3259

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Vliv alkuronia na spřahování muskarinových receptorů s G-proteiny

Influence of alcuronium on muscarinic receptor coupling to G-proteins

Diplomová práce

Školitel: MUDr. Vladimír Doležal, DrSc.

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Alena Randáková

Praha, 2008

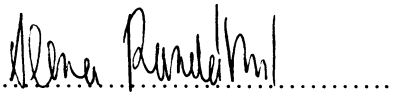
Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli MUDr. Vladimíru Doležalovi, DrSc. za odborné vedení, ochotu a trpělivý přístup při vypracovávání mé diplomové práce. Za pomoc a cenné rady při experimentální práci a všeobecnou podporu děkuji také Mgr. Janu Jakubíkovi, PhD. a Ing. Pavlu Michalovi, PhD. a dále pak celému kolektivu oddělení neurochemie za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za zájem a věcné připomínky.

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele MUDr. Vladimíra Doležala, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala."

V Praze dne: 3.9. 2008



Obsah

A. **Úvod** 5

B. **Cíl práce** 6

C. **Seznam použitých zkratek** 7

D. **Teoretická část** 8

1. Mezibuněčná komunikace 8

2. Receptory 8

3. Receptory spřažené s G-proteiny 9

4. G-proteiny 11

5. Efektory řízené G-proteiny 14

6. Muskarinové acetylcholinové receptory 16

6.1. *Struktura vazebných míst muskarinových receptorů* 18

7. Spřahování muskarinových receptorů s G-proteiny 20

8. Alosterické regulace muskarinových receptorů 21

E. **Praktická část** 25

9. Materiály a přístroje 25

9.1. *Chemikálie a materiály* 25

9.2. *Přístroje* 26

9.3. *Biologický materiál* 26

10. Metody 27

10.1. *Pěstování a sklízení buněk* 27

10.2. *Příprava membrán* 27

10.3. *Biochemická měření* 28

10.3.1. Stanovení proteinů 28

10.3.2. Stanovení exprese a afinity mAChR 28

10.3.3. Vazba GTPγ$^{[35]}$S na membrány CHO buněk 28

10.3.4. Imunoprecipitace α podjednotek značených GTPγ$^{[35]}$S pomocí specifických protilátek a Protein-A agarosy 29

10.4. *Analýza dat*.....30

11. Výsledky.....32

11.1. *Exprese a afinita mAChR v membránách CHO buněk*.....32

11.2. *Optimalizace podmínek pro stanovování stimulace vazby GTP $\gamma^{[35]}S$ na membrány CHO buněk*.....34

11.3. *Vliv alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ $^{[35]}S$ na membrány CHO buněk*.....38

11.4. *Optimalizace podmínek pro imunoprecipitaci α podjednotek značených GTP$\gamma^{[35]}S$ pomocí specifických protilátek a Protein-A agarosy*.....41

11.5. *Imunoprecipitace Gi, Gq/11 a Gs α podjednotek značených GTP$\gamma^{[35]}S$ pomocí specifických protilátek a Protein-A agarosy*.....42

11.6. *Vliv alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTP$\gamma^{[35]}S$ na α podjednotky G-proteinů v membránách připravených z CHO buněk*.....43

12. Diskuze.....51

13. Shrnutí.....56

F. **Seznam citované literatury**.....57

A: Úvod

Muskarinové acetylcholinové receptory (mAChR) sestávají z pěti podtypů (M_1-M_5) s odlišnou lokalizací a farmakologickými a funkčními vlastnostmi */Bonner a spol., 1987, Peralta a spol., 1987/*. Patří do široké rodiny membránových receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR; G-protein coupled receptors), které pro přenos signálu do buňky využívají GTP vázajících proteinů (G-proteinů). Funkční odpovědi zprostředkované jednotlivými podtypy muskarinových receptorů určuje v první řadě typ G-proteinu, se kterým jsou schopny reagovat */Caufield, 1993, Wess, 1996/*. Liché podtypy mAChR $M_{1,3,5}$ se preferenčně spřahují s G-proteiny Gq/11 a přímo tak stimulují fosfolipasu Cβ. Preferenční skupinou G-proteinů pro muskarinové receptory $M_{2,4}$ jsou Gi-proteiny, jejichž aktivace má za následek inhibici adenylátcyklasy.

Specifita spřahování muskarinových receptorů s jednotlivými G-proteiny, stejně jako u dalších GPCR, není absolutní a za určitých podmínek je možná jejich interakce s více než jedním typem G-proteinu, což poskytuje ohromnou variabilitu funkčních výsledků receptorové aktivace. Ačkoli je výsledné působení těchto netypických funkčních projevů v přenosu signálu in vivo zatím neznámé, může mít úlohu při různých patologických stavech a jejich léčbě, stejně tak při otravách či předávkování léky */Tuček a spol., 2002/*.

Klasické (orthosterické) vazebné místo pro (přirozeného muskarinového agonistu) acetylcholin je u jednotlivých podtypů mAChR vysoce homologní */Hulme a spol., 2003/*, což má za následek, že orthosteričtí agonisté v podstatě nejsou podtypově selektivní. Pro selektivní regulaci funkce jednotlivých podtypů se naskýtá možnost využití alosterických modulátorů, které se vážou na méně konzervované extracelulární domény muskarinových receptorů */Krejčí a Tuček, 2001, Jakubík a spol., 2005/*. Na rozdíl od orthosterických ligandů jsou podtypově selektivní a navíc alosterické interakce různých dvojic orthosterický ligand - alosterický ligand vykazují vzhledem ke vzájemné kooperativitě výraznou podtypovou specificitu */Jakubík a spol., 1995, 1997/*. Využití alosterických modulátorů by tak mohlo otevřít nové možnosti na poli farmakologie mAChR. Podtypově selektivní ovlivňování vazby orthosterických agonistů na receptor pomocí alosterických modulátorů je známo z citovaných studií. Otázkou však zůstává, jak vazba alosterických modulátorů ovlivňuje spřahování muskarinových receptorů vyvolané orthosterickým agonistou s jednotlivými třídami G-proteinů a zda se toto působení liší ve vztahu k preferenčním a nepreferenčním G-proteinům.

B: Cíl práce

Cílem této práce je přispět k objasnění vlivu alosterické modulace vazby orthosterického agonisty karbacholu (nehydrolyzovatelný analog přirozeného mediátoru acetylcholinu) na spřahování jednotlivých podtypů muskarivových receptorů s různými G-proteiny. Za tímto účelem byly sledovány účinky alosterického modulátoru alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ$^{[35]}$S na α podjednotky všech membránových G-proteinů a na α podjednotky podtříd Gi a Gq/11 G-proteinů skrze muskarinové receptory podtypu M_{1-4}. Výsledky byly srovnávány se známým snížením afinity jednotlivých podtypů muskarinových receptorů ke karbacholu vyvolaným alosterickým působením alkuronia */Jakubík a spol., 1997/* s cílem zjistit, zda zvýšení rovnovážné disociační konstanty (snížení afinity) karbacholu odpovídá u jednotlivých podtypů receptoru posunu hodnoty EC_{50} (koncentrace karbacholu, která vyvolává polovinu maximální aktivace G-proteinů) pro karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ$^{[35]}$S na α podjednotky jednotlivých typů G-proteinů.

C: Seznam použitých zkratek

^{3}H-NMS	tritiová forma N-methylskopolaminu
AC	adenylátcyklasa
ACh	acetylcholin
CNS	centrální nervový systém
DAG	diacylglycerol
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DTT	dithiothreitol
EC_{50}	effective concentration $_{50}$ (koncentrace, vyvovávající polovinu max. odpovědi)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
Emax	maximální stimulace
GABA	Gamma-aminobutyric acid (kyselina γ-aminomáselná)
GDP	guanosindifosfát
GTPγ$^{[35]}$S	guanosin 5´-O-(3-[^{35}S] thio)trifosfát
HEK-293	(Human Embryonic Kidney cells) fibroblasty z lidských ledvin
CHO	Chinese hamster ovary (fibroblasty z ovárií zlatého křečka)
IP_3	inozitoltrisfosfát
JEG	buňky z lidského choriokarcinomu
mAChR	muskarinové acetylcholinové receptory
Na-Hepes	sodná sůl kyseliny 1-[2-hydroxyethyl]piperazin- 1-ethansulfonové
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDE	fosfodiesterasa
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PLA2	fosfolipasa A2
PLC	fosfolipasa C
PNS	periferní nervový systém
TM helix	transmembránový helix

D: Teoretická část

1. *Mezibuněčná komunikace*

Chemická komunikace mezi buňkami využívá signálních molekul (neurotransmitery, hormony atd.) uvolněných do extracelulární tekutiny, které se váží na specifické receptory umístěné na plazmatické membráně cílové buňky a jejich prostřednictvím ovlivňují její činnost. Receptor zde chápeme jako protein, který po navázání ligandu mění svou konformaci, což vede ke změně funkce (receptory s vlastní enzymatickou aktivitou nebo chemicky řízené iontové kanály) nebo prostřednictvím protein - proteinových interakcí ke konformační změně dalších proteinů (receptory spřažené s G-proteiny) a ovlivnění jejich funkce. Jedna signální molekula často působí prostřednictvím více podtypů příslušného receptoru a může tak vyvolávat různé odpovědi. Například acetylcholin aktivuje všechny acetylcholinové receptory, které zahrnují různé podtypy ionotropních nikotinových i metabotropních muskarinových receptorů. Buňka může reagovat pouze na ty molekuly (signály), pro které má receptory. Na základě toho, jakým podtypem příslušného receptoru buňka disponuje, může na jednu a tutéž signální molekulu reagovat různým způsobem */Tuček, 1995/*. Výsledná reakce buňky pak závisí na tom, jakými efektory je buňka vybavena.

2. *Receptory*

Z hlediska lokalizace lze receptory rozdělit na cytoplazmatické a membránové. Membránové receptory hrají při mezibuněčné komunikaci hlavní roli. Podle způsobu přenosu informace je lze rozdělit do tří skupin:

a) ***Chemicky řízené iontové kanály*** (ionotropní receptory), kde vazba ligandu na receptor vyvolá změnu v propustnosti iontového kanálu.

b) ***Receptory s vlastní enzymatickou aktivitou***, kde vazbou agonisty dochází k aktivaci podjednotky receptoru, která má katalytickou schopnost.

c) ***Receptory spřažené s G-proteiny*** (metabotropní receptory), kde navázáním agonisty do vazebného místa dochází k aktivaci heterotrimerního G-proteinu, který je prostředníkem mezi receptorem a efektorem */Gilman, 1987/*.

Tyto skupiny receptorů se neliší jen způsobem přenosu informace, ale také svojí stavbou a rychlostí přenosu signálu. S tím souvisí i funkce, při jejichž řízení se jednotlivé skupiny receptorů uplatňují. Nejrychleji probíhá přenos signálu prostřednictvím receptorů spojených s iontovými kanály, které využívá organismus téměř výlučně na synapsích. Přenos signálu tímto způsobem se odehrává v řádu milisekund. Na druhou stranu nejpomaleji je signál přenášen receptory s vlastní enzymatickou aktivitou. Tyto receptory jsou aktivovány hormony, růstovými faktory, cytokiny a antigeny. Receptory spřažené s G-proteiny váží jak neuropřenašeče tak hormony */Tuček, 1995/*.

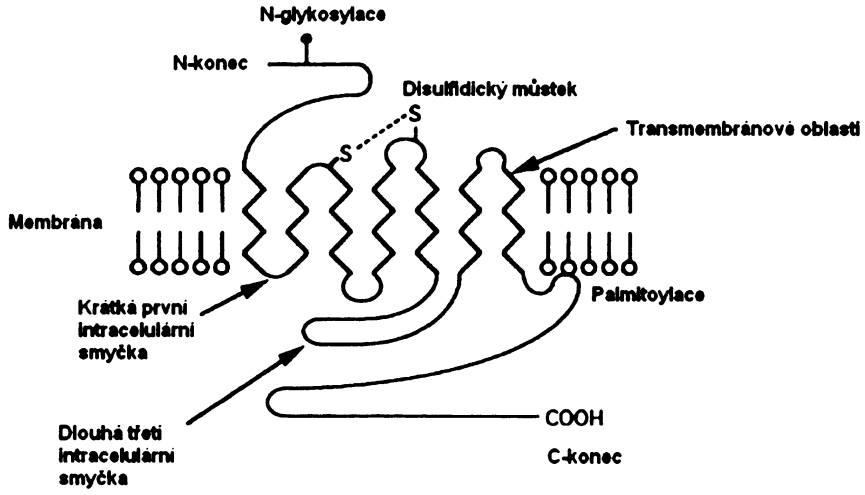
3. *Receptory spřažené s G-proteiny*

Receptory spřažené s G-proteiny (GPCR; G-protein coupled receptor) reprezentují největší skupinu membránových receptorů. Jsou využívány celou řadou různorodých signálních molekul a hrají důležitou roli v mnoha fyziologických systémech */Tuček, 1995/*.

