

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

1. lékařská fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233218450

2008

Jaroslav SRP

**Genová exprese receptorů pro
oxytocin v některých oblastech CNS
a v srdci**

Jaroslav Srp

Katedra biochemie PŘF UK a
Laboratoř biochemické neurofarmakologie,
Ústav lékařské biochemie 1. LF UK
Univerzita Karlova v Praze
Vedoucí práce: doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc.
doc. RNDr. František Novák, CSc.

Praha 2008

UNIVERZITA KARLOVA v Praze

Přírodovědecká fakulta

Oborová knihovna chemie

Albertov 6, 128 43 Praha 2

IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208

UK 22

pr.č. 102 b/08 stud
(bioch.)

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelů a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 3. června 2008

Podpis

Jaroslav Šrp

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce doc. MUDr. Věře Klenerové, DrSc. a prof. MUDr. Sixtovi Hyni, DrSc. za cenné poznámky a odborné vedení.

Dále bych rád poděkoval prof. RNDr. Anně Strunecké, DrSc. za pomoc při sepisování mé práce a především za cenné odborné rady. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině, která mě plně podporovala nejen při psaní tohoto textu, ale také během mého celého dosavadního studia.

Obsah

1.	ÚVOD.....	6
2.	CÍL PRÁCE.....	7
3.	OXYTOCIN.....	8
3.1.	STRUKTURA OXYTOCINU.....	8
3.2.	GEN PRO OXYTOCIN.....	11
3.3.	PERIFERNÍ FYZIOLOGICKÉ FUNKCE OXYTOCINU.....	12
3.4.	ÚČINEK OXYTOCINU NA KREVŇÍ TLAK.....	13
3.5.	SÍŇOVÝ NATRIURETICKÝ HORMON (ANP).....	13
3.6.	CENTRÁLNÍ ÚČINKY OXYTOCINU.....	15
4.	RECEPTOR PRO OXYTOCIN.....	16
4.1.	RECEPTORY SPŘAŽENÉ S G PROTEINY (GPCRS).....	16
4.2.	RODINY GPCRS.....	20
4.3.	G PROTEINY, JEJICH VÝSKYT, STRUKTURA A FUNKCE.....	21
4.4.	ADENYLYLCYKLASA, CYKICKÉ AMP A PROTEINKINASA A.....	22
4.5.	FOSFOLIPASA C A JEJÍ DRUZÍ POSLI.....	23
4.6.	EFEKTORY OXYTOCINOVÉHO RECEPTORU.....	26
5.	STRUKTURA RECEPTORU PRO OXYTOCIN.....	28
6.	OXYTOCINOVÝ RECEPTOR V SRDCI.....	31
7.	OXYTOCINOVÝ RECEPTOR V CENTRÁLNÍM NERVOVÉM SYSTÉMU.....	33
8.	STRUKTURA GENU OXYTOCINOVÉHO RECEPTORU.....	35
9.	GENOVÁ EXPRESE OXYTOCINOVÉHO RECEPTORU.....	37
10.	SOUHRN.....	39
11.	LITERATURA.....	40

Seznam použitých zkratek

AC	adenylylcyklasa
ADH	antidiuretický hormon, vasopresin
ANP	síňový natriuretický peptid (atrial natriuretický peptid)
AP místo	regulační místo v promotoru genu pro oxytocinový receptor
APRE	regulační místo v promotoru (actu-phase response element)
ATP	adenosintrifosfát
BNP	B typ síňového natriuretického peptidu
Ca ²⁺	dvojmocné ionty vápníku
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	komplementární DNA syntetizovaná z mRNA
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
cMyb	regulační místo v promotoru genu pro oxytocinový receptor
CNP	C typ síňového natriuretického peptidu
CNS	centrální nervová soustava
cPLA ₂	cytoplasmatická fosfolipasa A štěpící diacylglycerol
DAG	diacylglycerol
e1-e3	extracelulární smyčky
ECL	extracelulární smyčka (extracellular loop)
ERE	vazebné místo pro estrogen (estrogen response element)
GABA	kyselina gamaaminomáselná
GDP	guanosindifosfát
GMP	guanosinmonofosfát
GPCRs	receptor spřažený s G proteiny (G protein coupled receptors)
GRK	kinasa aktivovaná receptorem spřaženým s G proteiny
GTP	guanosintrifosfát
G _α	α podjednotka G proteinu
G _{ai}	inhibující α podjednotka G proteinu
G _{αq}	α podjednotka G proteinu aktivující proteinkinasu C
G _{as}	α podjednotka G proteinu aktivující adenylylcyklasu
G _β	β podjednotka G proteinu
G _γ	γ podjednotka G proteinu
i1-i3	intracelulární smyčky

ICLintracelulární smyčka (intracellular loop)
IP₃ inositoltrisfosfát
MAP kinasamitogen-aktivovaný protein
mGluRsmetabotropické glutamátové receptory
MLC lehký řetězec myosinu (myosin light chain)
mRNA messenger RNA
NMR nukleární magnetická resonance
NOoxid dusný
PI fosfatidylinositol
PKA protein kinasa A
PKC proteinkinasa C
PLC fosfolipasa C
TM transmembránová doména

1. Úvod

Hormon oxytocin je znám již dlouho, dříve se však předpokládalo, že jeho funkce je využívána pouze při porodu, kdy napomáhá kontrakci hladké svaloviny dělohy (odtud jeho název, který v řečtině znamená „rychlý porod“) a při laktaci, kdy napomáhá uvolňování mléka. Teprve později, poté co se zjistilo, že oxytocin je produkován u obou pohlaví, se odhalily i další periferní funkce oxytocinu především v srdci, kde reguluje krevní tlak, a účinky v centrální nervové soustavě, kde kromě jiných vlivů působí i jako neurotransmitter.

Oxytocin jako peptid s polárními aminokyselinami neprochází membránou, ale váže se na receptor na buněčném povrchu a jeho aktivací se přenese signál do buňky. Oxytocinový receptor patří do rodiny tzv. receptorů spřažených s G proteiny (GPCRs), které pomocí G proteinu aktivují různé efekторы, což vede ke tvorbě druhých posílů. V případě oxytocinového receptoru je efektořem fosfolipasa C a vznikající druzí posíl inositoltrisfosfát a diacylglycerol, a následně intracelulární vápník Ca^{2+} .

Oxytocin má svou funkci v srdci, kde po vazbě na receptor je chopen regulovat srdeční tep a tlak krve. Působí ve prospěch uvolňování síňového natriuretického peptidu (ANP), který je zodpovědný za kontrolu průtoku krve a kardiovaskulární homeostasy.

Hlavním místem syntézy oxytocinu jsou neurosekreční buňky v jádrech hypotalamu, je skladován v neurohypofýze, odkud je na elektrický stimul uvolňován do krevního řečiště. Přestože se předpokládá, že plasmatický oxytocin není schopen procházet přes hemoencefalitickou bariéru do mozku, byl oxytocin po periferní aplikaci detekován i v mozku. Byla také nalezena a popsána místa v mozku s výskytem oxytocinového receptoru.

Mezi centrální účinky oxytocinu se řadí ovlivnění sexuálního, mateřského a sociálního chování. Bylo prokázáno, že oxytocin je spojen i se stresovou odpovědí na různé podněty, dále s učením, pamětí a celkově s procesem poznávání. Tyto efekty byly pozorovány a popsány nejen u lidí, ale i u celé řady savců.

Doposud byl odhalena sekvence pouze jednoho genu pro oxytocinový receptor Kimurou v roce 1992. Ukázalo se že tento gen v oblasti promotoru obsahuje nespočetnou řadu regulačních sekvencí, což naznačuje, že exprese podléhá silné regulaci a to nejen podle tkáňové specifity, ale i podle aktuálního stavu organismu. Asi největší vliv na expresi mají steroidní hormony, zejména estrogen.

2. Cíl práce

Oxytocin je nonapeptid s velmi důležitými fyziologickými účinky v periferních oblastech na reprodukční systém savců. V poslední době byl kromě těchto vlivů objeven také vliv na centrální nervovou soustavu a další periferní účinky, především na srdce. Vzhledem k množství prací, které se zabývají jak samotným oxytocinem tak i oxytocinovým receptorem jsem vyhledal základní informace o této problematice, a sepsal je do bakalářské práce. Zaměřil jsem se především na genovou expresi oxytocinového receptoru v srdci a centrální nervové soustavě.

3. Oxytocin

Oxytocin spolu s dalším peptidovým hormonem vasopresinem izoloval a syntetizoval jako první americký biochemik Vincent du Vigneaud (1953). Byl to první peptidový hormon, jehož strukturu se podařilo odhalit a který byl syntetizován s biologickou aktivitou. Za tuto práci získal Nobelovu cenu za chemii (1955) (Du Vigneaud, 1955). Velký podíl na výzkumu oxytocinu lze připsat i vědcům z tehdejšího Československa. Již v roce 1956, tedy rok po udělení Nobelovy ceny, se podařilo vědeckému týmu z Ústavu organické chemie a biochemie v Praze, pod vedením profesora J. Rudingera, připravit oxytocin a některé jeho deriváty.

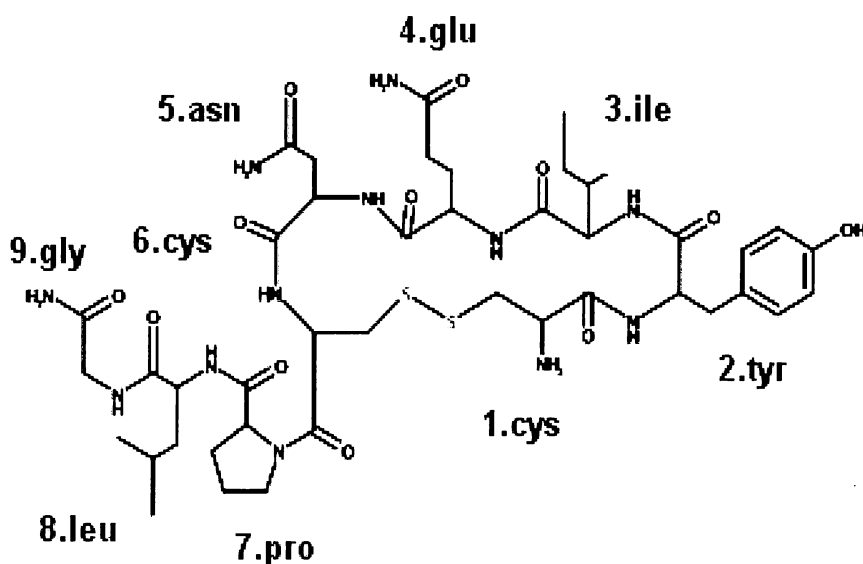
3.1. Struktura oxytocinu

Oxytocin je jeden z fylogeneticky nejstarších živočišných hormonů. Když jej spolu s vasopresinem v roce 1953 americký biochemik Vincent du Vigneaud poprvé izoloval a syntetizoval, vědělo se o jeho funkci jen málo. K objasnění struktury použil částečné odbourávání jednotlivých aminokyselin, čímž získal směs fragmentů, které pak rozdělil pomocí papírové chromatografie. Zjistil, že tento peptidový hormon se skládá z devíti aminokyselin (cys-tyr-ile-gln-asn-cys-pro-leu-gly). První a šestá aminokyselina jsou cysteinové zbytky, které v prostředí buňky tvoří disulfidický můstek a tím uzavírají 6 aminokyselin do kruhu. Zbývající tři (pro-leu-gly) vyčnívají z této kruhové struktury v podobě postranního řetězce, často označovaného jako „ocásek“ (obr. 1; str. 9) (Du Vigneaud et al., 1953).

Oba neurohypofyzální hormony - oxytocin i vasopresin - jsou nonapeptidy s disulfidickým můstkem mezi prvním a šestým cysteinovým zbytkem. To má za následek, že se utvoří cyklická molekula s C terminálním ocáskem skládající se ze tří aminokyselin. Podle aminokyseliny v pozici 8 se tyto peptidy dělí do dvou skupin: vasopresinová má v pozici 8 bazický lysin nebo arginin, zatímco oxytocinová má v pozici 8 neutrální zbytek. Isoleucin v pozici 3 oxytocinu je esenciální pro nasednutí na receptor, zatímco u vasopresinu to je právě bazická aminokyselina v pozici 8 (tab. 1; str. 10). Odlišnost v polaritě těchto zbytků se považuje za klíč, který umožňuje rozpoznání signálního peptidu receptorem (Gimpl a Fahrenholz, 2001).

V poslední době se molekula oxytocinu opět dostala do středu zájmu, proto se jeho struktura začala studovat pomocí moderních strukturních technik. Například práce

Budyšínského. a spol. (Budesinsky et al., 2005) se zabývá NMR (nukleární magnetická resonance) strukturou oxytocinu a jeho čtyř analogů, které se lišily modifikací (methylace a hydroxymethylace v různých pozicích) aromatického kruhu fenylalaninu, který zaměnili v pozici 2 za tyrosin. Zjistilo se, že tyto čtyři analogy mají naprosto odlišnou biologickou aktivitu, přestože se jejich NMR spektra téměř nelišila. Také se ukázalo, že kruh vytvořený disulfidickým můstkem mezi prvním a šestým cysteinem je stabilizován pomocí dvou vodíkových můstků, které propojují NH skupinu tyrosinu s CO skupinou asparaginu a naopak NH skupinu asparaginu s CO skupinou tyrosinu. Acyklická část není k cyklické nikterak koordinována a zdá se být zcela flexibilní nebo může být připojena pomocí vodíkového můstku mezi isoleucinem a kruhovou částí molekuly (Flegel, 2008). Z analýz struktury NMR metodou vyplynulo, že z ní nelze předpovědět biologickou aktivitu. Výrazná shoda NMR struktur těchto analogů v roztoku na jedné straně a naprostá odlišnost v biologické aktivitě na straně druhé prokázala, že funkce oxytocinu je především závislá na jeho specifické vazbě na receptor (Budesinsky et al., 2005).



Obrázek 1: Struktura oxytocinu.

Oxytocinu má disulfidický uzavřený kruh šesti aminokyselin (cys-tyr-ile-gln-asn-cys) a postraní řetězec tvořený třemi aminokyselinami (pro-leu-gly).

Tabulka 1: Sekvence aminokyselin oxytocinové a vasopresinové skupiny.

Jsou uvedeny rozdíly neurohypofyzálních hormonů, tedy rozdíly mezi vasopresinovou a oxytocinovou skupinou. Hvězdička označuje aminokyselinu stejnou jaká se vyskytuje u oxytocinu. Vidět jsou dva cysteinové zbytky potřebné pro tvorbu disulfidického můstku mezi polohou 1 a 6. Tyto dvě skupiny se liší především v aminokyselině v pozici 8, kde oxytocin a jemu podobné peptidy mají neutrální zbytek (ile; val), zatímco vasopresinová skupina se vyznačuje basickým argininem nebo lysinem.

