla měřena na odpovědích velikosti řádově desítek pA). Schildova regrese inhibice ACh ( $10\mu\text{M}$ ) odpovědí (+)-tubokurarinem dospělého přirozeného receptoru (spodní graf): černé body Schildovy regrese ( $1 \cdot 10^{-5}$ ;  $1 \cdot 10^{-6}$  a  $1 \cdot 10^{-7}$  M) odpovídají koncentrační oblasti (+)-Tc, kde směrnice lineárního proložení spadala v rámci statistické odchylky do oblasti  $a=1$  ( $a=0,75 \pm 0,33$ ), tj. je možné uvažovat o kompetitivním působení. Vložený obrázek spodního grafu zobrazuje detail průsečíků funkcí  $y=1 \cdot x + y_0$  s x-ovou osou, tj. hodnoty logaritmu případné afinity (+)-Tc k vazebnému místu pro ACh.





Obrázek 28 - Inhibiční křivka embryonálního přirozeného receptoru pro (+)-Tc měřená na odpovědích aktivovaných  $10\mu\text{M}$  ACh (nahore) v porovnání s ACh aktivační křivkou stejného receptoru (modrá křivka vloženého obrázku horního grafu; červená křivka odpovídá zmíněné inhibici). Schildova regrese inhibice ACh odpovědí (+)-tubokurarinem dospělého přirozeného receptoru (spodní graf): Schildova regrese byla v grafu vynášena pouze pro (+)-Tc koncentrace  $1 \cdot 10^{-5}$ ;  $1 \cdot 10^{-6}$  a  $1 \cdot 10^{-7}$  M, kde směrnice lineárního proložení spadala v rámci statistické odchylky do oblasti  $a=1$  ( $a=0,88 \pm 0,16$ ), tj. je možné uvažovat o kompetitivním působení. Vložený obrázek spodního grafu zobrazuje detail průsečíků funkcí  $y=1 \cdot x + y_0$  s x-ovou osou, tj. hodnoty logaritmů případné afinity (+)-Tc k ACh vazebnému místu.

## 4.2 Interakce inhibitorů acetylcholinesterázy se svalovým nAChR

### 4.2.1 Vliv physostigminu na funkci svalového embryonálního nAChR

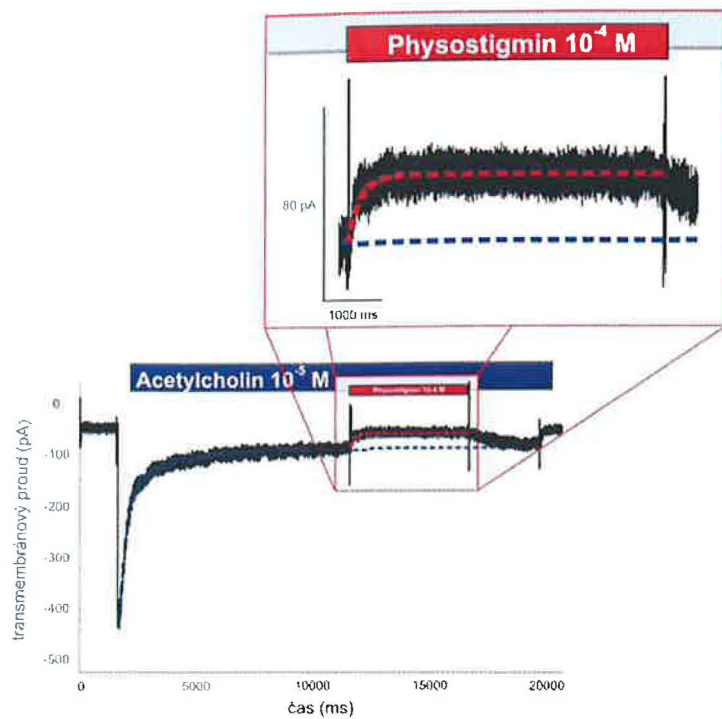
#### 4.2.1.1 *Physostigmin zmenšuje odpovědi vyvolané 10 $\mu$ M ACh*

Studovali jsme vliv Phy na svalový embryonální nAChR exprimovaný v linii COS-7. První experimenty ukázaly, že samostatně aplikovaný Phy v širokém rozmezí koncentrací (0,1  $\mu$ M - 1 mM) není schopen vyvolat při měření metodou terčíkového zámku v konfiguraci snímání z celé buňky žádnou měřitelnou odpověď.

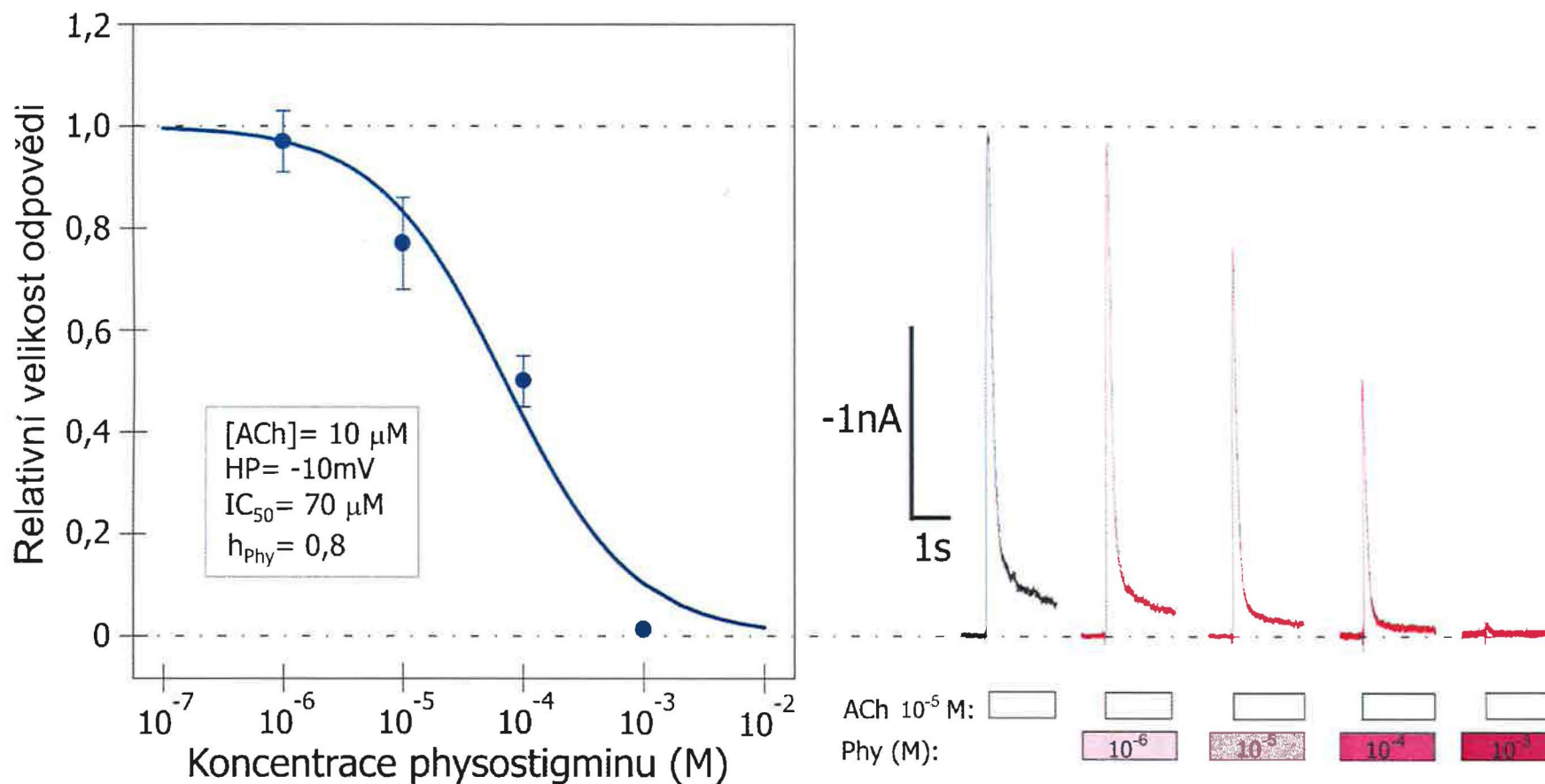
Proto jsme se rozhodli prostudovat případný vliv Phy na odpovědi vyvolané ACh. Předběžné pokusy ukázaly, že Phy aplikovaný souběžně s ACh snižuje velikost odpovědi na ACh a má vliv i na tvar desenzitizační fáze odpovědi. Vliv Phy jsme nejčastěji testovali na odpovědích vyvolaných koncentracemi ACh blízkými  $EC_{50}$  na embryonálním receptoru, tj. především na 10  $\mu$ M koncentraci ACh.

Abychom zjistili rychlost účinku Phy na odpovědi vyvolané ACh, aplikovali jsme 100  $\mu$ M Phy na populaci embryonálních receptorů desenzitizovaných kontinuální aplikací 10  $\mu$ M ACh (tj. do plata ACh odpovědi, viz obr. 29). Účinek Phy se v plné míře projevil za čas kratší než 1 s ( $\tau$  poklesu plata bylo rovno 208 ms). Pro většinu dalších pokusů jsme tedy zvolili schéma 5s preaplikace Phy, následnou koaplikaci Phy a ACh (10 s) a dalších 5 s aplikace samotného Phy (stejně schéma bylo použito i u experimentů popisujících vliv ostatních modulátorů na amplitudu a celkový tvar ACh odpovědi, tj. 5 s preaplikace modulátoru, 10 s, popř. 15 s koaplikace modulátoru a ACh a následné 5 s aplikace samotného modulátoru, neboť nástup jejich účinků měl obdobnou rychlost). Tímto způsobem se vyhneme přechodným jevům spojeným se současnou změnou koncentrace dvou látek, u kterých předpokládáme různou rychlost nástupu účinku. Doba preaplikace je tak dostatečně dlouhá, aby uvedla populaci do (z hlediska obsazenosti receptorů molekulami Phy) rovnovážného stavu. Protože rychlost odeznívání účinků Phy na obr. 29 je výrazně pomalejší, nepředpokládali jsme významnější odstavování Phy ani v případě kompetice s ACh.

Při koaplikaci různých koncentrací Phy s 10  $\mu$ M ACh (podle zmíněného schématu) se projevilo koncentračně závislý inhibiční účinek Phy na ACh odpovědi (obr. 30).  $IC_{50}$  byla zjištěna proložení inhibiční křivky inhibiční Hillovou funkcí (22) a pro odpovědi na 10  $\mu$ M ACh byla rovna 70  $\mu$ M Phy. Milimolární koncentrace Phy odpovědi téměř úplně blokovaly.



**Obrázek 29 - Záznam vlivu 100  $\mu\text{M}$  Phy aplikovaného do desensitizačního plata odpovědi na 10  $\mu\text{M}$  ACh pro embryonální receptor:** Na obrázku je záznam ACh odpovědi modulované koaplikací Phy v oblasti desensitizačního plata. Pokles plata vyvolaný aplikací Phy jsem proložila jednoexponenciální funkcí a průběh desensitizace vyvolané ACh jsem včetně oblasti aplikace Phy proložila dvouexponenciální funkcí. Časová konstanta poklesu vyvolaného Phy je  $\tau = 208$  ms (časové konstanty desensitizace ACh odpovědi jsou  $\tau_1 = 1947$  ms a  $\tau_2 = 267$  ms). Účinek Phy tedy nastupuje v době kratší než 1s a to znamená, že 5sekundová preaplikace Phy je dostatečně dlouhá na uvedení populace receptorů do rovnovážného stavu.



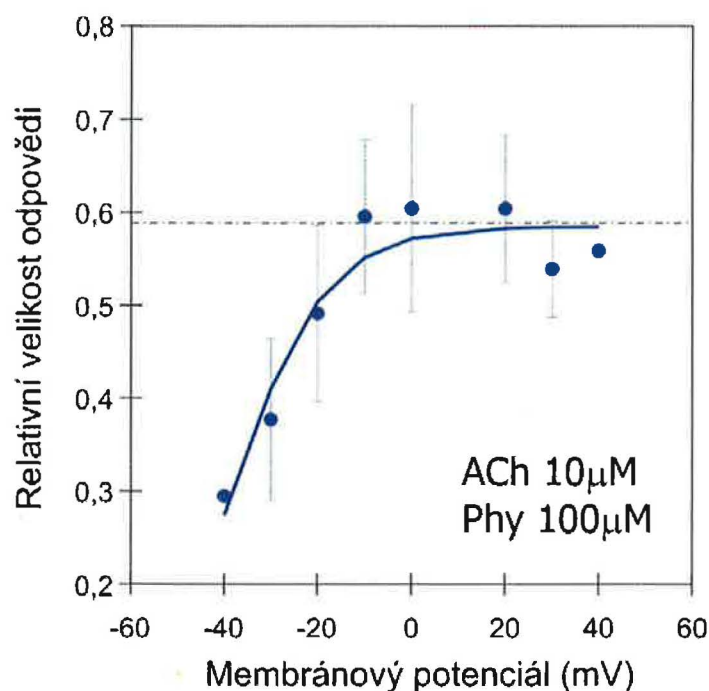
**Obrázek 30 - Inhibiční křivka Phy pro embryonální receptor měřená na odpovědích vyvolaných 10  $\mu$ M ACh a záznamy odpovídajících odpovědí:** Odpovědi na 10  $\mu$ M ACh byly modulovány přetrvávající aplikací Phy o různých koncentracích (v rozmezí 1  $\mu$ M až 1 mM), a to při membránovém potenciálu -10 mV. Zatímco 1  $\mu$ M Phy ovlivnil amplitudu ACh odpovědi jen minimálně. Při koncentraci 1 mM Phy byla tato ACh odpověď téměř úplně inhibována (na 4 % kontroly). Výsledná sigmoidální inhibiční křivka je charakterizována hodnotou IC<sub>50</sub> (Phy) = 70  $\mu$ M a Hillovým koeficientem H<sub>Phy</sub> = 0,8. V pravé části obrázku jsou znázorněny záznamy odpovědí ovlivněných odpovídajícími koncentracemi Phy.



#### 4.2.1.2 Inhibice vyvolaná Phy má i napěťově závislou složku

Inhibice proudů vyvolaných ACh může vznikat prostřednictvím mnoha mechanismů. Jedním z nich je blokáda otevřeného kanálu, kterou je možné odhalit pomocí napěťové závislosti inhibice (v případě kladně nabitého Phy by měla při kladném membránovém potenciálu napěťově závislá složka vymizet). Následujícím pokusem jsme se snažili prostudovat napěťovou závislost účinku 100  $\mu\text{M}$  Phy na amplitudu odpovědi vyvolaných 10  $\mu\text{M}$  ACh, určit rozmezí membránových potenciálů, ve kterém se uplatňuje účinek Phy jakožto blokátoru iontového kanálu (resp. kde tento účinek vymizí), a objasnit, zda Phy působí na nAChR aktivovaný acetylcholinem i jiným mechanismem, než je blokáda kanálu.

Podle obr. 31 zůstávala na kladném a slabě negativním membránovém potenciálu míra inhibice v blízkosti 42 % (tj. výsledná relativní amplituda dosahovala 0,58) a s rostoucím negativním membránovým potenciálem se zvyšovala až na 71 % (relativní amplituda = 0,29). Po odečtení této napěťově závislé složky však ještě zůstává složka konstantně inhibující ACh odpovědi o cca 42 %. V dalších experimentech jsme se zaměřili na mechanismus napěťově nezávislé složky. Z důvodu minimalizace vlivu blokády otevřeného kanálu byly všechny následující experimenty měřeny na membránovém potenciálu rovném -10 mV.



**Obrázek 31 - Závislost míry Phy (100  $\mu\text{M}$ ) inhibice ACh odpovědi (10  $\mu\text{M}$ ) embryonálního receptoru na membránovém potenciálu:** Graf popisuje závislost relativní velikosti (vztážené k velikosti kontrolní ACh odpovědi na konkrétním potenciálu) odpovědi na hodnotě vloženého membránového potenciálu. Phy indukovaná inhibice odpovědi na ACh nabývá na kladných a slabě negativních potenciálech přibližně konstantní hodnoty 42 %, na negativnějších potenciálech (HP < -20 mV) pak míra inhibice roste úměrně vloženému membránovému potenciálu.



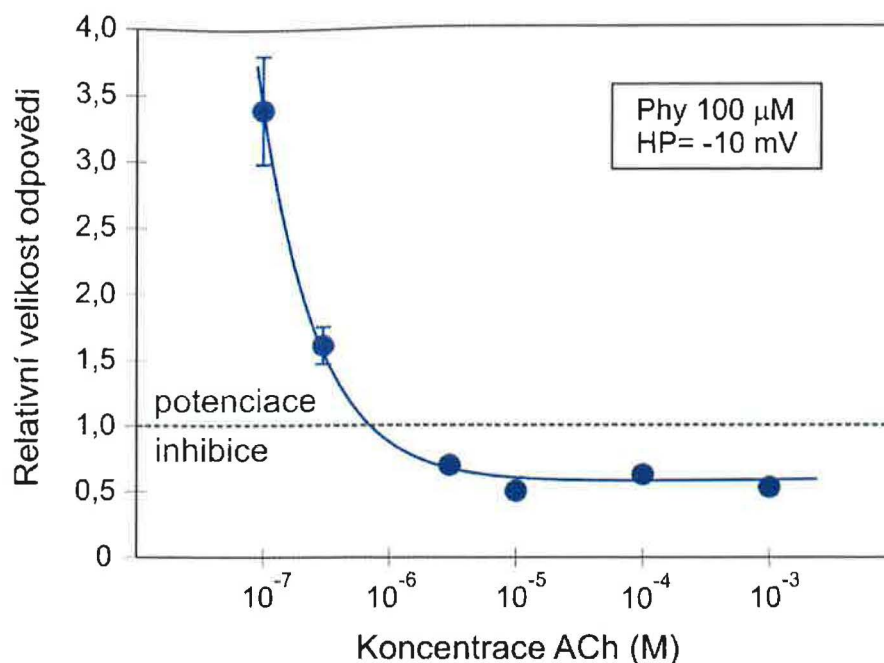
### 4.2.1.3 *Inhibiční a potenciační účinek physostigminu je závislý na koncentraci ACh*

Povahu této napěťově nezávislé složky jsme zjišťovali v dalším pokusu, který popisuje vliv pre- a koaplikace 100  $\mu\text{M}$  Phy na odpovědi vyvolané různými koncentracemi ACh. Pokud by se míra blokády s koncentrací ACh neměnila, dalo by se z toho usoudit, že Phy působí z jiného vazebného místa než ACh. Na druhou stranu, pokud by se s rostoucí koncentrací ACh účinek Phy snižoval, znamená to, že Phy kompetuje s ACh o vazebné místo, přičemž rostoucí množství ACh dokáže Phy vytěsnit a zmírnit (při dostatečné koncentraci ACh i úplně potlačit) jeho inhibiční účinek. Obr. 32 popisuje tuto závislost a plyne z něj, že v koncentračním rozmezí 10-1000  $\mu\text{M}$  ACh se míra blokády prakticky nemění (pohybuje se v rozmezí  $0,59 \pm 0,09$ ) což by podporovalo tezi, že Phy působí z odlišného vazebného místa než ACh (nekompetitivně).