Nejznámějšími představiteli této skupiny jsou receptory pro malé molekuly, jako jsou biogenní aminy (adrenalin, noradrenalin, acetylcholin, dopamin, serotonin, histamin), melatonin, adenosin, ATP, aminokyseliny (glutamát, aspartát, GABA), receptory pro peptidické hormony a mediátory a pravděpodobně nejlépe prozkoumané receptory pro fotony v tyčinkách a čípcích oční sítnice */Tuček, 1995/*. Společným rysem GPCR je využití heterotrimerních G-proteinů pro přenos signálu do buňky a sedm transmembránových úseků receptoru. Model pravděpodobné struktury GPCR byl predikován na základě známé struktury jim blízké molekuly rhodopsinu /Schertler a spol., 1993/ a srovnávání sekvencí mnoha GPCR */Baldwin, 1993, 1994/*.

Polypeptidový řetězec všech GPCR je tvořen sedmi transmembránovými α helixy (TM I-TM VII), spojenými střídavě třemi intracelulárními (i1-i3) a třemi extracelulárními (o1-o3) smyčkami o přibližně stejné délce. Výjimkou je pouze výrazně delší třetí intracelulární smyčka i3, která propojuje 5. a 6. transmembránový segment. Tato smyčka, která má výrazně variabilní primární strukturu, obsahuje aminokyseliny účastnící se vazby s G-proteiny */Wess, 1996/*. N-konec peptidového řetězce je uložen extracelulárně a C-koncová doména intracelulárně. Společným prvkem GPCR je dále glykosylace asparaginových zbytků v N-koncové extracelulární doméně. Tato posttranslační modifikace se zřejmě podílí na skládání a expresi receptoru na povrchu buňky */Watson a Arkinstall, 1994/*. Mezi cysteinovým zbytkem při C-konci první extracelulární smyčky a cysteinovým zbytkem uprostřed druhé extracelulární smyčky bývá u většiny GPCR vysoce

konzervovaný disulfidický můstek. Tento můstek hraje důležitou úlohu při tvorbě správné terciární struktury receptoru */Watson a Arkinstall, 1994/*. Pomocí palmitoylace cysteinového zbytku na intracelulárním C-konci receptorového proteinu, která patří k dalším společným prvkům většiny GPCR, může být C-konec zanořen do membrány a vytvářet tak čtvrtou intracelulární smyčku (obrázek č. 1) */Watson a Arkinstall, 1994/*.



Obrázek č. 1: Struktura GPCR (převzato a upraveno z *Watson a Arkinstall, 1994*)

U všech GPCR je sedm transmembránových segmentů situováno přibližně do kruhu, čímž vytváří pevný svazek. Aminokyseliny přítomné na vnitřní straně transmembránových helixů se uplatňují při vazbě agonistů. Poskládání GPCR se děje ve dvou následných krocích. Nejprve jsou samostatné transmembránové helixy začleněny do lipidové dvojvrstvy a následně sestaveny pomocí specifických interakcí helix - helix do podoby funkčního receptorového proteinu */Wess, 1996/*.

Navázáním agonisty do jeho vazebného místa dochází k aktivaci receptoru. Aktivací rozumíme změnu jeho konformace, která následně vyvolá aktivaci heterotimerního G-proteinu, který zde slouží jako prostředník při aktivaci různých signálních drah. G-protein se váže k třetí intracelulární smyčce */Caulfield, 1993/* (obrázek č. 1). Při stimulaci GPCR agonistou může docházet k desensitizaci receptoru (snížení odpovědi vyvolané receptorem) a jeho následné internalizaci (přesun receptoru endocytózou z povrchu dovnitř buňky). V těchto procesech hraje důležitou roli fosforylace serinů a threoninů třetí intracelulární smyčky. Při desensitizaci nejprve dochází k funkčnímu odpřažení receptoru a

G-proteinu (uncoupling). K tomuto ději dochází velmi rychle (vteřiny, minuty). Odpřažení vede k rychlému snížení odpovědi vyvolané agonistou a může tak sloužit jako ochranný mechanismus proti nadměrné stimulaci. Následujícím krokem je internalizace receptoru, která nastává po několikaminutovém působení agonisty. Internalizované receptory se mohou po odstranění agonisty vrátit zpět do membrány nebo být odbourány (po několikahodinovém působení agonisty) */Wess, 1996/*.

4. *G-proteiny*

GTP vázající proteiny, neboli G-proteiny, jsou bílkoviny, které ke své funkci potřebují GTP. Heterotrimerní G-proteiny slouží jako prostředníci při přenosu signálu z receptorů do buňky. Jedná se o proteiny tvořené třemi odlišnými podjednotkami α, β a γ, přičemž podjednotky β a γ tvoří stabilní dimer a nelze je od sebe oddělit bez denaturace */Tuček, 1995/*. Podjednotka α má vazebné místo pro GTP/GDP a vlastní GTP-asovou aktivitu. V klidovém stavu existuje G-protein jako trimer s navázaným GDP. Při jeho aktivaci dojde ke snížení afinity pro GDP, jeho nahrazení GTP a rozpadu komplexu na podjednotku α a dimer βγ. Aktivace G-proteinu je ukončena GTP-asovou aktivitou podjednotky α, která rozštěpí navázané GTP a umožní tak obnovení trimerního komplexu (podrobněji str. 13).

Uvolněné α podjednotky G-proteinů přímo ovlivňují celou řadu efektorů jako adenylátcyklasa (AC), fosfolipasa C (PLC), fosfodiesterasa (PDE) a fosfolipasa A2 (PLA2) a nepřímo i další proteiny, například iontové kanály. Dimer podjednotek βγ přímo ovlivňuje některé iontové kanály, například napěťově řízené vápníkové kanály v presynaptických zakončeních nebo draslíkové kanály v srdeční tkáni. G-proteiny se také podílejí na dalších intracelulárních procesech jako je například vesikulární transport nebo uspořádání cytoskeletu */Nestler a Duman, 1999/*.

V nervové soustavě existuje mnoho typů heterotrimerních G-proteinů, které lze na základě funkční a strukturní podobnosti α podjednotek rozdělit do čtyř základních skupin, přičemž každá skupina může být dále dělena na jednotlivé typy, případně podtypy */Nestler a Duman, 1999/*.

Klasifikace G-proteinů

a) $\mathbf{G_s}$ (Gs, Golf)
b) $\mathbf{G_i}$ (Gi, Go, Gt, Ggust, Gz)
c) $\mathbf{G_q}$ (Gq, G_{11},G_{14}, G_{15}, G_{16})
d) $\mathbf{G_{12}}$ (G_{12}, G_{13})

Nejdůležitější funkce hlavních skupin G-proteinů

Gs: α podjednotka Gs proteinů aktivuje adenylátcyklasu (AC) a váže se na některé Ca^{2+} kanály a aktivuje je

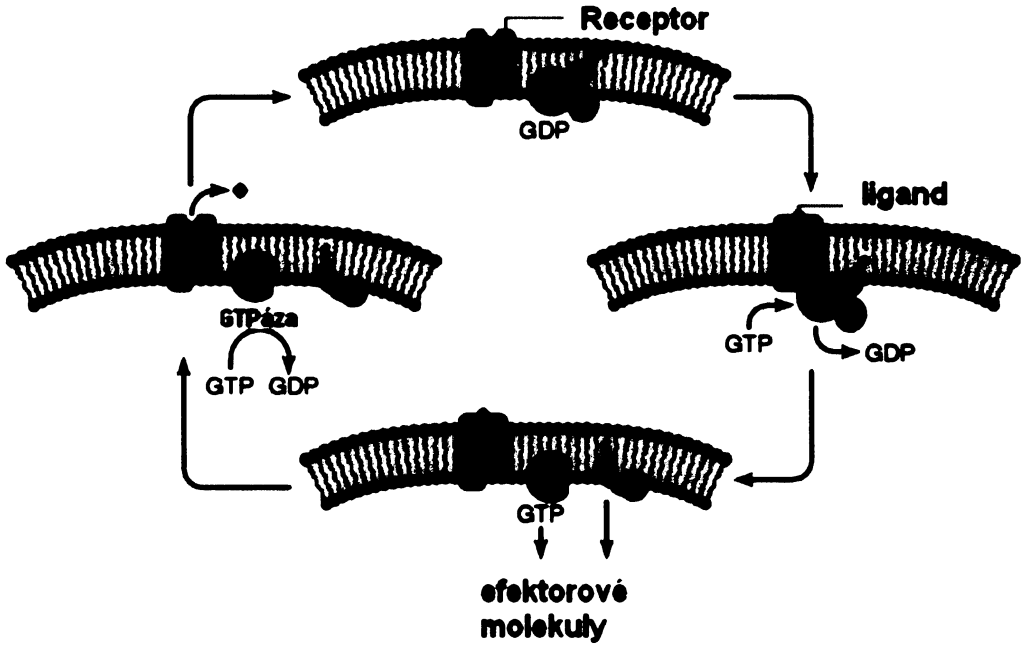
Gi: α podjednotka Gi proteinů přímo inhibuje AC, v určité míře aktivuje K^+ kanály a inhibuje Ca^{2+} kanály. Gt proteiny přímo aktivují fosfodiesterasu

Gq: α podjednotka Gq proteinů aktivuje fosfolipasu C β

Každá α podjednotka G-proteinů je složena ze dvou domén. Jedna doména je sídlem GTP-asové aktivity, obsahuje vazebné místo pro GTP, vazebné místo pro βγ komplex a vazebné místo pro efektor. Druhá doména má pravděpodobně stabilizují funkci při přeměně GTP na GDP. Všechny α podjednotky G-proteinů mohou být modifikovány palmitoylací nebo myristoylací, případně obojím */Wedegaertner a spol., 1995, Milligan a spol., 1995, Ross a spol., 1995/*. Tyto modifikace ovlivňují jednak schopnost α podjednotky interagovat s plazmatickou membránou, jednak regulují její afinitu k dimeru βγ, což hraje roli při disociaci a reasociaci heterotrimeru */Mumby a spol., 1994 /*.

Je důležité zmínit, že i β a γ podjednotky existují v několika variantách s odlišnými funkčními vlastnostmi */Neer, 1995/*. Při přenosu signálu hraje dimer βγ významnou roli. Nejen že umožňuje funkční spojení G-proteinu s receptorem, ale má i významnou biologickou aktivitu. Dimer βγ se váže a aktivuje určité typy K^+ kanálů (negativně chronotropní a inotropní účinek v srdci), inhibuje některé typy Ca^{2+} kanálů (presynaptická (auto)inhibice uvolňování mediátorů), ovlivňuje aktivitu PLC β a určité typy AC (viz dále) */Inglese a spol., 1995/*. Také se váže na určité proteinkinasy, jako například na kinasy fosforylující receptory spřažené s G-proteiny, čímž se podílí na jejich desensitizaci. Podjednotky βγ mohou být lipidicky modifikovány isoprenylací */Rando, 1996/*, což hraje roli při jejich ukotvení do plazmatické membrány.

Funkční cyklus heterotrimerních G-proteinů spočívá v jejich disociaci na aktivní podjednotky v odpovědi na extracelulární signál a zpětné reasociaci, která cyklus ukončí */Hamm a spol., 1996/*. V klidovém stavu jsou G-proteiny ve formě heterotrimerů, na jejichž α podjednotce je navázán GDP. Některé G-proteiny mohou být vázány na receptor. V takovém případě je nukleotidové vazebné místo obsazeno GDP, receptor má nízkou afinitu pro agonistu, mají-li ho volné, afinita receptoru pro agonistu je vysoká */Tuček, 1995/*. Navázání orthosterického agonisty na receptor vyvolá konformační změnu receptoru, což vede ke konformační změně na α podjednotce, ta vede ke snížení afinity α podjednoty pro GDP, dochází k jeho disociaci a následné vazbě GTP, který je v buňce ve vyšší koncentraci. Po vazbě GTP dojde ke snížení afinity α podjednotky k receptoru i dimeru βγ a k jejich vzájemnému odpoutání. Volné α podjednotky s navázaným GTP i komplex podjednotek βγ jsou biologicky aktivní a v závislosti na typu podjednotek mohou přímo regulovat různé efektorové molekuly. Aktivovaná α podjednotka je také schopná reagovat s receptorem a snížit jeho afinitu pro ligand. Podjednotka α s navázaným GTP je aktivní do doby, dokud její vlastní GTP-asová aktivita nepřemění GTP na GDP. To vede k reasociaci α podjednotky s dimerem βγ v inaktivní heterotrimer, který je pak připravený pro další aktivační cyklus */Neer a spol., 1995/* (obrázek č. 2).