Upraveno podle (Gimpl a Fahrenholz, 2001)

Peptidy oxytocinové a vasopresinové skupiny										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	výskyt
Oxytocin a jeho skupina	Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly(NH ₂)	placentálové, někteří vačnatci, chiméra hlavatá (<i>Hydrolagus colliei</i>)
Mesotocin	*	*	*	*	*	*	*	Ile	*	vačnatci, dvojdyšné ryby
Isotocin	*	*	*	Ser	*	*	*	Ile	*	Osteichthyes
Glumitocin	*	*	*	Ser	*	*	*	Gln	*	žraloci (Chondrichthyes)
Valitocin	*	*	*	*	*	*	*	Val	*	žraloci (Chondrichthyes)
Aspargtocin	*	*	*	Asn	*	*	*	*	*	žraloci (Chondrichthyes)
Asvatocin	*	*	*	Asn	*	*	*	Val	*	žraloci (Chondrichthyes)
Phasvatocin	*	*	Phe	Asn	*	*	*	Val	*	žraloci (Chondrichthyes)
Cephalotocin	*	*	Phe	Arg	*	*	*	Ile	*	<i>Octopus vulgaris</i> (Molluscs)
Annetocin	*	Phe	Val	Arg	*	*	*	Thr	*	<i>Eisenia foetida</i> (Annelids)
Vasotocin	*	*	*	*	*	*	*	Arg	*	Nonmammalian vertebrates, cyclostomes
Vasopresin a jeho skupina	*	*	Phe	*	*	*	*	Arg	*	savci
Lysipresin	*	*	Phe	*	*	*	*	Lys	*	prase, někteří vačnatci
Phenypresin	*	Phe	Phe	*	*	*	*	Arg	*	klokani (vačnatci)
Locupresin	*	Leu	*	Thr	*	*	*	Arg	*	<i>Locusta migratoria</i> (hmyz)
Arg-conopresin	*	Ile	*	Arg	*	*	*	Arg	*	<i>Conus geographicus</i> (měkkýši)
Lys-conopresin	*	Phe	*	Arg	*	*	*	Lys	*	<i>Lymnaea stagnalis</i> (měkkýši)

3.2. Gen pro oxytocin

Struktura genu kódující oxytocin byla objasněna v roce 1984 (Ivell a Richter, 1984). Podle odhadů mohou být geny pro oxytocin a vasopresin staré až 500 milionů let, což naznačuje jejich výjimečnost a nezbytnou funkci v organismu. Oxytocin je syntetizován v neurosekretických buňkách hypotalamu tzv. paraventriculárních a supraoptických jádrech jako prekursorový komplex oxytocin-neurofysin I.

Oxytocin s vasopresinem mají velice podobnou strukturu, a přestože se jejich fyziologické účinky liší, mají mnohé společné. Jejich podobnost je dána i tím, že jsou lokalizovány na stejném chromosomu velice blízko (vzdálenost se pohybuje od 3 do 12 kbp u myši (Hara et al., 1990), člověka (Sausville et al., 1985) a potkana (Mohr et al., 1988)), ale transkribují se v opačném směru. Toto uspořádání nejspíše vychází z genové duplikace běžného dědičného genu, které následovalo převrácení jednoho z genů (Gimpl a Fahrenholz, 2001). Lidský gen pro oxytocin-neurofysin I kódující oxytocinový propeptid byl nalezen na chromosomu 20p13 (Rao et al., 1992) a skládá se ze tří exonů. První exon kóduje samotný nonapeptid a další signální oblasti oxytocin-neurofysin I a exony dva a tři kódují neurofysinovou část komplexu (Gimpl a Fahrenholz, 2001).

Oxytocinový propeptid je velice hojně syntetizován v neurosekrečních buňkách hypotalamu, ve dvou jádrech paraventriculárních a supraoptických. Tento propeptid podléhá dalším posttranslačním modifikacím v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Váčky pak putuje dolů axonem do zadního laloku hypofýzy (posterior pituitary - neurohypofýza) (Brownstein et al., 1980), kde je skladován se svou doprovodnou molekulou neurofysinem a po nervovém impulsu je už samotný oxytocin uvolňován do krevního řečiště (Renaud a Bourque, 1991).

Neurofysin je malý protein (93-95 AMK) bohatý na disulfidické můstky a slouží především k přenosu, balení a skladování oxytocinu v granulích v terminální části axonů. V zadním laloku hypofýzy se oxytocin vyskytuje ve vysokých koncentracích ($>0,1$ M) v dimerním komplexu s neurofysinem (poměr 1:1) (Rose et al., 1996). Pro tvorbu tohoto dimeru jsou nejdůležitější cys-1 a tyr-2 v molekule oxytocinu, které jsou v prostředí neurosekretorických granulí protonovány ($\text{pH}\approx 5,5$) a tak se mohou vázat na neurofysin pomocí vodíkových vazeb a elektrostatických sil. V méně kyselém prostředí plasmy ($\text{pH}\approx 7,4$) se tento dimér rozruší a krví putuje už samotný oxytocin (Gimpl a Fahrenholz, 2001).

„Northern blot“ analýza mRNA pro oxytocin odhalila expresi tohoto genu v děloze, amnionu, v srdci a průdušnici. Jestliže dochází k tvorbě oxytocinu i v těchto tkáních a jsou zde přítomny oxytocinové receptory, pak to naznačuje, že oxytocin účinkuje také jako parakrinní anebo autokrinní mediátor (Shojo a Kaneko, 2000). Účinnost oxytocinu nezávisí pouze na jeho hladinách v krvi, ale je i určován množstvím receptorů pro tento peptid. Tak například těsně před porodem se zvýší nejen koncentrace oxytocinu v krvi, ale především množství receptorů v děloze.

3.3. Periferní fyziologické funkce oxytocinu

Du Vigneaud publikoval svůj článek (Du Vigneaud et al., 1953) v době, kdy se zdála funkce oxytocinu jako periferního hormonu zcela jasná, tedy pouze jako molekula stimulující hladkou svalovinu dělohy během porodu a hormon, který se uvolňuje v průběhu laktace při stimulaci bradavek. Pozdější studie zaměřené především na oxytocinový receptor ukázaly, že tato jednoduchá molekula má daleko širší uplatnění v mnoha jiných tkáních než se původně předpokládalo. Vliv oxytocinu byl pozorován v mnoha periferních tkáních, ale také v centrální nervové soustavě, lze tedy jeho funkci rozdělit na periferní a centrální. Mezi periferní účinky spadá vliv na dělohu při porodu, vliv na ejekci mléka při stimulaci prsních bradavek během laktace, vliv na srdce a na ledviny během zvýšeného krevního tlaku a také na pohlavní orgány během sexuálního aktu u obou pohlaví. V mozku je oxytocin spojován s chováním, stresem a má vliv i na paměť aj.

U savců působí oxytocin kontrakci myoepiteliálních buněk. Tyto buňky vystylají mléčnou žlázu prsu a jejich kontrakcí dochází k ejekci mléka ven z bradavky. Oxytocin způsobuje taky stahy hladké svaloviny dělohy při porodu. Citlivost této tkáně je regulována pohlavními hormony: estrogeny je zvyšována a progesterony naopak snižována. Tato citlivost v pozdním stádiu těhotenství je způsobena zvýšeným počtem receptorů na povrchu buněk této tkáně. Při porodu se ke zvýšenému množství receptorů přidá i zvýšená sekrece samotného oxytocinu. Rozšíření děložního hrdla vede k sestupu plodu do porodních cest a také ke stimulaci supraoptických a paraventriculárních jader hypofýzy, tedy ke zvýšení sekrece oxytocinu do krve a tím i k zesílení porodní činnosti. Zatímco u hlodavců je uvolnění oxytocinu esenciální pro navození a udržení porodu, u lidí oxytocin v cirkulaci není nezbytný pro iniciaci anebo udržení porodu. Normální porod proběhne i bez přítomnosti oxytocinu pro dysfunkci zadního laloku hypofýzy (Phelan et al., 1978).

Nejasný je vliv oxytocinu v netěhotné děloze. Drážděním genitálu během soulože má také vliv na uvolňování oxytocinu a jeho vazba na receptor v děloze vyvolá její kontrakce, které mohou napomáhat při transportu spermatu. I u mužů se oxytocin uvolňuje při pohlavním styku a je možné, že napomáhá při stahu svalstva, které má za následek vystříknutí sperma do utery.

Přehledněji o fyziologických funkcích oxytocinu pojednávají učebnice lékařské fyziologie například Přehled lékařské fyziologie od Ganonga (Ganong, 2002).

3.4. Účinek oxytocinu na krevní tlak

Krevní tlak je ovlivňován mnoha mechanismy, z nichž některé z nich jsou regulovány hormony neurohypofýzy. Dříve objevené, lépe prostudované a patrně i důležitější jsou mechanismy účinku vasopresinu (antidiuretický hormon-ADH). Uvolňování tohoto hormonu je ovlivňováno vzestupem krevní osmolarity a poklesem krevního objemu. ADH působí jednak na cévy, které stahuje, dále také v ledvinách sběrných kanálcích, kde řídí zpětnou resorpci vody. Takto zvyšuje krevní tlak například při poranění nebo jiných krevních ztrátách.

Avšak i druhý neurohypofyzární nonapeptid – oxytocin – hraje v regulaci krevního tlaku nezanedbatelnou roli. Oxytocin ovšem nemá přímý vliv, jeho působení je zprostředkováno přes síňový natriuretický peptid (ANP). Bylo dokázáno, že zvýšení krevního tlaku navodí uvolňování oxytocinu z neurohypofýzy do krve, který pak v srdci stimuluje uvolnění ANP, jenž postupně navodí v ledvinách natriuresu (Haanwinckel et al., 1995). U potkanů má intravenosní podání oxytocinu za následek zvýšení koncentrace ANP v plasmě, které je závislé na dávce. Podání oxytocinu intraperitoneálně vyvolalo u potkanů významné uvolnění ANP a posléze natriuresu spojenou se zvýšením močové osmolality (Gutkowska et al., 1997).

3.5. Síňový natriuretický hormon (ANP)

ANP se tvoří a uvolňuje ze srdečního svalu, jako odpověď na podněty, kterými jsou v první řadě zvýšené rozpětí srdeční síně a také vazba plasmatického oxytocinu na receptor.

Síňový natriuretický peptid je 28 aminokyselin dlouhý peptid, který obsahuje kruh o 17 aminokyselinách. Tento kruh je vytvořen disulfidickým můstkem mezi cysteinem v poloze sedm a dvacet tři (de Bold et al., 1981).

V roce 1981 de Bold a jeho spolupracovníci zjistili, že homogenát ze srdce obsahuje sloučeninu, která je schopná vyvolat natriuresu a vasodilataci (de Bold et al., 1981). ANP byl izolován a osekvenován o dva roky později (Flynn et al., 1983) a posléze i jeho dvě isoformy B-typ (BNP) a C-typ (CNP). Hlavní zdroj BNP je srdeční komora, ačkoliv původně byl objeven v prasečím mozku (Sudoh et al., 1988). C-typ ANP byl prvně lokalizován v nervové soustavě (Sudoh et al., 1990), ale posléze se zjistilo, že je produkován především endoteliálními buňkami (Suga et al., 1992).

Gen pro ANP je u lidí lokalizován na prvním chromosomu a jeho transkripce vede k mRNA, která kóduje 151 aminokyselin dlouhý prekursor pre-proANP obsahující signální sekvenci dlouhou 25 aminokyselin, která nasměruje vznikající protein do sarkoplasmatického retikula srdečních buněk. Zde se odštěpuje signální sekvence a takto vzniklý 126 aminokyselin dlouhý pro-ANP je zásobní molekulou pro ANP. Tento peptid prochází přes Golgiho aparát do sekretorických váčků, z nichž je následně uvolňován exocytosou do extracelulárního prostoru (Ruskoaho, 1992). Při exkreci peptidu do okolí je pro-ANP rozštěpen endopeptidasou (Yan et al., 2000) na dva fragmenty. N terminální fragment a významnější biologicky aktivní hormon atrial ANP (Misono et al., 1984). Pozorovatelné hladiny mRNA pro ANP byly zjištěny v centrální nervové soustavě, plicích, ledvinách, nadledvinách a tkáních cév. Tyto hodnoty ale nepřesáhly 1% zjištěného ANP v srdci, proto se nepředpokládá jejich velký vliv na celkovou koncentraci tohoto peptidu v plasmě (Rosenzweig a Seidman, 1991; Ruskoaho, 1992).

Efekt ANP se projeví až po jeho vazbě na specifický receptor. Doposud byly identifikovány tři typy ANP receptorů: ANP_A, ANP_B, ANP_C receptory. ANP_A a ANP_B mají guanylycyklasovou aktivitu a zprostředkovávají biologické efekty ANP. Naopak ANP_C receptor je také schopný vázat molekulu ANP, ale jeho úkolem je stahovat ANP z oběhu (Yandle, 1994).

Hlavním místem účinku ANP jsou ledviny a hladká svalovina cév, kterou relaxuje a snižuje tak tlak krve. V ledvinách má ANP vliv na propustnost kapilár a tím i na zvýšení vylučování solí a vody do moči (natriuresa). Také inhibuje uvolňování nebo vliv mnoha hormonů, mimo jiné i aldosteronu, reninu a vasopresinu (Ruskoaho, 1992). Tento natriuretický efekt vyplývá z přímé inhibice absorpce sodíku v ledvinových sběrných kanálcích, vzestup glomerulární filtrace a inhibice produkce a sekrece aldosteronu jehož úlohou je naopak sodík a vodu zadržovat (Rosenzweig a Seidman, 1991).

3.6. Centrální účinky oxytocinu

Buňky paraventriculárního jádra hypotalamu nemají zakončení jen v zadním laloku hypofýzy, odkud je oxytocin uvolňován do krve, ale také v mnoha částech centrálního nervového systému (bulbus olfactorius; přes thalamus a kaudálně do mozku kmenu a míchy). Zakončení byla pozorována jak v sympatických, tak parasympatických centrech. Další studie dokázaly, že oxytocin způsobuje klasický synoptický kontakt a je uvolňován na základě depolarizace indukované draslíkem nebo veratridinu. Oxytocin v cerebrospinální tekutině je považován za nezávislý na neurohypofyzálním oxytocinu, jelikož odezva na různé podněty není souhlasná (Insel et al., 1997).

V centrální nervové soustavě (CNS) je oxytocinový gen primárně exprimován v magnocelulárních neuronech v hypotalamu v paraventriculárních a supraoptických jádrech. Akční potenciál přiveden na tyto neurosekretické buňky má za následek uvolňování oxytocinu z jejich koncových axonů do neurohypofýzy (Poulain a Wakerley, 1982). V paraventriculárních jádrech hypotalamu byly identifikovány dva druhy neuronů, které obsahují oxytocin. Magnocelulární neurony, které končí v neurohypofýze a parvocelulární neurony, které mají zakončení v řadě jiných oblastí CNS. Pouze malá část (0,2%) neuronů má současně zakončení v obou částech mozku. Zakončení oxytocinových neuronů bylo popsáno v mnoha různých oblastech potkaního mozku, např. dorsomediálním hypotalamickým jádře, v několika thalamických jádrech, v dorsální a ventrální hipokampu, subiculu, entorhinálním kortexu, amygdale a mnoha dalších částech (Richard et al., 1991).