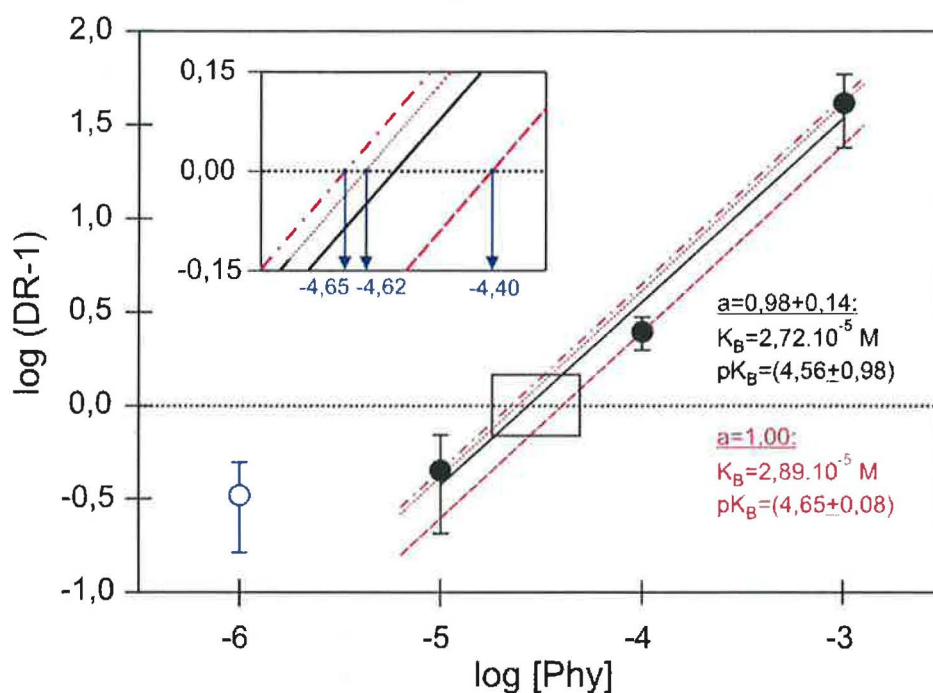
Ze stejného důvodu (diagnostika mechanismu napěťově nezávislé složky) jsem provedla rovněž Schildovu regresi inhibiční křivky pro ACh 10  $\mu\text{M}$  a škálu koncentrací Phy (od 1  $\mu\text{M}$  do 1 mM). Graf je uveden na obr. 33. Zde jsem pro Phy koncentrační rozmezí od 10  $\mu\text{M}$  do 1 mM získala hodnotu směrnice  $a = 0,98 \pm 0,14$ . V této koncentrační škále by se v případě kompetice podle Schildovy analýzy vázal Phy s afinitou  $K_B = 2,89 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  ( $pK_B = 4,65 \pm 0,08$ ). Tento interval zahrnuje i bod, kde Phy=100  $\mu\text{M}$  a ACh=10  $\mu\text{M}$ , v němž jsme inhibici vyhodnotili jako nekompetitivní. Interpretaci výsledků těchto metod je tedy potřeba podrobit pečlivé analýze.

Vraťme se k původnímu grafu vlivu koncentrace ACh na výslednou amplitudu odpovědi ovlivněných 100  $\mu\text{M}$  Phy (obr. 32). Při koncentracích ACh 300 nM a nižších totiž Phy tyto odpovědi potencoval. U 100 nM ACh dosáhla odpověď dokonce 339 % kontroly. U potencovaných odpovědí jsme rovněž měřili rychlosti nástupu odpovědi (nepublikováno). Z těchto měření jsme zjistili, že preaplikace 100  $\mu\text{M}$  Phy dvakrát zkracuje  $\tau$  nástupní hrany odpovědí na nízký (100-300 nM) ACh.

V průměru však 100 nM ACh vyvolává jen malé proudové odpovědi, řádově desítky až 150 pA. Kromě potenciace odpovědí byl u těchto submikromolárních koncentrací ACh kontinuální aplikací Phy způsobeno prohloubení a zrychlení desensitizace, která jinak u tak nízkých koncentrací ACh prakticky nenastává (obr. 34).



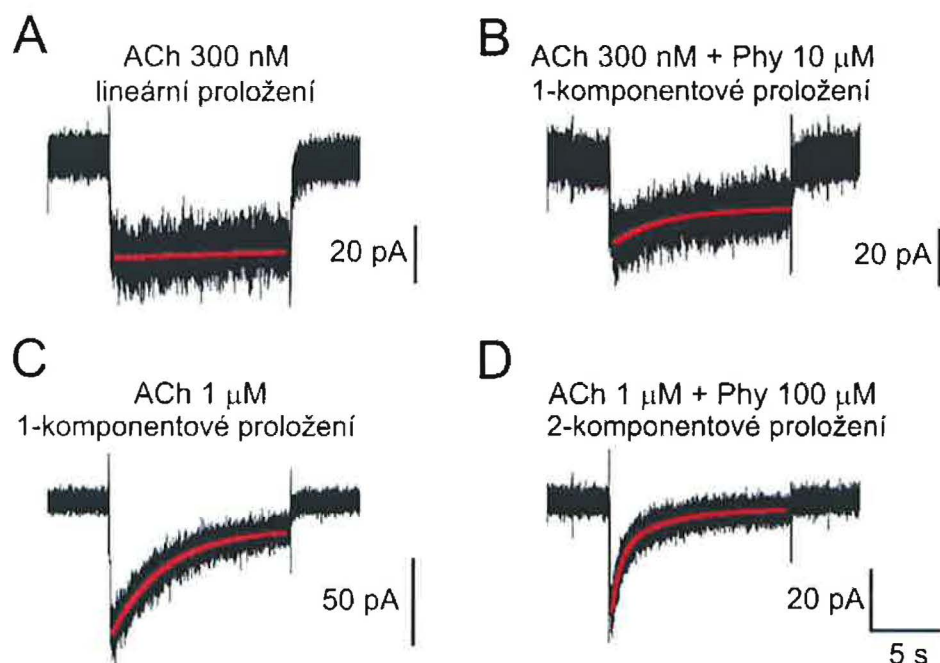
**Obrázek 32 - Inhibičně-aktivační křivka pro ACh odpovědi (různé koncentrace) ovlivněné přetrvávající aplikací 100 μM Phy:** Pro ACh v koncentračním rozmezí od 3 do 1000 μM zůstává míra blokády v úzkém pásu  $0,59 \pm 0,09$  a podporuje tak domněnku, že Phy působí z jiného vazebného místa než ACh. Při koncentracích 100 nM až 1 μM se přidává potenciační efekt Phy, který při nejnižší koncentraci dosahuje  $3,39 \pm 0,41$  násobku kontroly. Závislost jsem proložila aktivační křivkou zahrnující různé typy interakce modulatoru s nAChR podle (R. Zwart a H.P. Vijverberg, 1997).



**Obrázek 33 - Schildovo proložení Phy inhibice odpovědi na 10 μM ACh přirozeného embryonálního receptoru:** podmínce pro hodnotu směrnice  $a=1$  dobře odpovídají koncentrace Phy  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  M ( $a=0,98 \pm 0,14$ ) a této hodnotě směrnice odpovídá hodnota předpokládané afinity Phy vzhledem k ACh vazebnému místu  $K_B=2,72 \cdot 10^{-5}$  M. Proložení těchto bodů přímkami o směrnici  $a=1$  získáváme o málo vyšší hodnotu afinity  $K_B=2,89 \cdot 10^{-5}$  M. Ve vloženém obrázku je znázorněn detail průsečíků lineárního proložení  $a \neq 1$  (černě) a přímk se směrnicí  $a=1$  (červeně).

#### 4.2.1.4 *Phy zrychluje a prohlubuje desensitizaci ACh odpovědí*

Obr. 34 ilustruje účinek přetrvávající aplikace Phy na tvar ACh odpovědi. Z dříve uvedeného schématu o závislosti tvaru desensitizační fáze ACh odpovědi na koncentraci ACh (obr. 22) již víme, že odpovědi na 100 nM ACh prakticky postrádají desensitizační pokles, popř. je tento pokles jen velmi pomalý a takřka lineární. Z obr. 34a,b vyplývá, že Phy v 10  $\mu\text{M}$  koncentraci je schopný kromě snížení celkové amplitudy u takovýchto odpovědí navodit desensitizaci. V případě 300 nM ACh a při aplikaci 10  $\mu\text{M}$  Phy má výsledný desensitizační pokles tvar jednokomponentové exponenciální funkce. Jak je patrné z obr. 34c, analogický 1-exponenciální pokles pozorujeme u odpovědi na samotný ACh o koncentraci o řád vyšší (1  $\mu\text{M}$ ). U těchto odpovědí s přirozenou 1-exponenciální desensitizací pak má pre- a koaplikace Phy za následek zrod další exponenciální komponenty desensitizace (obr. 34d). Phy tak u odpovědi na  $\mu\text{M}$  ACh evokuje kinetiku spatřovanou u desensitizace vyvolané ještě vyššími koncentracemi ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ) ACh (obr. 22d).



**Obrázek 34 - Vliv Phy na tvar odpovědi:** obrázek ilustruje vliv přetrvávající Phy aplikace na kinetiku desensitizace u dvou odpovědí na ACh různých koncentrací. Obr. a) záznam odpovědi na ACh 300nM, jenž vykazuje jen slabý, lineární desensitizační pokles. Obr. b) odpověď na tutéž koncentraci ACh, avšak ovlivněnou pre- a koaplikací 10  $\mu\text{M}$  Phy, což má za následek zrychlení a prohloubení desensitizace. Velikost odpovědi v desensitizační fázi klesá v souladu s jednoexponenciální funkcí. Obr c) záznam odpovědi na 1  $\mu\text{M}$  ACh. Tvar odpovědi odpovídá jednoexponenciálnímu poklesu. Obr. d) odpověď na stejnou koncentraci ACh jako u c), avšak ovlivněná pre- a koaplikací 100  $\mu\text{M}$  Phy. Aplikace Phy také prohloubila desensitizaci a zapříčinila změnu kinetiky desensitizace z jednoexponenciálního poklesu na dvouexponenciální. Měřitko časové škály je u všech záznamů stejné.

Obr. 35 popisuje závislosti parametrů desensitizačních poklesů 10  $\mu\text{M}$  ACh odpovědi modulovaných pre- a koaplikací Phy o různých koncentracích. Desensitizační fázi physostigminem inhibovaných odpovědí jsme prokládali dvouexponenciální funkcí (21). Parametry odpovědi se výrazně měnily jak mezi buňkami, tak částečně i v rámci měření na jedné buňce. Proto jsme se rozhodli normalizovat parametry jednotlivých komponent a plata

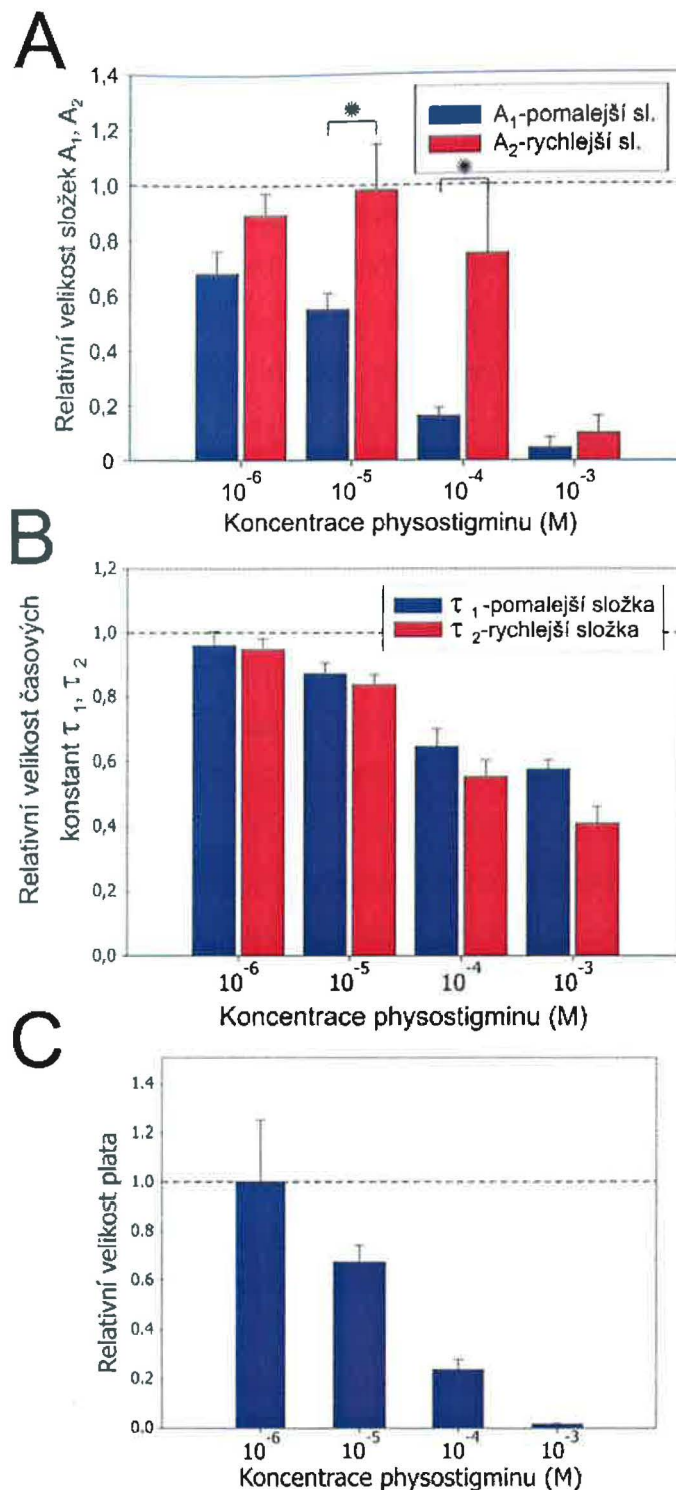
tak, že parametr desensitizace pod vlivem Phy jsme dělili kontrolním parametrem desensitizace v nepřítomnosti Phy, přičemž kontrolní parametr byl získáván jakožto aritmetický průměr parametru kontrolní odpovědi na ACh předcházející před a následující za záznamem modulovaným Phy. V následujících grafech jsem parametry těchto křivek postupně vynesla v závislosti na koncentraci Phy.

Na obr. 35a je zobrazen graf závislosti dvou složek maximální amplitudy odpovědi na ACh ( $10 \mu\text{M}$ ) na koncentraci pre- a koaplikovaného Phy. Již při  $1 \mu\text{M}$  koncentraci Phy byly obě dvě složky amplitud vzhledem ke složkám kontrolní odpovědi zřetelně sníženy, přičemž k většímu relativnímu poklesu došlo u pomalejší složky (statisticky významný rozdíl je však až u  $10 \mu\text{M}$  Phy). Se zvyšující se koncentrací Phy tato složka výrazně klesala a při  $1 \text{ mM}$  Phy téměř vymizela. U druhé, rychlé komponenty byla situace o něco složitější. Inhibice u ní byla statisticky významná teprve na  $10 \mu\text{M}$  a vyšších koncentracích Phy a při  $1 \text{ mM}$  Phy i tato rychlejší amplitudová komponenta výrazně poklesla (tj. milimolární Phy téměř úplně blokuje odpověď na  $10 \mu\text{M}$  ACh). Pomalejší složka tedy byla na zvyšování koncentrace Phy citlivější než rychlá komponenta. Rozdíl v míře ovlivnění obou složek jsme podrobili t-testu a statisticky významný rozdíl jsme pozorovali u koncentrací  $10 \mu\text{M}$  a  $100 \mu\text{M}$  Phy. Platí, že se zvyšující se koncentrací Phy se zvedá podíl rychlejší komponenty na celé odpovědi (obdobně jako u odpovědi na samotný ACh v závislosti na jeho koncentraci), avšak úhrnná amplituda odpovědi klesá.

Bylo pozorováno také celkové zrychlení desensitizace ve smyslu zkracování obou časových konstant  $\tau$  v závislosti na koncentraci Phy. Příslušný graf je uveden na obr. 35b. Z obrázku je patrné, že relativní hodnoty obou časových konstant ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) klesají s rostoucí Phy koncentrací v rozmezí od  $1 \mu\text{M}$  do  $0,1 \text{ mM}$  zhruba stejně rychle, avšak na  $1 \text{ mM}$  Phy se odchylka mezi poklesem  $\tau_1$  a  $\tau_2$  prohlubuje a časová konstanta rychlejší komponenty klesá až na 40 % kontroly (stále však rozdíl mezi inhibicí  $\tau_1$  a  $\tau_2$  nenabývá podle t-testu statistické významnosti). Tento jev ve výsledku vede k ještě výraznějšímu urychlování desensitizace.