Obrázek č. 2: Funkční cyklus G-proteinů (převzato a upraveno z Nestler a Duman, 1999)

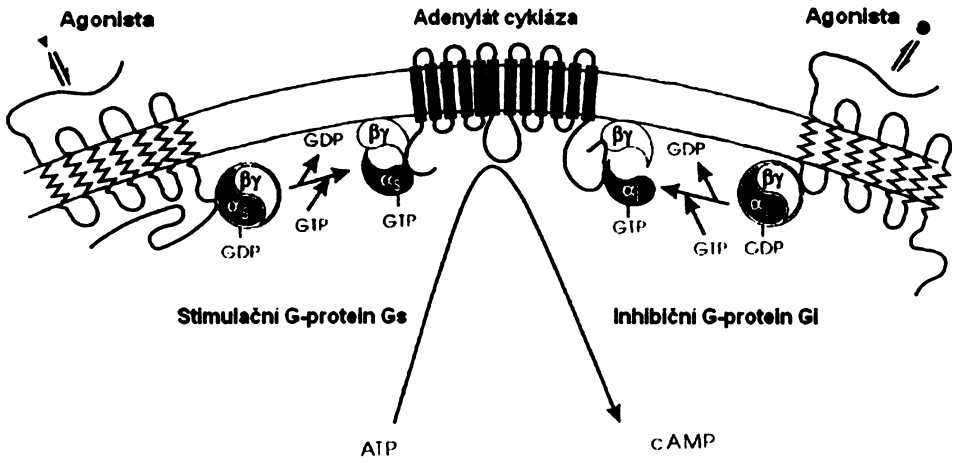
Jediný komplex agonista - receptor je schopen aktivovat několik G-proteinů za sebou. Po dobu interakce každé aktivované α podjednotky s efektorem může vznikat mnoho molekul druhých poslů. Tímto způsobem dochází k zesílení přenášeného signálu */Tuček, 1995/*.

Některé typy G-proteinů mohou být kovalentně modifikovány ADP-ribosylací. Toho lze využít při studiu jejich funkčního cyklu. Jako nástroje zde mohou sloužit bakteriální toxiny cholera toxin (z bakterie *Vibrio cholerae*) a pertussis toxin (z bakterie *Bordetella pertussis*). Tyto toxiny katalyzují ADP-ribosylaci α podjednotek určitých G-proteinů. Cholera toxin katalyzuje ADP-ribosylaci argininu u α podjednotky Gs proteinu (případně Gt proteinu). Tato modifikace inhibuje vlastní GTP-asovou aktivitu α podjednotky. G-protein tak zůstává ve své aktivní konformaci. V důsledku toho dochází k dlouhodobé stimulaci AC. Pertussis toxin katalyzuje ADP-ribosylaci cysteinu lokalizovaného na C-konci α podjednotky u Gi, Go a Gt proteinů. Tato modifikace vede k odpřažení G-proteinu od receptoru a brání tak jeho aktivaci. Tento mechanismus brání funkční odpovědi zprostředkované Gi, Go a Gt proteiny, jako je např. inhibice adenylátcyklasy */Watson a Arkinstall, 1994, Nürnberg a spol., 1995/*.

5. *Efektory řízené G-proteiny*

Mezi nejdůležitější efektorové molekuly, jejichž aktivita je řízena prostřednictvím G-proteinů, patří ***adenylátcyklasa*** (AC). Tento enzym katalyzuje přeměnu ATP na cAMP prostřednictvím vytvoření cyklické fosfodiesterové vazby z α fosfátu ATP. Cyklický AMP má v buňce funkci tzv. druhého posla. Aktivuje na cAMP závislou proteinkinasu A (PKA), která fosforyluje serin a threonin substrátových proteinů a ovlivňuje tak jejich aktivitu. Cyklický AMP hraje stěžejní roli při regulaci celé řady funkcí. Podílí se na regulaci genové transkripce, mitogeneze, metabolismu, kontraktilitě hladké svaloviny či regulaci aktivity iontových kanálů */Watson, Arkinstall, 1994/*. Aktivita cAMP je ukončena působením fosfodiesterasy.

Aktivita adenylátcyklasy může být regulována GPCR prostřednictním Gs a Gi G-proteinů. Aktivací heterotrimerního G-proteinu Gs a interakcí jeho Gsα podjednotky s molekulou AC dochází ke stimulaci tohoto enzymu a zvýšené tvorbě cAMP. Na druhou stranu Gi G-proteiny adenylátcyklasu inhibují, a tím snižují produkci cAMP */Watson a Arkinstall, 1994/* (obrázek č. 3, str. 15).

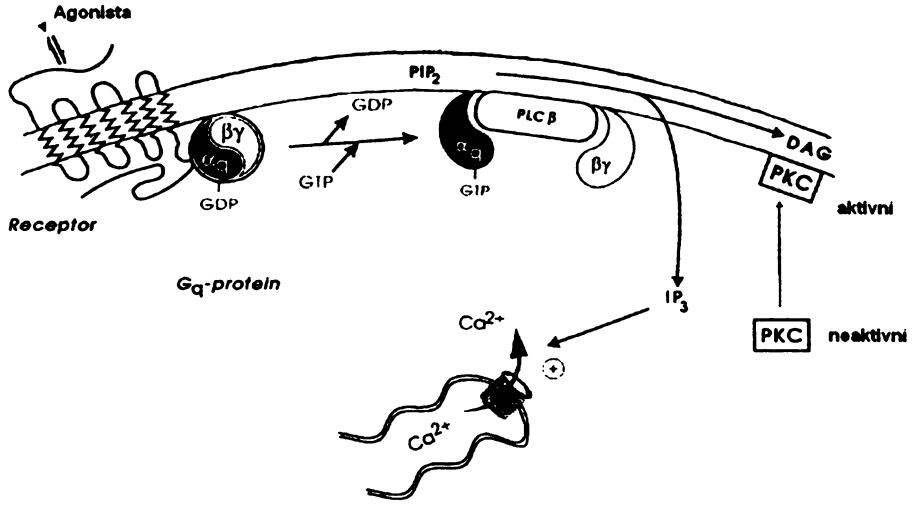


Obrázek č. 3: Regulace aktivity adenylátcyklasy prostřednictvím GPCR (převzato a upraveno z *Watson a Arkinstall, 1994*)

Bylo identifikováno devět různých forem AC (AC I - AC IX) */Neer a spol., 1995/*. Všechny formy jsou membránové proteiny stimulované α podjednotkou Gs proteinů a s výjimkou AC IX forskolinem (rostlinný diterpen). Jednotlivé formy se liší lokalizací */Schneider a spol., 1997, Huang a spol., 1995, Herve a spol., 1993, Xie a spol., 1995, Inglese a spol., 1995/* a citlivostí na Ca^{2+}/kalmodulin, Gαi, $G_{\beta\gamma}$ */Neer a spol., 1995/* a fosforylaci */Duman a Nestler, 1999/*.

Dalším důležitým efektorem jehož aktivita je řízena prostřednictvím G-proteinů je ***fosfolipasa Cβ*** (PLC β) */Caulfield, 1993/*. PLCβ katalyzuje hydrolýzu membránového fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu. Produkty hydrolýzy jsou dva druzí poslové inositol-1,4,5-trisfosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG) */Watson a Arkinstall, 1994/*.

Aktivita PLCβ je řízena prostřednictním G-proteinu Gq. Interakcí jeho Gqα podjednotky s molekulou PLCβ dochází ke stimulaci hydrolýzy membránových inositolových fosfolipidů za vzniku příslušných druhých poslů. IP_3 mobilizuje Ca^{2+} ze zásob v endoplazmatickém retikulu a tím zvyšuje koncentraci volného Ca^{2+} v cytozolu. DAG aktivuje proteinkinasu C (PKC) (obrázek č. 4, str. 16).



Obrázek č. 4: Hydrolýza inositolfosfátů prostřednictvím PLCβ. (převzato a upraveno z *Watson a Arkinstall, 1994*)

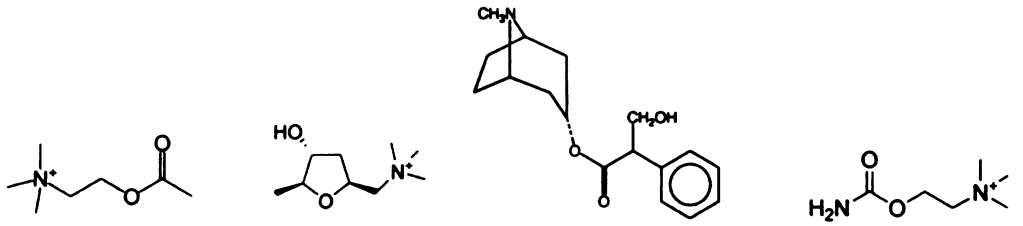
Fosfolipasa Cβ rovněž existuje v několika izoformách s odlišnou regulací. Byly identifikovány čtyři izoformy PLC β (1-4), přičemž všechny mohou být aktivovány Gq proteiny a některé (β2 a β3) i βγ dimery Gi proteinů */Caulfield, 1993, Rhee a Choi, 1992/.*

6. *Muskarinové acetylcholinové receptory (mAChR)*

Muskarinové receptory jsou zástupci široké rodiny membránových receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Jejich přirozeným agonistou je acetylcholin (obrázek č. 5 A, str. 17), který je důležitým neurotransmiterem jak v centrálním, tak periferním nervovém systému */Caulfield, 1993/.* V experimentální práci bývá často využíván jeho nehydrolyzovatelný analog karbachol (obrázek č. 5 D, str. 17).

Acetylcholin se podílí na řízení celé řady fyziologických funkcí a cholinergní deficit je spojen s mnoha patologickými stavy. Příkladem může být vážné zhoršení kognitivních funkcí při Alzheimerově chorobě. Kromě přenosu signálu prostřednictvím metabotropních muskarinových receptorů využívá acetylcholin ještě druhého typu receptorů - receptory nikotinového typu, které patří mezi chemicky řízené iontové kanály */Watson a Arkinstall, 1994/.*

Pojmenování muskarinových receptorů je odvozeno od alkaloidu muskarinu (obrázek č. 5 B, str. 17), který působí jako jejich agonista. Jako antagonista zde působí např. atropin (obrázek č. 5 C, str. 17).



Obrázek č. 5: **A)** *acetylcholin* ***B)*** *muskarin* *C) atropin* *D) karbachol*

Muskarinové receptory se vyskytují ve všech částech centrálního nervového systému (CNS), periferního nervového systému (PNS) a v parasympatikem inervovaných tkáních. Vyskytují se i na buňkách některých synapsí sympatického nervového systému (potní žlázy) a na buňkách, které nemají synapse, jako jsou bílé krvinky nebo endoteliální buňky. Muskarinové receptory mohou působit jak excitační tak inhibiční odpovědi v závislosti na jejich lokalizaci a podtypu */Caufield, 1993/*.

V CNS se muskarinové receptory uplatňují v celé řadě vegetativních, senzorických i motorických funkcích. Dále hrají roli při regulaci stavu bdělosti a spánku, emočních odpovědích, nebo udržení pozornosti. V mozkové kůře a hipokampu se mAChR podílejí na řízení vyšších kognitivních funkcí jako je učení a paměť */Wess, 1996/*. Aktivace parasympatiku prostřednictvím muskarinových receptorů vede k takovým dějům, jako je zpomalení srdečního rytmu či zvýšení sekrece exokrinních a endokrinních žláz, kontrakce hladké svaloviny atd. */Caufield, 1993/*.

Aplikací molekulárně biologických a farmakologických technik bylo identifikováno pět podtypů muskarinových receptorů (M_1-M_5) s odlišnou lokalizací a farmakologickými a funkčními vlastnostmi */Bonner a spol., 1987, Peralta a spol., 1987/*. Podtypy mAChR M_{1-4} se vyskytují v celé řadě periferních tkání a oblastech CNS. Podtyp M_5 je v malé míře lokalizován pouze v určitých oblastech CNS (viz tabulka č. 1, str. 18). Jednotlivé podtypy muskarinových receptorů se na buňkách často vyskytují současně alespoň s jedním dalším podtypem, což znesnadňuje mapování jejich výskytu */Watson a Arkinstall, 1994/*.

Tabulka č. 1: Distribuce jednotlivých podtypů muskarinových receptorů v centrálním a periferním nervovém systému podle *Wesse, 1996.*

Distribuce	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5
Mozková kůra	xx	x	x	x	
Hipokampus	xx	x	x	x	(x)
Striatum	xx	x	x	xx	(x)
Thalamus	xx	x	x	x	
Mozkový kmen a mozeček	(x)	xx	x		(x)
Srdce		xx			
Hladká svalovina		xx	xx	x	
Žlázy s vnější sekrecí	x		xx		

X označuje přítomnost receptoru.