Koncentrace oxytocinu v extracelulární tekutině v supraoptickém jádře byla vypočítána na sto až tisícinásobek basální koncentrace v plasmě, tj. 1-10 nmol/dm³. K dalšímu zvýšení může dojít při stimulaci neuronů akčním potenciálem např. při laktaci (Landgraf et al., 1992). Hematoencefalitická bariéra brání průchodu oxytocinu kolujícímu v plasmě procházet do CNS; proto neexistuje žádný vztah mezi uvolněním oxytocinu z neurohypofýzy a změnou v koncentraci oxytocinu v cerebrospinální tekutině. Periferní stimulace, jako dráždění bradavek nebo rozšíření pochvy při porodu, vyvolá výrazné zvýšení plasmatického oxytocinu a také může, ale ani nemusí vyvolat změny v koncentraci v cerebrospinální tekutině. Na potkanech bylo dokázáno, že elektrická stimulace neurohypofýzy evokuje uvolňování oxytocinu do krve, zatímco stimulace paraventriculárního jádra vyvolá změnu koncentrace oxytocinu jak v krevním řečišti, tak i

v cerebrospinální tekutině (Gimpl a Fahrenholz, 2001). Po hypofysektomií (odstranění hypofýzy) oxytocin zmizí z krve, ale koncentrace v cerebrospinální tekutině vzroste (Dogterom et al., 1977). Oxytocin přítomný v cerebrospinální tekutině je pravděpodobně odvozen z neuronů, které se protáhly do třetí mozkové komory, limbického systému, mozkového kmenu a míchy. Koncentrace oxytocinu v cerebrospinální tekutině se pohybuje v rozmezí 10-50 pmol/dm³ a jeho poločas života je mnohem delší (28 minut) než v krvi (1-2 minuty) (Jones a Robinson, 1982; Meyer et al., 1987). U lidí a u opic byl pozorován cirkadiální rytmus v koncentraci oxytocinu v cerebrospinální tekutině, zatímco u plasmatického oxytocinu se tento jev nevyskytuje (Amico et al., 1983).

4. Receptor pro oxytocin

Oxytocin je jako peptid s polárními aminokyselinami (tyr, gln, asn) látka hydrofilní, proto je pro přenos jeho signálu přes nepolární buněčnou membránu nezbytný receptor. Prostřednictvím tohoto receptoru je extracelulární signál přenesen do nitra buňky. Oxytocinový receptor je typický zástupce rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs=G-protein coupled receptors).

Trojrozměrná studie struktury oxytocinu odhalila, že pro nasednutí oxytocinu na receptor je nezbytný disulfidický můstek mezi 1. a 6. cysteinem, který dovoluje vytvořit dvě vodíkové vazby mezi Tyr-2 a Asn-5, což má velký vliv na biologickou aktivitu této molekuly.

4.1. Receptory spřažené s G proteiny (GPCRs)

S vývojem mnohobuněčných organismů byl úzce spjat i vývoj v komunikaci mezi sousedními, ale i vzdálenějšími buňkami a také s okolním prostředím. Jako nejhojnější způsob se vyskytuje přenos signálu pomocí receptoru, nejčastěji receptoru spřaženého s G proteiny, které tvoří největší a evolučně nejúspěšnější rodinu receptorů buněčného povrchu (Bockaert a Pin, 1999). Tyto receptory hrají klíčovou roli za fyziologických i patofyziologických podmínek (Hynie a Klenerová, 2002). Zprostředkovávají buněčnou odpověď na obrovskou škálu různých signálů přicházejících z extracelulárního prostoru, tedy na různé druhy hormonů, neurotransmiterů, větší či menší proteiny, peptidy, ale i fotony.

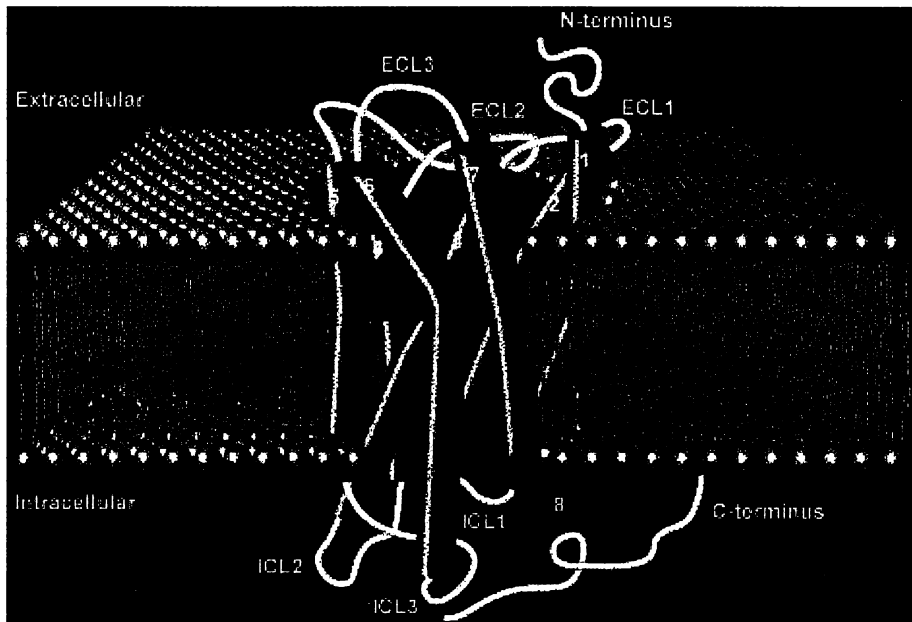
Studie dvourozměrné struktury krystalu GPCRs rhodopsinového typu vedla k definici centrálního jádra skládající se ze sedmi vysoce konzervovaných sekvencí nepolárních aminokyselin, které se stáčí do šroubovice (α helix) (Unger et al., 1997) a tím tvoří úseky procházející přes lipidickou dvojrivrstvu buněčné membrány (Bockaert a Pin, 1999). Proto se také GPCRs nazývají „heptahelikální“ nebo „seven-transmembrane (7TM) receptors“. Tyto úseky jsou spojeny na vnější a vnitřní straně buňky třemi extracelulárními (e1-e3) a třemi intracelulárními (i1-i3) smyčkami (Baldwin, 1993). Zjistilo se, že dva cysteinové zbytky na e1 a e2 jsou vysoce konzervované ve většině GPCRs a tvoří disulfidický můstek, který je pravděpodobně podstatný pro správné sbalení a stabilizaci proteinu (Bockaert a Pin, 1999). N konec receptoru je vystaven vnějšímu prostředí a je zodpovědný za vazbu ligandu, zatímco intracelulární C konec odpovídá za vazbu G proteinu. Velice rozlišná škála ligandů, které se mohou vázat na N konec (od fotonu aktivující opsin až po velké glykoproteiny), naznačuje, že tato část receptoru bude mezi rodinami velice variabilní (obr. 2; str. 19). Sekvence aminokyselin určuje vazebné schopnosti ligandu, který může mít funkci agonisty, antagonisty, alosterického aktivátoru nebo ligandu. Další odlišnosti mohou být způsobeny fosforylací nebo jinými modifikacemi na intracelulárních smyčkách, což vede k další regulaci GPCRs (Hynie a Klenerová, 1998).

GPCRs tedy přenášejí signál z vně buňky do cytoplasmy, kde aktivují G proteiny (heterotrimerní GTPasa). Tím spouští kaskádu procesů, mezi něž patří aktivace enzymů adenylylcyklasy, fosfolipasy C a fosfolipasy A_2 . Vznikající druzí posli, jako cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), diacylglycerol (DAG), inositoltrisfosfát (IP_3) či druhotně cytosolický vápník (Ca^{2+}) působí na cytosolické kinasy (proteinkinasa A; proteinkinasa C; kalmodulin) a tím regulují různé cytoplasmatické enzymy, iontové kanály a funkci dalších struktur. Bylo také ukázáno, že přenos signálu přes GPCRs nemusí být zprostředkován tvorbou druhých poslů, dokonce se nemusí zapojovat ani G protein, což zcela mění staré názory na tento způsob přenosu signálu (Hynie a Klenerová, 2002). Další studie také vyvrátily domněnku že GPCRs fungují jako monomery. V řadě studií byl popsán vznik diméru nebo i oligomeru, a dokonce i heterodimerizace. Takto vzniklé struktury jsou pravděpodobně nutné pro účinnou vazbu agonistů a tedy i pro plně funkční signalizaci. Proto byla teorie o účinnosti GPCRs rozšířena nejen o regulace pomocí fosforylace, glykosilace a asociace s jinými proteiny, ale i o oligomeraci (Hynie a Klenerová, 2002).

Sedm transmembránových domén tvoří tzv. jádro receptoru. Toto jádro a změny v jeho uspořádání jsou pravděpodobně zodpovědné za aktivitu receptoru (Unger et al.,

1997). Biochemické analýzy a metagenese s modelem GPCRs rhodopsinového typu odhalily, že přepínání mezi neaktivní a aktivní formou receptoru je spojeno se změnou relativní orientace třetí a šesté transmembránové domény, což vede k odhalení místa pro vazbu G proteinu (Farrens et al., 1996; Bourne, 1997; Javitch et al., 1997). Takto vyvolané změny se projeví ve změně vzájemné polohy druhé a třetí intracelulární smyčky, čímž se utvoří kapsa, do které se může vázat α podjednotka G proteinu. Je pozoruhodné, jak rozmanitá škála ligandů je schopná vyvolat identickou změnu v intracelulárních smyčkách a tím vytvořit místo pro aktivaci G proteinu.

Proces desensitizace GPCRs vyžaduje fosforylaci cytoplasmatických domén třemi různými regulačními molekulami: protein kinasou regulovanou druhými posli (PKC, PKA), serin/threonin GPCR kinasou (GRKs) a arestiny. Fosforylace receptoru protein kinasou A nebo protein kinasou C pozmění konformaci receptoru tak, že případná interakce s G proteinem je oslabena. Další možnost, jak utlumit GPCRs je fosforylovat navázaného agonistu specifickou GPCRs kinasou a pak navázáním proteinu arestinu. Tento způsob fosforylace a následné desensitizace je doprovázen redukcí afinity agonisty k GPCRs, pravděpodobně poškozením vazby GPCRs-G protein (Shojo a Kaneko, 2000). Oxytocinový receptor obsahuje na C konci tři motivy souhlasné s protein kinasou C. Berra a spol. odhalili, že desensitizace oxytocinového receptoru je způsobeno protein kinasou C β , nikoliv pomocí GPCR kinasy (Berrada et al., 2000). Desensitizované receptory podléhají endocytóze a jsou skladovány ve váčcích pod cytoplasmatickou membránou. Po ukončení antagonistického účinku mohou být recetory navráceny na membránu nebo při dlouhodobém působení antagonisty jsou GPCRs degradovány uvnitř lysosomu.



Obrázek 2: Struktura receptoru sraženého s G proteiny (GPCRs)

Červeně jsou označeny a očíslovány (1-7) hydrofóbní transmembránové domény, které protínají plasmatickou membránu a na vnější straně jsou spojeny třemi extracelulárními smyčkami (ECL1-ECL3 = extracellular loop). Na vnitřní straně buňky jsou tyto domény propojeny pomocí třech intracelulárních smyček (ICL1-ICL3 = intracellular loop). Je také vyznačen N konec vyčnívající ven z buňky, který zodpovídá za vazbu ligandu, a intracelulární C konec nesoucí místo pro vazbu efektoru.

Převzato z (Kristiansen, 2004)

4.2. Rodiny GPCRs

GPCRs jsou historicky rozděleny do šesti rodin (z toho tři byly nalezeny u obratlovců (Harmar, 2001)), které se liší sekvencí nukleotidů v kódujících genech. Tyto odlišnosti jsou dány vysokou variabilitou ligandů, kteří se váží na tyto receptory. Další jemné odlišnosti jsou dány především sestřihem, fosforylací a dalšími úpravami mRNA nebo glykosylací již vzniklého receptoru (Bockaert a Pin, 1999). Například u obratlovců bylo identifikováno 1000-2000 různých typů GPCRs, které zabírají více než 1% celého lidského genomu. V poslední době lze na základě aminokyselinových sekvencí usuzovat, že počet členů GPCRs rodiny je daleko větší, než se dříve soudilo a to je i důvod, proč se tyto receptory stávají hlavními cíly pro objevy nových farmak (Hynie a Klenerová, 2002).

Ačkoliv velká část struktury receptoru je vždy stejná (např. domény procházející membránou) velké rozdíly ve vazebných ligandech a efektorech způsobují i rozmanitost GPCRs. Jedná se především o odlišnosti v délce i funkci N terminální extracelulární, C terminální intracelulární doméně a v jejich intracelulárních smyčkách. Každá z těchto domén je zodpovědná za specifické vlastnosti těchto rozmanitých receptorů.

Rodina I (podrodina 1a) GPCRs je aktivována malými molekulami jako jsou např. katecholaminy, které se váží do dutinky mezi TM-III a TM-IV. V případě rhodopsinu, který je aktivován fotony, je v této dutině kovalentně vázána molekula retinalu. Světelný paprsek změní jeho konformaci z 11-cis na všechny trans, čímž vyvolá změnu v receptoru a podle výše uvedeného mechanismu i jeho aktivaci. Poté se retinal uvolní z dutiny a nahradí jej nová molekula 11-cis retinalu. Podrodina 1b je aktivována krátkými peptidy jako je oxytocin, vasopresin, které se váží na N terminální extracelulární doménu receptoru (Trumpp-Kallmeyer et al., 1995).

Pro rodinu II GPCRs, která přenáší signál velkých proteinů jako např. glukagon nebo sekretin, je typická dlouhá N terminální doména, která hraje roli při vazbě objemného ligandu (Pantaloni et al., 1996).

Rodina III GPCRs je velice původní. Zahrnuje metabotropické glutamátové receptory (mGluRs), receptor aktivovaný extracelulárním vápníkem (Ca^{2+} -sensing receptor) a receptor pro GABA_B . Všechny tyto proteiny mají dlouhou extracelulární doménu, která sdílí nízkou, ale podstatnou sekvenci podobnou periplasmatickým bakteriálním proteinům (O'Hara et al., 1993).

4.3. G proteiny, jejich výskyt, struktura a funkce

G proteiny, respektive jejich disociovaná podoba na α podjednotku a dimér $\beta\gamma$ podjednotek, regulují aktivitu strukturně rozmanité skupiny efektorových molekul. G proteiny jsou zodpovědné za aktivaci adenylcyklasy vytvářející cyklický AMP (cAMP) z Mg^{2+} -ATP substrátu, fosfolipasy C štěpící fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát za vzniku dvou druhých posílů: diacylglycerolu a inositoltrisfosfátu (viz dále). Také aktivuje specifické iontové kanály pro draslík (K^+), sodík (Na^+) a vápník (Ca^{2+}) (Clapham, 1994; Morris a Malbon, 1999). Název G proteiny je odvozen od jejich schopnosti vázat a štěpit makroergní sloučeninu guanosintrifosfát (GTP).

G proteiny jsou heterotrimerní proteiny skládající se ze tří podjednotek označených řeckými písmeny α , β, γ (G_α ; G_β ; G_γ). Jejich funkcí je zajistit přenos signálu na efektor a jeho amplifikace. Podjednotky α , β , γ se liší nejen hmotností ($\alpha = 45$ kDa, $\beta = 37$ kDa, $\gamma = 9$ kDa), ale především funkcí. Co mají ale společné je, že jsou všechny asociovány na buněčnou membránu (G_α podjednotka díky zbytkům kyseliny myristoylové nebo kyseliny palmitové nebo kombinací obou, G_β a G_γ pomocí prenylace C konce G_γ podjednotky).