Poslední z grafů popisujících desensitizační fázi odpovědi analyzuje vliv Phy na výšku desensitizačního plata odpovědi na  $10 \mu\text{M}$  ACh, tj. relativní závislost parametru C odpovědi ovlivněných Phy na koncentraci Phy (vztah 25). I zde jsem vynášela relativní hodnoty vztahované k velikosti plata kontrolní odpovědi (aritmetického průměru parametrů kontrol předcházející a následující za testovanou odpovědí). V koncentračním rozmezí mezi  $1 \mu\text{M}$  a  $1 \text{ mM}$  Phy stále výrazněji snižoval plato modulovaných odpovědí a při milimolární Phy koncentraci dosáhla desensitizace v daném koncentračním pásmu maxima (minimální plato) a po velice krátké době tak přecházela prakticky celá populace původně aktivovaných receptorů do desensitizovaného stavu.



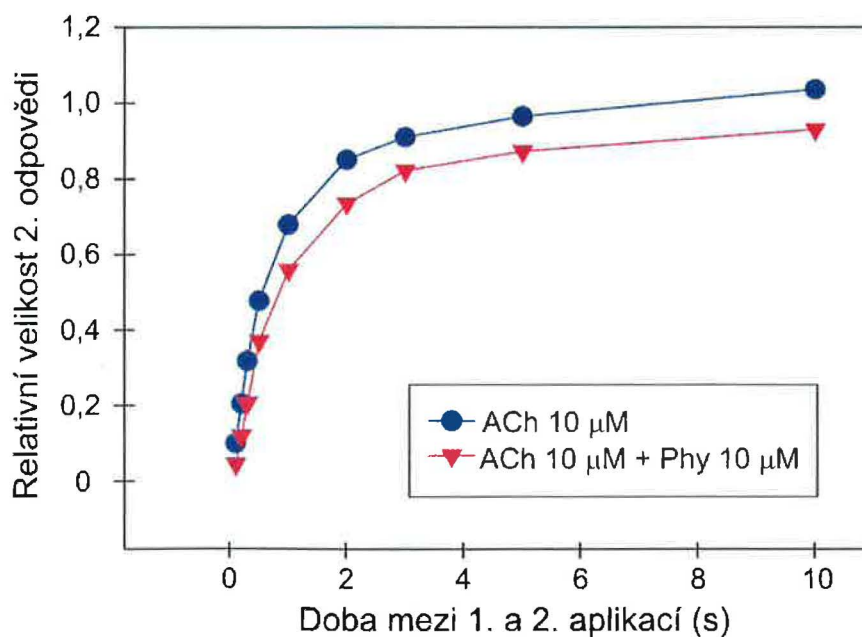


**Obrázek 35 – Vliv vzrůstající koncentrace pre- a koaplikovaného Phy na parametry desensitizace odpovědi vyvolané 10  $\mu$ M ACh: a) vliv Phy na jednotlivé složky amplitudy exponenciálních složek: Phy o koncentraci 1  $\mu$ M až 1 mM vyvolal koncentračně závislý pokles pomalejší složky  $A_1$ , která při Phy 1mM klesá téměř k nule. Vliv na rychlejší složku  $A_2$  nebyl tak výrazný, i přesto však 1 mM Phy tuto složku výrazně potlačuje, b) vliv Phy na velikost časových konstant  $\tau_1$  a  $\tau_2$ : graf popisuje závislost relativní velikosti časových konstant  $\tau_1$  a  $\tau_2$  na koncentraci Phy. Phy v koncentračním rozmezí od 1  $\mu$ M do 1 mM účinně zkracuje časové konstanty obou složek a míra působení Phy na obě časové konstanty je srovnatelná, c) vliv Phy na velikost plata odpovědi: Phy v koncentračním rozmezí od 1  $\mu$ M do 1 mM snižuje relativní výšku desensitizačního plata (členu C z exponenciálního proložení, konstantního v čase) v míře úměrné koncentraci aplikovaného Phy, přičemž 1 mM Phy redukuje plato téměř k nule. Všechny proudové odpovědi byly měřeny při membránovém potenciálu -10 mV.**



#### 4.2.1.5 *Phy zpomaluje resensitizaci embryonálních receptorů*

Resensitizace je přechod receptoru z desensitizovaného stavu do aktivovatelného klidového (angl. resting) stavu. Studovala jsem vliv přetrvávající aplikace 10  $\mu\text{M}$  Phy na schopnost resensitizace populace embryonálních receptorů desensitizovaných 10sekundovou aplikací 10  $\mu\text{M}$  ACh. Schéma pokusu bylo následující: Snímala jsem velikosti vždy dvou po sobě jdoucích ACh odpovědí v přítomnosti Phy a kontrolní dvojice odpovědí bez Phy. První 10 s dlouhá aplikace ACh sloužila k uvedení populace receptorů do desensitizovaného stavu. Následovala pauza přesně definované délky, kdy nebyl aplikován žádný ACh, buňka byla oplachována kontrolním roztokem s Phy (či pouze ECS roztokem). V této době docházelo k postupné resensitizaci, tj. znovuvedení do klidového stavu. Poté byl opět aplikován ACh o stejné koncentraci. Byl měřen postupný návrat velikosti druhé odpovědi v závislosti na době odmývání ACh (interval mezi dvěma aplikacemi) a kvantifikován jako míra relativního poklesu odpovědi vůči amplitudě první odpovědi (míra resensitizace). Křivku resensitizace jsem tedy vynášela jako závislost relativní amplitudy druhé odpovědi na délce časové prodlevy. Vliv Phy jsem vyhodnocovala jako změnu tvaru a kinetiky kontrolní resensitizační křivky, je-li v průběhu měření kontinuálně aplikován roztok 10  $\mu\text{M}$  Phy. Jak je patrné z obr. 36, přítomnost Phy skutečně ovlivnila schopnost návratu receptorů z desensitizovaného do klidového stavu. Při proložení resensitizační křivky jednoexponenciální funkcí odpovídá resensitizaci ovlivněné Phy časová konstanta návratu  $\tau_{\text{Phy}} = 554 \pm 62$  ms, zatímco kontrolní



**Obrázek 36 - Vliv 10 $\mu\text{M}$  Phy na průběh resensitizace odpovědí na ACh (10  $\mu\text{M}$ ) embryonálních receptorů:** Resensitizační křivka udává závislost relativní velikosti 2. odpovědi na délce časového intervalu mezi koncem 1. a počátkem 2. ACh aplikace. Z obrázku je patrné, že pre- a koaplikace 10  $\mu\text{M}$  Phy (červená křivka) zpomaluje resensitizaci embryonálních receptorů k ACh (v porovnání s kontrolní, modrou závislostí). Resensitizační křivky můžeme proložit exponenciální funkcí. Kontrolní odpověď samotného ACh pak resensitizuje s časovou konstantou 391 ms, zatímco odpovědi ovlivněné přetrvávající aplikací 10  $\mu\text{M}$  Phy resensitizují s konstantou 554 ms.

resensitizační křivka je charakterizována  $\tau_{\text{kontr}} = 391 \pm 53$  ms. Dokonce i po 10sekundové časové prodlevě, kdy kontrolní ACh odpovědi v nepřítomnosti Phy dospěly do 100 % amplitudy první odpovědi (byla tedy opět k dispozici stejně početná populace aktivovatelných receptorů), zůstává relativní velikost odpovědi populace ovlivněné Phy na 93 % kontroly.

#### 4.2.2 Vliv galanthaminu na funkci embryonálního receptoru

Dalším inhibitorem AChE, u kterého byl zkoumán přímý vliv na acetylcholinové receptory, je Gal. Samostatně aplikovaný Gal v koncentračním rozmezí 100 nM až 1 mM nevyvolával na buňkách exprimujících embryonální receptor při měření metodou terčíkového zámku v konfiguraci měření z celé buňky žádné měřitelné odpovědi. Proto jsme se rozhodli zkoumat vliv pre- a koaplikace Gal o různých koncentracích na amplitudu a jiné charakteristiky odpovědí vyvolaných zejména 10  $\mu\text{M}$  ACh (blízko  $\text{EC}_{50}$  u embryonálního receptoru).

##### 4.2.2.1 Gal inhibuje odpovědi nAChR vyvolané ACh

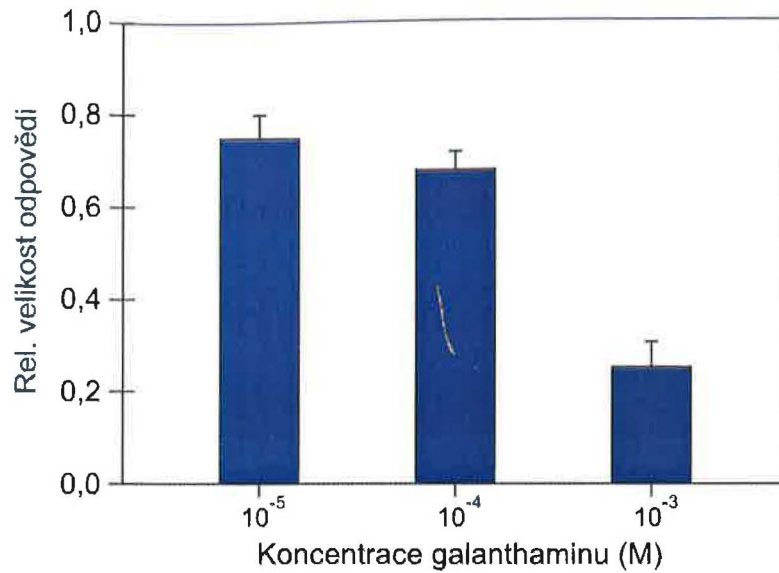
Nejprve jsem se pokusila stanovit část inhibiční křivky pro 10  $\mu\text{M}$  ACh a Gal o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  až 1 mM. Graf této závislosti je uveden na obr. 37. Již 10  $\mu\text{M}$  koncentrace Gal způsobila více než 20% pokles amplitudy ACh odpovědi. Se zvyšující koncentrací se inhibice dále prohlubuje, ale ani 1 mM Gal nebyl schopen úplně zablokovat odpověď na 10  $\mu\text{M}$  ACh.

Pro body z obr. 37 jsem použila Schildovy analýzy (vztah 20) a první dva body (0,1-1 mM Gal), u kterých se dala pozorovat nejvyšší hodnota směrnice  $a$ , jsem proložila lineární funkcí (obr. 38). Výsledkem byla přímka se směrnici  $a = 0,72 \pm 0,20$ . Z tohoto testu je tedy patrné, že Gal v koncentračním rozmezí od 10  $\mu\text{M}$  do 1 mM (ani při 10  $\mu\text{M}$  Gal) o vazebná místa s ACh nekompetuje.

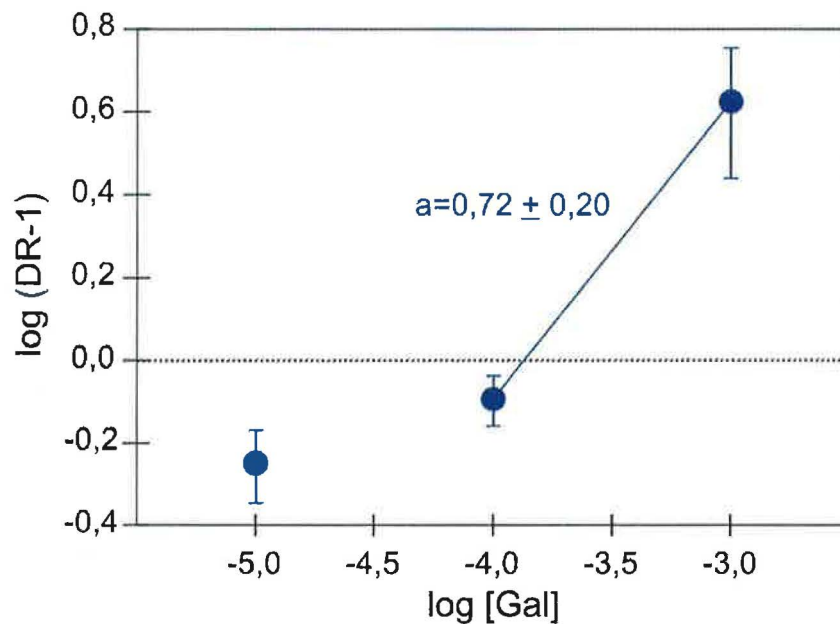
##### 4.2.2.2 Způsobuje galanthamin blokádu otevřeného kanálu?

V dalším testu jsem se zaměřila na diagnostiku nekompetitivního působení Gal na nAChR, která může v zásadě zahrnovat dva mechanismy: alosterickou inhibici a blokádu otevřeného kanálu.

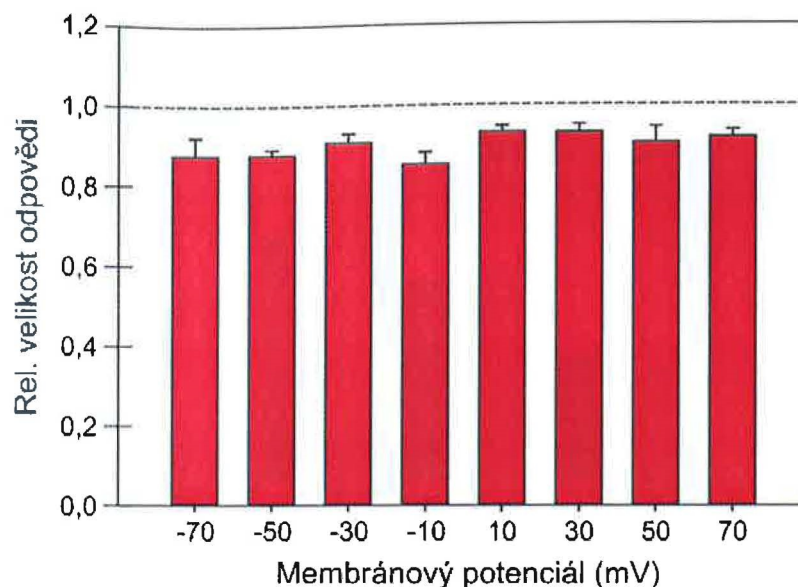
Přítomnost blokády otevřeného kanálu se dá ověřit známým testem zahrnujícím napět'ovou závislost inhibice. Vzhledem k tomu, že Gal v sobě nese několik kladně nabitých dusíkatých skupin, projevila by se blokáda otevřeného kanálu na záporném membránovém potenciálu a na kladném potenciálu by plně vymizela. Pro ověření této hypotézy jsme testovali účinek 10  $\mu\text{M}$  Gal na 10  $\mu\text{M}$  ACh v poměrně širokém napět'ovém rozmezí mezi -70 mV a +70 mV. Graf této závislosti je uveden na obr. 39. Jak je vidět, míra inhibice se napříč celou napět'ovou škálou od -70 mV do +70 mV nemění a k blokáde otevřeného kanálu zřejmě nedochází.



**Obrázek 37 - Vliv Gal na velikost odpovědi embryonálního receptoru vyvolané ACh (10  $\mu$ M):** pre- a koaplikace Gal v koncentračním rozmezí od 10  $\mu$ M do 1 mM redukuje velikost odpovědi na ACh úměrně ke koncentraci Gal, avšak ani 1mM koncentrace Gal není schopna plně inhibovat ACh odpověď.



**Obrázek 38 - Schildovo vynesení Gal indukované inhibice ACh odpovědi:** Gal inhibiční křivka z minulého obrázku byla převedena do Schildova plotu. Proložíme-li jeho body lineární funkcí, nejvyšší směrnice odpovídá proložení mezi koncentracemi 100  $\mu$ M a 1 mM Gal, avšak ani zde směrnice nenabývá ani v rámci statistické odchylky hodnoty 1 ( $a = 0,72 \pm 0,20$ ). Gal tedy v testované koncentrační oblasti nekompetuje s ACh o vazebné místo.



Obrázek 39 - Nezávislost míry Gal (10  $\mu\text{M}$ ) inhibice odpovědi aktivovaných ACh (10  $\mu\text{M}$ ) na velikosti membránového potenciálu: relativní velikost ACh odpovědi ovlivněné pre- a koaplikací Gal a vztažené vzhledem ke kontrolní ACh odpovědi byla vynášena oproti hodnotě membránového potenciálu. Jak je vidět, míra inhibice se napříč celou napěťovou škálou od -70 mV do +70 mV téměř nemění.