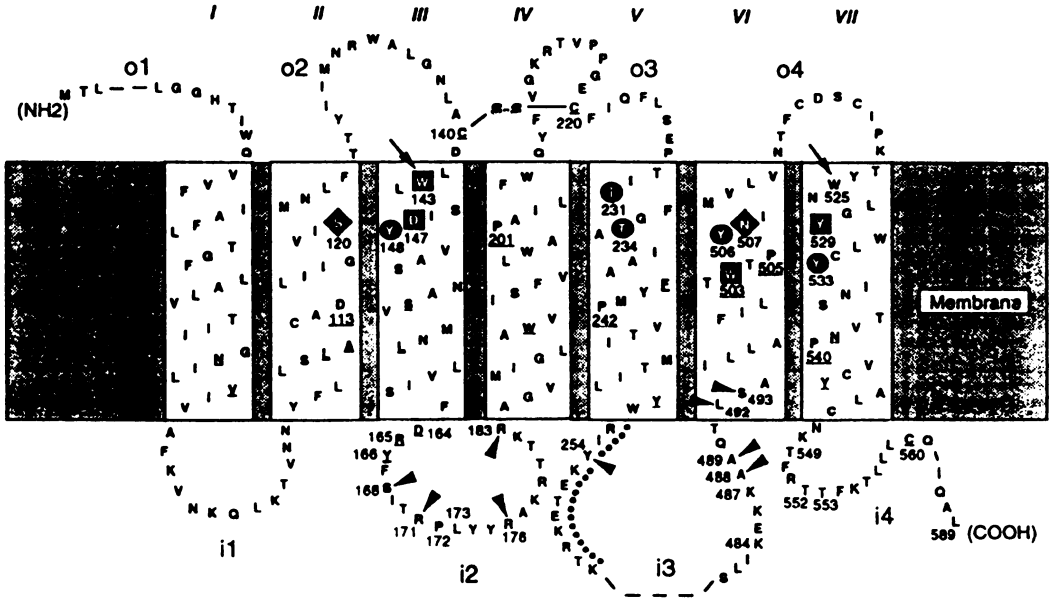
6.1. Struktura vazebných míst muskarinových receptorů

Struktura všech podtypů muskarinových receptorů je obdobná struktuře rodiny GPCR, kam mAChR přísluší. Aminokyseliny účastnící se vazby agonistů a antagonistů muskarinových receptorů se nacházejí ve štěrbině vzniklé kruhovým uspořádáním transmembránových helixů TM (I-VII).

Aminokyseliny účastnící se vazby agonisty jsou pravděpodobně lokalizovány na extracelulárním konci TM helixů III, V, VI a VII ve vzdálenosti 10-15 Å od povrchu buňky */Wess, 1996/*. Bylo potvrzeno, že kladně nabitá amoniová hlava ACh a prakticky všech dalších muskarinových agonistů vytváří iontovou vazbu s aspartátem v TM III (v obr. č. 6, str. 19 Asp 147), který je konzervován pro všechny GPCR pro biogenní aminy */Wess, 1996/*. Dále bylo na potkaním M_3 receptoru pozorováno, že rozhodující úlohu pro vazbu ACh hrají dva threoniny a čtyři tyroziny (v obrázku č. 6, str. 19 se jedná o: Thr 231, Thr 234, Tyr 148, Tyr 506, Tyr 529, Tyr 533). Záměna těchto aminokyselin (Thr za Ala a Tyr za Phe) vedla ke snížení afinity muskarinových receptorů pro agonisty (10-60 krát), zatímco afinita pro antagonisty zůstala beze změn. Tyto aromatické aminokyseliny se pravděpodobně podílejí na stabilizaci iontového páru mezi Asp v TM III a kladně nabitou hlavou ACh. Také se jeví možná interakce mezi Tyr 148 (TM III), Thr 231 a/nebo 231 (TM V) (obrázek č. 6, str. 19) a esterovým řetězcem ACh prostřednictvím vodíkových vazeb */Wess, 1996/*.

Na vazbě antagonistů muskarinových receptorů se stejně jako u agonistů uplatňuje Asp v TM III (147 v obrázku č. 6, str. 19). Další aminokyseliny podílející se na vazbě jak agonistů tak antagonistů jsou Trp 143, Trp 503, Tyr 529, u nichž je pravděpodobně

podstatný jejich aromatický charakter, protože jejich záměna za alanin vedla k výraznému poklesu afinity pro antagonisty, zatímco záměna za fenylalanin k žádným změnám nevedla. Aromatické zbytky zde pravděpodobně stabilizují iontovou vazbu mezi Asp v TM III a kladně nabitou aminovou skupinou přítomnou prakticky u všech muskarinových antagonistů. Aminokyseliny, které se podílejí výhradně na vazbě antagonistů jsou Ser v TM II (odpovídající Ser 120 u M_3 v obrázku č. 6) a Asn v TM VI (Asn 507) */Wess, 1996/*.



Obrázek č. 6: Struktura potkaního M_3 receptoru (převzato a upraveno z *Wess, 1996*).
Aminokyseliny, které jsou podtrženy, jsou konzervované pro většinu GPCR. Aminokyseliny důležité pro vazbu agonistů i kompetitivních antagonistů jsou zvýrazněny černými čtverečky. Černé kroužky vyznačují aminokyseliny účastnící se vazby pouze agonistů. Kosočtverečky znázorněné aminokyseliny jsou nezbytné pro vazbu pouze antagonistů. Aminokyseliny účastnící se vazby alosterického modulátoru galaminu jsou označeny šipkami. Černé trojúhelníky označují aminokyseliny zprostředkovávající funkční kontakt s Gq/11 proteiny.

Za vazbu muskarinových receptorů s G-proteiny odpovídají převážně aminokyseliny druhé a třetí intracelulární smyčky receptoru. Vazebné místo pro G-protein je tvořeno hlavně Asp v TM II (Asp 113 v obrázku č. 6), Pro v TM VII (Pro 540 v obrázku č. 6), vysoce konzervovaný triplet Asp-Arg-Tyr lokalizovaný na N-konci i2 smyčky (Asp-164-Arg-165-Tyr-166 v obrázku č. 6) a aminokyseliny třetí intracelulární smyčky i3 Tyr, Ala, Ala (Tyr 254, Ala 488 a Ala 489 v obrázku č. 6) */Wess, 1996/*.

Kromě orthosterického (klasického) vazebného místa pro ACh mají muskarinové receptory na extracelulárním povrchu ještě alespoň jedno, ale spíš více vazebných míst pro alosterické ligandy */Lazareno a spol., 2000, 2002/*. Tyto látky se vážou na ne zcela přesně

určená místa na druhé a třetí extracelulární smyčce receptoru /*Krejčí a Tuček 2001, Jakubík a spol., 2005*/

7. *Spřahování muskarinových receptorů s G-proteiny*

Navázáním agonisty na receptor dochází ke konformační změně transmembránového jádra receptoru a tato změna se šíří do intracelulární oblasti receptoru a umožňuje tak funkční spojení receptoru s G-proteinem /*Gudermann a spol., 1995*/.

Celé spektrum biochemických a elektrofyziologických odpovědí zprostředkovaných jednotlivými podtypy muskarinových receptorů je určeno v první řadě typem G proteinu, se kterým jsou tyto receptory schopny reagovat /*Wess, 1996*/. Na základě preferenčního spřahování s jednotlivými typy G-proteinů lze muskarinové receptory rozdělit do dvou funkčních skupin /*Wess, 1996*/. Podtypy $M_{1,3,5}$ se preferenčně spřahují s G-proteiny Gq/11 /*Caufield, 1993*/ a v menší míře s Gs /*Burford a Nahorsky, 1996*/. Stimulují tak přímo PLC β, která katalyzuje hydrolýzu fosfatidylinositolu (PI), při které vznikají druzí poslové diacylglycerol (DAG) a inozitoltrisfosfát (IP3) a slabě syntézu cAMP prostřednictvím aktivace AC. Generované molekuly druhých poslů se následně účastní dalších fyziologických dějů (viz kapitola 5., str. 14).

Do druhé funkční skupiny patří muskarinové receptory M_2 a M_4. Tyto podtypy mAChR se preferenčně spřahují s Gi/o proteiny, což má za následek inhibici adenylát-cyklasy vedoucí ke snížení tvorby cAMP a tudíž utlumení signalizace na něm závislé. Tento efekt je výraznější, když je adenylát cyklasa stimulována např. aktivací adrenergních receptorů, nebo forskolinem /*Caufield, 1993*/. Spřahování s G-proteiny u jednotlivých členů výše zmíněných dvou funkčních skupin nemusí být totožné. U JEG buněk (buňky z choriokarcinomu) exprimujících M_2 a M_4 mAChR bylo pozorováno, že zatímco M_2 receptor se spřahuje se všemi podtypy Gi a Go proteinů, tedy Gi1, Gi2, Gi2 a Go1, Go2, tak M_4 rozpoznává jen Gi2, Go1, Go2 /*Migeon a spol., 1995*/.

Specifitu muskarinových receptorů pro jednotlivé G-proteiny určuje 8-12 aminokyselinových zbytků na N- a C-koncích třetí intracelulární smyčky receptoru /*Wess, 1996*/. Preferenční spřahování mAChR s G-proteiny může být ovlivňováno také βγ dimery G-proteinů /*Wess, 1996*/.

Selektivita muskarinových receptorů k jednotlivým podtypům G-proteinů je spíše relativní než absolutní. Některé studie /*Offermanns a spol., 1994*/ ukazují, že pokud jsou M_1 a M_3 mAChR, spřahující se preferenčně s Gq a Gs proteiny, exprimované ve vysokém

množství v HEK-293 (fibroblasty z lidských ledvin) buňkách, mohou za přítomnosti vysoké koncentrace agonisty také aktivovat Gi_1 a Gi_3 α podjednotky. Muskarinové M_2 receptory se preferenčně spřahují s Gi/o G-proteiny a mohou tak inhibovat AC. Bylo však pozorováno, že při vyšší koncentraci agonisty dochází ke snížení tohoto účinku, a v závislosti na úrovni receptorové exprese, k stimulaci syntézy cAMP */Michal a spol., 2001/* a rovněž i hromadění inositolfosfátů */Ashkenazi a spol.,1987, Vogel a spol., 1995*). Následně byly provedeny studie */Michal a spol., 2007/* na CHO buňkách exprimujících lidský M_2 receptor s vyřazenými α podjednotkami jednotlivých G-proteinů, ve kterých bylo potvrzeno, že se v těchto případech jedná o přímou interakci M_2 receptoru s Gs a Gq/11 proteiny.

Mnoho GPCR může za určitých podmínek interagovat s více než jedním typem G-proteinu, což poskytuje ohromnou variabilitu funkčních výsledků receptorové aktivace. Závisí to například na hustotě receptorů, dostupnosti jednotlivých G-proteinů, účinnosti agonisty, desentizaci atd. */Tuček a spol., 2002/*. Tyto netypické funkční výsledky mohou mít úlohu při různých patologických stavech a jejich léčbě, stejně tak při otravách či předávkování léky.

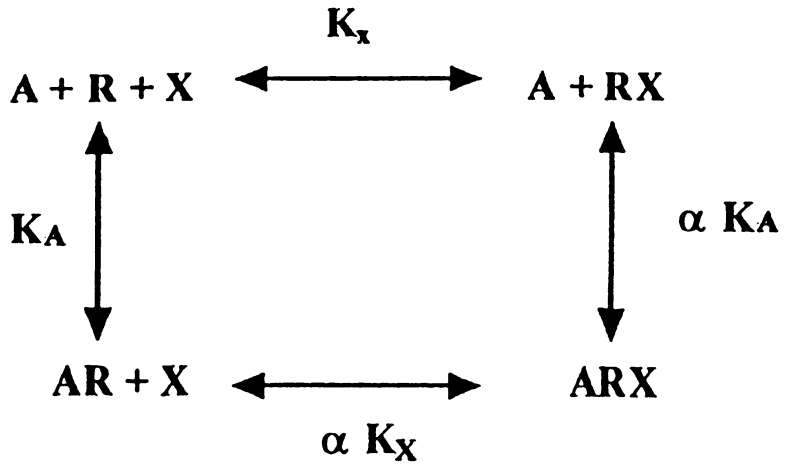
8. *Alosterické regulace muskarinových receptorů*

Vysoká homologie klasického (orthosterického) vazebného místa u jednotlivých podtypů muskarinových receptorů ztěžuje hledání selektivních agonistů pro jednotlivé podtypy receptorů a cílené ovlivňování jejich aktivity. Kromě klasického vazebného místa však mají muskarinové receptory na extracelulárních kličkách jedno nebo spíše více vazebných míst pro alosterické ligandy, která se nacházejí v proměnlivé oblasti receptoru */Lazareno a spol., 2000, 2002, Birdsall a spol., 2001/*. Alosterické ligandy jsou tedy na rozdíl od orthosterických výrazně podtypově selektivní a navíc interakce různých dvojic orthosterický ligand - alosterický ligand vykazují vzhledem ke vzájemné kooperativitě podtypovou specificitu */Jakubík a spol., 1995, 1997/*. Alosterický ligand je definován jako molekula, která se váže do alosterického místa a ovlivňuje tak vazbu ligandu do klasického vazebného místa prostřednictvím změny proteinové konformace */Kenakin, 2004/*. Z pohledu alosterických interakcí patří muskarinové receptory mezi nejlépe prostudovanou skupinu receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR) */Christopoulos a spol., 1998/*.