Heterotrimér G proteinu není k sobě vázán zcela pevně, G_α podjednotka může disociovat od diméru $G_\beta - G_\gamma$. Rozlišujeme dva stavy, pokud je na G_α podjednotce navázán guanosindifosfát (GDP) je tato podjednotka navázána k dimeru $G_\beta-G_\gamma$ a G protein je inaktivní. Pokud se ale GDP vlivem interakce G proteinu s receptorem GPCRs vymění za GTP, G_α se uvolní a disociuje v membráně k efektorovým enzymům, jejichž aktivitu reguluje. Subjednotka α má GTPasovou aktivitu, hydrolýzou GTP a vytvořením GDP navrácí G protein do inaktivního stavu. Dimer podjednotek $G_\beta-G_\gamma$ je k sobě poměrně silně vázán s vysokou afinitou (pro jeho rozrušení je třeba vyvolat denaturující podmínky). Afinita G_α podjednotky k heterodimeru $G_\beta-G_\gamma$ je tedy dána přítomností GDP a naopak s navázaným GTP se její afinita ztrácí a získává afinitu k některému z efektorů signální dráhy.

G proteiny jsou spojeny s celou řadou signálních drah. $G_{\alpha s}$ podjednotka aktivuje různé formy adenylcyklasy (AC), specifické iontově selektivní kanály (Na^+ ; K^+ ; Ca^{2+}), tyrosinkinasovou dráhu, $G_{\alpha q}$ subjednotka aktivuje fosfolipasu C. $G_{\alpha i}$ podjednotka působí inhibičně. Je tedy vidět, že účinek G proteinů je široký, což se projevuje v mnoha různých typech G proteinů. Ale nejde jen o odlišné cílové enzymy, G proteiny reagují s celou řadou receptorů. Dá se říci, že G proteiny tvoří můstek v komunikaci mezi vnějším prostředím buňky a cytoplasmou. Jsou schopny reagovat na různé podněty přicházející na specifické

buňky a cytoplasmou. Jsou schopny reagovat na různé podněty přicházející na specifické receptory a podle intenzity signálu je předat dál na cílové intracelulární proteiny. Také tvoří důležitý komunikační uzel, dochází na nich totiž k sumaci různých signálů, jejich vyhodnocení a odeslání dál (Gilman, 1987; Morris a Malbon, 1999). G proteiny jsou intenzivně zkoumány jako možný terapeutický cíl farmak.

4.4. Adenylylcyklasa, cyklické AMP a proteinkinasa A

Nejznámější a nejlépe prostudovaný přenos signálu pomocí G proteinu je systém spojený s tvorbou cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který je jako intracelulární posel zodpovědný za aktivaci a regulaci celé řady fyziologických funkcí prostřednictvím fosforylace enzymů a proteinů specifickými proteinkinasami. Je charakteristický svou obousměrnou regulací, tedy s aktivací i inhibicí. Stimulace nebo inhibice komplexu adenylylcyklasy (AC) tvořící cAMP závisí na typu navázaného G proteinu (aktivace- $G_{s\alpha}$; inhibice- $G_i\alpha$).

Ke studiu adenylylcyklasy se využívají bakteriální toxiny, které tzv. ADP ribosylací inaktivují vnitřní GTPasovou aktivitu α podjednotek G proteinů. Cholerový toxin způsobuje inaktivitu $G_s\alpha$ podjednotky, zatímco pertusový toxin blokuje GTPasovou aktivitu $G_i\alpha$ podjednotky a tak brání jejímu inhibičnímu působení (Sharp a Hynie, 1971).

Adenylylcyklasa je transmembránový enzym, tvořený hydrofilní a hydrofobní podjednotkou. Hydrofilní podjednotka několikrát protíná lipidickou dvojvrstvu buněčné membrány (např. adenylylcyklasa typu I prochází membránou šestkrát).

Na degradaci cAMP a tak i na utlumení citlivosti nebo úplném znečitlivění této signální dráhy se podílí další velice důležitý enzym, fosfodiesterasa, která s pomocí Mg^{2+} katalyzuje rozklad cAMP na neaktivní 5'-AMP, které může být fosforylován a dále využíván v buňce jako ATP.

Cyklický AMP působí prostřednictvím cAMP-dependentní proteinkinasy A (proteinkinasy A-PKA). Aktivovaná proteinkinasa A katalyzuje přenos γ fosfátu z ATP na serinové a threoninové zbytky v enzymech a jiných proteinových substrátech. To má za následek vznik nové konformace anebo také změnu lokalizace v rámci buňky a tedy aktivaci nebo inhibici daného proteinu. Působení dalších mnoha proteinkinas, které mohou mít souhlasný nebo opačný efekt vůči proteinkinase A dochází k zajištění jemné regulace vlivu signálních molekul a také k nesmírné rozmanitosti konečných účinků.

Opačný účinek mají fosfatasy, které z fosforylovaných proteinů odštěpí fosfát, čímž navrací proteinu původní konformaci a také aktivní/inaktivní stav. Regulací fosfatasy dochází k další modulaci přivedeného signálu. Takto se dá modifikovat délka a intenzita buněčné odpovědi.

4.5. Fosfolipasa C a její druzí posli

Dalším efektozem receptorů spřezaných s G proteiny je fosfolipasa C. Tento membránově vázaný enzym štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát za vzniku dvou druhých poslů: k membráně vázaný diacylglycerol (DAG) a rozpustný inositol-1,4,5-trisfosfát (obr. 3; str.25). Tento systém přenosu signálu je patrně ještě rozšířenější než přenos pomocí kaskády cAMP, mimo jiné je i spojen s receptorem pro oxytocin.

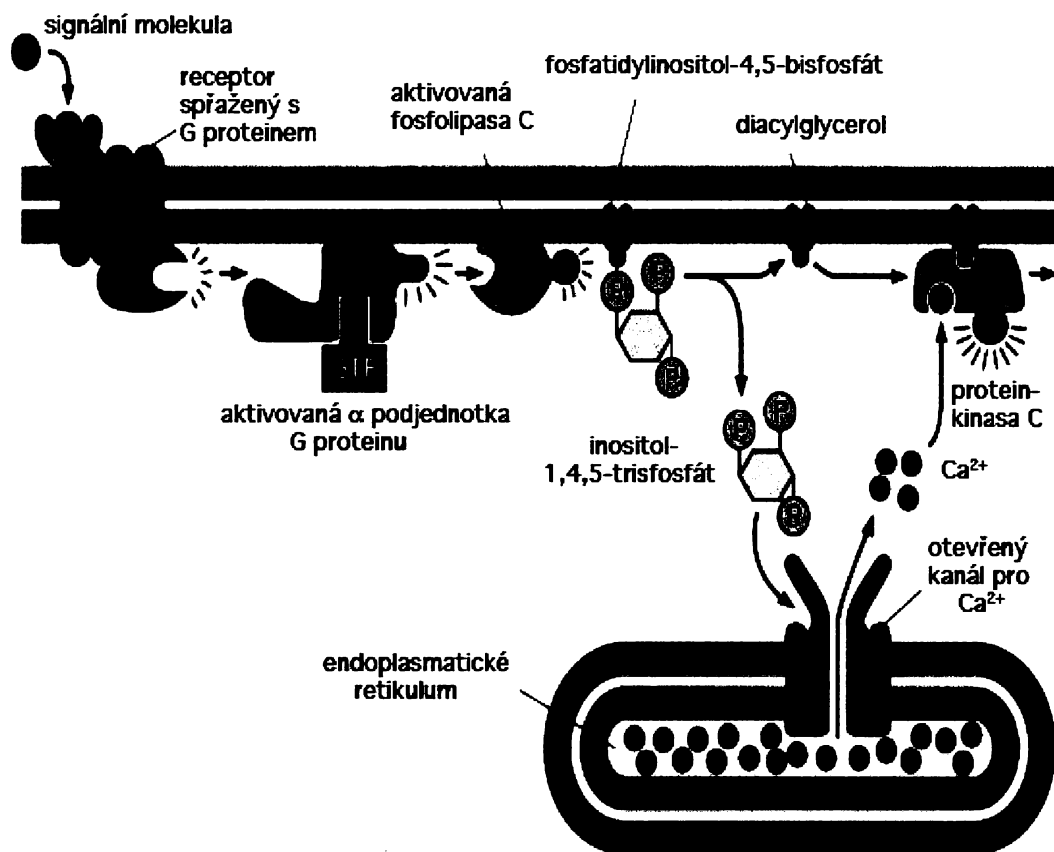
Fosfolipasa C je aktivována neurotransmitery, hormony, gastrointestinálními hormony, eikosanoidy, antigenními podněty, růstovými faktory, které využívají G proteiny, apod. Inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃) je ve vodě rozpustný druhý posel, který difunduje od plasmatické membrány k endoplasmatickému retikulu, kde se váže na transmembránový Ca²⁺ specifický kanál a jeho aktivací spustí uvolňování vápníku po koncentračním spádu do cytoplasmy. Tento kanál je znám jako IP₃ receptor a je regulován jak inositolem -1,4,5-trisfosfátem, tak i hladinou vápníku v cytoplasmě. Uvolňování Ca²⁺ vede zpravidla ke vzniku oscilačních vln Ca²⁺ v cytoplasmě. Tento mechanismus je zahrnut v celé řadě procesů, mimo jiné i signalizace v neuronech nebo stahy hladké svaliviny. Uvolněný vápník zastává i jiné funkce, mezi nejdůležitější bezpochyby patří aktivace kalmodulinu a jeho homologů (Voet D. a Voet J., 2004; Strunecká a Patočka, 2006).

Druhá molekula vzniklá štěpením fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu je membránově vázaný diacylglycerol. Přestože je vázán na vnitřní stranu cytoplasmatické membrány i tak působí jako druhý posel a v přítomnosti Ca²⁺ a fosfatidylserinu je schopen aktivovat protein kinasu C (PKC). Tento membránově vázaný enzym fosforyluje a tak moduluje aktivitu mnoho dalších enzymů, mimo jiné i glykogen syntasu. Diacylglycerol je v některých buňkách degradován cytosolickou fosfolipasou A (cPLA₂) za vzniku arachidonátu, který slouží jako výchozí molekula pro syntézu mnoha dalších parakriních hormonů, jako třeba prostaglandiny nebo prostacykliny (Voet D. a Voet J., 2004).

Intracelulární vápník plní v buňce řadu funkcí včetně úlohy signální molekuly, která zprostředkovává mimo jiné i spřažení dějů excitace-kontrakce a stimulace-sekrece.

Koncentrace vápníku v cytoplasmě je na rozdíl od extracelulárního prostoru velice nízká, rozdíly jsou až 10000 násobné. Stálá koncentrace je udržována vápníkovými kanály, které propouští extracelulární Ca^{2+} a Ca^{2+} skladované v endogenních zásobách (endoplasmatické retikulum a mitochondrie) do cytoplasmy, a Ca^{2+} -ATPasami, které aktivním transportem pumpují vápník zpět proti koncentračnímu spádu ven z buňky nebo do endoplasmatického retikula. Další možností jak snížit koncentraci vápníku v cytoplasmě je pomocí Na^+ - Ca^{2+} antiporteru, který využívá gradient sodíku, aby transportoval vápník proti gradientu ven z cytoplasmy.

V buňce existuje řada proteinů, které váží vápník a tím zahajují příslušné specifické buněčné funkce. Nejznámější z těchto proteinů je kalmodulin, který má čtyři vazebná místa pro Ca^{2+} a jeho vazbou dochází k výrazné konformační změně kalmodulinu. Samotný kalmodulin nemá enzymatickou aktivitu, ale váže se k jiným proteinům jako jejich podjednotka a tak mění jejich specifickou aktivitu. Ca^{2+} prostřednictvím kalmodulinu ovlivňuje metabolismus cyklických nukleotidů, fosforylace různých proteinů, metabolismus vápníku, kontraktilní proteiny, metabolismus glykogenu a řadu dalších funkcí. Aktivovaný kalmodulin také reguluje aktivitu strukturálních elementů buňky (aktin-myosinový komplex hladkých svalů), uvolnění granulí a endocytosu aj.



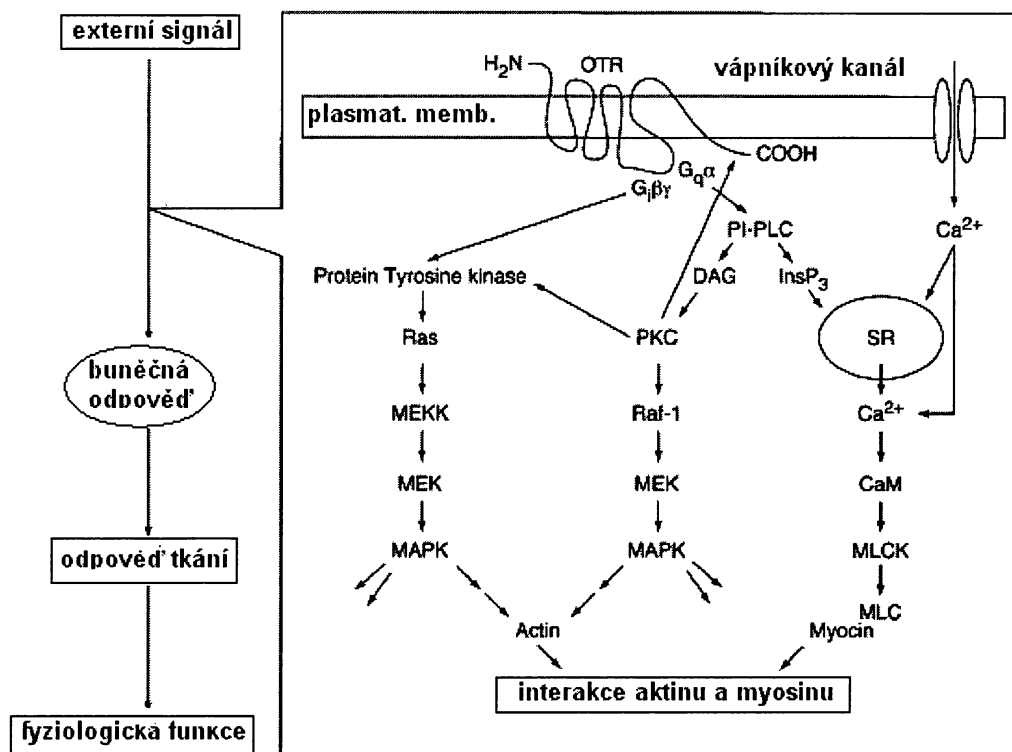
Obrázek 3: Signální dráha spojená s G proteinem.

Je zde vidět přenos signálu signální molekulou na receptor, který aktivuje G protein. α podjednotka G proteinu pak aktivuje fosfolipasy C, která generuje štěpením fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu dva druhé posly: membránově vázaný diacylglycerol a cytoplasmatický inositol-1,4,5-trisfosfát, který aktivuje vápníkové kanály, a tak zvyšuje koncentraci Ca^{2+} v cytoplasmě. Vápník spolu s diacylglycerol aktivuje proteinkinasu C, která fosforilací reguluje další buněčné pochody.

převzato a upraveno z (Alberts et al., 1998)

4.6. Efektory oxytocinového receptoru

Přímý kontakt oxytocinu se svým receptorem má za následek aktivaci efektoru pomocí G proteinu (G_i anebo G_q). Oxytocin stimuluje rapidní nárůst intracelulárního vápníku, aktivuje MAP (mitogen-activated protein) kinasu a syntézu prostaglandin E_2 . Dále aktivací fosfolipasy C a následným štěpením fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu dojde ke vzniku dvou druhých posílů – inositol-1,4,5-trisfosfát, který mobilizuje vápník ze sarkoplasmatického retikula, a diacylglycerolu, který aktivuje proteinkinasy C, která může fosforylací modulovat funkci mnoha proteinů mimo jiné i MAP kinasu a syntézu prostaglandin E_2 . Generovat prostaglandin E_2 lze také pomocí fosfolipasy A_2 , která je aktivována Ca^{2+} dependentní proteinkinase. Intracelulární vápník se váže na kalmodulin, což má za následek aktivace kinasy pro myosinový lehký řetězec (MLC kinasa). Fosforylací a defosforylací 20 kDa lehkého řetězce myosinu se odrazně reguluje kontrakce hladké svaloviny dělohy při porodu nebo cév jako odpověď na zvýšený krevní tlak (obr. 4; str. 27) (Shojo a Kaneko, 2000).