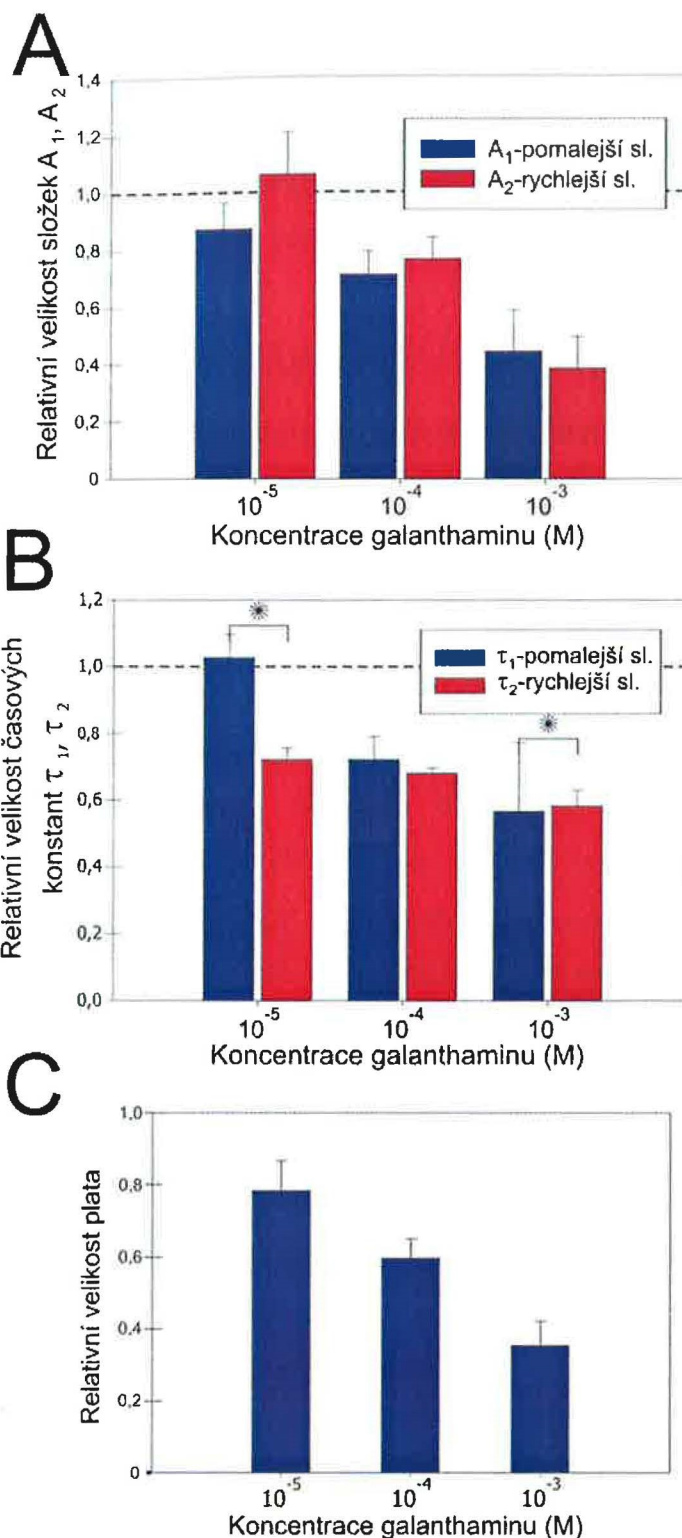
#### 4.2.2.3 Vliv galanthaminu na desensitizační kinetiku ACh odpovědi

Obr. 40 popisuje změnu desensitizační kinetiky embryonálního receptoru způsobenou působením Gal v koncentračním rozmezí od 10  $\mu\text{M}$  do 1 mM.

První graf (obr. 40a) popisuje vliv Gal na jednotlivé složky amplitudy odpovědi na 10  $\mu\text{M}$  ACh. Se zvyšující se koncentrací Gal se relativní velikost jednotlivých složek amplitudy snižuje. T-test však nenalezl v míře ovlivnění amplitud první a druhé složky na měřeném Gal koncentračním rozmezí žádný statisticky významný rozdíl. V počáteční stati výsledků jsem popisovala obvyklý poměr velikosti složky  $A_1$  (pomalejší, nižší) vůči  $A_2$  (rychlejší, vyšší) pro odpověď embryonálního receptoru na 10  $\mu\text{M}$  ACh. Je patrné, že na výslednou velikost amplitudy bude mít podstatnější vliv míra ovlivnění rychlejší a vyšší ze složek  $A_2$ , avšak poměr inhibice obou složek výrazně vypovídá o kinetice vlivu Gal na funkci recepturu. Pro dvě slabší Gal koncentrace způsobuje inhibice pomalejší ze složek ve výsledku zrychlení desensitizačního poklesu. U nejvyšší milimolární koncentrace Gal se poměr míry inhibice obou složek obrací, avšak rozdíl v inhibici stále nedosahuje statistické významnosti a je potřeba připomenout, že celková amplituda odpovědi je zde redukována na cca 25 % a měření je tak ovlivněno relativně větší statistickou chybou.

Kromě změn velikosti složek amplitudy jsem se pokusila o analýzu změn časových konstant odpovědí na 10  $\mu\text{M}$  ACh vyvolaných aplikací Gal (koncentrace 10-1000  $\mu\text{M}$ ; obr. 40b). Velikost časové konstanty pomalejší složky  $\tau_1$  se pro 10  $\mu\text{M}$  Gal prakticky nezměnila, avšak druhá složka ( $\tau_2$ ) byla touto koncentrací výrazně zkrácena (podle t-testu byl rozdíl mezi ovlivněním časových konstant statisticky významný), a pro obě složky při vyšších koncentra-





**Obrázek 40 – Vliv Gal na parametry desenzitizace odpovědi vyvolané 10  $\mu$ M ACh: a) vliv Gal na složky amplitudy odpovědi na ACh: 10  $\mu$ M koncentrace Gal relativní amplitudu rychlejší složky A<sub>2</sub> prakticky nemění, pomalejší složka a obě složky u vyšších koncentrací Gal jsou inhibovány v koncentračně závislém modu (rozdíl mezi inhibicí složek však nedosahuje stat. významnosti), b) vliv Gal na velikost časových konstant  $\tau_1$  a  $\tau_2$  desenzitizace ACh odpovědi: časová konstanta  $\tau_2$  (rychlejší komponenta) je výrazně redukována na všech třech koncentracích Gal s maximální inhibicí na 1 mM Gal, zatímco 10  $\mu$ M Gal konstantu  $\tau_1$  (pomalejší komponenta) prakticky nemění, c) vliv Gal na výšku desenzitizačního plata ACh odpovědi: Gal v daném koncentračním rozmezí účinně prohlubuje míru desenzitizace, a to úměrně koncentraci Gal. V porovnání s Phy však redukce plata (zvláště při 1 mM koncentraci) nedosahuje takové míry. Měření byla prováděna na přirozeném embryonálním receptoru při membránovém potenciálu -10mV.**

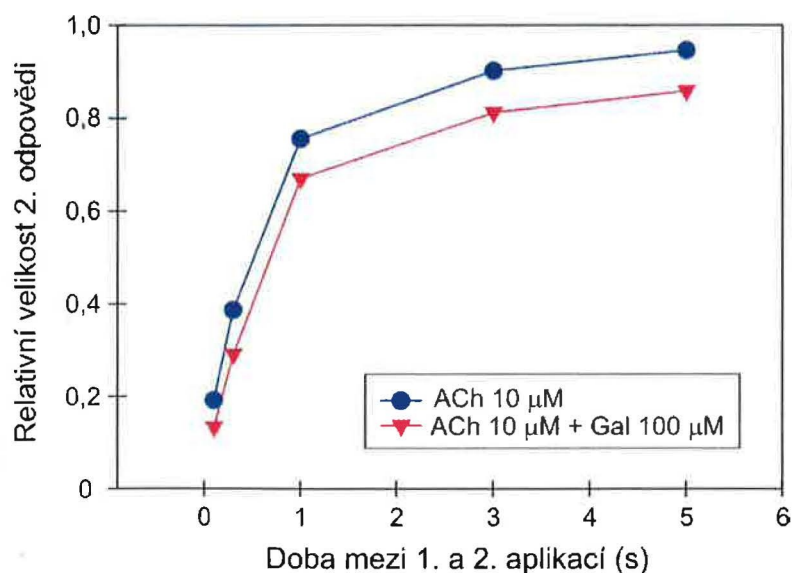


koncentracích platí, že se zvyšující se koncentrací se míra redukce časových konstant prohlubuje.

Obr. 40c popisuje závislost relativní velikosti desensitizačního plata na koncentraci pre- a koaplikovaného Gal. Je patrné, že Gal v koncentracích od 10  $\mu\text{M}$  do 1 mM prohlubuje míru desensitizace (snižuje výšku plata), a to koncentračně závislým způsobem.

#### 4.2.2.4 Galanthamin zpomaluje resensitizaci embryonálních nAChR

Na obr. 41 vidíme porovnání resensitizační křivky pro samostatně aplikovaný 10  $\mu\text{M}$  ACh a resensitizaci odpovědi na 10  $\mu\text{M}$  ACh aplikovaný do přetrvávající aplikace 100  $\mu\text{M}$  Gal. Schéma experimentu bylo stejné jako v případě měření resensitizace ovlivněné Phy. Z obrázku je patrné, že pro jednotlivé časové úseky nabývá druhá (desensitizovaná a resensitizující) odpověď vždy menší relativní velikosti pro odpovědi ovlivněné Gal, tj. rychlost resensitizace embryonálního receptoru se (při 10  $\mu\text{M}$  ACh) vlivem 100  $\mu\text{M}$  Gal snižuje. Tuto rychlost resensitizace lze přesněji kvantifikovat. Časovou závislost resensitizace je možné proložit jednoexponenciální funkcí. Časová konstanta kontrolní acetylcholinové resensitizační křivky byla rovna  $\tau_{\text{kontr}}=282\pm 49$  ms, přičemž resensitizace embryonálního receptoru pod stálou aplikací 100  $\mu\text{M}$  Gal se prodlužuje na  $\tau_{\text{Gal}}=372\pm 63$  ms. Ani 5s časový úsek neumožnil v případě Gal kompletní resensitizaci a velikost druhé odpovědi zůstává rovna 86 % (oproti 95% resensitizaci kontroly).



**Obrázek 41 - Vliv 100  $\mu\text{M}$  Gal na resensitizaci odpovědi na ACh (10  $\mu\text{M}$ ) embryonálního receptoru:** Resensitizační křivka udává závislost relativní velikosti 2. odpovědi na délce prodlevy mezi koncem 1. a počátkem 2 aplikace ACh. Z obrázku je patrné, že pre- a koaplikace 100  $\mu\text{M}$  Gal (červená křivka) snižuje rychlost resensitizace (vzhledem ke kontrolní modré křivce). Kontrolní odpověď samotného ACh resensitizuje s časovou konstantou 282 ms, zatímco odpovědi ovlivněné přetrvávající aplikací 100  $\mu\text{M}$  Gal resensitizují s konstantou 372 ms.

## 5 Diskuse

### 5.1 Aktivace svalových nikotinických acetylcholinových receptorů

#### 5.1.1 Popis aktivace a desensitizace rekombinantních svalových nAChR exprimovaných v linii COS-7

ACh je v případě embryonálního i dospělého svalového receptoru účinný agonista a na divokých (přírodních, nemutovaných) typech svalových nAChR je schopný aktivovat více než 90 % z populace přítomných receptorů (C.J. Lingle a kol., 1992).

V našich experimentech byly aktivační ACh křivky rekombinantních nAChR (přirozený embryonální a dospělý receptor) charakterizovány dvěma základními parametry. Prvním je  $EC_{50}$ , které v našem případě jednoduché sigmoidní závislosti charakterizuje střed koncentračního pásu efektivní aktivace. Hodnoty  $EC_{50}$  myších svalových receptorů  $EC_{50emb} = (9 \pm 2,6) \mu\text{M}$  pro přirozený embryonální receptor a  $EC_{50adult} = (10 \pm 2,6) \mu\text{M}$  pro dospělý receptor byly velice podobné. Jak je vidět z obr. 21, aktivační křivka dospělého receptoru má strmější průběh a užší koncentrační rozmezí, v rámci něhož je receptor efektivně aktivovatelný. Tuto strmost popisuje druhý parametr, Hillův koeficient. Dospělému receptoru náleží vyšší Hillův koeficient  $H_{adult} = 1,70 \pm 0,29$  (v porovnání s Hillovým koeficientem embryonálního receptoru  $H_{emb} = 1,22 \pm 0,16$ ), což souvisí s vysokou ekvivalencí vazebných míst a zároveň s výraznějši kooperativitou. Funkční parametry našich rekombinantních receptorů exprimovaných v nesvalové buněčné linii byly velice podobné charakteristikám přirozeně exprimovaných svalových nAChR (D. Colquhoun a B. Sakmann, 1985, S.M. Sine, 1988). Hodnoty  $EC_{50}$  a Hillova koeficientu u obou *in vitro* exprimovaných receptorů vypovídají o tom, že tyto receptory by *in vivo* v případě zachování všech naměřených funkčních parametrů byly schopné efektivně fungovat v nativním prostředí, neboť „pracovní“ koncentrace ACh na nervosvalové ploténce se pohybuje okolo 0,5 mM (J.G. Nicholls a kol., 1992). To znamená, že v případě našich receptorů by bylo při chemické transmissi aktivováno okolo 90 % populace (C.J. Lingle a kol., 1992).

Dalšími parametry dobře charakterizujícími daný typ receptoru jsou parametry desensitizace. Tyto charakteristiky lze dokonce v kombinaci s molekulárně biologickými metodami užít při analýze receptorového vybavení různých tkání *in vivo*, zejména součástí nervové soustavy. Jak je však z obr. 22 a 34 vidět, přestože naše tkáňová kultura obsahovala pouze jeden typ receptorů, průběh desensitizace byl kromě specifických modulátorů výrazně závislý i na koncentraci použitého agonisty. Závislost na koncentraci agonisty souvisí s kinetikou (a tvarem kinetického schématu) receptoru a afinitou jednotlivých aktivovaných a desensitizovaných stavů. Při nízkých koncentracích se uplatňují nejdříve stavy s relativně nejvyšší afinitou a s výhodnou polohou v kinetickém schématu (závisí i na absolutní velikosti

jednotlivých rychlostních konstant), při zvyšování koncentrace dochází k zaplnění stavů s nižší afinitou. Proto jsme v případě odpovědi na 100 nM ACh pozorovali velice pomalý pokles, který bylo možné spolehlivě proložit pouze lineární funkcí, zatímco v případě 1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M koncentrace ACh odpověď klesala s jednoexponenciální, resp. dvouexponenciální funkcí.

### 5.1.2 (+)-Tubokurarin patrně působí na dospělém nAChR kromě kompetitivní inhibice i prostřednictvím parciálního agonismu

Tubokurarin je z literatury znám jako příklad kompetitivního inhibitoru nAChR (R.R. Neubig a J.B. Cohen, 1979, S.M. Sine a P. Taylor, 1981). Z dalších zdrojů je známa funkce (+)-Tc jakožto blokátoru otevřeného kanálu (R. Beranek a F. Vyskocil, 1967, D. Colquhoun a kol., 1979). Mezi nejzajímavější zjištění ohledně (+)-Tc však patří objev schopnosti slabé aktivace, resp. parciálního agonismu (+)-Tc (J.H. Steinbach a Q. Chen, 1995, K. Takeda a A. Trautmann, 1984, L. Ziskind a M.J. Dennis, 1978). Tyto různé účinky byly pozorovány mimo jiné v závislosti na koncentračním rozmezí jak samotného (+)-Tc, tak ACh. Proto jsme se rozhodli otestovat mechanismus působení (+)-Tc v poměrně velké koncentrační škále od 0,1 nM (resp. 1 nM) do 10  $\mu$ M (+)-Tc, a to na odpovědích vyvolaných 10  $\mu$ M ACh.

Zaměřili jsme se na popis mechanismu působení (+)-Tc na dospělém a embryonálním přirozeném receptoru. V klasické farmakologii je popisován zejména kompetitivní účinek (+)-Tc na svalovém nAChR. Metod, kterých je možno užít pro potvrzení kompetice ve funkční elektrofyziologické studii, je několik, nejužívanějšími jsou tyto:

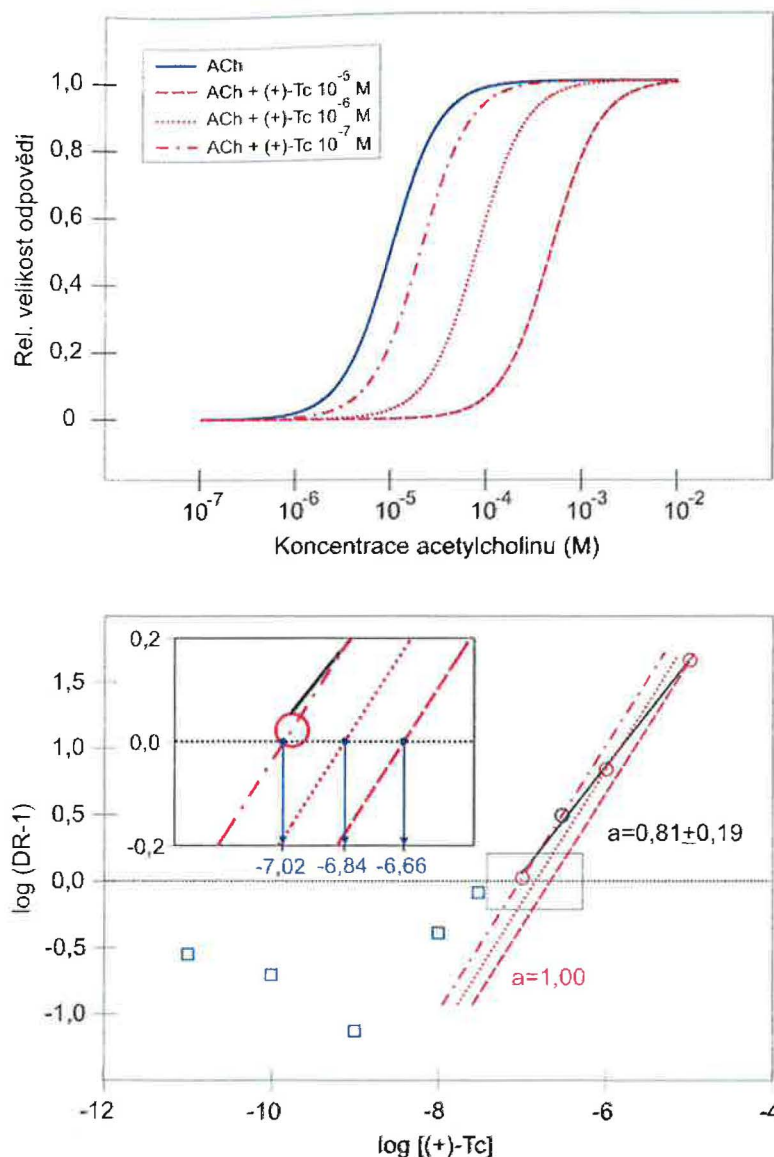
První metodou je užití sady aktivačních křivek pro různé koncentrace (+)-Tc. Kompetice (+)-Tc s ACh přichází v úvahu v případě, kdy se tyto aktivační křivky paralelně posunují spolu s rostoucí koncentrací (+)-Tc směrem k vyšším koncentracím ACh, přičemž u nich zůstává zachován jak tvar sigmoidy (tj. Hillův koeficient), tak velikost maximální odpovědi. Ilustrační sada takových aktivačních křivek je uvedena v horním grafu obr. 42 (data použitá v grafu jsou pouze ilustrační a byla získána kombinací měření a výpočtu aktivačních křivek za užití předpokladu kompetice (+)-Tc s ACh). My jsme pro zjištění mechanismu působení (+)-Tc zvolili tzv. Schildovu metodu (dolní graf obr. 42), ke které je potřeba spolehlivě naměřená aktivační křivka pro samotný ACh a inhibiční křivka (+)-Tc naměřená pro vhodně zvolené koncentrace ACh.