Alosterická interakce nastává, když se na receptor současně váží dva ligandy, s receptorem vytvářejí ternární komplex a každý z nich mění afinitu receptoru vůči

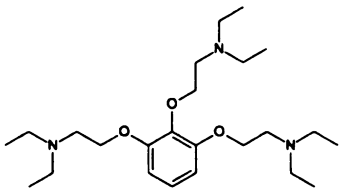
druhému ligandu. Alosterická interakce je reciproká. Vazba klasického nebo alosterického ligandu ovlivňuje afinitu receptoru k druhému ligandu stejným způsobem a ve stejném rozsahu. Dochází-li po navázání jednoho ligandu k poklesu afinity pro druhý ligand, hovoříme o negativní kooperativitě, v opačném případě se jedná o kooperativitu pozitivní. Velikost kooperativity mezi alosterickým a orthosterickým ligandem udává faktor kooperativity α, který odpovídá násobku, o který se změní afinita jednoho ligandu po navázání druhého. Faktor kooperativity vyjadřuje poměr afinit ligandu pro obsazený a neobsazený receptor. Hodnota $\alpha > 1$ znamená negativní kooperativitu, hodnota $\alpha < 1$ pozitivní kooperativitu. Negativní i pozitivní alosterické účinky mají své limity odpovídající faktoru kooperativity α. Alosterický ligand totiž ovlivňuje vazbu klasického ligandu pouze v určitém koncentračním rozmezí, nad tuto hranici už zvyšování koncentrace alosterického modulátoru dále vazbu klasického ligandu neovlivňuje. Ve vazebných pokusech se pozitivní kooperativita projeví zvýšením afinity pro radioligand, tedy zvýšením vazby radioligandu, pokud je v subsaturující koncentraci. Negativní kooperativita se projeví opačně. Důležitým rysem alosterické modulace jsou změny kinetiky asociace a disociace ligandu.

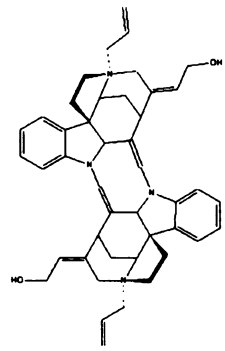
Nejjednodušší model popisující alosterickou interakci je model ternárního komplexu (obrázek č. 7, str. 23). Popisuje interakci dvou ligandů skrze různá vazebná místa na jednom receptoru. Alosterická interakce zde může být kvantifikována pomocí rovnovážných disociačních konstant pro každý ligand a faktoru kooperativity. Alosterickou interakcí je i interakce mezi GPCR a G-proteinem.



Obrázek č. 7. Model ternárního komplexu alosterické interakce (převzato a upraveno z *Christopoulos a spol., 1998*). R = receptor; X = klasický ligand; A = alosterický ligand; $K_{X,A}$ = rovnovážné disociační konstanty komplexů AR a RX; α = faktor kooperativity (vzájemná maximální změna afinity A a X k jejich vazebným místům při současném navázání do formy ternálního komplexu AXR.

Alosterické vlastnosti exogenních ligandů byly poprvé pozorovány u neobvyklých funkčních */Clark a Mitchelson, 1976/* a vazebných */Dunlap a Brown 1983, Stockton a spol., 1983, Nedoma a spol., 1986, Tuček a spol., 1990*) vlastností nervosvalových blokátorů jako je galamin a alkuronium (obrázek č. 8 A, B). Afinita k podtypům muskarinových receptorů klesá v případě alkuronia ve směru $M_2 > M_4 = M_3 > M_1 > M_5$ */Jakubík a spol., 1995/* a u galaminu ve směru $M_2 > M_4 > M_1 > M_3 > M_5$ */Ellis a spol., 1991, Gnagey a spol., 1999/.*





Obrázek č. 8 A) Galamin **B)** Alkuronium

Od té doby bylo popsáno velké množství alosterických látek, které podtypově specificky mění afinitu receptoru pro muskarinové agonisty a antagonisty */Tuček a spol., 1990, Proška a Tuček, 1994, Dong a spol., 1995, Jakubík a spol., 1995, 1997, Lazareno a Birdsall, 1995, Tuček a spol., 1998/.*

Také bylo pozorováno */Jakubík a spol., 1996, 1998/*, že vazba alosterických modulátorů neovlivňuje jen vlastnosti klasického vazebného místa, ale rovněž aktivuje G-proteiny. Alosterické modulátory alkuronium, galamin a strychnin vykazovaly i v nepřítomnosti agonisty schopnost ovlivňovat syntézu cAMP u CHO $M_{2,4}$ buněk jako klasický agonista karbachol. Z toho vyplývá, že k aktivaci muskarinových receptorů může docházet nejen z jejich klasického, ale i alosterického vazebného místa.

E: Praktická část

9. *Materiály a přístroje*

9.1. Chemikálie a materiály

Guanosin 5´-O-(3-[^{35}S] thio)trifosfát (GTPγ$^{[35]}$S) 1250 Ci/mmol (Perkin Elmer, USA)

^{3}H-N-methylscopolamin (^{3}H-NMS) 71,6 Ci/mmol (Perkin Elmer ,USA)

Karbachol (Sigma - Aldrich, Česká republika)

DTT (dithiothreitol) (Sigma - Aldrich, Česká republika)

GDP (Sigma - Aldrich, Česká republika)

GTPγS (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Protein-A agarosa (Santa Cruz Biotechnology, USA)

Polyklonální anti Gα i-3 (C-10), anti Gα s/olf (C-19), anti Gα q/11 (C-18) (Santa Cruz Biotechnology, USA)

DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s medium) (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Hovězí fetální sérum (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Geneticin (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Butyrát sodný (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Trypsin (Sigma - Aldrich, Česká republika)

NaCl (Penta, Česká republika)

Na-HEPES (Sigma - Aldrich, Česká republika)

EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) (Serva, Německo)

$MgCl_2$ (Lachema, Česká republika)

NaOH (Penta, Česká republika)

Folinovo činidlo (Folin - Ciocolteau; Dr Kulich Pharm. s.r.o., Česká republika)

Atropin (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Alkuronium dichlorid (Roche, Švýcarsko)

Filtry ze skleněných vláken - GF/B a GF/A (Whatman, UK)

Scintilační roztok - Rotiszint eco plus (Roth, Německo)

Scintilační plátky - Meltilex A (Wallac, Finsko)

9.2. Přístroje

Homogenizátor: ULTRA-Turrax T25 (Janke a Kunkel GmbH a Co., Německo)

Centrifugy: Biofuge freco (Heraeus, Německo)

Sigma 3K18 (Sigma Laborzenrifugen, Německo)

Universal 16R (Hettich, Německo)

Třepačky destiček: PST-60Hl PLUS Thermo Shaker (Boeco, Německo)

Grant-bio (P-lab a.s., Česká republika)

Filtrační zařízení: Tomtec Cell harvestor Mach III (USA)

Filtrační zařízení: Brandel Cell harvestor (USA)

Microbeta 1450 scintilation counter Wallac (Finsko)

Čtečka destiček Wallac Victor^{TM} (Finsko)

9.3. Biologický materiál

Fibroblasty z ovárií zlatého křečka (CHO - Chinese hamster ovary) stabilně exprimující jednotlivé podtypy lidských muskarinových receptorů (označované M_{1-4}) byly laskavě poskytnuty Profesorem T. I. Bonnerem (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

10. Metody

10.1. Pěstování a sklízení buněk

CHO buňky stabilně exprimující lidské muskarinové receptory M_{1-4} byly pěstovány při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO_2 v médiu pro tkáňové kultury (Dulbecco´s modified Eagle´s medium; DMEM) doplněném o 0,005 % geneticin a 10 % fetální telecí sérum */Jakubík a spol., 1995/* v Petriho miskách (75-78 cm^2). Před sklízením byly buňky vystaveny 24 hodin působení butyrátu sodnému o koncentraci 5 mM, pro zvýšení exprese muskarinových receptorů */Dion a spol., 1997/*.

Buňky byly sklízeny po dosažení konfluence po pěti dnech růstu v kultuře. Nejprve byly opláchnuty dvakrát 5 ml fosfátového izotonického roztoku (PBS; Phosphate Buffered Saline) a následně, po přidání 3 ml PBS, jemně sklizeny pomocí škrabky. Poté následovala centrifugace 3 min při 300 g a po odsátí supernatantu byly uskladněny v -20 °C.

10.2. Příprava membrán

Zamražené CHO buňky sklizené z dvaceti Petriho misek byly resuspendovány ve 20 ml homogenizačního média a na ledu homogenizovány v homogenizátoru Ultra-Turrax při 22000 otáčkách/min dvakrát po dobu 30 vteřin s přestávkou 30 vteřin. Hrubé fragmenty byly odstraněny nízkootáčkovou centrifugací při 400 g po dobu 2 minut a při 4 °C. Supernatant byl rozdělen do mikrozkumavek po 1,4 ml a centrifugován 30 min při 30000 g a 4 °C. Supernatant byl odsát a sediment (hrubá membránová frakce) byl promyt 1 ml reakčního media bez DTT. Následovala opětovná centrifugace 30 min při 30000 g a 4 °C. Po odsátí supernatantu byly membrány zamraženy při -80 °C.

Homogenizační médium: 100 mM NaCl, 20 mM Na-HEPES, 10 mM EDTA, pH 7,4
Reakční médium: 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM Na-HEPES, 1mM DTT, pH 7,4

10.3. Biochemická měření

10.3.1. Stanovení proteinů

Množství proteinů bylo stanovováno spektrofotometricky při 690 nm Lowryho metodou */Lowry a spol., 1951/* v Petersonově modifikaci */Peterson, 1977/*. Stanovení byla provedena vždy v kvadruplikátech v mikrotitračních 96-jamkových destičkách. Vzorky byly rozpuštěny v 1 M roztoku NaOH. Kalibrační křivka byla tvořena roztoky lidského sérového albuminu o výsledných koncentracích 0-1,25-2,5-5-10-20 μg/jamku s přidáním roztoku 1 M NaOH v množství odpovídajícím aliquotu stanovovaných vzorků, pro zachování stejného pH jako u stanovovaných vzorků.

10.3.2. Stanovení exprese a afinity mAChR

Membrány CHO M_{1-4} buněk byly resuspendovány v reakčním médiu (kapitola 10.2., str. 27) tak, aby výsledná koncentrace byla 10 μg proteinu/vzorek. Membrány byly inkubovány v 96-jamkových destičkách v konečném objemu 0,8 ml se značeným ^{3}H-N-methylscopolaminem (^{3}H-NMS, neselektivní antagonista muskarinových receptorů) o koncentracích 2000-1000-500-250-125-62,5 pM, 60 minut při 30 °C v kvadruplikátech. Pro určení nespecifické vazby byl navíc pro každou koncentraci radioligandu přidán do reakční směsi atropin v saturující koncentraci 12,5 μM. Inkubace byla ukončena rychlou vakuovou filtrací (Brandel Cell Harvestor) radioaktivně označených membrán za použití Whatmann GF/F filtrů namočených pro snížení nespecifické vazby v polyethyleniminu. Radioaktivita zachycená na filtru byla po zabudování do pevného scintilátoru měřena pomocí scintilačního počítače Microbeta. Koncentrace značeného ligandu byla stanovována ze známé specifické radioaktivity ^{3}H-NMS a z radioaktivity v médiu, stanovené v alikvotech přidávaného média kapalným scintilačním měřením.

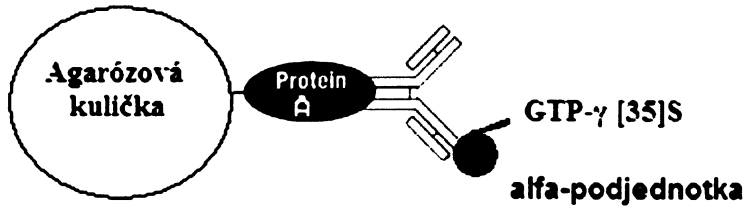
10.3.3. Vazba GTP γ$^{[35]}$S na membrány CHO buněk

Spřahování muskarinových receptorů s G-proteiny bylo měřeno jako nárůst vazby radioaktivně značeného nehydrolyzovatelného analogu GTP guanosin-5'γ[^{35}S]thiotrifosfátu (GTPγ$^{[35]}$S) na membrány z CHO buněk po stimulaci muskarinovým orthosterickým agonistou karbacholem. Pokusy byly provedeny v přítomnosti nebo nepřítomnosti saturující koncentrace alosterického modulátoru alkuronia. Byla měřena vazba GTPγ$^{[35]}$S na membrány v klidovém stavu, při stimulaci receptorů karbacholem, maximální vazba a

nespecifická vazba. Stanovení byla provedena v kvadruplikátech v 96-jamkových mikrotitračních destičkách, přičemž objem reakční směsi na jamku činil 200 µl. Membrány byly na ledu resuspendovány v reakčním médiu (kapitola 10.2., str. 27) a 50 µl aliquoty obsahující 4-10 µg proteinu byly inkubovány 5 min s 50 µl reakčního média ± GDP v konečné koncentraci 20 µM pro CHO $M_{2,4}$ a 1 µM pro CHO $M_{1,3}$ při 30 °C. Následně byl přidán 50 µl aliquot reakčního média ± karbachol v koncentračním rozmezí 0,03-1000 µM a následovala 15 minutová preinkubace při 30 °C. Při měření vazby GTPγ$^{[35]}$S na membrány v přítomnosti alosterického modulátoru bylo v posledních pěti minutách preinkubace s agonistou přidáno alkuronium v množství 5 µl a konečné koncentraci 100 µM pro M_1, 10 µM pro $M_{2,3}$ a 20 µM pro M_4, která je pro jednotlivé podtypy saturující */Jakubík a spol., 1997/*. Nakonec byl do reakční směsi přidán GTPγ$^{[35]}$S v objemu 50 µl tak, aby finální koncentrace byla 500 pM. Následovala 20 minutová inkubace při 30 °C (optimalizace podmínek: str. 34-38). Maximální vazba GTPγ$^{[35]}$S na membrány a tedy celkový obsah G-proteinů byl určen jako specifická vazba v nepřítomnosti GDP. Nespecifická vazba byla určena v přítomnosti 10 µM neznačeného GTPγS. Inkubace byla ukončena rychlou vakuovou filtrací radioaktivně označených membrán za použití Whatmann GF/B filtrů a Tomtec Harvestoru Mach III. Radioaktivita zachycená na filtru byla po zabudování do pevného scintilátoru měřena pomocí scintilačního počítače Microbeta.