Obrázek 4: Předpokládaný přenos signálu pomocí oxytocinového receptoru

OTR=oxytocinový receptor; PI-PLC=komplex fosfatidylinositolu-4,5-bis-fosfátu a fosfolipasy C; DAG=diacylglycerol; InsP3=inositol-1,4,5-trisfosfát; PKC=proteinkinasa C, SR=sarkoplasmatické retikulum; CaM=calmodulin; MLC=lehké řetězce myosinu (myosin light chain); MLCK=kinasa lehkých řetězců myosinu; MAPK=kinasa proteinu mitogenu; MEK MAPK/extracelulární signál redukující kinasa; MEKK=MEK kinasa

Převzato a upraveno z (Shojo a Kaneko, 2000)

5. Struktura receptoru pro oxytocin

Oxytocinový receptor je typickým zástupcem GPCRs rodiny I rhodopsinového typu. Sedm α helixových transmembránových domén je vysoce konzervováno mezi všemi GPCRs, protože zodpovídají za aktivaci a přenos signálu. Změna orientace mezi třetí a šestou transmembránovou smyčkou odhalí místo pro vazbu G proteinu a tak aktivuje receptor. Dále bylo zjištěno, že v této rodině GPCRs jsou nezbytné pro vazbu agonisty a aktivaci receptoru aspartát ve druhé transmembránové doméně (asp-85) a tripeptid asp-arg-tyr (asp-arg-cys v případě oxytocinového receptoru) na rozhraní druhé intracelulární smyčky a třetí transmembránové domény (Bockaert a Pin, 1999). Další vysoce konzervované aminokyseliny v této rodině GPCRs jsou dva cysteiny tvořící disulfidický můstek mezi první a druhou extracelulární smyčkou a dva cysteiny na C terminální doméně, který nesou zbytek kyseliny palmitové a přidrží tak C konec u plasmatické membrány. Odstranění těchto dvou palmitových zbytků má za následek významné změny ve funkci receptoru (Schulein et al., 1996).

Oxytocinový receptor nese dvě (myši, potkaní) nebo tři (lidský, prasečí, ovčí, hovězí) potencionální místa pro N-glykosilaci na extracelulární N terminální doméně. Hmotnost samotného receptoru byla vypočítána podle aminokyselinové sekvence cDNA na 40-45 kDa. Zatímco hmotnost funkčního receptoru z membrán buněk dělohy byla stanovena pomocí fotoznačeného agonisty na 68-80 kDa, tak v membráně buněk izolovaných z prsních žláz byla hmotnost stanovena na 65 kDa. Předpokládá se, že rozdíly v hmotnostech receptorů v děloze a prsních žlázách jsou způsobeny odlišnými glykosilickými vzory. Pokusy s receptory bez glykosilace, kdy se zaměnil asparagin v pozicích 8,15 a 26 za aspartát, ukázaly nezměněnou vazebnou charakteristiku receptoru. Proto se předpokládá, že glykosilace není nezbytná pro vlastní expresi receptoru a nemá žádný efekt na funkci receptoru (Kimura et al., 1997).

Oxytocin povrchně interaguje s extracelulárními smyčkami a N terminální doménou receptoru s využitím běžných, ale i selektivních kontaktní místa této GPCRs rodiny receptorů. Pomocí molekulární technik bylo navrženo místo pro vazbu agonisty na oxytocinový receptor jako malá trhlina ohraničená dokola sestavenými transmembránovými doménami. Pro tvorbu vazebného místa jsou nezbytné glutaminové zbytky na transmembránových doménách 2, 3, 4 a 6 a lysinový zbytek na třetí transmembránové

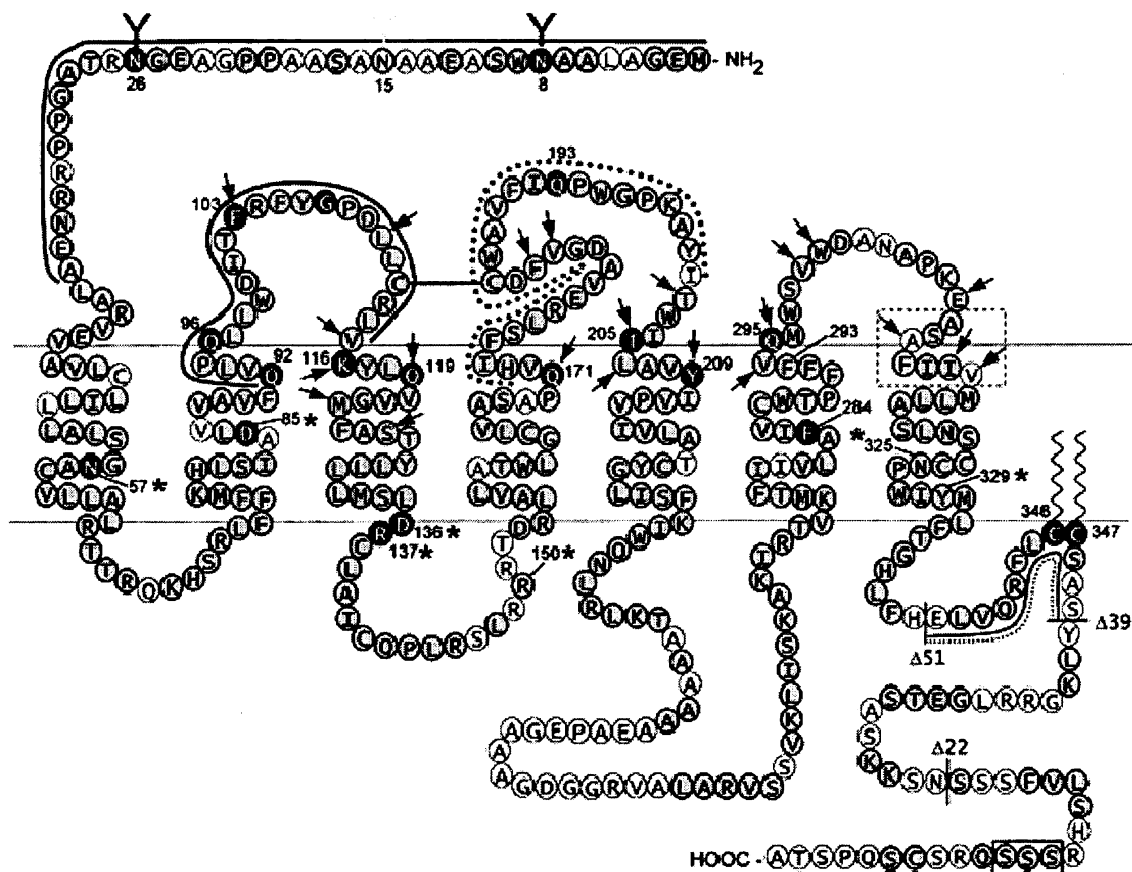
doméně. Jejich záměna za alanin vedla ke snížení afinity k agonistům (Mouillac et al., 1995; Barberis et al., 1998).

Aminokyseliny phe-103, tyr-115 a asp-115 v lidském oxytocinovém receptoru, V1a/V1b a V2 receptoru pro vasopresin jsou determinující pro selektivní vazbu ligandu (Chini et al., 1995; Ufer et al., 1995). Například záměna tyr-115 za phe v potkaním V1a receptoru vede k devatenásobnému zvýšení afinity k oxytocinu oproti nativnímu receptoru. Předpokládá se, že i druhá extracelulární smyčka je důležitá při vazbě agonisty na receptor, protože její sekvence aminokyselin je konzervovaná u všech zástupců receptorů pro nonapeptidové hormony.

Oxytocinový receptor má nízkou selektivitu při vazbě různých ligandů. Nonapeptid s identickou cyklickou částí jako má oxytocin a s leucinem v pozici 8 se váže se stejnou afinitou. Tento objev naznačuje, že cyklická část oxytocinu hraje podstatnější roli v selektivitě vazby než lineární tripeptid. Na konec receptoru se podílí na vazbě oxytocinu interakcí s hydrofobní leucinem v pozici 8 na oxytocinu a také spolu s první extracelulární smyčkou váže lineární tripeptid oxytocinu. Druhá extracelulární smyčka receptoru interaguje s cyklickou částí molekuly oxytocinu (obr. 5str. 30) (Postina et al., 1996).

Několik prací naznačuje, že vazebné místo pro antagonistu oxytocinu se liší od místa pro agonistu. Studie chymerických receptorů poskytly důkaz, že vazebné místo pro antagonistu oxytocinu je tvořeno první, druhou a sedmou transmembránovou doménou. Hlavní příspěvek k vazebné afinitě antagonisty je připisován horní části sedmé transmembránové domény (Elands et al., 1988). Tyto oblasti nejsou zodpovědné za vazbu agonisty, proto většina mutací v těchto sekvencích nemá vliv na afinitu agonisty k receptoru (Barberis et al., 1998).

Zatímco u V1 a V2 receptoru je zcela jasné, že pro vazbu G proteinu jsou nezbytné ale dostačující intracelulární smyčky dva a tři (Liu a Wess, 1996), u oxytocinového receptoru je problém vazby G proteinu složitější. Do vazby G proteinu se zapojuje více intracelulárních domén oxytocinového receptoru (Gimpl a Fahrenholz, 2001).



Obrázek 5: Struktura oxytocinového receptoru.

Aminokyselinová sekvence lidského oxytocinového receptoru znázorňuje strukturu sedmi membránových domén s nepolárními aminokyselinami, tři extracelulární a tři intracelulární smyčky a také N terminální a C terminální domény. Na N konci jsou patrná místa pro glykosylaci označené „Y“, tedy asparagin v pozici 8, 15 a 26. Dále jsou také zobrazeny dva cysteinové zbytky vedle sebe v pozicích 346 a 347, které přidrží C konec lipidickou kotvou v membráně. Tečkovanou čarou je vyznačena část receptoru, který interaguje s cyklickou částí oxytocinu, plnou čarou část, která je zodpovědná za vazbu lineárního tripeptidu.

převzato z (Gimpl a Fahrenholz, 2001)

6. Oxytocinový receptor v srdci

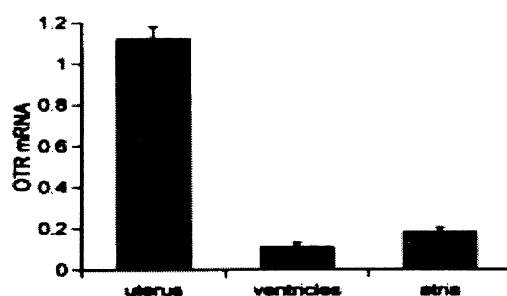
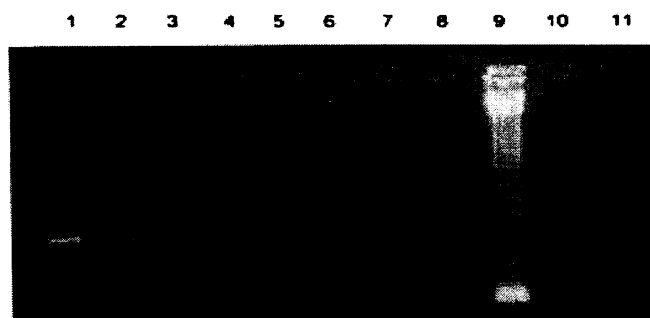
V srdeční svalovině oxytocinový receptor moduluje účinek oxytocinu na uvolňování síňového natriuretického peptidu (ANP), který zpomaluje srdeční rytmus a redukuje sílu kontrakce srdce, čímž snižuje krevní tlak. Síňový natriuretický peptid má velké vasodilatační účinky a přes cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) má i negativní chronotropické a ionotropické účinky. Gutkowska a kolektiv předpokládá, že endoteliální oxytocinový receptor je přes uvolněný vápník spojen se stimulací NO dráhy, která vede k srdeční relaxaci (Gutkowska et al., 2000). Tato skupina spekuluje, že oxytocin generuje oxid dusný, který aktivuje guanylcyklastu a vznikající cGMP napomáhá při relaxaci srdeční svaloviny a cév. Také Kadekaro a spol. navrhl, že produkce NO je nezbytná k udržení basální sekrece oxytocinu stejně jako tlaku krve, protože NO selektivně inhibuje uvolňování oxytocinu (Kadekaro et al., 1997). Regulace signalizace oxytocinu oxidem dusným může hrát roli ve zpětné vazbě a tím i při určení frekvence a amplitudy přeneseného signálu. Oxid dusný (NO) je plyn schopný procházet membránou buněk a patří mezi významné intracelulární signální molekuly. Mimo jiné je zapojen do procesu vasodilatace a slouží též jako neurotransmitter (Bredt a Snyder, 1994).

Studie ukázaly, že srdce je místem exprese genu pro oxytocinový receptor. Amplifikací cDNA pomocí metody PCR s využitím specifických oligonukleotidových primerů se zjistilo, že se exprimuje jak v síních a komorách srdce, tak i v aortě. Jako pozitivní test byla použita mRNA oxytocinového receptoru z dělohy. Podle polohy bandů se zjistilo, že v srdci se exprimuje gen dlouhý 373 bp (obr. 6; str. 32). Experimenty také dokázaly, že oxytocinový receptor je přítomen v místě exprese své mRNA, tedy ve všech částech srdce. Dále se také zjistilo, že množství exprimovaného genu v síni srdce je nepatrně vyšší než v komoře, ale i tak je nejméně desetkrát nižší než v děloze ne gravidních samic potkanů (Gutkowska et al., 1997).

Uvolňování ANP jako důsledek stimulace oxytocinového receptoru je spojena s uvolňováním intracelulárního vápníku do cytoplasmy. Ukázalo se, že zvýšení koncentrace intracelulárního Ca^{2+} napomáhá buněčné exocytose (Knight et al., 1989) a tedy i při sekreci ANP v srdci (Ruskoaho et al., 1985).

Srdce se ukázalo také jako místo syntézy samotného oxytocinu. V tekutině vytékající z promývaného srdce nebo pouze z kultivovaných buněk srdeční svaloviny

(myocyt) byl oxytocin detekován. Tento fakt byl dokázán přítomností oxytocinové mRNA v srdeční tkáni, která byla stanovena pomocí PCR a Southern blotu (Jankowski et al., 1998). Relativně nízké koncentrace uvolňovaného oxytocinu ze srdce svědčí spíše o parakriním či autokriním vlivu, což dokazuje také fakt, že oxytocin uvolňovaný ze srdce nemá vliv na jeho celkovou koncentraci v krvi (Jankowski et al., 1998).