Schildovou metodou (vztahy 16, 17) a podle modifikovaného Cheng-Prusoffova vzorce (vztah 15) byly v případě přirozeného embryonálního a dospělého receptoru určeny hodnoty afinity (+)-Tc v oblasti koncentrací, kde se dá uvažovat o kompetitivní vazbě. U dospělého i embryonálního receptoru se kompetice týkala koncentrací od 0,1  $\mu$ M do 10  $\mu$ M (+)-Tc na odpovědích aktivovaných 10  $\mu$ M ACh. Podle Schildovy metody vyšla afinita (+)-Tc

k embryonálnímu receptoru nepatrně nižší než k dospělému receptoru (na hranici statistické významnosti), zatímco metodou Cheng-Prusoffovou vychází afinita embryonálního receptoru vyšší než dospělého. Avšak při srovnání hodnot získaných různými metodami se rozdíly stírají a je naopak třeba si povšimnout systematického posunutí hodnot  $K_B$  získaných Cheng-Prusoffovou metodou směrem k nižším koncentracím (vyšší afinitě). Rozdíl si vysvětlují ve smíšeném účinku kompetitivní inhibice a blokády otevřeného kanálu při vyšších koncentracích (+)-Tc.

U inhibiční křivky dospělého přirozeného a dvakrát mutovaného receptoru jsme pozorovali v oblasti nejnižších koncentrací pokles relativních odpovědí. Příčina této inhibice není jasná. V práci Steinbacha a Chena (J.H. Steinbach a Q. Chen, 1995) byl pozorován parciální agonismus (+)-Tc, který by za určitých podmínek vysvětloval deformaci inhibiční křivky, avšak v citované práci byl tento jev pozorován při výrazně nižších koncentracích ACh. Případný aktivační účinek by měl zřejmě za následek posunutí celé inhibiční křivky směrem k vyšším koncentracím (a snížení zdánlivé afinity (+)-Tc). Celý mechanismus by však bylo potřeba podrobit důkladné analýze z hlediska kinetických parametrů a konkrétních kinetických schémat, což vzhledem k rozptylu parametrů (např. rychlosti nástupu a odmývání inhibovaných odpovědí) nebylo možné. Je zároveň zajímavé, že u embryonálních receptorů jsme podobný jev nepozorovali. Může to souviset s výraznou neekvivalencí vazebných míst, kde v případě smíšeného obsazení ACh a (+)-Tc není účinnost konformační přeměny ve směru k otevření vzhledem k podstatě parciálního agonismu natolik vysoká, aby se projevil parciálně aktivační vliv (+)-Tc. Pozorovaná inhibiční křivka by tak opravdu odpovídala pouze inhibici a zdánlivá afinita ( $i$  hodnota afinity získaná Schildovou metodou) by tak u embryonálního receptoru lépe odpovídala skutečnosti. Afinita (+)-Tc vzhledem k embryonálnímu receptoru by byla nižší než k dospělému.





**Obrázek 42 - Porovnání metody aktivačních křivek a Schildovy metody při určování kompetice inhibitoru s agonistou:** Na prvním grafu jsou uvedeny aktivační křivky ACh na dospělém přirozeném receptoru, a to kontrolní resp. v přítomnosti různých koncentrací (+)-Tc (10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> M). Tyto závislosti byly vygenerovány pouze jako ilustrace technické náročnosti této metody za použití experimentálních dat a předpokladu kompetice (+)-Tc s ACh. Důkazem kompetice by bylo paralelní posunutí aktivačních křivek působením (+)-Tc, u nichž by tvar (Hillův koef.) i maximum zůstaly nezměněny. Ve spodní části obrázku je uvedeno Schildovo vynesení pro inhibici ACh (10 μM) odpovědi (+)-tubokurarinem na téže receptoru. Funkcí  $y=x+y_0$  jsem prokládala pouze body, pro které je směrnice lineárního proložení v rámci odchylky rovna 1 (tj. v koncentracích 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> M). Průsečíky funkce  $y=x+y_0$  s x-ovou osou udávají hodnoty logaritmu afinity (+)-Tc k ACh vazebnému místu.

### 5.1.3 Aktivace embryonálního a dospělého nAChR probíhá různými mechanismy

$EC_{50}$  acetylcholinu bylo v našich experimentech pro dospělý i embryonální receptor téměř totožné, zatímco Hillův koeficient byl u dospělého receptoru podstatně vyšší (1,7 oproti 1,2). Vyšší hodnota Hillova koeficientu aktivační acetylcholinové křivky dospělého receptoru (vzhledem k embryonálnímu receptoru) se dá vysvětlit menším rozdílem ve velikosti afinit (vyšší ekvivalenci) jednotlivých vazebných míst (C.E. Spivak, 1995) a ve vyšší míře jejich kooperativity. Tím se také liší od embryonálního receptoru, který má hodnoty afinit obou



vazebných míst podstatně rozdílnější (G. Akk a A. Auerbach, 1996, P. Blount a J.P. Merlie, 1989, F.N. Salamone a kol., 1999). Prakticky stejná hodnota  $EC_{50}$  embryonálního a dospělého receptoru tak nevypovídá o stejném fungování těchto receptorů, neboť na aktivaci se u každého z receptorů podílejí různé mechanismy odlišnou měrou. Vyšší hodnota účinnosti otevírání u embryonálních receptorů byla již dříve potvrzena např. v práci (D.J. Maconochie a J.H. Steinbach, 1998). Rychlostní konstanta otevírání  $\beta$  je podle této práce sice vyšší pro dospělý receptor ( $80\,000\text{ s}^{-1}$ ) než pro embryonální ( $60\,000\text{ s}^{-1}$ ), avšak výsledná účinnost otevírání  $E=\beta/\alpha$  ( $\alpha$  je rychlostní konstanta zavírání) je z důvodu vysoké rychlosti zavírání dospělého receptoru vyšší pro embryonální receptor ( $E=50$ ) než pro dospělý receptor ( $E=33$ ). Gu, Franco a spoluautoři (Y. Gu a kol., 1990) porovnávali délky salv otevření a zjistili, že salvy embryonálních receptorů trvají až 10x déle než receptorů dospělých, což je v souladu s pozorováním, že délky salv jsou určeny rychlostmi zavírání (D.J. Maconochie a J.H. Steinbach, 1998). Embryonální receptor tak více preferuje otevřený stav. Z práce (J. Krusek a F. Vyskocil, 2003) je patrné, že pro většinu receptorů podobných svalovému nAChR má změna účinnosti otevírání  $E$  podstatně menší vliv na hodnotu Hillova koeficientu, než je míra neekvivalence afinit vazebných míst (zn.  $Y$ , poměr afinit). Vliv  $E$  a  $Y$  na hodnotu  $EC_{50}$  je komplikovanější a výrazně závisí na konkrétní kombinaci hodnot jednotlivých parametrů a na typu modelu aktivace (J. Krusek a F. Vyskocil, 2003, C.E. Spivak, 1995).

Úlohu záporně nabitých aminokyselin F-smyčky  $\delta$  podjednotky ( $\delta:D^{180}$  a  $\delta:E^{189}$ ) dospělého receptoru jsem spatřovala v účasti na procesu otevírání receptoru (tedy ovlivňující  $E$ ; viz dále). Pokud je jejich funkce v embryonálním receptoru totožná, dá se z předchozích úvah očekávat, že obdobná mutace by u embryonálního receptoru vedla k ještě markantnějším změnám účinnosti aktivace než u dospělého receptoru. Srovnání mutace dospělého a embryonálního receptoru se nám však z technických důvodů nezdařilo.

#### 5.1.4 $\delta:D^{180}$ a $\delta:E^{189}$ F-smyčky dospělého receptoru se účastní

##### konformační změny vazebného místa a iniciace otevření iontového kanálu

Dvojnásobnou mutací ACh vysokoafinitního místa byl více ovlivněn účinek agonisty ACh než inhibiční účinek (+)-Tc ( $EC_{50}$  ACh se 40-krát zvýšilo, afinita (+)-Tc vzhledem k vazebnému místu pro ACh se snížila pouze zhruba dvakrát). Důležitým faktorem je, že agonisté preferují při vazbě vysokoafinitní otevřený, popř. desenzitizovaný stav, avšak kompetitivní antagonisté žádnou konformační změnu nevyžadují (vážou se se stejnou afinitou na klidový uzavřený i otevřený stav). Otevření kanálu tedy agonisty svým způsobem stabilizuje ve vazebném místě. Stabilizace se dá mechanisticky vysvětlit konformační změnou vazebného místa (T.

Grutter a J.P. Changeux, 2001). Po navázání patřičného počtu molekul agonisty podle této publikace následuje „uzamčení“ vazebných kapes C-smyčkou v součinnosti se smyčkami komplementární podjednotky, tedy smyčkami D, E, F (obě mutované aminokyseliny se nacházejí přímo v F-smyčce nebo v jejím blízkém okolí). Diskutovaná konformační změna není pozorována u kompetitivních antagonistů, jejichž afinita se pak po navázání dále nemění a nenutí tak receptor k přechodu do otevřeného stavu. Účinek mutovaných záporně nabitých aminokyselin se dá vysvětlit dalekosahovou elektrostatickou interakcí mezi záporně nabitými aminokyselinovými zbytky a kladně nabitou amoniovou skupinou ACh molekuly, popř. kladně nabitými residui C-smyčky. Tato interakce může ve fyziologických roztocích může působit i na 10 Å (D.A. Stauffer a A. Karlin, 1994). Prvotní vazba ACh na receptor by se tak odehrávala převážně prostřednictvím interakce mezi primární  $\alpha$  podjednotkou a ACh, zatímco komplementární podjednotka by molekulu agonisty stabilizovala v jeho poloze a následně ve spolupráci s dalšími vazebnými smyčkami (hlavně C-smyčky) uzamkla. Tento děj je spojen se zvýšením afinity a iniciuje další posloupnost dějů vedoucí k otevření iontového kanálu. Je zajímavé, že protein AChBP, u něhož nebyl pozorován přechod do otevřené konformace, má právě tyto záporně nabitě aminokyseliny v primární struktuře posunuty blíže k N-konci řetězce. Nabízí se vysvětlení, že ke konformačnímu přechodu AChBP nedochází z důvodu nedokonalé (nikoli neexistující) konformační změny vazebného místa spojené mimo jiné s posunutím struktury odpovídající F-smyčce. Při vazbě ACh na svalovém receptoru a AChE jsou patrné některé podobnosti. U obou proteinů stabilizují vazbu ACh ve vazebném místě záporně nabitě aminokyseliny (u nAChR F-smyčka a u AChE anionické místo), otázkou je snad pouze pořadí dějů (anionické místo má za úkol navázat kvarterní dusík ACh molekuly a nasměrovat ji tak do esterického místa, kde se váže karboxylová součást ACh a probíhá vlastní hydrolýza, zatímco u nAChR předpokládáme nejdřív nasednutí ACh zejména prostřednictvím aromatických aminokyselin hlavní -  $\alpha$ -části - vazebného místa a poté uzamčení smyčkami, např. F-smyčkou).

Účinek mutace  $\delta$ :E189Q dospělého receptoru byl (přestože se také jedná o zaměnění záporně nabitě aminokyseliny neutrálním ekvivalentem) slabší než účinek mutace  $\delta$ :D180N. Aminokyselina  $\delta$ :D<sup>180</sup> se podle strukturních studií (N. Unwin, 2005) nalézá přímo v F-smyčce komplementární části vazebného místa, zatímco  $\delta$ :E<sup>189</sup> již není přímou součástí této smyčky.  $\delta$ :E<sup>189</sup> se tak nemusí účastnit stabilizace agonisty až takovou měrou, i když její podíl je neoddiskutovatelný. Dvojitá mutace  $\delta$ :D180N|E189Q měla vliv na parametry ACh křivky ještě větší (40x zvýšené  $EC_{50}$ , pokles Hillova koeficientu z 1,7 na 1,1), mutace obou aminokyselin má vliv na činnost receptoru.

(+)-Tc se však projevuje i jako parciální agonista (J.H. Steinbach a Q. Chen, 1995). Dalo by se to vysvětlit tak, že při navázání (+)-Tc přece jen dochází k malému (resp. méně pravděpodobnému) pootočení smyček ve smyslu uzamčení vazebného místa. Tento pohyb

jen s malou pravděpodobností dosáhne požadované meze, aby následovalo otevření iontového kanálu. To by se však mělo projevit v malém rozdílu disociačních konstant získaných metodou inhibiční funkční studie a vazebnou studií, avšak vzhledem k reálné přesnosti měření by tento rozdíl nemusel být patrný.

Dalším důležitým faktorem je skutečnost, že pro účinnou inhibici činnosti nAChR postačí navázání pouze jedné molekuly (+)-Tc, která se pravděpodobněji váže na (+)-Tc-vysokoafinitní místo  $\alpha\varepsilon$ , které však mutací nebylo ovlivněno, zatímco pro účinnou aktivaci je zapotřebí obsazení obou ACh-vázajících míst, tedy i mutovaného místa  $\alpha\delta$ .

Dílčí jednobodové mutace  $\delta$  podjednotky byly testovány v práci (M. Martin a kol., 1996). Tato publikace je z velké části založena na vazebných studiích za použití  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -bungarotoxinu. Dalším rozdílem je exprese neúplných rekombinantních myších svalových receptorů ( $\alpha\beta\delta$ ,  $\alpha\beta\gamma$ ,...) v oocytech drápatky (*Xenopus*). V této práci dospěli k markantnějšímu rozdílu mezi ovlivněním vazby ACh a (+)-Tc (výrazná změna  $K_D$  ACh u  $\delta$ :D180N, malá změna  $K_D$  ACh mutací  $\delta$ :E189Q a malé změny  $K_B$  (+)-Tc způsobené oběma mutacemi), avšak povaha změn byla ve shodě s našimi výsledky.

## 5.2 Interakce inhibitorů AChE s nAChR

Karbamáty se v aktivním centru AChE vážou podobným mechanismem jako molekula ACh. Vzhledem k podobnosti mezi interakcí ACh s AChE, resp. ACh s nAChR, tak vyvstává otázka, zda karbamáty nemohou interagovat také s acetylcholinovým vazebným místem u svalových nAChR. Konkrétně by se jednalo o kompetitivní účinek Phy či Gal.

### 5.2.1 Physostigmin způsobuje blokádu otevřeného kanálu a alostericky zvyšuje afinitu otevřeného a desenzitizovaného stavu vůči ACh

V literatuře bylo popsáno několik mechanismů přímé interakce Phy s nAChR (E.X. Albuquerque a kol., 1984, J. Bufler a kol., 1996, K.O. Okonjo a kol., 1991, R. Zwart a kol., 2000). Ačkoliv zatím nebylo vazebné místo pro Phy podrobně popsáno, zdá se, že hlavní farmakologický účinek Phy bude mít nekompetitivní charakter. Nejprve byla potvrzena funkce Phy jakožto slabého nekompetitivního agonisty nAChR receptorů (I. van den Beukel a kol., 1998). Podle těchto prací se Phy váže mimo jiné na lysin  $\alpha 1$ :K $^{125}$  N-koncové domény, který je v  $\alpha$  podjednotkách konzervovaný, jak na modelu *T. californica* prokázal Schrattenholz a kol. (A. Schrattenholz a kol., 1993b). Otevření způsobená Phy sice vykazovala stejnou vodivost jako otevření pomocí ACh, avšak nebylo pozorováno shlukování do salv (J.C. Cooper a kol., 1996, K.P. Shaw a kol., 1985, R.E. Wachtel, 1993). V našich experimentech

však Phy nevyvolával žádné makroskopické proudy - odpovědi na úrovni celé buňky, tj. neprojevil se ani jako slabý agonista. Ke stejnému výsledku dospěli i v práci (R. Zwart a kol., 2000). Tento fakt není tak překvapivý, protože aktivace nAChR popsaná v literatuře byla pozorována při experimentech s použitím fluorescenčních technik nebo technikou terčíkového zámku v konfiguraci měření jednotlivých kanálů, tedy metodami schopnými citlivější detekce činnosti méně účinných agonistů.

10  $\mu\text{M}$  ACh aktivuje makroskopické proudy s rychlým nástupem a značnou mírou desensitizace. Při aplikaci 10  $\mu\text{M}$  ACh do přetrvávající aplikace Phy se projevil inhibiční účinek Phy, který byl závislý na koncentraci Phy. Phy zároveň ovlivňoval rychlost a míru desensitizace. 1 mM Phy byl schopen odpověď na ACh téměř úplně inhibovat (obr. 30).

První otázkou bylo, z jakého místa Phy v našem případě na receptor působí. Analýza aktivační křivky není jediným nástrojem při popisu působení ligandu. U inhibitorů, jejichž molekula má při fyziologickém pH elektrický náboj, lze zjistit vztah mezi umístěním vazebného místa inhibitoru v póru iontového kanálu a napětovou závislostí inhibice. Je-li náboj ligandu jako u Phy kladný, může se při negativním membránovém potenciálu projevit blokadou otevřeného kanálu (kladně nabitý inhibitor je vtahován k zápornému vnitřku buňky a „ucpe“ iontový kanál). Tato blokáda je napětově závislá a tudíž lze její účinky matematicky odlišit od napětově nezávislé modulace nebo kompetitivní inhibice. Z podstaty napětové blokady její účinek při kladném potenciálu pro kladně nabitý Phy úplně vymizí, což jsme také pozorovali, neboť při kladném membránovém potenciálu míra inhibice 10  $\mu\text{M}$  ACh proudů 100  $\mu\text{M}$  physostigminem klesla na cca 40 % (oproti 70 % při -40 mV). Phy na záporných membránových potenciálech působí mechanismem blokady otevřeného kanálu (obr. 31). Stejné chování bylo potvrzeno v dřívějších pracích (J. Bufler a kol., 1996). Publikace (J. Militante a kol., 2008) dokonce ztotožňuje místo, z kterého Phy způsobuje blokádu otevřeného kanálu s místem pro klasický blokátor QX-222. Z důvodu minimalizace blokady iontového kanálu jsme další experimenty prováděli při membránovém potenciálu -10 mV.