10.3.4. Imunoprecipitace α podjednotek značených GTPγ $^{[35]}$S pomocí specifických protilátek a Protein-A agarosy

Jednotlivé volné α podjednotky G-proteinů s navázaným GTPγ$^{[35]}$S mohou být specificky precipitovány pomocí protilátek proti jednotlivým typům α podjednotek a Protein-A agarosy (obrázek č. 9, str. 30).



Obrázek č. 9: Princip imunoprecipitace prostřednictvím specifických protilátek a Protein-A agarosy

Imunoprecipitace byla provedena v triplikátech v 96-jamkových destičkách. Neprve byly membrány CHO buněk označeny GTPγ$^{[35]}$S (viz kapitola 10.3.3). Inkubace membrán s GTPγ$^{[35]}$S byla ukončena solubilizací v 1% roztoku detergentu Nonidet P-40 (detergent byl přidán v objemu 25 µl) při 4 °C a třepání 750 rpm. Po rozpuštění membrán byly přidány protilátky proti jednotlivým α podjednotkám v objemu 5 µl a konečném ředění 1:100 s následnou inkubací přes noc při teplotě 4 °C (optimalizace podmínek: str. 41-42). Následovala hodinová inkubace vzorků s 5 µl Protein-A agarosy ukončená rychlou vakuovou filtrací přes Whatmann GF/A filtry na Tomtec Harvestoru Mach III. Radioaktivita zachycená na filtru (Protein-A agarosa s navázanými označenými α podjednotkami příslušných G-proteinů) byla po zabudování do pevného scintilátoru měřena na scintilačním počítači Mikrobeta.

10.4. Analýza dat

Prokládání křivek a statistická zpracování dat byla provedena za použití programu GraphPad Prism4 (GraphPad software, Inc., USA).

V saturačních vazebných pokusech s ^{3}H-NMS byla měřena vazba radioligandu (Y) v závislosti na jeho koncentraci (X). Saturační křivka má tvar hyperboly a je popsána rovnicí:

$$Y = \frac{B\max \cdot X}{Kd + X}$$

kde Bmax (maximální vazba radioligandu, odpovídající počtu vazebných míst) je hodnota, ke které se hyperbola limitně blíží a Kd (rovnovážná disociační konstanta) je koncentrace ligandu, při které je obsazeno 50 % receptorů.

Stimulace vazby GTPγ $^{[35]}$S (Y) v závislosti na log koncentrace karbacholu (X) byla hodnocena podle rovnice:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(LogEC50 - X)}} \qquad (1)$$

případně

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(\log EC50 - X) \cdot HillSlope}} \qquad (2)$$

Jedná se o sigmoidální koncentrační závislost, kde hodnota EC_{50} vyjadřuje koncentraci agonisty, který vyvolá poloviční odpověď mezi bazální (Bottom) a maximální (Top) odpovědí. Rovnice (1) popisuje sigmoidální závislost se stálým sklonem (Hillův koeficient = 1), rovnice (2) popisuje sigmoidální závislost s proměnlivým sklonem (Hillův koeficient ≠ 1). Hillův koeficient popisuje strmost křivky (standardní sklon: Hillův koeficient = 1; je-li > 1, křivka je strmější, je-li < 1 křivka je plošší)

Jednotlivé hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. (Standard error of the mean; střední chyba průměru).

11. Výsledky

11.1. Exprese a afinita mAChR v membránách CHO buněk.

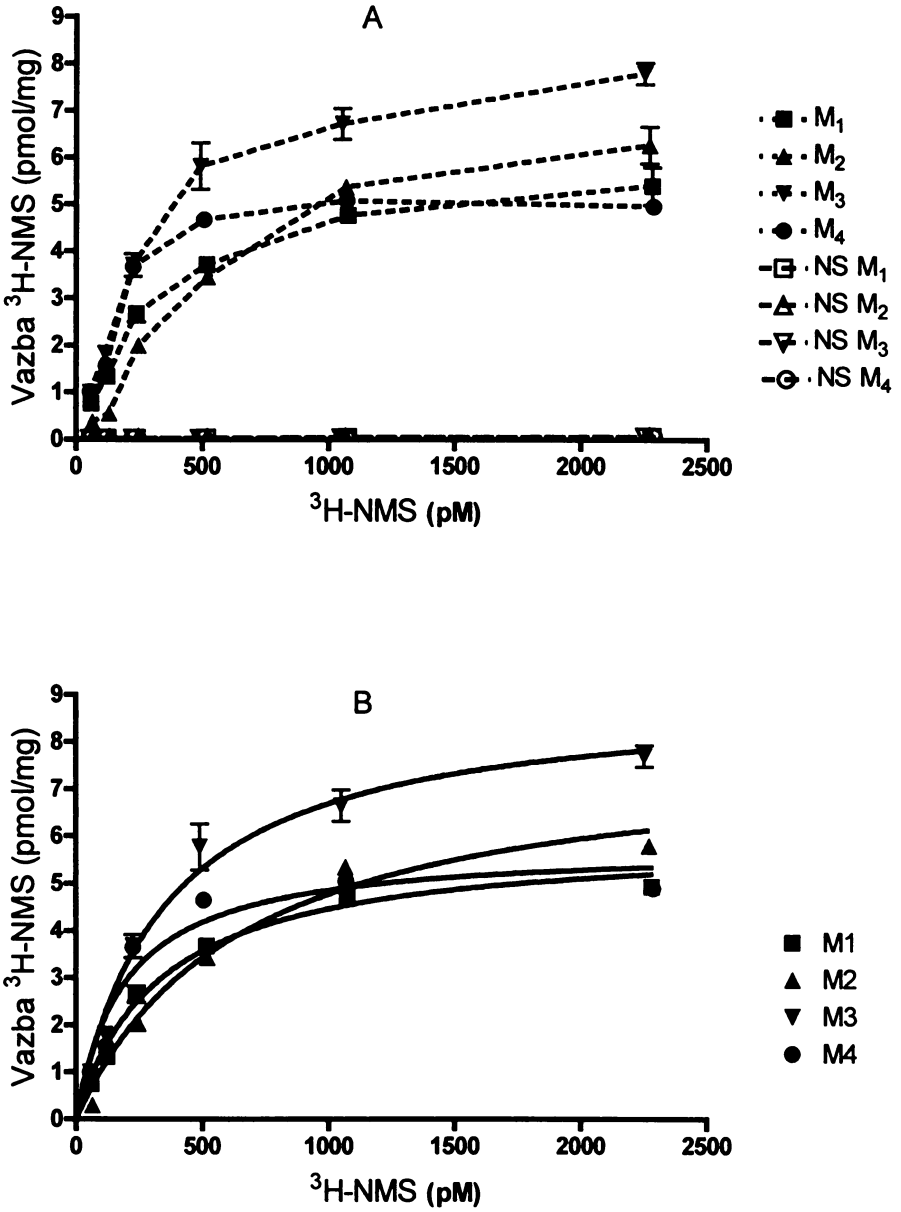
Pro charakterizaci muskarinových receptorů podtypu M_{1-4} exprimovaných v plasmatické membráně CHO buněk bylo využito saturačních vazebných pokusů s radioaktivně značeným muskarinovým antagonistou ^{3}H-NMS. Ze specifické vazby ^{3}H-NMS na membrány CHO buněk (obrázek č. 10 B, str. 33), která je rozdílem mezi vazbou celkovou a nespecifickou (obrázek č. 10 A, str. 33), byla stanovena exprese muskarinových receptorů a afinita k ^{3}H-NMS (tabulka č. 2).

Nespecifická vazba (obrázek č. 10 A, str. 33) byla stanovována v přítomnosti saturující koncentrace (12,5 μM) neznačeného (neselektivního) orthosterického muskarinového antagonisty atropinu. Velikost nespecifické vazby byla velmi nízká a pohybovala se v rozmezí 0,38-1,25 % celkové vazby.

Úroveň exprese M_1, M_3 a M_4 receptorů u jednotlivých preparátů membrán byla přibližně stejná, zatímco u M_2 receptorů kolísala. Afinita jednotlivých podtypů muskarinových receptorů k ^{3}H-NMS klesala ve směru $M_4 > M_3 = M_1 > M_2$.

Tabulka č. 2: Parametry vazby ^{3}H-NMS na M_1-M_4 muskarinové receptory exprimované v membránách CHO buněk. Afinita ^{3}H-NMS je vyjádřena jako rovnovážná disociační konstanta (Kd, pM) a exprese receptorů (maximální vazba) v pmol/mg membránových proteinů. Výsledky jsou uvedeny jako rozpětí hodnot získaných z nejméně dvou nezávislých pokusů v kvadruplikátech.

	M1	M2	M3	M4
exprese receptorů (pmol/mg proteinu)	5,23 - 5,56	1,2 - 7,89	9,03 - 9,31	5,80 - 6,76
Kd (pM)	334,8 - 499,8	454,2 - 652,4	349,1 - 459,3	157,9 -194,1



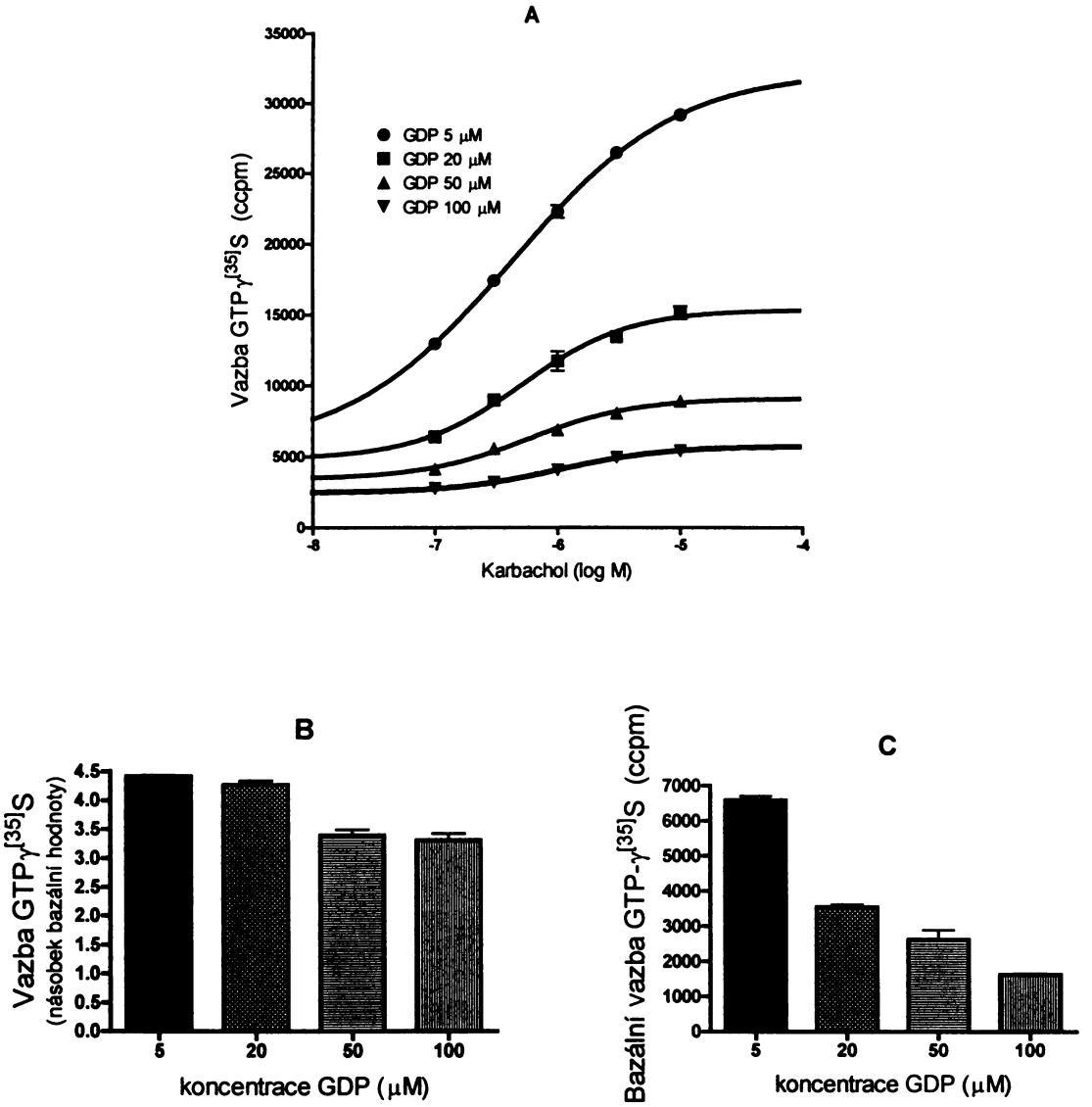
Obrázek č. 10: Vazba ^{3}H-NMS na membrány CHO buněk, exprimující M_{1-4} muskarinové receptory (reprezentativní pokus). **A**: Celková (plné symboly) a nespecifická (NS, prázdné symboly) vazba ^{3}H-NMS v závislosti na koncentraci značeného ligandu (osa x, pM) je vyjádřena v pikomolech navázaného ligandu na miligram membránových proteinů (osa y). **B**: Specifická vazba ^{3}H-NMS, která je stanovena jako rozdíl mezi celkovou a nespecifickou vazbou, je proložena rovnicí saturační křivky (viz. kapitola 10.4., str. 30). Parametry vazby jsou uvedeny v tabulce č. 2, str. 32.