Obrázek 6: Amplifikace mRNA pro oxytocinový receptor pomocí RT-PCR v děloze, komoře a síni myšního srdce.

Gutkowské a spol. se podařilo namnožit gen pro oxytocinový receptor z myšního srdce. Obrázek je fotografie 2% agarosového gelu barveného ethidium bromidem. Do první linie byl dán vzorek z dělohy, který vykazuje nejsilnější band, do třetí linie vzorek z pravé a do čtvrté z levé síně srdce. Do linie 5 a 6 byli aplikovány z komor srdce a to z pravé do páté a z levé do šesté. Sedmá linie představuje vzorek z aorty. Jako kontrola se použil vzorek 123 bp GIBCO/BRL. Na spodní grafu je vidět relativní srovnání množství mRNA pro oxytocinový receptor v obou částech srdce a v děloze.
převzato z: (Gutkowska et al., 1997)

7. Oxytocinový receptor v centrálním nervovém systému

Experimenty s primárními kultivovanými buňkami nervové soustavy ukázaly, že receptor pro oxytocin se vyskytuje jak na hypothalamických neuronech, tak i na astrocytech (Di Scala-Guenot a Strosser, 1995). U potkanů byl oxytocinový receptor detektován v mnoha mozkových partiích jako v kortikální oblasti, olfaktorickém (čichový) systému, basálních gangliích, limbickém systému, thalamu, hypothalamu, mozkovém kmeni a míše. U dospělých potkanů byl nalezen oxytocinový receptor ve vysokých koncentracích v dorsální pedunkulární kůře, předním čichovým jádře, v uskupení buněk spodního palida, limbickém systému a v hypothalamickém ventromediálním jádře (Tribollet et al., 1992; Barberis a Tribollet, 1996). Gen pro oxytocinový receptor je exprimován v oblastech splývajících s výskytem vazebných míst pro oxytocin (Yoshimura et al., 1993). Oxytocinový receptor byl také identifikován v míšních segmentech, ale pouze v malém množství a byl omezený pouze na povrchovou vrstvu horního rohu (Tribollet et al., 1997). Nebyly zaznamenány nějaké výrazné odlišnosti v množství receptoru mezi samčím a samičím mozkiem. Pozoruhodné je, že se výrazně liší místa pro vazbu vasopresinu od míst pro vazbu oxytocinu (Gimpl a Fahrenholz, 2001).

Distribuce a množství vazebných míst pro oxytocin podléhá výrazným změnám během vývoje jedince, pouze malý zlomek oxytocinových receptorů zůstává ve stejném množství na stejném místě (Tribollet et al., 1992). V některých místech je receptor exprimován pouze dočasně v období dětství nebo dospívání. U obou pohlaví potkanů byly rozpoznány dvě kritická období během vývoje a to třetí postnatální týden (týden, který předchází odstavení mládřat) a puberta, což nejspíše souvisí s vlivem oxytocinu na mateřské a sexuální chování. Například u mládřat se oxytocinový receptor hojně vyskytuje v oblastech cinguly a retrosplenialního kortexu stejně jako v různých oblastech míchy, naopak u dospělců se v těchto místech vyskytuje pouze v malé míře nebo je dokonce nedetekovatelný. V některých oblastech mozku se oxytocinový receptor vyskytuje hojně až v dospělosti (např. olfactorycký hrbol a hypothalamické ventromediální jádra) (Tribollet et al., 1992). U starších potkanů se snižuje množství míst pro vazbu oxytocinu, což je pravděpodobně způsobeno výrazně nižší hladinou plasmatického testosteronu. V čichovém hrbolu a ventromediálním jádře hypothalamu exprese oxytocinového receptoru podléhá právě regulaci pohlavními steroidy. Dávka testosteronu starším potkanům může v těchto

oblastech obnovit normální hladinu receptoru pro oxytocin, jaká se vyskytuje u mladších jedinců s dostatečnou produkcí pohlavních hormonů (Arsenijevic et al., 1995).

Velká rozmanitost v distribuci a množství oxytocinového receptoru byla také zjištěna mezi různými druhy savců. Například přední sobiculum v hipokampu u potkanů obsahuje mnoho vazebných míst pro oxytocin, zatímco u morčete, křečka, králíka a kosmana nebyla detekována žádná vazebná místa. U monogamní a polygamních hrabošů bylo zjištěno, že rozdílná distribuce oxytocinového receptoru se odráží v jejich společenské struktuře (sociálním chování) (Insel a Shapiro, 1992). Lidské nigrostriální dopaminové neurony mohou být také cílem pro oxytocin a tak oxytocinový systém může být spojen s motorickou a basální funkcí ganglia. V lidském mozku byla také zjištěna vysoká citlivost na oxytocin v Meynertově basálním jádře, ale vazebná místa chyběla v hipokampu, amygdale, entorhinalím cortexu a v bulbus olfaktorius (Loup et al., 1991).

V mozku má estrogen a další pohlavní hormony vliv nejen na syntézu samotného oxytocinu, ale má také výrazný vliv na regulaci oxytocinového receptoru (Tribollet et al., 1990; McCarthy, 1995). Kastrace a inhibice aromatasové aktivity, tedy snížení produkce pohlavních hormonů, sníží vaznost oxytocinu, zatímco zvýšená koncentrace estradiol a testosteron zvýší vaznost oxytocinu obzvláště v místech mozku, které jsou spojovány s reprodukčními funkcemi, jako třeba ventrolaterální část ventromediálního jádra hypotalamu (Tribollet et al., 1990). Podání estrogenu zvýší afinitu oxytocinového receptoru v preoptické části předního hypotalamu (Caldwell et al., 1994) a zvýší hustotu i místa pro vazbu na oxytocinový receptor v ventrolaterální část ventromediálního jádra hypotalamu (Coirini et al., 1991). Progesteron způsobí další zvýšení vazebných míst pro oxytocin a je nejvíce potřebný k maximálnímu rozšíření pokrytí oxytocinového receptoru (Schumacher et al., 1990; Coirini et al., 1991). Dlouhodobé podávání progesteronu mělo za následek zvýšení základní hladiny oxytocinového receptoru v limbických strukturách, pokles ve ventromediálním jádře hypotalamu a spolu s estrogenem zvýšení vazebných míst ve všech studovaných oblastech mozku s výjimkou medialní preoptické oblasti (Patchev et al., 1993). Také byl zjištěn vliv glukokortikoidů na oxytocinový receptor v mozku (Schumacher et al., 1990; Patchev et al., 1993). Mezidruhové rozdíly se netýkají pouze distribuce oxytocinového receptoru v mozku, ale také regulace pohlavními hormony. Například estrogen vyvolá zvýšení oxytocin vazebných míst u potkana, ale u myši ve stejných oblastech vyvolá snížení vazebných míst (Insel et al., 1993).

8. Struktura genu oxytocinového receptoru

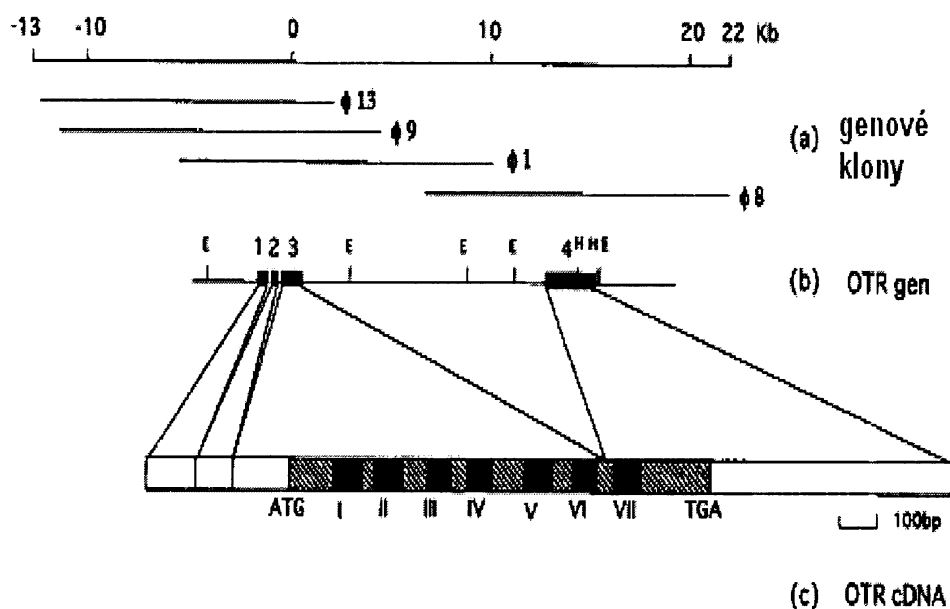
Pro oxytocinový receptor existuje pouze jeden gen o rozpětí 17 000 bází (bp), který leží v prostoru 3p25 - 3p26. Jako první izoloval a identifikoval cDNA pro lidský oxytocinový receptor Kimura v roce 1992 (Kimura et al., 1992) (obr. 7; str. 36) a od té doby se osekvenovalo mnoho jiných, jako např. potkaní (Rozen et al., 1995), myší (Kubota et al., 1996), prasečí (Gorbulev et al., 1993) nebo hovězí (Bathgate et al., 1995). Lidský oxytocinový receptor je exprimován ve dvou velikostech: 3,6 kbp v prsu a 4,4 kbp v děloze. Obsahuje 3 introny a 4 kódující exony, jejichž sekvence je převážně vysoce konzervovaná, protože kóduje sedm transmembránových domén. Exon 1 a 2 obsahuje 5' promotorovou nekódující oblast. Introny 1 a 2 jsou poměrně krátké 629, respektive 166 bp. Exon 3 začíná 142 bp upstream od adenosinu iniciačního ATG kodonu a sahá až po 922 kb downstream, to znamená, že kóduje šest transmembránových domén spolu s extracelulárními a intracelulárními smyčkami receptoru. Intron 3 je nejrozsáhlejší a zabírá něco okolo 12 kbp. Exon 4 obsahuje sekvenci kódující poslední sedmou transmembránovou doménu a celý C konec receptoru včetně polyadenylačního signálu (Inoue et al., 1994).

Některé GPCRs neobsahují žádné introny, zatímco jiné mají intron stejně jako gen pro oxytocinový receptor, tedy mezi sekvencemi kódující šestou a sedmou transmembránovou doménu. Intron obsahuje i gen pro lidský vasopresinový V2 receptor, který s oxytocinovým receptorem sdílí 41% shodu v pořadí bází, což z nich dělá dva nejvíce si podobné receptory mezi GPCRs. Oxytocinový receptor oproti V2 receptoru obsahuje ještě dva další introny před iniciačním kodonem translace, což může naznačovat více komplikovanou regulaci transkripce oxytocinového receptoru (Inoue et al., 1994).

Gen pro oxytocinový receptor je exprimován nejen v děloze, mléčných žlázách, v srdci a kardiovaskulárním systému, ledvinách, v ženských i mužských pohlavních orgánech, ale i centrálně a v mnoha oblastech mozku a míchy.

Ačkoliv doposud byla objevena pouze jedna kopie genu pro oxytocinový receptor, mnoho studií prokazuje přítomnost obličných receptorových typů v různých tkáních. První typ byl pozorován u potkanů v děloze a druhý v ledvinách. Tyto dva typy se liší ve vazbě agonistů a antagonistů. Tento výskyt může vysvětlovat odlišné tkáňové odezvy na přítomnost agonistů a antagonistů, stejně tak i odlišný vliv steroidních hormonů na expresi

oxytocinového receptoru. Pokud se neobjeví další gen, který by kódoval druhý typ oxytocinového receptoru, je pravděpodobné, že odlišné vlastnosti těchto dvou typů jsou dány sestřihem jediné molekuly mRNA pro oxytocinový receptor (Verbalis, 1999).



Obrázek 7: Organizace genu pro lidský oxytocinový receptor

- a) Jsou zde vidět čtyři překrývající se genové klony štěpené různými endonukleasmi. Fragment z EcoRI (7,4 kbp velký) obsahuje exony 1-3, 3,9 kbp dlouhý HindIII fragment a 1,2 kbp Hind III/EcoRI fragment obsahuje exon 4.
- b) Diagram oxytocinového genu: exony jsou zvýrazněny černou linií a očíslovány, jsou také vyznačena restriční místa endonukleas (E=EcoRI; H=HindIII)
- c) Struktura cDNA pro oxytocinový receptor: černě jsou vyznačeny a očíslovány římskými čísly (I-VII) domény procázející skrz membránu; extracelulární a intracelulární domény jsou vyznačeny šrafovaně; ATG značí start translace a TGA konec.

Převzato a upraveno z (Inoue et al., 1994)

9. Genová exprese oxytocinového receptoru

Na rozdíl od ostatních GPCRs podléhá receptor pro oxytocin výrazným regulacím v expresi. Tkáňovou specifitu exprese oxytocinového receptoru lze ukázat například při těhotenství a během kojení. Těhotná žena má zvýšenou expresi receptoru v děloze, což vede ke zvýšené citlivosti této tkáně na oxytocin, ale těsně po porodu dochází k prudkému poklesu citlivosti v důsledku snížení množství receptorů na membránách. Naopak v mléčných žlázách zůstává zvýšená exprese oxytocinového receptoru i po porodu a to během celé fáze laktace (Soloff et al., 1979; Breton et al., 2001). Toto přepínání v expresi umožňuje aktivovat různé tkáně v různých fázích mateřství.

Transkripce začíná 618 bp upstream od iniciačního kodonu. Hlavní vliv na zesílení exprese má promotor, naopak k zeslabení slouží především methylace oblasti 3. intronu. Velký vliv na genomickou i negenomickou regulaci exprese mRNA pro oxytocinový receptor mají i pohlavní hormony (Gimpl a Fahrenholz, 2001).

Při sekvenování oblasti 18 kbp upstream od místa startu translace našli Inoue a spol. mnoho různorodých nukleotidových sekvencí spojených s regulací transkripce (obr. 8; str. 38) (Inoue et al., 1994). Poblíž startu transkripce se nachází motiv TATA boxu (TTTTAAA) a Sp-1 vazebné místo, které je od TATA motivu vzdáleno 35 bp. Takovéto uspořádání sekvencí v promotoru genu splňuje požadavek pro silnou promotorovou aktivitu potřebnou k transkripci genu. 5' oblast genu obsahuje také čtyři GATA-1 motivy, jedno c-Myb vazebné místo, jedno AP-2 místo a dvě AP-1 místa. Dalším regulačním místem v promotoru jsou dvě souhlasné sekvence jaderného faktoru interleuktinu 6 (NF IL6 = nucleofactor interleuctin 6) a poblíž se vyskytující dvě vazebná místa pro reaktanty akutní fáze (APRE = acute phase reactant-responsive element). Tyto promotorové sekvence jsou typické pro geny, jejichž exprese je indukována infekcí nebo zánětem. V této souvislosti se sledoval vliv latentní infekce v děloze na předčasný porod (Inoue et al., 1994).