Vyloučíme-li blokádu iontového kanálu, stále zůstává napětově nezávislá složka inhibice. Možnost diagnostiky povahy inhibice nabízí Schildova analýza. Směrnice grafu Schildovy analýzy (obr. 33) nabývala pro koncentrace 10  $\mu\text{M}$  – 1 mM Phy hodnoty  $a=0,98\pm 0,14$  což je blízké k jedné. Tato hodnota je většinou interpretována jako důkaz kompetice inhibitoru s agonistou. V případě kompetice by se (podle Schildovy analýzy) Phy vázal k ACh vazebnému místu se zdánlivou afinitou  $K_B=30 \mu\text{M}$ . Zdánlivé afinity ACh a Phy by tak byly srovnatelné ( $EC_{50}$  acetylcholinu pro embryonální receptor je 9  $\mu\text{M}$ ), tudíž při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  Phy i ACh by obsazení vazebných míst mělo být podobné (neznačená to, že bude odpověď inhibována na jednu polovinu, neboť pro aktivaci receptoru jsou potřeba 2 molekuly ACh, zatímco v případě kompetitivní inhibice postačí k zablokování aktivace pouze jedna

molekula Phy). V případě, že bychom koncentraci Phy zafixovali na těchto 100  $\mu\text{M}$  a koncentraci ACh dále zvýšili, měla by se míra inhibice snížit. Tato situace byla testována a zobrazuje ji obr. 32 (závislost míry inhibice/aktivace 100  $\mu\text{M}$  Phy na koncentraci ACh). Jak je z grafu vidět, v oblasti koncentrací 10  $\mu\text{M}$  – 1 mM ACh je míra inhibice physostigminem prakticky konstantní, ACh tudíž není ani při nejvyšších koncentracích schopen vytlačit Phy z vazebného místa a Phy tedy musí působit odjinud a jiným způsobem než ACh. Hodnota směrnice  $a=1$  Schildovy regrese tedy v tomto případě neznámá nutně kompetici. V článku (F.J. Ehler, 1988) popisuje autor případ alosterického ligandu, který v určité kombinaci koncentrací agonisty a tohoto ligandu vykazuje směrnici  $a$  rovnou 1, přestože působí alostericky z jiného vazebného místa než ACh. Zdánlivě chybnou diagnostiku kompetitivnosti Phy pomocí Schildovy analýzy lze vysvětlit tak, že směrnici  $a$  v Schildově grafu lze považovat pouze za orientační parametr při určování kompetitivnosti. Hodnota  $a=1$  je sice nutnou, ale ne postačující podmínkou pro kompetici ligandu s agonistou. Částečně toto tvrzení potvrzuje pozorování Schrattenholze a kol. (A. Schrattenholz a kol., 1993b), kteří prokázali účast lysinu  $\alpha 1:K^{125}$  na vazbě Phy. Tato aminokyselina neleží přímo ve vazebném místě pro ACh, avšak v jeho blízkosti. I podle (E.F. Pereira a kol., 1993b, B. Schroder a kol., 1994) se Phy váže na oblast  $\alpha 118-145$ , resp.  $\alpha 181-216$ , což odpovídá řetězcům  $\beta 6-7$  a  $\beta 9-10$  N-koncového  $\beta$ -sendviče (K. Brejc a kol., 2001). Tyto řetězce sice nezasahují do vazebného místa pro ACh, avšak jsou k němu poměrně blízko (J. Militante a kol., 2008). Jakým způsobem ovlivňuje Phy receptor z alosterického místa? Může nám pomoci pozorování smíšeného účinku 100  $\mu\text{M}$  Phy na odpovědi vyvolané různými koncentracemi ACh (obr. 32). Afinita ACh je určena poměrem (efektivní) rychlosti navazování a odvazování ACh. Nástupní hrany odpovědí lze měřit pouze u nižších koncentrací agonisty, neboť je jejich tvar určen násobkem rychlostní konstanty navazování a koncentrace agonisty, tj. při vyšších koncentracích rychlost nástupu vzroste tak, že je srovnatelná či vyšší než rychlost aplikace a stane se neměřitelnou. Při měření nástupních hran malých, nedesenzitizujících odpovědí na 100-300 nM ACh jsme tak zjistili, že preaplikace 100  $\mu\text{M}$  Phy zkracuje  $\tau$  nástupní hrany na polovinu. Tento nástup jsme prokládali jednoexponenciální funkcí (nepublikováno). Phy tak může alostericky zvyšovat afinitu ACh vzhledem k vazebnému místu. Na hodnotě afinity se podílí ještě rychlost odvazování, ale tu se nám vzhledem k omezené rychlosti výměny roztoků (asi 50 ms) nepodařilo změřit. Domněnku o alosterickém zvyšování afinity pro ACh však posiluje potenciace přesahující 300 %, která byla pozorována právě u těchto malých ACh koncentrací, jak je vidět na obr. 32. Potenciaci proudů vyvolaných ACh na neuronálních receptorech  $\alpha 4\beta 2$  pozorovali i (R. Zwart a kol., 2000). Sterická blízkost vazebných míst ACh a Phy by takové působení umožňovala.

Popisujeme-li kinetiku nAChR sekvenčním schématem

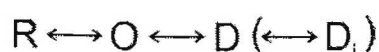


schéma (3)



kde R značí uzavřenou konformaci, O otevřený kanál a D desenzitizovaný stav, vazba Phy by tak posouvala rovnováhu směrem k vysokoafinitnímu otevřenému či desenzitizovanému(-ým) stavu(-ům). U nízkých, jinak nedesenzitizujících koncentrací ACh bylo po aplikaci Phy pozorováno výrazné zvýšení amplitudy následované desenzitizačním poklesem (obr. 32, 34). U odpovědi na vyšší koncentrace ACh (které již samy vyvolávají výrazný přechod do desenzitizovaného stavu) jsme po přidání Phy pozorovali (Phy-) koncentračně závislé zrychlování této desenzitizace (snižování  $\tau$  obou exponenciál; obr. 34, 35) a její prohloubení (snižování plata; obr.34, 35). Zvyšování afinity desenzitizovaného stavu tak mělo za následek zmnožení populace receptorů v desenzitizovaném stavu a efektivní snížení odpovědi. Stejný pokles odpovědi spojený se zrychlováním a prohlubováním desenzitizace již byl také pozorován (A. Storch a kol., 1995, R. Zwart a kol., 2000). Při nízkých koncentracích ACh tak zřejmě proti sobě působí děj potenciace s dějem desenzitizace (u nízkých koncentrací ACh je stále velký potenciál pro zvýšení aktivace vlivem zvýšení afinity – v relativní škále se více projeví potenciace). U vyšších koncentrací ACh, které jsou schopny aktivovat většinu přítomných receptorů, již zvyšování afinity nemá potenciační účinek a na relativní velikost odpovědi má převažující vliv usnadněný přechod do desenzitizovaného stavu, který se projeví jako pozorovaná inhibice (obr. 32). Na afinitě desenzitizovaného stavu se taktéž podílí velikost rychlosti opouštění tohoto stavu, tj. rychlost resenzitizace. Obr. 36 popisuje vliv 10  $\mu$ M Phy na rychlost resenzitizace odpovědi na 10  $\mu$ M ACh. Jak je vidět, aplikace Phy resenzitizaci mírně zpomalovala. Tento pokles rychlosti resenzitizace však není schopen vysvětlit téměř úplnou inhibici 10  $\mu$ M ACh odpovědi 1 mM physostigminem (obr. 30). Na zvýšení afinity desenzitizovaného stavu se tudíž zřejmě podílí hlavně markantní zrychlení vstupu do desenzitizace.

Phy tudíž způsobuje alosterické zvýšení afinity otevřeného a desenzitizovaného stavu způsobené zrychlením přechodu z klidového do otevřeného stavu, zvýšením rychlosti přechodu do desenzitizovaného stavu a patrně částečně i snížením rychlosti resenzitizace. Při vyšších negativních potenciálech způsobuje blokádu otevřeného kanálu.

### 5.2.2 Galanthamin alostericky zvyšuje afinitu desenzitizovaného stavu

V literatuře byl u submikromolárních koncentrací galanthaminu popsán potenciační účinek vzhledem k odpovědím nAChR. Bylo rovněž dokázáno, že Gal alostericky zvyšuje afinitu ACh k receptorům (A. Maelicke a kol., 2000). Vyšší než mikromolární koncentrace Gal podle literatury naopak odpovědi mechanismem blokády otevřeného kanálu snižují. Dále byl pozorován vliv Gal na snížení míry desenzitizace nAChR aktivovaných acetylcholinem (A. Maelicke a kol., 2001).

V našich experimentech samotný Gal v širokém koncentračním rozmezí 10 nM – 1 mM nevyvolával na přirozeném embryonálním nAChR žádnou makroskopickou odpověď.

Pre- a koaplikace 10  $\mu$ M – 1 mM Gal však byla schopna inhibovat odpovědi na 10  $\mu$ M ACh (obr. 37). Oproti téměř úplné blokádě odpovědi na ACh (10  $\mu$ M) 1 mM physostigminem (obr. 30) však Gal ani v nejvyšší, milimolární koncentraci nebyl schopen odpověď na ACh zcela inhibovat. Touto schopností Gal inhibovat cholinergní proudy se liší naše pozorování od (G. Akk a J.H. Steinbach, 2005), kde žádný vliv Gal na odpovědi vyvolané 5  $\mu$ M ACh nepotvrdili. V zásadě může Gal působit dvěma způsoby – kompetitivně nebo nekompetitivně. S ohledem na míru Gal inhibice odpovědi vyvolaných ACh (obr. 37) se dá uvažovat o kompetitivní inhibici pouze v případě, kdy by byla jeho afinita natolik nízká, že ani při těchto vysokých koncentracích není schopen ACh efektivně vytěsnit (zvláště vzhledem k faktu, že při experimentech byl roztok ACh aplikován teprve po pětisekundovém působení Gal, který tak již s největší pravděpodobností obsadil svá vazebná místa). Pravděpodobnější je druhá možnost, že Gal působí z jiného vazebného místa než ACh (alostericky nebo blokádou otevřeného kanálu) a jeho účinek se sice s koncentrací Gal mění, avšak nemá takovou inhibiční účinnost, aby mohl odpověď na ACh plně zablokovat. Rozhodující slovo k otázce kompetice Gal s ACh měla Schildova analýza inhibiční křivky (obr. 38), která ukázala, že v žádném koncentračním intervalu nepůsobí Gal čistě kompetitivním způsobem (nejvyšší hodnota směrnice  $a$  dosahovala hodnoty  $a = 0,72 \pm 0,20$ ). Vzhledem k vysokým koncentracím Gal přichází v úvahu smíšený kompetitivní účinek spojený s blokádou otevřeného kanálu, avšak, jak je vidět z obr. 39, žádnou potenciálově závislou složku inhibice se nepodařilo prokázat. Gal tedy nevyvolává blokádu otevřeného kanálu a jeho působení je buď čistě alosterické, nebo smíšené kompetitivní a alosterické. Alosterické modulátory mohou ze vzdáleného vazebného místa působit poměrně velkým množstvím mechanismů. Jedním z nich je změna afinity některých stavů nAChR, včetně stavu desenzitizovaného. Gal podle obr. 40b v koncentračním rozmezí 10  $\mu$ M až 1 mM zrychluje desenzitizaci embryonálního receptoru. Obr. 40c popisuje závislost relativní velikosti desenzitizačního pláta na koncentraci pre- a koaplikovaného Gal. Z tohoto obrázku je patrné, že Gal ve stejném koncentračním rozmezí také prohlubuje míru desenzitizace (koncentračně závislým způsobem). V urychlování a prohlubování desenzitizačního poklesu odpovědi na 10  $\mu$ M ACh, které je závislé na koncentraci Gal (obr. 40a,b,c) vidím podobnost s chováním Phy na embryonálním receptoru (obr. 35). Jedním z mechanismů, kterým může Gal inhibovat odpovědi na ACh, je alosterické zvyšování afinity desenzitizovaného stavu. Tomuto mechanismu nasvědčuje mimo jiné pozorování zpomalování resenzitizace pod vlivem 100  $\mu$ M Gal (obr. 41), neboť v sekvenčním schématu je rychlost resenzitizace jednou ze dvou složek afinity desenzitizovaného stavu. Je zajímavé, že námi pozorované zrychlování a prohlubování desenzitizace ACh odpovědi je v naprostém protikladu s pozorováním (A. Maelicke a kol., 2001).

O případném působení Gal na afinitu otevřené konformace nemůžeme nic říci, neboť změny rychlosti nástupu a rychlosti deaktivace nebyly (z technických důvodů) detekovatelné a nebyla ani pozorována potenciace ACh odpovědí.

## 6 Shrnutí

### Vliv záporně nabitých aminokyselin $\delta:D^{180}$ a $\delta:E^{189}$ F-smyčky na aktivaci a inhibici svalových nAChR

- I přes podobnost parametrů aktivačních křivek embryonálních a dospělých receptorů se mechanismus jejich aktivace liší. Kooperativita embryonálního receptoru ( $H=1,22$ ) je sice snížena rozdílem mezi afinitami vazebných míst, tato nevýhoda je částečně vyrovnána vyšší účinností otevírání. Oproti tomu je kooperativita dospělého nAChR zvýšena ( $H=1,7$ ) poměrně velkou ekvivalencí vazebných míst, ale celková účinnost otevření je menší než u embryonálního receptoru.
- (+)-Tubokurarin, látka často považovaná za prototyp kompetitivního antagonisty svalového nAChR, v našich pokusech působil smíšeným mechanismem. Při vyšších koncentracích (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) sice projevoval čistou kompetici (snad jen s výjimkou hraniční situace přirozeného dospělého receptoru), avšak v oblasti velmi nízkých koncentrací jsme pozorovali složitější chování patrně způsobené parciálním agonismem.
- Záměna záporně nabitých aminokyselin  $\delta:D^{180}$ ,  $\delta:E^{189}$  F-smyčky dospělého svalového nAChR za jejich neutrální analogy ( $\delta:D180N|E189Q$ ) měla větší vliv na aktivaci receptoru acetylcholinem než na inhibici prostřednictvím (+)-Tc.
- Aspartát  $\delta:D^{180}$  a glutamát  $\delta:E^{189}$  F-smyčky dospělého svalového nAChR se prostřednictvím dalekodosahové elektrostatické interakce s amoniovou skupinou ACh účastní zvýšení afinity (uzamčení) ACh vazebného místa při aktivaci. Podíl  $\delta:D^{180}$  je vyšší než  $\delta:E^{189}$ , což souvisí s umístěním aspartátu přímo v F-smyčce ( $\delta:E^{189}$  je pouze v její blízkosti), která spolu s dalšími smyčkami vazebného místa (zejména s C-smyčkou) svým pohybem iniciuje otevření iontového kanálu receptoru.

### Interakce inhibitorů acetylcholinesterázy se svalovým nAChR

- Phy sám o sobě nevyvolával aktivaci proudů měřitelných v konfiguraci snímání z celé buňky. Phy způsobuje potenciaci odpovědi na nízké koncentrace (0,1-1,0  $\mu\text{M}$ ) a zrychluje jejich desensitizaci. Pravděpodobným mechanismem může být vazba na nekompetitivní vazebné místo (při aktivaci embryonálního receptoru acetylcholinem), které alostericky zvyšuje afinitu otevřeného a desensitizovaného stavu, urychluje otevírání a patrně i přechod do desensitizace a zpomaluje resensitizaci. Odpovědi na

vyšší ACh koncentrace Phy inhibuje zvyšováním populace receptorů v desenzitizovaném stavu (zároveň moduluje tvar desenzitizačního poklesu odpovědi na ACh - zrychluje jej a prohlubuje). Při vyšších negativních potenciálech způsobuje blokádu otevřeného kanálu.

- Gal sám o sobě neaktivuje embryonální nAChR ani nezpůsobuje blokádu otevřeného kanálu. Z místa odlišného od vazebného místa pro ACh způsobuje inhibici ACh (10  $\mu$ M) aktivovaných proudů. Pravděpodobným mechanismem může být alosterické zvýšení afinity desenzitizovaného stavu.