11.2. Optimalizace podmínek pro stanovování stimulace vazby GTPγ[35]S na membrány CHO buněk

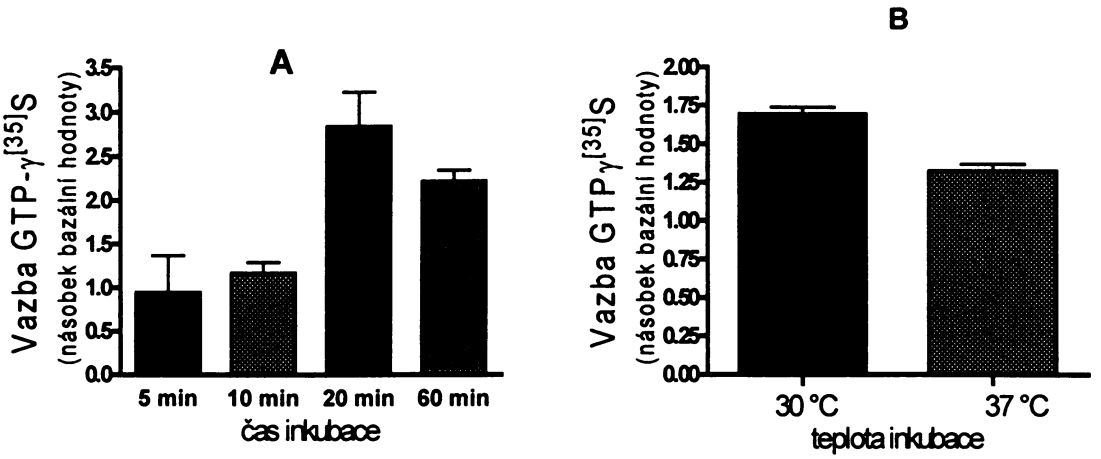
Aktivace G-proteinů s muskarinovými receptory byla měřena jako nárůst vazby radioaktivně značeného nehydrolyzovatelného analogu guanosintrifosfátu guanosin-5'-γ[35S]thiotrifosfátu (GTPγ[35]S) na membrány připravené z CHO M_{1-4} buněk po stimulaci muskarinovým orthosterickým agonistou karbacholem, který je nehydrolyzovatelným analogem přirozeného agonisty acetylcholinu.

Nejprve byly optimalizovány podmínky pro stanovování vazby GTPγ[35]S na membrány s cílem najít podmínky pro co nejlépe měřitelnou odpověď. Tyto pokusy byly provedeny na membránách exprimujících M_2 a M_1 receptory jako zástupcích sudých a lichých podtypů. Výsledky pokusů jsou demonstrovány v obrázcích (č. 11-15, str. 35-37). Optimalizován byl vhodný poměr koncentrací GDP ku GTPγ[35]S, který se liší z důvodu odlišné kinetiky aktivace preferenčních G-proteinů */DeLapp a spol., 1999/* u lichých a sudých podtypů muskarinových receptorů, doba a teplota inkubace s radioligandem a s ohledem na používanou techniku oddělování značených membrán od nenavázaného radioligandu rychlou vakuovou filtrací bylo rovněž nutno stanovit minimální množství membrán, nutné pro spolehlivé a reprodukovatelné měření.

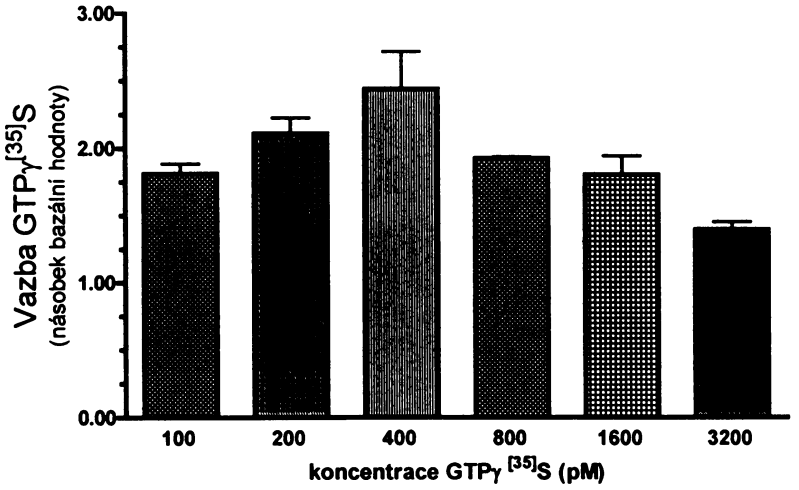
Bazální vazba GTPγ[35]S (v nepřítomnosti agonisty) se podle předpokladu snižovala se zvyšující se koncentrací GDP u membrán exprimujících sudý (obrázek č. 11 C, str. 35) i lichý (obrázek č. 15 B, str. 37) podtyp muskarinového receptoru. Nejvýhodnější poměr signál/šum karbacholem stimulované vazby 500 pM GTPγ[35]S u membrán exprimujících M_2 receptory byl zjištěn při 5 a 20 μM GDP (obrázek č. 11 A, B, str. 35) a u membrán exprimujících M_1 receptory při 1 μM GDP (obrázek č. 15 A, str. 37). Zvýšení vazby GTPγ[35]S karbacholem bylo dobře měřitelné po dvacetiminutové inkubaci a další prodloužení inkubace již k dalšímu zvýšení nevedlo (obrázek č. 12 A, str. 36). Větší zvýšení stimulované vazby u membrán exprimujících M_2 receptory bylo zjištěno po inkubaci při 30 °C než po inkubaci při 37 °C (obrázek č. 12 B, str. 36). Nejvýhodnější poměr signál/šum karbacholem stimulované vazby GTPγ[35]S při fixní 50 μM koncentraci GDP byl zjištěn při 400 pM GTPγ[35]S (obrázek č. 13, str. 36). Spolehlivé měření karbacholem stimulované vazby GTPγ[35]S bylo zjištěno při koncentracích proteinů 3 μg na vzorek a vyšších (obrázek č. 14, str. 37). Optimální podmínky vybrané pro stanovování stimulované vazby GTPγ[35]S na membrány, které byly použity v dalších pokusech, jsou shrnuty v (tabulce č. 3, str. 38).



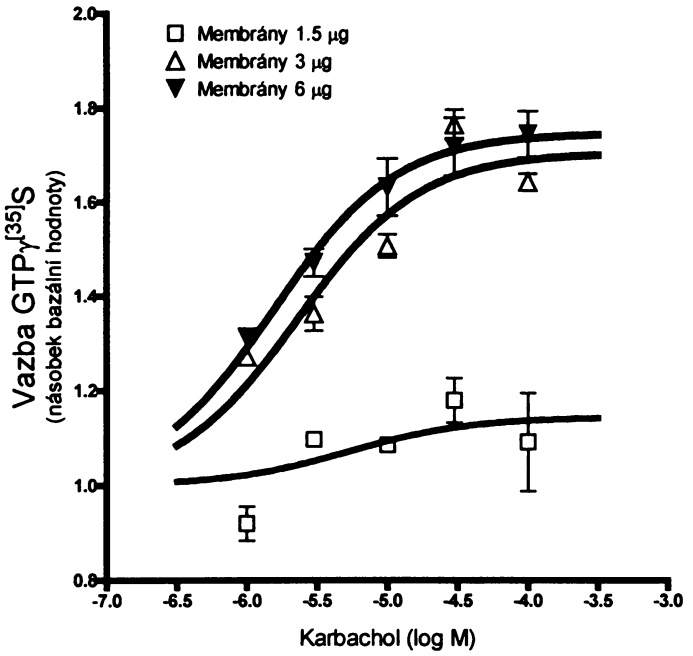
Obrázek č. 11: Vliv koncentrace GDP na stimulaci vazby GTPγ[35]S karbacholem na membrány exprimující M_2 receptor. **A:** Membrány (6 μg proteinů) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ[35]S s různými koncentracemi GDP (5 - 100 μM, symboly jsou označeny v obrázku). Vazba GTPγ[35]S byla stimulována karbacholem (osa x; log M) a je vyjádřena v ccpm (osa y). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M. stanovení v kvadruplikátu. **B:** Závislost stimulace vazby karbacholem na koncentraci GDP. Vypočítaná maximální stimulace vazby GTPγ [35]S z pokusu znázorněném v grafu A je vyjádřena jako násobek bazální vazby v nepřítomnosti karbacholu (osa y). **C:** Závislost bazální vazby GTPγ[35]S (v nepřítomnosti karbacholu) na koncentraci GDP. Hodnoty změřené vazby v pokusu znázorněném v grafu A jsou vyjádřeny v ccpm (osa y).



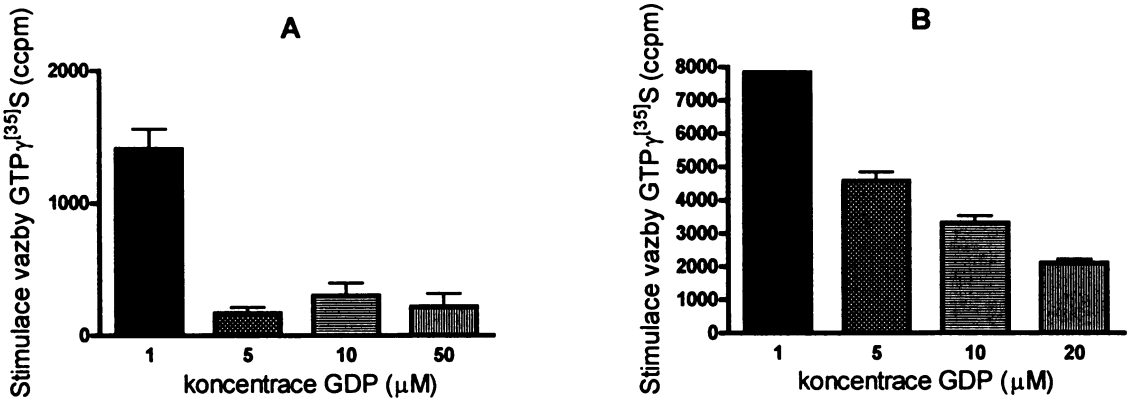
Obrázek č. 12: Vliv doby a teploty inkubace na zvýšení vazby GTPγ[35]S na membrány exprimující M_2 receptor vyvolané karbacholem. **A:** Membrány (4 μg proteinů) byly inkubovány při 30 °C v přítomnosti 1000 pM GTPγ[35]S a 100 μM GDP po dobu 5 - 60 minut. Maximální stimulovaná vazba GTPγ[35]S vyvolaná 100 μM karbacholem je na ose y vyjádřena jako násobek bazální vazby (v nepřítomnosti karbacholu).
B: Membrány byly inkubovány v přítomnosti 100 pM GTPγ[35]S, 5 μM GDP a 100 μM karbacholu po dobu 60 minut při teplotě 30 °C a 37 °C. Karbacholem stimulovaná vazba GTPγ[35]S je na ose y vyjádřena jako násobek bazální vazby (v nepřítomnosti karbacholu). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M stanovení v kvadruplikátu.



Obrázek č. 13: Závislost zvýšení vazby GTPγ[35]S na membrány CHO M_2 buněk karbacholem na koncentraci GTPγ[35]S. Memrány (4 μg proteinů) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 50 μM GDP, 100 μM karbacholu a různých koncentrací (100-3200 pM) GTPγ[35]S. Maximální stimulovaná vazba GTPγ[35]S je na ose y vyjádřena jako násobek bazální vazby (v nepřítomnosti karbacholu). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M. stanovení v kvadruplikátu.



Obrázek č. 14: Stimulace vazby GTPγ[35]S karbacholem na membrány exprimující M_2 receptor za použití různého množství membránových proteinů. Membrány (1,5-3-6 μg proteinů, symboly jsou označeny v obrázku) byly inkubovány 60 minut při 30 °C v přítomnosti 1000 pM GTPγ[35]S a 20 μM GDP. Vazba GTPγ[35]S byla stimulována karbacholem (osa x; log M) a je vyjádřena jako násobek bazální vazby (v nepřítomnosti karbacholu). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M. stanovení v kvadruplikátu.