V promotorové oblasti genu pro oxytocinový receptor se nenalezlo místo pro vazbu estrogenu tzv. „estrogen response element“ (ERE) (Peale et al., 1988). Místo toho byly nalezeny dvě poloviční palindromická místa ERE (5'-GGTCA-3' motivy) v oblasti 5'promotoru a jedno poloviční palindromické místo ERE (5'-TGACC-3') v 3' promotorové oblasti. Toto zjištění je více než překvapivé, protože gen pro oxytocinový

receptor patří mezi nejvíce citlivé geny na stimulaci estrogenem. Estrogen jasně zvyšuje vaznost receptoru i expresi mRNA pro oxytocinový receptor. Dokazují to pokusy *in situ* hybridizace nejen v děložože, ale také v hypotalamu a v ledvinách (Verbalis, 1999). Dodnes ale nebyla plně objasněna role různých regulačních proteinů na promotoru oxytocinového receptoru (Zingg a Laporte, 2003). Vliv estrogenu je nejspíše nepřímý nebo pomocí dalších promotorových elementů (Ivell a Walther, 1999).

```

-1848 CAGCTGTCTT CCAGGAGAAA GAAAGGCAAG CTTGGTTCTA CAGGCCAGTG TTTTCTTCT
-1788 CACATTCACC CTTCAGGGGC TCATAGGGAA AAATCTGCCT TCATCCAGCC GTGGGGTGAG
ERE-5'
-1728 GCAGGGGTGT TTTACCTGCT AGGATTGAAC CCTCAGATTC CACAGATTAT ACAGTTTCAG
-1668 AAAACCAGAG GGACAGGACC TCAGACATTA GGTATCTTGA CCAGTGTCTT CATTTTACAT
GATA-1 ERE-3'
-1608 ATGAGGGAGC TGAGGCCCAA AGAGAAGGGG CTTGCCCAAG GTCTCTTCAT TCTCACCCGA
ERE-5'
-1548 GTCGTCTGTA ACTTTAATCT GTAATTTTCG AGCCCGATAG GTACTATTTA CTAATPATTA
AP-1 AP-1
-1488 TTAATCTGTC CTGCCACCCC TTGGCAATGC TGTCAAGATT CCCAGCCCCC ATCTCTGAAAT
NFIL6
-1428 GATTACTCAG CTAGAACCCT GGGATCCAGG TCTCTTAAGG TTGGCCCTTG GGATATCTCG
APRE AP2 APRE GATA-1
-1368 GCATGGGGCT GTAATTGTGG ATTAAGGAAA CCCAGTCTCT GGCTAACTCA AGTCTCTCCA
-1308 CATAATAAAA AGACGGAGGA GTGAATGTC AGGAGGAAT ACACATTTAA TGCATTTTAA
-1248 AGAGCCCTGT TTATTTTGA ATCCTGGCCT TTTTTCCTGA CTTAATCTT GCCCACTGA
-1188 AATTACTTCA AAAAATGATT TTTAGAATAG AGAAGGGGCA GGGAGGCTCA CAAGCTGTCT
SP-1
-1128 TTAACATTTG ATCTTCTCTT GGCATCATT AGAATTTTAA TTCCGAGCG CGACAAGGAG
GATA-1
-1068 GCAGAACCG CTCTTGGCG CAGACAAGCA GAATCACTTT AATGAAGAC AGTGTGTGTC
-1008 TTCAGAATTT CCTCTAAAC TACCGAAAA ATAACGCCTC TTCCAGCACT GCTTAGAATA
-948 GAGCCATTT CTAATTCCTC ATTAACGCGA ATAGGAACAA AAGTATCCA AAGCAAGAC
MYB
-888 TTATTTGAGT TCACCTCTAA AGCCCTACA TCAAGCTGGA GGATGGGGG GAGAGAAAAG
-828 CCTGAAAATF AACATCATT TTGGGAGATA ATCAATTTAA ATGCTTTTGT AACTCTATTC
NFIL6 GATA-1
-768 GTATCTACCC GGGGAGGAGC ATTATTATTC AAGCCCTCTA TGTGTCTCGG AGTCAAGACC
-708 TTCTAAACCA AGAAGGGAAG AAACGGGGGG GTTATTGAGC AGTTCCCTCC CTCTCCAGG
SP1
-648 TTTAAATCAC TCGAATAATA ACCCATTTGT TAAGGCTCTG GGACCAACGC TGGCCGAAAC
TATA like motif

```

Obrázek 8: Nukleotidová sekvence promotorové oblasti genu pro oxytocinový receptor

Hvězdičkou jsou vyznačena místa startu transkripce. Motiv TATA boxu, SP-1 vazebného místa a další regulační oblasti jsou označeny rámečkem a popiskem. Převzato z (Inoue et al., 1994)

10. Souhrn:

- Oxytocin spolu s vasopresinem patří mezi hormony zadního laloku hypofýzy (neurohypofýzy). Jedná se o nonapeptid, jehož šest aminokyselin tvoří cyklickou část spojenou disulfidickým můstkem mezi cysteiny v poloze 1 a 6 a zbylé tři aminokyseliny vyčnívají v podobě lineárního tripeptidu. Hlavním místem syntézy je hypotalamus, odkud je transportován do neurohypofýzy, kde se uvolňuje do krve a působí na různé tkáně.
- Oxytocinový receptor patří do rodiny receptorů spřažených s G proteiny (GPCRs), podrodiny 1b-rhodopsinového typu. Vykazuje typickou strukturu této skupiny receptorů, tedy sedm transmembránových domén, místo pro vazbu ligandu a místo pro vazbu G proteinu. Aktivací receptoru se spouští signální kaskáda, která má za následek aktivaci fosfolipasy C a tak vznik druhých posílů: diacylglycerolu, inositol-1,4,5-trisfosfátu a následně uvolnění vápníku do cytoplasmy.
- Kromě známých periferních funkcí (stahy dělohy a stimulace laktace) má oxytocin vliv také na srdce. Z neurohypofýzy se uvolňuje při zvýšeném krevním tlaku, putuje do srdce, kde po vazbě na receptor stimuluje uvolňování síňového natriuretického peptidu, který v ledvinách vyvolá natriuresu a tak i pokles krevního tlaku. Oxytocin tak působí opačně než vasopresin – antidiuretický hormon.
- Oxytocin má vliv na centrální nervovou soustavu. V lidském mozku byly receptory nalezeny v kortikálních oblastech - Maynertovo basální jádro, v limbickém systému - laterálním septálním jádře a v různých částech mozkového kmenu. Ovlivňuje různé druhy chování, procesy spojené s poznáváním a mimo jiné se uvolňuje také při stresové odpovědi.
- Doposud byl objeven pouze jeden gen pro oxytocinový receptor, je exprimován ve dvou velikostech: 3,6 kbp a 4,4 kbp. Obsahuje tři introny a čtyři kódující exony. Tyto exony kódují velmi konzervované nukleotidové sekvence transmembránových domén a místa pro vazbu oxytocinu a G proteinu.
- Exprese oxytocinového receptoru podléhá ve všech tkáních přísné regulaci, jak naznačuje velké množství vazebných míst v oblasti promotoru genu. Kromě běžného motivu TATA boxu se zde vyskytuje i SP-1 vazebné místo, dvě vazebná místa pro reaktanty akutní fáze (APRE), poloviční palindromická místa pro vazbu estrogeneru (ERE) a další.

11. Literatura

- [1] **Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al.** Základy buněčné biologie: Espero Publishing, s.r.o. 1998
- [2] **Amico JA, Tenicela R, Johnston J, Robinson AG.** A time-dependent peak of oxytocin exists in cerebrospinal fluid but not in plasma of humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 947-951
- [3] **Arsenijevic Y, Dreifuss JJ, Vallet P, Marguerat A, Tribollet E.** Reduced binding of oxytocin in the rat brain during aging. *Brain Res* 1995; 698: 275-279
- [4] **Baldwin JM.** The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* 1993; 12: 1693-1703
- [5] **Barberis C, Tribollet E.** Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 1996; 10: 119-154
- [6] **Barberis C, Mouillac B, Durroux T.** Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* 1998; 156: 223-229
- [7] **Bathgate R, Rust W, Balvers M, Hartung S, Morley S, Ivell R.** Structure and expression of the bovine oxytocin receptor gene. *DNA Cell Biol* 1995; 14: 1037-1048
- [8] **Berrada K, Plesnicher CL, Luo X, Thibonnier M.** Dynamic interaction of human vasopressin/oxytocin receptor subtypes with G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C after agonist stimulation. *J Biol Chem* 2000; 275: 27229-27237
- [9] **Bockaert J, Pin JP.** Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 1999; 18: 1723-1729
- [10] **Bourne HR.** How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 134-142
- [11] **Bredt DS, Snyder SH.** Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 175-195
- [12] **Breton C, Di Scala-Guenot D, Zingg HH.** Oxytocin receptor gene expression in rat mammary gland: structural characterization and regulation. *J Mol Endocrinol* 2001; 27: 175-189
- [13] **Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H.** Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 1980; 207: 373-378
- [14] **Budesinsky M, Prochazka Z, Slaninova J.** Oxytocin and its analogs, methyl-substituted in ortho-, meta- or para-position of aromatic ring of phenylalanine in

position 2: NMR study and biological activities. *Protein Pept Lett* 2005; 12: 343-347

- [15] **Caldwell JD, Walker CH, Pedersen CA, Barakat AS, Mason GA.** Estrogen increases affinity of oxytocin receptors in the medial preoptic area-anterior hypothalamus. *Peptides* 1994; 15: 1079-1084
- [16] **Clapham DE.** Direct G protein activation of ion channels? *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 441-464
- [17] **Coirini H, Schumacher M, Flanagan LM, McEwen BS.** Transport of estrogen-induced oxytocin receptors in the ventromedial hypothalamus. *J Neurosci* 1991; 11: 3317-3324
- [18] **de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H.** A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981; 28: 89-94
- [19] **Di Scala-Guenot D, Strosser MT.** Downregulation of the oxytocin receptor on cultured astroglial cells. *Am J Physiol* 1995; 268: C413-418
- [20] **Dogterom J, Van Wimersma Greidanus TB, Swabb DF.** Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats. *Neuroendocrinology* 1977; 24: 108-118
- [21] **Du Vigneaud V.** A trail of sulfa research: from insulin to oxytocin. *Nobel Lecture* 1955;
- [22] **Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S.** The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *The Journal of Biological Chemistry* 1953; 205: 949-957
- [23] **Elands J, Barberis C, Jard S, Tribollet E, Dreifuss JJ, Bankowski K, et al.** 125I-labelled d(CH₂)₅[Tyr(Me)₂,Thr⁴,Tyr-NH₂(9)]OVT: a selective oxytocin receptor ligand. *Eur J Pharmacol* 1988; 147: 197-207
- [24] **Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG.** Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 1996; 274: 768-770
- [25] **Flegel M.** Oxytocinové a vasopresinové peptidy. 2008; 2008.
- [26] **Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ.** The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117: 859-865
- [27] **Ganong WF.** Přehled lékařské fyziologie: Nakladatelství H&H, Jinočany 2002

- [28] **Gilman AG.** G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 615-649
- [29] **Gimpl G, Fahrenholz F.** The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 2001; 81: 629-683
- [30] **Gorbulev V, Buchner H, Akhundova A, Fahrenholz F.** Molecular cloning and functional characterization of V2 [8-lysine] vasopressin and oxytocin receptors from a pig kidney cell line. *Eur J Biochem* 1993; 215: 1-7
- [31] **Gutkowska J, Jankowski M, Mukaddam-Daher S, McCann SM.** Oxytocin is a cardiovascular hormone. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 625-633
- [32] **Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM.** Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 11704-11709
- [33] **Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J.** Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7902-7906
- [34] **Hara Y, Battey J, Gainer H.** Structure of mouse vasopressin and oxytocin genes. *Brain Res Mol Brain Res* 1990; 8: 319-324
- [35] **Harmar AJ.** Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol* 2001; 2: 1-10
- [36] **Hynie S, Klenerová V.** Heterogeneity of adrenergic receptors. *Homeostasis* 1998; 38: 145-156
- [37] **Hynie S, Klenerová V.** Nové pohledy na účinky cAMP včetně jeho dlouhodobých účinků a významu při hledání nových psychofarmak. *Psychiatrie* 2002; 6: 15-20
- [38] **Chini B, Mouillac B, Ala Y, Balestre MN, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, et al.** Tyr115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V1a vasopressin receptor. *EMBO J* 1995; 14: 2176-2182
- [39] **Inoue T, Kimura T, Azuma C, Inazawa J, Takemura M, Kikuchi T, et al.** Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 32451-32456
- [40] **Insel TR, Shapiro LE.** Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 5981-5985
- [41] **Insel TR, Young L, Wang Z.** Central oxytocin and reproductive behaviours. *Rev Reprod* 1997; 2: 28-37

- [42] **Insel TR, Young L, Witt DM, Crews D.** Gonadal steroids have paradoxical effects on brain oxytocin receptors. *J Neuroendocrinol* 1993; 5: 619-628
- [43] **Ivell R, Richter D.** Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 2006-2010
- [44] **Ivell R, Walther N.** The role of sex steroids in the oxytocin hormone system. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 151: 95-101
- [45] **Jankowski M, Hajjar F, Kawas SA, Mukaddam-Daher S, Hoffman G, McCann SM, et al.** Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14558-14563
- [46] **Javitch JA, Fu D, Liapakis G, Chen J.** Constitutive activation of the beta2 adrenergic receptor alters the orientation of its sixth membrane-spanning segment. *J Biol Chem* 1997; 272: 18546-18549
- [47] **Jones PM, Robinson IC.** Differential clearance of neurophysin and neurohypophysial peptides from the cerebrospinal fluid in conscious guinea pigs. *Neuroendocrinology* 1982; 34: 297-302
- [48] **Kadekaro M, Liu H, Terrell ML, Gestl S, Bui V, Summy-Long JY.** Role of NO on vasopressin and oxytocin release and blood pressure responses during osmotic stimulation in rats. *Am J Physiol* 1997; 273: R1024-1030
- [49] **Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H.** Structure and expression of a human oxytocin receptor.[erratum appears in Nature 1992 May 14;357(6374):176]. *Nature* 1992; 356: 526-529
- [50] **Kimura T, Makino Y, Bathgate R, Ivell R, Nobunaga T, Kubota Y, et al.** The role of N-terminal glycosylation in the human oxytocin receptor. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 957-963
- [51] **Knight DE, von Grafenstein H, Athayde CM.** Calcium-dependent and calcium-independent exocytosis. *Trends Neurosci* 1989; 12: 451-458
- [52] **Kristiansen K.** Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 2004; 103: 21-80
- [53] **Kubota Y, Kimura T, Hashimoto K, Tokugawa Y, Nobunaga K, Azuma C, et al.** Structure and expression of the mouse oxytocin receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 124: 25-32
- [54] **Landgraf R, Neumann I, Russell JA, Pittman QJ.** Push-pull perfusion and microdialysis studies of central oxytocin and vasopressin release in freely moving rats during pregnancy, parturition, and lactation. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 652: 326-339