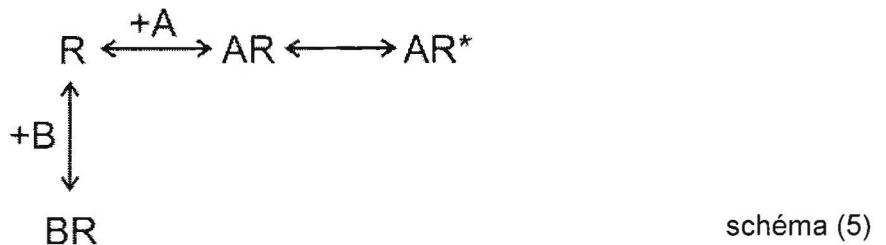
## 7 Příloha

### 7.1 Odvození vztahu pro Schildovu regresi

Při odvozování vztahu pro Schildovu regresi se vychází ze situací naznačených reakčními schématy (3) a (4):



Pro situaci vazby pouze 1 molekuly agonisty  $A$  na receptor  $R$  ( $AR^*$  je symbol pro receptor aktivovaný navázaným agonistou), resp. případu, kde je účinek agonisty  $A$  tlumen vazbou kompetitivního antagonisty  $B$ :



Získáváme tak dvě aktivační (tzv. Gaddumovy) rovnice:

$$1. \quad Y_A = \frac{\frac{[A]_A}{K_A}}{\frac{[A]_A}{K_A} + 1} \quad \text{pro případ prosté aktivace} \quad (23)$$

$$2. \quad Y_B = \frac{\frac{[A]_B}{K_A}}{\frac{[A]_B}{K_A} + \frac{[B]}{K_B} + 1} \quad \text{pro kompetici agonisty s antagonistou.} \quad (24)$$

Podstatou Schildovy regrese je vyhodnocení posunutí aktivační křivky vlivem antagonisty. Vzhledem k tomu, že tvar i velikost křivky zůstávají u kompetitivního antagonisty nezměněny, posunutí pak lze charakterizovat změnou koncentrace agonisty schopného kompenzovat změnu aktivační křivky vyvolané přítomností antagonisty. Zavádí se tak, tzv. „dose ratio“- $DR$

$$DR = \frac{[A]_B}{[A]_A} \quad (25)$$

kde  $[A]_B$  je koncentrace agonisty vyvolávající odpověď o určité velikosti, a to pod vlivem antagonisty, a  $[A]_A$  je koncentrace samotného agonisty vyvolávající stejně velkou odpověď. Podmínka stejné míry aktivace se dá zapsat jako:

$$Y_A = Y_B \quad , \text{ tj. } \quad \frac{\frac{[A]_A}{K_A}}{\frac{[A]_A}{K_A} + 1} = \frac{\frac{[A]_B}{K_A}}{\frac{[A]_B}{K_A} + \frac{[B]}{K_B} + 1} \quad (26)$$

Zavedením substituce  $DR$  (18) v rovnici (19) a jednoduchými úpravami pak dostáváme

$$\frac{DR[A]_A}{K_A} + DR = \frac{DR[A]_A}{K_A} + \frac{[B]}{K_B} + 1, \text{ tj. } DR - 1 = \frac{[B]}{K_B}$$

Poměr  $\frac{[B]}{K_B}$  zlinealizujeme zlogaritmováním celé rovnice, čímž dostáváme hlavní vztah

Schildovy regrese (16)  $\log(DR - 1) = \log[B] - \log K_B$ . Průsečík lineárního vynesení s osou  $x$  ( $y = \log(DR - 1) = 0$ ) pak určuje hodnotu disociační konstanty inhibitoru, resp. její logaritmus (17)  $\log[B] = \log[K_B]$ .

## 8 Vlastní publikace v impaktovaných časopisech

Lindovsky J, Kaniakova M, Svobodova L, Vyskocil F, Krusek J (2008) Role of negatively charged amino acids in beta 4 F-loop in activation and desensitization of alpha 3 beta 4 rat neuronal nicotinic receptors. *Biochim Biophys Acta* 1778:864-71

Svobodova L, Krusek J, Hendrych T, Vyskocil F (2006) Physostigmine modulation of acetylcholine currents in COS cells transfected with mouse muscle nicotinic receptor. *Neurosci Lett* 401:20-4

Svobodova L, Krusek J, Hendrych T, Vyskocil F (2005) Allosteric modulation of the nicotinic acetylcholine receptor by physostigmine. *Ann N Y Acad Sci* 1048:355-8

Krusek J, Dittert I, Hendrych T, Hnik P, Horak M, Petrovic M, Sedlacek M, Susankova K, Svobodova L, Tousova K, Ujec E, Vlachova V, Vyklicky L, Vyskocil F, Vyklicky L, Jr. (2004) Activation and modulation of ligand-gated ion channels. *Physiol Res* 53 Suppl 1:S103-13

## 9 Literatura

- M. H. Akabas aA. Karlin, 1995. Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment of the alpha-subunit. *Biochemistry*. 34, 12496-12500.
- G. Akk aA. Auerbach, 1996. Inorganic, monovalent cations compete with agonists for the transmitter binding site of nicotinic acetylcholine receptors. *Biophys J*. 70, 2652-2658.
- G. Akk aJ. H. Steinbach, 2005. Galantamine activates muscle-type nicotinic acetylcholine receptors without binding to the acetylcholine-binding site. *J Neurosci*. 25, 1992-2001.
- E. X. Albuquerque, A. Akaike, K. P. Shaw aD. L. Rickett, 1984. The interaction of anticholinesterase agents with the acetylcholine receptor-ionic channel complex. *Fundam Appl Toxicol*. 4, S27-33.
- H. R. Arias, 1997. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res Brain Res Rev*. 25, 133-191.
- H. R. Arias, 1998. Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta*. 1376, 173-220.
- H. R. Arias, 1999. Role of local anesthetics on both cholinergic and serotonergic ionotropic receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 23, 817-843.
- H. R. Arias, 2000. Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochem Int*. 36, 595-645.
- O. Arunlakshana aH. O. Schild, 1959. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother*. 14, 48-58.
- A. Auerbach aG. Akk, 1998. Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism. *J Gen Physiol*. 112, 181-197.
- J. E. Baenziger, M. L. Morris, T. E. Darsaut aS. E. Ryan, 2000. Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem*. 275, 777-784.
- D. L. Beene, G. S. Brandt, W. Zhong, N. M. Zacharias, H. A. Lester aD. A. Dougherty, 2002. Cation-pi interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT<sub>3A</sub>) and nicotinic acetylcholine receptors: the anomalous binding properties of nicotine. *Biochemistry*. 41, 10262-10269.
- W. H. Beers aE. Reich, 1970. Structure and activity of acetylcholine. *Nature*. 228, 917-922.
- R. Beranek aF. Vyskocil, 1967. The action of tubocurarine and atropine on the normal and denervated rat diaphragm. *J Physiol*. 188, 53-66.
- G. Biesecker, 1973. Molecular properties of the cholinergic receptor purified from *Electrophorus electricus*. *Biochemistry*. 12, 4403-4409.
- P. Blount aJ. P. Merlie, 1989. Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*. 3, 349-357.

- P. Blount aJ. P. Merlie, 1990. Mutational analysis of muscle nicotinic acetylcholine receptor subunit assembly. *J Cell Biol.* 111, 2613-2622.
- L. S. Borges aM. Ferns, 2001. Agrin-induced phosphorylation of the acetylcholine receptor regulates cytoskeletal anchoring and clustering. *J Cell Biol.* 153, 1-12.
- L. S. Borges, S. Yechikhov, Y. I. Lee, J. B. Rudell, M. B. Friese, S. J. Burden aM. J. Ferns, 2008. Identification of a motif in the acetylcholine receptor beta subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization. *J Neurosci.* 28, 11468-11476.
- N. D. Boyd aJ. B. Cohen, 1980. Kinetics of binding of [3H]acetylcholine and [3H]carbamoylcholine to Torpedo postsynaptic membranes: slow conformational transitions of the cholinergic receptor. *Biochemistry.* 19, 5344-5353.
- K. Brejc, W. J. van Dijk, R. V. Klaassen, M. Schuurmans, J. van Der Oost, A. B. Smit aT. K. Sixma, 2001. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature.* 411, 269-276.
- C. A. Briggs aD. G. McKenna, 1998. Activation and inhibition of the human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by agonists. *Neuropharmacology.* 37, 1095-1102.
- J. Bufler, C. Franke, H. Parnas aJ. Dudel, 1996. Open channel block by physostigmine and procaine in embryonic-like nicotinic receptors of mouse muscle. *Eur J Neurosci.* 8, 677-687.
- A. Buonanno, J. Mudd, V. Shah aJ. P. Merlie, 1986. A universal oligonucleotide probe for acetylcholine receptor genes. Selection and sequencing of cDNA clones for the mouse muscle beta subunit. *J Biol Chem.* 261, 16451-16458.
- P. H. Celie, R. V. Klaassen, S. E. van Rossum-Fikkert, R. van Elk, P. van Nierop, A. B. Smit aT. K. Sixma, 2005. Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 280, 26457-26466.
- P. H. Celie, S. E. van Rossum-Fikkert, W. J. van Dijk, K. Brejc, A. B. Smit aT. K. Sixma, 2004. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron.* 41, 907-914.
- M. Colledge aS. C. Froehner, 1998. To muster a cluster: anchoring neurotransmitter receptors at synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 3341-3343.
- G. L. Collingridge, R. W. Olsen, J. Peters aM. Spedding, 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology.* 56, 2-5.
- D. Colquhoun, 1998. Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol.* 125, 924-947.
- D. Colquhoun, 2007. Why the Schild method is better than Schild realised. *Trends Pharmacol Sci.* 28, 608-614.



- D. Colquhoun, F. Dreyer aR. E. Sheridan, 1979. The actions of tubocurarine at the frog neuromuscular junction. *J Physiol.* 293, 247-284.
- D. Colquhoun aB. Sakmann, 1985. Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J Physiol.* 369, 501-557.
- J. C. Cooper, O. Gutbrod, V. Witzemann aC. Methfessel, 1996. Pharmacology of the nicotinic acetylcholine receptor from fetal rat muscle expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol.* 309, 287-298.
- P. J. Corringer, N. Le Novère aJ. P. Changeux, 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40, 431-458.
- D. A. Craig, 1993. The Cheng-Prusoff relationship: something lost in the translation. *Trends Pharmacol Sci.* 14, 89-91.
- C. Czajkowski aA. Karlin, 1995. Structure of the nicotinic receptor acetylcholine-binding site. Identification of acidic residues in the delta subunit within 0.9 nm of the 5 alpha subunit-binding. *J Biol Chem.* 270, 3160-3164.
- J. Del Castillo aB. Katz, 1957. Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 146, 369-381.
- M. DiPaola, P. N. Kao aA. Karlin, 1990. Mapping the alpha-subunit site photolabeled by the noncompetitive inhibitor [3H]quinacrine azide in the active state of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 265, 11017-11029.
- I. Dittert, J. Benedikt, L. Vyklicky, K. Zimmermann, P.W. Reeh, V. Vlachova, 2006. Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods.* 151, 178-185.
- D. A. Dougherty, 2007. Cation-pi interactions involving aromatic amino acids. *J Nutr.* 137, 1504S-1508S; discussion 1516S-1517S.
- F. J. Ehlert, 1988. Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol.* 33, 187-194.
- S. Elenes aA. Auerbach, 2002. Desensitization of diliganded mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor channels. *J Physiol.* 541, 367-383.
- S. Elenes, Y. Ni, G. D. Cymes aC. Grosman, 2006. Desensitization contributes to the synaptic response of gain-of-function mutants of the muscle nicotinic receptor. *J Gen Physiol.* 128, 615-627.
- A. B. Elgoyhen, D. S. Johnson, J. Boulter, D. E. Vetter aS. Heinemann, 1994. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell.* 79, 705-715.
- V. A. Eterovic, L. Li, A. Palma aM. G. McNamee, 1990. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor function by adenine nucleotides. *Cell Mol Neurobiol.* 10, 423-433.
- R. Exley, M. Moroni, F. Sasdelli, L. M. Houlihan, R. J. Lukas, E. Sher, R. Zwart al. Bermudez, 2006. Chaperone protein 14-3-3 and protein kinase A increase the

- relative abundance of low agonist sensitivity human alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem.* 98, 876-885.
- G. Feng, J. H. Steinbach aJ. R. Sanes, 1998. Rapsyn clusters neuronal acetylcholine receptors but is inessential for formation of an interneuronal cholinergic synapse. *J Neurosci.* 18, 4166-4176.
- C. P. Fenster, M. F. Rains, B. Noerager, M. W. Quick aR. A. Lester, 1997. Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J Neurosci.* 17, 5747-5759.
- G. H. Fletcher aJ. H. Steinbach, 1996. Ability of nondepolarizing neuromuscular blocking drugs to act as partial agonists at fetal and adult mouse muscle nicotinic receptors. *Mol Pharmacol.* 49, 938-947.
- T. M. Fong aM. G. McNamee, 1987. Stabilization of acetylcholine receptor secondary structure by cholesterol and negatively charged phospholipids in membranes. *Biochemistry.* 26, 3871-3880.
- S. Forsen aS. Linse, 1995. Cooperativity: over the Hill. *Trends Biochem Sci.* 20, 495-497.
- S. C. Froehner, C. W. Luetje, P. B. Scotland aJ. Patrick, 1990. The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron.* 5, 403-410.
- J. L. Galzi, D. Bertrand, A. Devillers-Thiery, F. Revah, S. Bertrand aJ. P. Changeux, 1991a. Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the alpha 7 neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 294, 198-202.
- J. L. Galzi, S. Bertrand, P. J. Corringer, J. P. Changeux aD. Bertrand, 1996. Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Embo J.* 15, 5824-5832.
- J. L. Galzi, F. Revah, A. Bessis aJ. P. Changeux, 1991b. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 31, 37-72.
- P. Gardner, D. C. Ogden aD. Colquhoun, 1984. Conductances of single ion channels opened by nicotinic agonists are indistinguishable. *Nature.* 309, 160-162.
- E. Gavuzzo aM. Pomponi, 2002. Inhibition of acetylcholinesterase by physostigmine analogs: conformational mobility of cysteine loop due to the steric effect of the alkyl chain. *J Biochem Mol Toxicol.* 16, 64-69.
- E. A. Gay aJ. L. Yakel, 2007. Gating of nicotinic ACh receptors; new insights into structural transitions triggered by agonist binding that induce channel opening. *J Physiol.* 584, 727-733.
- R. Giniatullin, A. Nistri aJ. L. Yakel, 2005. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci.* 28, 371-378.

- R. A. Giniatullin, M. V. Talantova aF. Vyskocil, 2001. The role of desensitisation in decay time of miniature endplate currents in frogs *Rana ridibunda* and *Rana temporaria*. *Neurosci Res.* 39, 287-292.
- T. Grutter aJ. P. Changeux, 2001. Nicotinic receptors in wonderland. *Trends Biochem Sci.* 26, 459-463.
- Y. Gu, A. Franco, Jr., P. D. Gardner, J. B. Lansman, J. R. Forsayeth aZ. W. Hall, 1990. Properties of embryonic and adult muscle acetylcholine receptors transiently expressed in COS cells. *Neuron.* 5, 147-157.
- X. Guo aR. A. Lester, 2007. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor desensitization by  $Ca^{2+}$ . *J Neurophysiol.* 97, 93-101.
- O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann aF. J. Sigworth, 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85-100.
- S. L. Hamilton, M. McLaughlin aA. Karlin, 1977. Disulfide bond cross-linked dimer in acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochem Biophys Res Commun.* 79, 692-699.
- S. B. Hansen, G. Sulzenbacher, T. Huxford, P. Marchot, P. Taylor aY. Bourne, 2005. Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *Embo J.* 24, 3635-3646.
- T. Heidmann aJ. P. Changeux, 1979. Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites. *Eur J Biochem.* 94, 281-296.
- T. Heidmann, R. E. Oswald aJ. P. Changeux, 1983. Multiple sites of action for noncompetitive blockers on acetylcholine receptor rich membrane fragments from *torpedo marmorata*. *Biochemistry.* 22, 3112-3127.
- A. V. Hill, 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curve. *J Physiol.* 40, IV-VII.
- D. G. Hill aJ. E. Baenziger, 2006. The net orientation of nicotinic receptor transmembrane alpha-helices in the resting and desensitized states. *Biophys J.* 91, 705-714.
- K. A. Huebsch aM. M. Maimone, 2003. Rapsyn-mediated clustering of acetylcholine receptor subunits requires the major cytoplasmic loop of the receptor subunits. *J Neurobiol.* 54, 486-501.
- H. W. Chang aE. Bock, 1977. Molecular forms of acetylcholine receptor. Effects of calcium ions and a sulfhydryl reagent on the occurrence of oligomers. *Biochemistry.* 16, 4513-4520.
- J. P. Changeux, A. Devillers-Thiery aP. Chemouilli, 1984. Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science.* 225, 1335-1345.

- J. P. Changeux aS. J. Edelman, 1998. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron*. 21, 959-980.
- J. P. Changeux aS. J. Edelman, 2005. Nicotinic acetylcholine receptors: from molecular biology to cognition. Odile Jacob, New York.
- J. P. Changeux aA. Taly, 2008. Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. *Trends Mol Med*. 14, 93-102.
- Y. Cheng aW. H. Prusoff, 1973. Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*. 22, 3099-3108.
- D. C. Chiara, Y. Xie aJ. B. Cohen, 1999. Structure of the agonist-binding sites of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: affinity-labeling and mutational analyses identify gamma Tyr-111/delta Arg-113 as antagonist affinity determinants. *Biochemistry*. 38, 6689-6698.
- M. B. Jackson, 1984. Spontaneous openings of the acetylcholine receptor channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81, 3901-3904.
- V. Jayaraman, P. N. Usherwood aG. P. Hess, 1999. Inhibition of nicotinic acetylcholine receptor by philanthotoxin-343: kinetic investigations in the microsecond time region using a laser-pulse photolysis technique. *Biochemistry*. 38, 11406-11414.
- E. M. Jeanclos, L. Lin, M. W. Treuil, J. Rao, M. A. DeCoster aR. Anand, 2001. The chaperone protein 14-3-3eta interacts with the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit. Evidence for a dynamic role in subunit stabilization. *J Biol Chem*. 276, 28281-28290.
- A. Karlin, 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*. 3, 102-114.
- T. Kenakin, 2006. *A Pharmacology Primer: Theory, Application and Method*. Elsevier Inc.
- T. P. Kenakin, 1984. The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacol Rev*. 36, 165-222.
- K. T. Keyser, L. R. Britto, R. Schoepfer, P. Whiting, J. Cooper, W. Conroy, A. Brozowska-Prechtel, H. J. Karten aJ. Lindstrom, 1993. Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina. *J Neurosci*. 13, 442-454.
- Y. Kidokoro, 1993. Developmental changes of transmitter gated channels. *Jpn J Physiol*. 43, 727-743.
- C. H. Kindler, D. Verotta, A. T. Gray, M. A. Gropper aC. S. Yost, 2000. Additive inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by corticosteroids and the neuromuscular blocking drug vecuronium. *Anesthesiology*. 92, 821-832.