- [55] **Liu J, Wess J.** Different single receptor domains determine the distinct G protein coupling profiles of members of the vasopressin receptor family. *J Biol Chem* 1996; 271: 8772-8778
- [56] **Loup F, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ.** Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study. *Brain Res* 1991; 555: 220-232
- [57] **McCarthy MM.** Estrogen modulation of oxytocin and its relation to behavior. *Adv Exp Med Biol* 1995; 395: 235-245
- [58] **Meyer C, Freund-Mercier MJ, Guerne Y, Richard P.** Relationship between oxytocin release and amplitude of oxytocin cell neurosecretory bursts during suckling in the rat. *J Endocrinol* 1987; 114: 263-270
- [59] **Misono KS, Fukumi H, Grammer RT, Inagami T.** Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 119: 524-529
- [60] **Mohr E, Bahnsen U, Kiessling C, Richter D.** Expression of the vasopressin and oxytocin genes in rats occurs in mutually exclusive sets of hypothalamic neurons. *FEBS Lett* 1988; 242: 144-148
- [61] **Morris AJ, Malbon CC.** Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 1999; 79: 1373-1430
- [62] **Mouillac B, Chini B, Balestre MN, Elands J, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, et al.** The binding site of neuropeptide vasopressin V1a receptor. Evidence for a major localization within transmembrane regions. *J Biol Chem* 1995; 270: 25771-25777
- [63] **O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, et al.** The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 1993; 11: 41-52
- [64] **Pantaloni C, Brabet P, Bilanges B, Dumuis A, Houssami S, Spengler D, et al.** Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J Biol Chem* 1996; 271: 22146-22151
- [65] **Patchev VK, Schlosser SF, Hassan AH, Almeida OF.** Oxytocin binding sites in rat limbic and hypothalamic structures: site-specific modulation by adrenal and gonadal steroids. *Neuroscience* 1993; 57: 537-543

- [66] **Peale FV, Jr., Ludwig LB, Zain S, Hilf R, Bambara RA.** Properties of a high-affinity DNA binding site for estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 1038-1042
- [67] **Phelan JP, Guay AT, Newman C.** Diabetes insipidus in pregnancy: a case review. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 130: 365-366
- [68] **Postina R, Kojro E, Fahrenholz F.** Separate agonist and peptide antagonist binding sites of the oxytocin receptor defined by their transfer into the V2 vasopressin receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 31593-31601
- [69] **Poulain DA, Wakerley JB.** Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 1982; 7: 773-808
- [70] **Rao VV, Loffler C, Battey J, Hansmann I.** The human gene for oxytocin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1992; 61: 271-273
- [71] **Renaud LP, Bourque CW.** Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol* 1991; 36: 131-169
- [72] **Richard P, Moos F, Freund-Mercier MJ.** Central effects of oxytocin. *Physiol Rev* 1991; 71: 331-370
- [73] **Rose JP, Wu CK, Hsiao CD, Breslow E, Wang BC.** Crystal structure of the neurophysin-oxytocin complex. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 163-169
- [74] **Rosenzweig A, Seidman CE.** Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 229-255
- [75] **Rozen F, Russo C, Banville D, Zingg HH.** Structure, characterization, and expression of the rat oxytocin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 200-204
- [76] **Ruskoaho H.** Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 479-602
- [77] **Ruskoaho H, Toth M, Lang RE.** Atrial natriuretic peptide secretion: synergistic effect of phorbol ester and A23187. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133: 581-588
- [78] **Sausville E, Carney D, Battey J.** The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *J Biol Chem* 1985; 260: 10236-10241
- [79] **Sharp GW, Hynie S.** Stimulation of intestinal adenyl cyclase by cholera toxin. *Nature* 1971; 229: 266-269

- [80] **Shojo H, Kaneko Y.** Characterization and expression of oxytocin and the oxytocin receptor. *Mol Genet Metab* 2000; 71: 552-558
- [81] **Schulein R, Liebenhoff U, Muller H, Birnbaumer M, Rosenthal W.** Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site. *Biochem J* 1996; 313 (Pt 2): 611-616
- [82] **Schumacher M, Coirini H, Pfaff DW, McEwen BS.** Behavioral effects of progesterone associated with rapid modulation of oxytocin receptors. *Science* 1990; 250: 691-694
- [83] **Soloff MS, Alexandrova M, Fernstrom MJ.** Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation? *Science* 1979; 204: 1313-1315
- [84] **Strunecká A, Patočka J.** Průvodce na cestu po fosfoinozitivové dráze. *Psychiatrie* 2006; 10:
- [85] **Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H.** A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332: 78-81
- [86] **Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H.** C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 863-870
- [87] **Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, et al.** Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *J Clin Invest* 1992; 90: 1145-1149
- [88] **Tribollet E, Barberis C, Arsenijevic Y.** Distribution of vasopressin and oxytocin receptors in the rat spinal cord: sex-related differences and effect of castration in pudendal motor nuclei. *Neuroscience* 1997; 78: 499-509
- [89] **Tribollet E, Audigier S, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ.** Gonadal steroids regulate oxytocin receptors but not vasopressin receptors in the brain of male and female rats. An autoradiographical study. *Brain Res* 1990; 511: 129-140
- [90] **Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ, Barberis C, Jard S.** Oxytocin receptors in the central nervous system. Distribution, development, and species differences. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 652: 29-38
- [91] **Trumpp-Kallmeyer S, Chini B, Mouillac B, Barberis C, Hoflack J, Hibert M.** Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors. *Pharm Acta Helv* 1995; 70: 255-262
- [92] **Ufer E, Postina R, Gorbulev V, Fahrenholz F.** An extracellular residue determines the agonist specificity of V2 vasopressin receptors. *FEBS Lett* 1995; 362: 19-23

- [93] **Unger VM, Hargrave PA, Baldwin JM, Schertler GF.** Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* 1997; 389: 203-206
- [94] **Verbalis JG.** The brain oxytocin receptor(s)? *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 146-156
- [95] **Voet D., Voet J.** Biochemistry. New Jersey: Wiley 2004
- [96] **Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q.** Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8525-8529
- [97] **Yandle TG.** Biochemistry of natriuretic peptides. *J Intern Med* 1994; 235: 561-576
- [98] **Yoshimura R, Kiyama H, Kimura T, Araki T, Maeno H, Tanizawa O, et al.** Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology* 1993; 133: 1239-1246
- [99] **Zingg HH, Laporte SA.** The oxytocin receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14: 222-227

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka

Supplementum

1. Regulace genové exprese

Porovnáním promotorových oblastí homologních genů z různých druhů savců, poskytlo informaci o klíčových regulačních oblastí v genu pro oxytocinový receptor. Na základě těchto srovnávacích analýz ve spojení s klinickými studiemi vztahu děložní infekce a předčasného porodu, byl navržen vliv prozánětlivého cytokininu (IL-1; IL-6) na zvýšení transkripce oxytocinového receptoru. Tyto cytokiny se váží na vazebné jaderné faktory (NFIL-6 nebo Stat3) (Inoue et al., 1994). IL-6 zvýší expresi oxytocinového receptoru pomocí aktivace tyrosin kinasové dráhy (viz Kimura et al., 2003).

Ostrogen byl považován za klíčovou molekulu v regulaci exprese oxytocinového receptoru. Vskutku podání oestrogenů kastrovaným potkanům zvýšilo množství vazebných míst pro oxytocin a množství mRNA kódující tento receptor. Tyto vlivy byly pozorovány periferně v hladké svalovině dělohy, ale i centrálně ve ventromediálním jádře mozku. V promotorové oblasti genu byla také nalezena poloviční místa zodpovědná za vazbu oestrogenů, tzv. „estrogen responsive element“ (ERE) (viz Kimura et al., 2003).

Další vliv je zprostředkovan aktivací dráhy spojené s protein kinasou C, která je aktivována vazbou sera na *ets* vazebnou sekvenci v promotoru (Copland et al., 1999). Sekvence *ets* kooperuje s *c-fos* / *c-jun* a výsledkem je zvýšení exprese oxytocinového receptoru (Hoare et al., 1999).

Jako příklad inhibice exprese oxytocinového receptoru bych uvedl epigenetickou regulaci methylací intronů DNA methyltransferasou. Methylace oblastí okolo intronu jedna a tři má za následek potlačení genové exprese (viz Kimura et al., 2003). Methylace může být důležitá pro tkáňovou specifitu expres tohoto genu (Kusui et al., 2001).

2. Genová exprese oxytocinového receptoru v CNS

Jak jsem již popsal, tak vliv na expresi oxytocinového receptoru mají v periférii pohlavní hormony. Z toho důvodu byl studován jejich vliv i v centrální nervové soustavě. Byl prokázán vliv estrogenu na množství mRNA oxytocinového receptoru v mozkových částech limbicko-hypotalamového systému, přesněji v ventromediálním jádře hypotalamu, v amygdale a v CA1 oblasti hipokampu. Největší zvýšení vykazovalo ventromediální jádro hipokampu. Jednalo se přibližně o čtyřnásobné zvýšení po 48 hodinovém podávání estrogenu oproti basální hladině. Nižší hladiny byly detekovány v amygdale a hipokampu. Vliv pohlavní hormonů může být na syntézu de novo mRNA oxytocinového receptoru nebo může mít vliv na stabilitu genového transkriptu v cytoplasmě (Quinones-Jenab et al., 1997).

3. Genové exprese oxytocinového receptoru v srdci

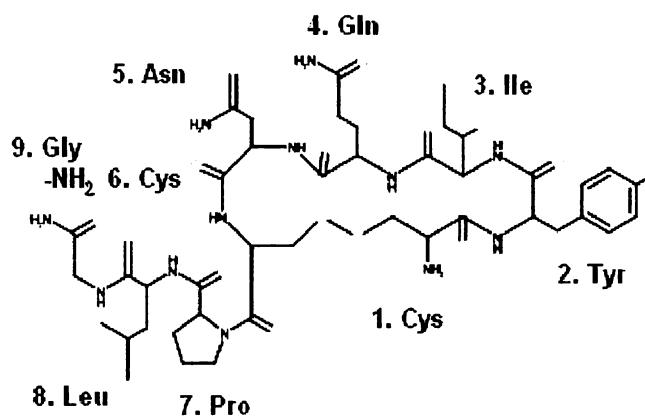
Oxytocin hraje klíčovou roli při diferenciaci srdečních buněk prostřednictvím vazby na svůj receptor (Paquin et al., 2002). Neonatální podání oxytocinu má za následek krátkodobou i dlouhotrvající genovou expresi v srdeční tkáni. Takto podaný oxytocin vede v rané postnatální fázi k expresi mRNA oxytocinových receptorů a receptorů pro estrogen (alfa i beta). S výjimkou receptoru pro estrogen alfa nebyly pozorovány rozdíly v expresi mezi pohlavím (Pournajafi-Nazarloo et al., 2007).

4. Literatura

- [1] **Copland JA, Jeng YJ, Strakova Z, Ives KL, Hellmich MR, Soloff MS.** Demonstration of functional oxytocin receptors in human breast Hs578T cells and their up-regulation through a protein kinase C-dependent pathway. *Endocrinology* 1999; 140: 2258-2267
- [2] **Hoare S, Copland JA, Wood TG, Jeng YJ, Izban MG, Soloff MS.** Identification of a GABP alpha/beta binding site involved in the induction of oxytocin receptor gene expression in human breast cells, potentiation by c-Fos/c-Jun. *Endocrinology* 1999; 140: 2268-2279
- [3] **Inoue T, Kimura T, Azuma C, Inazawa J, Takemura M, Kikuchi T, et al.** Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 32451-32456
- [4] **Kimura T, Saji F, Nishimori K, Ogita K, Nakamura H, Koyama M, et al.** Molecular regulation of the oxytocin receptor in peripheral organs. *J Mol Endocrinol* 2003; 30: 109-115
- [5] **Kusui C, Kimura T, Ogita K, Nakamura H, Matsumura Y, Koyama M, et al.** DNA methylation of the human oxytocin receptor gene promoter regulates tissue-specific gene suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 681-686
- [6] **Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J.** Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9550-9555
- [7] **Pournajafi-Nazarloo H, Papademetriou E, Partoo L, Saadat H, Cushing BS.** Modulation of cardiac oxytocin receptor and estrogen receptor alpha mRNAs expression following neonatal oxytocin treatment. *Endocrine* 2007; 31: 154-160
- [8] **Quinones-Jenab V, Jenab S, Ogawa S, Adan RA, Burbach JP, Pfaff DW.** Effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the uterus, pituitary, and forebrain of the female rat. *Neuroendocrinology* 1997; 65: 9-17

Opravný list

- Str. 4; řádek 24 – receptory spřažené s G proteiny
 Str. 4; řádek 30 – adenylylcykalsu
 Str. 5; řádek 3 – mitogen-aktivovanýprotein kinasa
 Str. 5; řádek 6 – mesengerová RNA
 Str. 5; řádek 8 – oxid dusnatý
 Str. 6; řádek 16 – schopen
 Str. 6; řádek 22 – hematoencelalickou bariéru
 Str. 6; řádek 29 – byla odhalena
 Str. 8; řádek 18 – (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂)
 Str. 8; řádek 20 - (Pro-Leu-Gly-NH₂)
 Str. 9; řádek 1 – Budešinského
 Str. 9; obr. 1



- Str. 9; řádek 20, 21 - (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys)
 Str. 9; řádek 21 - (Pro-Leu-Gly-NH₂)
 Str. 10; řádek 7 - (Ile; Val)
 Str. 11; řádek 18 – prepropeptid
 Str. 11; řádek 29 - Cys-1 a Tyr-2
 Str. 13; řádek 1 – dráždění
 Str. 13; řádek 5 – do pochvy místo do utery
 Str. 13; řádek 24 – zvýšením osmolality moči
 Str. 15; řádek 7 – veratridinem
 Str. 15; řádek 25 – hematoencefalická bariéra

Str. 16; řádek 14 - (Tyr, Gln, Asn)

Str. 16; odstavec 3 – disulfidický můstek není nezbytný pro nasednutí oxytocinu na receptor,
ale je nutný cyklus šesti aminokyselin

Str. 17; řádek 22, 23 – Ca^{2+} působí na cytosolické kinyasy (proteinkinasa A; proteinkinasa C) a
kalmodulin

Str. 18; řádek 1 – mutagenese

Str. 18; řádek 17 – Berrada

Str. 18; řádek 19 – protein kinasou C_{α}

Str. 23; řádek 21 – hladké svaloviny

Str. 25; řádek 10 – diacylglycerolem

Str. 26; řádek 13 – obratně

Str. 28 řádek 8 – (Asp-85)

Str. 28 řádek 8, 9 - Asp-Arg-Tyr (Asp-Arg-Cys v případě oxytocinového receptoru)

Str. 28; řádek 27 – Oxytocin interaguje s extracelulárními smyčkami ...

Str. 28; řádek 28 – selektivních kontaktních míst

Str. 28; řádek 29 – pomocí molekulárních technik

Str. 29; řádek 3 - aminokyseliny Phe-103, Tyr-115 a Asp-115

Str. 29; řádek 5 - záměna Tyr-115 za Phe

Str. 29; řádek 18 – studie chimerických receptorů

Str. 31; řádek 22 – podle polohy proužků

Str. 32; řádek 15 – nejsilnější proužek

Str. 32; řádek 16 – byly aplikovány

Str. 32; řádek 18 – na spodním grafu

Str. 33; řádek 19 – podléhá výrazným změnám během vývoje

Str. 34; řádek 6 – u monogamních a polygamních hrabošů

Str. 34; řádek 8 – nigrostriální dopaminové neurony

Str. 34; řádek 12 – entorhinálním kortexu

Str. 38; řádek 3 – nejen v děloze

Literatura:

- [25] **Flegel M.** Přednáška: Oxytocinové a vasopresinové peptidy. 2.4.2008.
[84] **Strunecká A, Patočka J.** Průvodce na cestu po fosfoinozitudové dráze. *Psychiatrie* 2006; 10: 8-12
[95] **Voet D., Voet J.** Biochemistry. New Jersey: Wiley 2004 – jedná se o kapitulu 19 – Přenos signálu