- M. Koenen, C. Peter, A. Villarroel, V. Witzemann aB. Sakmann, 2005. Acetylcholine receptor channel subtype directs the innervation pattern of skeletal muscle. *EMBO Rep.* 6, 570-576.
- D. E. Koshland, Jr., G. Nemethy aD. Filmer, 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry.* 5, 365-385.
- J. Krusek, 2004. Allostery and cooperativity in the interaction of drugs with ionic channel receptors. *Physiol Res.* 53, 569-579.
- J. Krusek aF. Vyskocil, 2003. Different degree of cooperativity in adult, embryonic and mutated mouse muscle nicotinic receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1646, 119-130.
- S. W. Kuffler aD. Yoshikami, 1975. The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J Physiol.* 251, 465-482.
- A. Kuryatov, F. A. Olale, C. Choi aJ. Lindstrom, 2000. Acetylcholine receptor extracellular domain determines sensitivity to nicotine-induced inactivation. *Eur J Pharmacol.* 393, 11-21.
- I. Langmuir, 1916. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. part 1. Solids. *J Am Chem Soc,* 2221-2295.
- S. J. Lansdell, V. J. Gee, P. C. Harkness, A. I. Doward, E. R. Baker, A. J. Gibb aN. S. Millar, 2005. RIC-3 enhances functional expression of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in mammalian cells. *Mol Pharmacol.* 68, 1431-1438.
- N. Le Novere, T. Grutter aJ. P. Changeux, 2002. Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca<sup>2+</sup>-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 3210-3215.
- P. Leff al. G. Dougall, 1993. Further concerns over Cheng-Prusoff analysis. *Trends Pharmacol Sci.* 14, 110-112.
- H. A. Lester, M. I. Dibas, D. S. Dahan, J. F. Leite aD. A. Dougherty, 2004. Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci.* 27, 329-336.
- L. Lin, E. M. Jeanclos, M. Treuil, K. H. Braunewell, E. D. Gundelfinger aR. Anand, 2002. The calcium sensor protein visinin-like protein-1 modulates the surface expression and agonist sensitivity of the alpha 4beta 2 nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 277, 41872-41878.
- J. Lindovsky, M. Kaniakova, L. Svobodova, F. Vyskocil aJ. Krusek, 2008. Role of negatively charged amino acids in beta 4 F-loop in activation and desensitization of alpha 3 beta 4 rat neuronal nicotinic receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1778, 864-871.
- J. Lindstrom, B. Walter aB. Einarson, 1979. Immunochemical similarities between subunits of acetylcholine receptors from Torpedo, Electrophorus, and mammalian muscle. *Biochemistry.* 18, 4470-4480.



- C. J. Lingle, D. Maconochie aJ. H. Steinbach, 1992. Activation of skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *J Membr Biol.* 126, 195-217.
- M. Liu aJ. P. Dilger, 2009. Site selectivity of competitive antagonists for the mouse adult muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* 75, 166-173.
- S. Lummis, D. Beene, N. Harrison, H. A. Lester aD. A. Dougherty, 2005. A cation-pi binding interaction with a tyrosine in the binding site of the GABA(C) receptor. *Chemistry and Biology.* 12, 993-997.
- D. J. Maconochie aJ. H. Steinbach, 1998. The channel opening rate of adult- and fetal-type mouse muscle nicotinic receptors activated by acetylcholine. *J Physiol.* 506 (Pt 1), 53-72.
- A. Maelicke aE. X. Albuquerque, 2000. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 393, 165-170.
- A. Maelicke, T. Coban, A. Schratzenholz, B. Schroder, S. Reinhardt-Maelicke, A. Storch, J. Godovac-Zimmermann, C. Methfessel, E. F. Pereira aE. X. Albuquerque, 1993. Physostigmine and neuromuscular transmission. *Ann N Y Acad Sci.* 681, 140-154.
- A. Maelicke, M. Samochocki, R. Jostock, A. Fehrenbacher, J. Ludwig, E. X. Albuquerque aM. Zerlin, 2001. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 49, 279-288.
- A. Maelicke, A. Schratzenholz, M. Samochocki, M. Radina aE. X. Albuquerque, 2000. Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 113, 199-206.
- L. G. Magazanik aF. Vyskocil, 1970. Dependence of acetylcholine desensitization on the membrane potential of frog muscle fibre and on the ionic changes in the medium. *J Physiol.* 210, 507-518.
- M. Martin, C. Czajkowski aA. Karlin, 1996. The contributions of aspartyl residues in the acetylcholine receptor gamma and delta subunits to the binding of agonists and competitive antagonists. *J Biol Chem.* 271, 13497-13503.
- N. Matsubara, A. P. Billington aG. P. Hess, 1992. How fast does an acetylcholine receptor channel open? Laser-pulse photolysis of an inactive precursor of carbamoylcholine in the microsecond time region with BC3H1 cells. *Biochemistry.* 31, 5507-5514.
- D. S. McGehee aL. W. Role, 1995. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol.* 57, 521-546.
- R. H. Meltzer, E. Thompson, K. V. Soman, X. Z. Song, J. O. Ebalunode, T. G. Wensel, J. M. Briggs aS. E. Pedersen, 2006. Electrostatic steering at acetylcholine binding sites. *Biophys J.* 91, 1302-1314.

- R. E. Middleton aJ. B. Cohen, 1991. Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: [3H]nicotine as an agonist photoaffinity label. *Biochemistry*. 30, 6987-6997.
- J. Militante, B. W. Ma, G. Akk aJ. H. Steinbach, 2008. Activation and block of the adult muscle-type nicotinic receptor by physostigmine: single-channel studies. *Mol Pharmacol*. 74, 764-776.
- N. S. Millar, 2003. Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans*. 31, 869-874.
- N. S. Millar, 2008. RIC-3: a nicotinic acetylcholine receptor chaperone. *Br J Pharmacol*. 153 Suppl 1, S177-183.
- N. S. Millar aP. C. Harkness, 2008. Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). *Mol Membr Biol*. 25, 279-292.
- A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi, M. Stowell aN. Unwin, 1999. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol*. 288, 765-786.
- A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi aN. Unwin, 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*. 423, 949-955.
- J. Monod, J. P. Changeux aF. Jacob, 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol*. 6, 306-329.
- J. Monod, J. Wyman aJ. P. Changeux, 1965. On The Nature Of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol*. 12, 88-118.
- T. W. Mu, H. A. Lester aD. A. Dougherty, 2003. Different binding orientations for the same agonist at homologous receptors: a lock and key or a simple wedge? *J Am Chem Soc*. 125, 6850-6851.
- R. R. Neubig aJ. B. Cohen, 1979. Equilibrium binding of [3H]tubocurarine and [3H]acetylcholine by Torpedo postsynaptic membranes: stoichiometry and ligand interactions. *Biochemistry*. 18, 5464-5475.
- J. G. Nicholls, A. R. Martin aB. G. Wallace, 1992. From neuron to brain: a cellular and molecular approach to the function of the nervous system. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- T. Nishizaki aK. Sumikawa, 1998. Effects of PKC and PKA phosphorylation on desensitization of nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res*. 812, 242-245.
- K. O. Okonjo, J. Kuhlmann aA. Maelicke, 1991. A second pathway of activation of the Torpedo acetylcholine receptor channel. *Eur J Biochem*. 200, 671-677.
- M. O. Ortells aG. G. Lunt, 1994. The transmembrane region of the nicotinic acetylcholine receptor: is it an all-helix bundle? *Receptors Channels*. 2, 53-59.
- R. L. Papke aJ. K. Porter Papke, 2002. Comparative pharmacology of rat and human alpha7 nAChR conducted with net charge analysis. *Br J Pharmacol*. 137, 49-61.

- K. G. Paradiso aJ. H. Steinbach, 2003. Nicotine is highly effective at producing desensitization of rat alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors. *J Physiol.* 553, 857-871.
- E. F. Pereira, M. Alkondon, S. Reinhardt, A. Maelicke, X. Peng, J. Lindstrom, P. Whiting aE. X. Albuquerque, 1994. Physostigmine and galanthamine: probes for a novel binding site on the alpha 4 beta 2 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in fibroblast cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 270, 768-778.
- E. F. Pereira, M. Alkondon, T. Tano, N. G. Castro, M. M. Froes-Ferrao, R. Rozental, R. S. Aronstam, A. Schrattenholz, A. Maelicke aE. X. Albuquerque, 1993a. A novel agonist binding site on nicotinic acetylcholine receptors. *J Recept Res.* 13, 413-436.
- E. F. Pereira, S. Reinhardt-Maelicke, A. Schrattenholz, A. Maelicke aE. X. Albuquerque, 1993b. Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 265, 1474-1491.
- W. D. Phillips, C. Kopta, P. Blount, P. D. Gardner, J. H. Steinbach aJ. P. Merlie, 1991. ACh receptor-rich membrane domains organized in fibroblasts by recombinant 43-kilodalton protein. *Science.* 251, 568-570.
- A. N. Placzek, F. Grassi, T. Papke, E. M. Meyer aR. L. Papke, 2004. A single point mutation confers properties of the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor to homomeric alpha7 receptors. *Mol Pharmacol.* 66, 169-177.
- V. V. Pollock, T. E. Pastoor aL. Wecker, 2007. Cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) phosphorylates Ser362 and 467 and protein kinase C phosphorylates Ser550 within the M3/M4 cytoplasmic domain of human nicotinic receptor alpha4 subunits. *J Neurochem.* 103, 456-466.
- M. W. Quick aR. A. Lester, 2002. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol.* 53, 457-478.
- S. E. Rankin, G. H. Addona, M. A. Kloczewiak, B. Bugge aK. W. Miller, 1997. The cholesterol dependence of activation and fast desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys J.* 73, 2446-2455.
- R. Reitstetter, R. J. Lukas aR. Gruener, 1999. Dependence of nicotinic acetylcholine receptor recovery from desensitization on the duration of agonist exposure. *J Pharmacol Exp Ther.* 289, 656-660.
- M. M. Rosenberg, F. Yang, M. Giovanni, J. L. Mohn, M. K. Temburni aM. H. Jacob, 2008. Adenomatous polyposis coli plays a key role, in vivo, in coordinating assembly of the neuronal nicotinic postsynaptic complex. *Mol Cell Neurosci.* 38, 138-152.
- F. N. Salamone, M. Zhou aA. Auerbach, 1999. A re-examination of adult mouse nicotinic acetylcholine receptor channel activation kinetics. *J Physiol.* 516 (Pt 2), 315-330.

- J. R. Sanes aJ. W. Lichtman, 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci.* 22, 389-442.
- K. P. Shaw, Y. Aracava, A. Akaike, J. W. Daly, D. L. Rickett aE. X. Albuquerque, 1985. The reversible cholinesterase inhibitor physostigmine has channel-blocking and agonist effects on the acetylcholine receptor-ion channel complex. *Mol Pharmacol.* 28, 527-538.
- A. Schratzenholz, T. Coban, B. Schroder, K. O. Okonjo, J. Kuhlmann, E. F. Pereira, E. X. Albuquerque aA. Maelicke, 1993a. Biochemical characterization of a novel channel-activating site on nicotinic acetylcholine receptors. *J Recept Res.* 13, 393-412.
- A. Schratzenholz, J. Godovac-Zimmermann, H. J. Schafer, E. X. Albuquerque aA. Maelicke, 1993b. Photoaffinity labeling of Torpedo acetylcholine receptor by physostigmine. *Eur J Biochem.* 216, 671-677.
- B. Schroder, S. Reinhardt-Maelicke, A. Schratzenholz, K. E. McLane, A. Kretschmer, B. M. Conti-Tronconi aA. Maelicke, 1994. Monoclonal antibodies FK1 and WF6 define two neighboring ligand binding sites on Torpedo acetylcholine receptor alpha-polypeptide. *J Biol Chem.* 269, 10407-10416.
- S. M. Sine, 1988. Functional properties of human skeletal muscle acetylcholine receptors expressed by the TE671 cell line. *J Biol Chem.* 263, 18052-18062.
- S. M. Sine, 1993. Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of residues that determine curare selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 9436-9440.
- S. M. Sine aJ. H. Steinbach, 1984. Activation of a nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys J.* 45, 175-185.
- S. M. Sine aP. Taylor, 1981. Relationship between reversible antagonist occupancy and the functional capacity of the acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 256, 6692-6699.
- S. M. Sine aP. Taylor, 1982. Local anesthetics and histrionicotoxin are allosteric inhibitors of the acetylcholine receptor. *Studies of clonal muscle cells. J Biol Chem.* 257, 8106-8104.
- T. K. Sixma aA. B. Smit, 2003. Acetylcholine binding protein (AChBP): a secreted glial protein that provides a high-resolution model for the extracellular domain of pentameric ligand-gated ion channels. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 32, 311-334.
- C. E. Spivak, 1995. Correlations among Hill parameters reflect models of activating ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 16, 39-42.
- D. A. Stauffer aA. Karlin, 1994. Electrostatic potential of the acetylcholine binding sites in the nicotinic receptor probed by reactions of binding-site cysteines with charged methanethiosulfonates. *Biochemistry.* 33, 6840-6849.
- J. H. Steinbach aQ. Chen, 1995. Antagonist and partial agonist actions of d-tubocurarine at mammalian muscle acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 15, 230-240.

- A. Storch, A. Schratzenholz, J. C. Cooper, E. M. Abdel Ghani, O. Gutbrod, K. H. Weber, S. Reinhardt, C. Lobron, B. Hermsen, V. Soskic et al., 1995. Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells. *Eur J Pharmacol.* 290, 207-219.
- G. J. Strecker et al. B. Jackson, 1989. Curare binding and the curare-induced subconductance state of the acetylcholine receptor channel. *Biophys J.* 56, 795-806.
- J. L. Sussman, M. Harel et al. Silman, 1993. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs. *Chem Biol Interact.* 87, 187-197.
- L. Svobodova, J. Krusek, T. Hendrych et al. Vyskocil, 2006. Physostigmine modulation of acetylcholine currents in COS cells transfected with mouse muscle nicotinic receptor. *Neurosci Lett.* 401, 20-24.
- K. Takeda et al. Trautmann, 1984. A patch-clamp study of the partial agonist actions of tubocurarine on rat myotubes. *J Physiol.* 349, 353-374.
- Z. Tuba, S. Maho et al. S. Vizi, 2002. Synthesis and structure-activity relationships of neuromuscular blocking agents. *Curr Med Chem.* 9, 1507-1536.
- N. Unwin, 1998. The nicotinic acetylcholine receptor of the Torpedo electric ray. *J Struct Biol.* 121, 181-190.
- N. Unwin, 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol.* 346, 967-989.
- N. Unwin, C. Toyoshima et al. Kubalek, 1988. Arrangement of the acetylcholine receptor subunits in the resting and desensitized states, determined by cryoelectron microscopy of crystallized Torpedo postsynaptic membranes. *J Cell Biol.* 107, 1123-1138.
- I. van den Beukel, R. G. van Kleef, R. Zwart et al. Oortgiesen, 1998. Physostigmine and acetylcholine differentially activate nicotinic receptor subpopulations in *Locusta migratoria* neurons. *Brain Res.* 789, 263-273.
- F. Vyskocil et al. G. Magazanik, 1972. The desensitization of postjunctional muscle membrane after intracellular application of membrane stabilizers and snake venom polypeptides. *Brain Res.* 48, 417-419.
- R. E. Wachtel, 1993. Physostigmine block of ion channels activated by acetylcholine in BC3H1 cells. *Mol Pharmacol.* 44, 1051-1055.
- A. Wiesner et al. Fuhrer, 2006. Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine kinases in the peripheral and central nervous system: same players, different roles. *Cell Mol Life Sci.* 63, 2818-2828.
- M. E. Williams, B. Burton, A. Urrutia, A. Shcherbatko, L. E. Chavez-Noriega, C. J. Cohen et al. Aiyar, 2005. Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells. *J Biol Chem.* 280, 1257-1263.



- P. T. Williamson, A. Verhoeven, K. W. Miller, B. H. Meier aA. Watts, 2007. The conformation of acetylcholine at its target site in the membrane-embedded nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 18031-18036.
- V. Witzemann, 2006. Development of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res.* 326, 263-271.
- J. R. Woollorton, V. I. Pidoplichko, R. S. Broide aJ. A. Dani, 2003. Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci.* 23, 3176-3185.
- D. J. Wyllie aP. E. Chen, 2007. Taking the time to study competitive antagonism. *Br J Pharmacol.* 150, 541-551.
- J. Wyman, Jr. aD. W. Allen, 1951. The problem of heme interactions in hemoglobine and the basis of Bohr effect. *J Polymer Sci.* 7, 499-518.
- Y. Xie aJ. B. Cohen, 2001. Contributions of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor gamma Trp-55 and delta Trp-57 to agonist and competitive antagonist function. *J Biol Chem.* 276, 2417-2426.
- X. Xiu, A. P. Hanek, J. Wang, H. A. Lester aD. A. Dougherty, 2005. A unified view of the role of electrostatic interactions in modulating the gating of Cys loop receptors. *J Biol Chem.* 280, 41655-41666.
- S. H. Yang, P. F. Armson, J. Cha aW. D. Phillips, 1997. Clustering of GABAA receptors by rapsyn/43kD protein in vitro. *Mol Cell Neurosci.* 8, 430-438.
- L. Yu, R. J. LaPolla aN. Davidson, 1986. Mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor gamma subunit: cDNA sequence and gene expression. *Nucleic Acids Res.* 14, 3539-3555.
- W. Zhong, J. P. Gallivan, Y. Zhang, L. Li, H. A. Lester aD. A. Dougherty, 1998. From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation-pi binding site in the nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 12088-12093.
- L. Ziskind aM. J. Dennis, 1978. Depolarising effect of curare on embryonic rat muscles. *Nature.* 276, 622-623.
- R. Zwart, R. G. van Kleef, C. Gotti, C. J. Smulders aH. P. Vijverberg, 2000. Competitive potentiation of acetylcholine effects on neuronal nicotinic receptors by acetylcholinesterase-inhibiting drugs. *J Neurochem.* 75, 2492-2500.
- R. Zwart aH. P. Vijverberg, 1997. Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and noncompetitive effects. *Mol Pharmacol.* 52, 886-895.