Obrázek č. 15: Vliv koncentrace GDP na stimulaci vazby GTPγ[35]S karbacholem na membrány exprimující M_1 receptory. Membrány (6 μg proteinů) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v médiu s 500 pM GTPγ[35]S a různými koncentracemi GDP (5-100 μM) v nepřítomnost nebo přítomnosti 10 μM karbacholu. **A:** Stimulace vazby GTPγ[35]S je vyjádřena v ccpm jako nárůst nad bazální vazbu v nepřítomnosti karbacholu (osa y). **B:** Závislost bazální vazby GTPγ[35]S (v nepřítomnosti karbacholu) na koncentraci GDP je vyjádřena v ccpm (osa y).

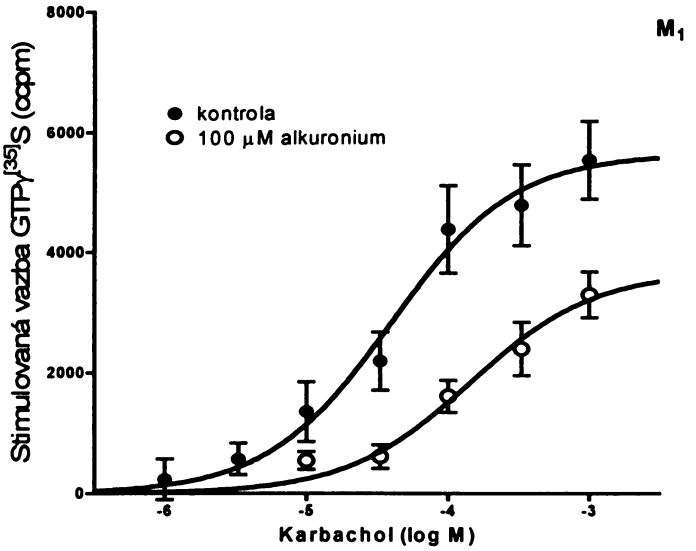
Tabulka č. 3: Optimální podmínky pro vazbu GTPγ[35]S na membrány CHO M_{1-4} buněk, stanovené na základě výsledků optimalizačních pokusů (obrázky č. 13-17).

	M_1, M_3	M_2, M_4
poměr GDP : GTPγ[35]S	1 μM : 500 pM	20 μM : 500 pM
inkubační teplota	30 °C	30 °C
doba inkubace	20 min	20 min
množství membrán	> 4 μg	> 4 μg

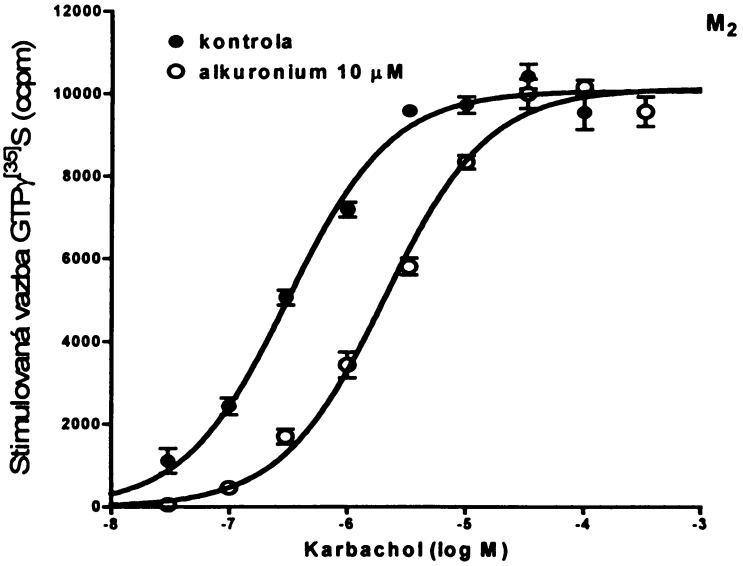
11.3. Vliv alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ[35]S na membrány CHO buněk

Protože bazální hodnoty (v nepřítomnosti karbacholu) vazby GTPγ[35]S na membrány nebyly stejné (tabulka č. 6, str. 49), byla karbacholem stimulovaná vazba hodnocena jako čistý nárůst vazby GTPγ[35]S nad bazální hodnotu.

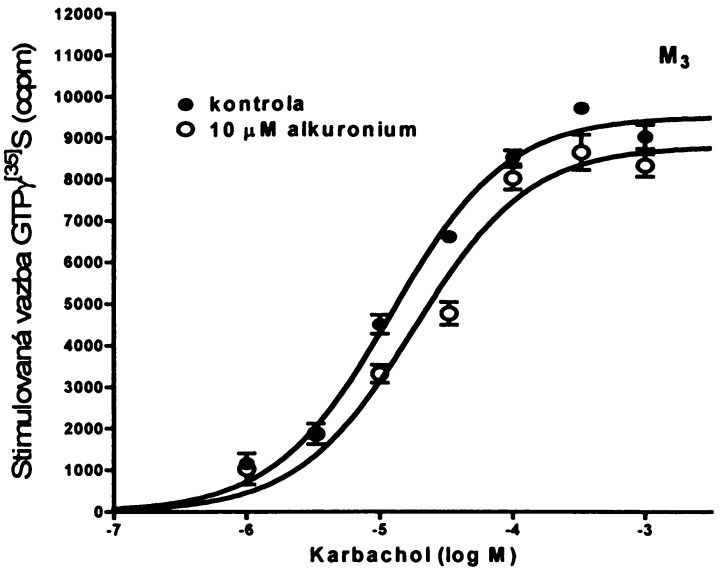
U membrán exprimujících výhradně M_1, M_2 a M_4 receptory došlo působením alkuronia k statisticky významnému zvýšení EC_{50} pro karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ[35]S (3,9 x; 8,0 x; 5,1 x), zatímco u membrán exprimujících M_3 receptory působení alkuronia vliv nemělo (obrázky č. 16-19, str. 39, 40 a tabulky č. 4 a 7, str. 41 a 50). Zvýšení EC_{50} bylo u membrán exprimujících M_1 a M_4 receptory doprovázeno výrazným snížením Emax (maximální stimulace) na 64 % a 94 % kontrolních hodnot (tabulka č. 4, str. 41). U membrán exprimujících M_2 a M_3 receptory nemělo alkuronium na hodnotu Emax vliv.



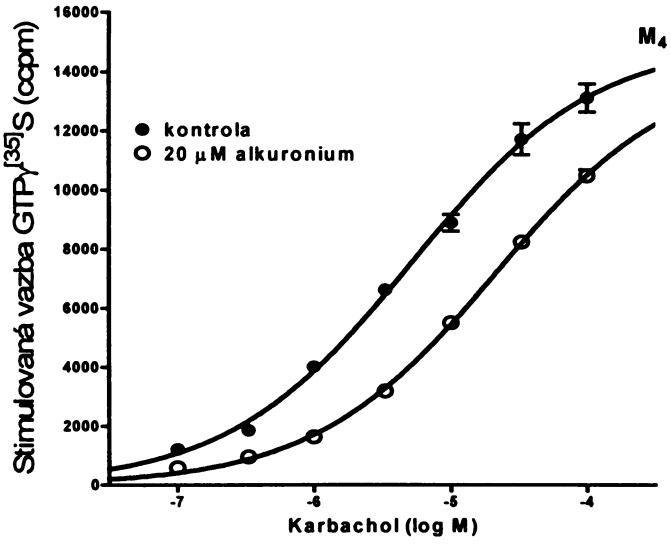
Obrázek č. 16: Vliv alkuronia na vazbu GTPγ[35]S na membrány CHO M_1 buněk *(reprezentativní pokus).* Membrány (10 μg proteinů) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ[35]S, 1 μM GDP, různých koncentrací karbacholu (osa x; log M) v kontrolních podmínkách (plné symboly) nebo v přítomnosti 100 μM alkuronia (prázdné symboly). Vazba GTPγ[35]S stimulovaná karbacholem je vyjádřena jako čistý vzestup vazby v ccpm (osa y) nad bazální hodnotu (kontrolní podmínky: 9802 ± 386; v přítomnosti alkuronia: 9452 ± 235 ccpm). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M stanovení v kvadruplikátu.



Obrázek č. 17: Vliv alkuronia na vazbu GTPγ[35]S na membrány CHO M_2 buněk *(reprezentativní pokus).* Membrány (6,3 μg proteinu) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ[35]S, 20 μM GDP, různých koncentrací karbacholu (osa x; log M) v kontrolních podmínkách (plné symboly) nebo v přítomnosti 10 μM alkuronia (prázdné symboly). Vazba GTPγ[35]S stimulovaná karbacholem je vyjádřena jako čistý vzestup vazby v ccpm (osa y) nad bazální hodnotu (kontrolní podmínky: 3031 ± 359; v přítomnosti alkuronia: 2450 ± 77 ccpm). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M stanovení v kvadruplikátu.



Obrázek č. 18: Vliv alkuronia na vazbu GTPγ[35]S na membrány CHO M_3 buněk *(reprezentativní pokus).* Membrány (9 μg proteinu) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ[35]S, 1 μM GDP, různých koncentrací karbacholu (osa x; log M) v kontrolních podmínkách (plné symboly) nebo v přítomnosti 10 μM alkuronia (prázdné symboly). Vazba GTPγ[35]S stimulovaná karbacholem je vyjádřena jako čistý vzestup vazby v ccpm (osa y) nad bazální hodnotu (kontrolní podmínky: 8003 ± 212; v přítomnosti alkuronia: 7332 ± 213 ccpm). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M stanovení v kvadruplikátu.



Obrázek č. 19: Vliv alkuronia na vazbu GTPγ[35]S na membrány CHO M_4 buněk *(reprezentativní pokus).* Membrány (8 μg proteinů) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ[35]S, 1 μM GDP, různých koncentrací karbacholu (osa x; log M) v kontrolních podmínkách (plné symboly) nebo v přítomnosti 20 μM alkuronia (prázdné symboly). Vazba GTPγ[35]S stimulovaná karbacholem je vyjádřena jako čistý vzestup vazby v ccpm (osa y) nad bazální hodnotu (kontrolní podmínky: 2326 ± 242; v přítomnosti alkuronia: 1928 ± 30 ccpm). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M stanovení v kvadruplikátu.

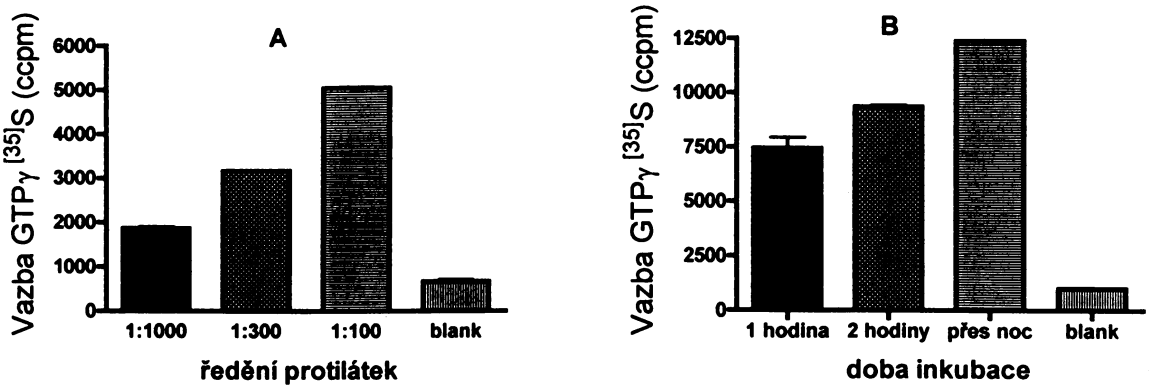
Tabulka č. 4: Vliv alkuronia na vazbu GTPγ[35]S na membrány CHO M_{1-4} buněk stimulovanou karbacholem. Souhrn sledovaných parametrů EC_{50} (μM) a Emax (ccpm/μg proteinu) karbacholem stimulované vazby GTPγ[35]S na membrány CHO M_{1-4} buněk v kontrolních podmínkách a přítomnosti alkuronia. Uvedené hodnoty jsou průměry ± S.E.M. minimálně ze tří nezávislých pokusů provedených v kvadruplikátech. Reprezentativní pokusy jsou znázorněny na obrázcích 16-19, str. 39-40. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; statisticky významně odlišné od kontrol podle párového t-testu.

	EC_{50} (μM)		Emax (ccpm/μg proteinů)	
receptor	**kontrola**	**alkuronium**	**kontrola**	**alkuronium**
M1	31,37 ± 6,32	127,60 ± 36,92*	978 ± 66	625 ± 14*
M2	0,28 ± 0,06	2,61 ± 0,48**	1629 ± 158	1704 ± 139
M3	32,51 ± 11,03	27,79 ± 6,99	1536 ± 243	1266 ± 151
M4	3,98 ± 0,96	19,05 ± 3,01**	1575 ± 159	1479 ± 156*

11.4. Optimalizace podmínek pro imunoprecipitaci α podjednotek označených GTPγ [35]S pomocí specifických protilátek a Protein-A agarosy

Ke zjištění vlivu alkuronia na aktivaci jednotlivých G-proteinů muskarinovými receptory jak preferenčními tak nepreferenčními bylo nutné odlišit vazbu GTPγ[35]S na α podjednotky jednotlivých G-proteinů. K tomuto účelu byla využita metoda imunoprecipitace pomocí specifických protilátek a izolace komplexů α podjednotka/protilátka pomocí Protein-A agarosy a filtrace.

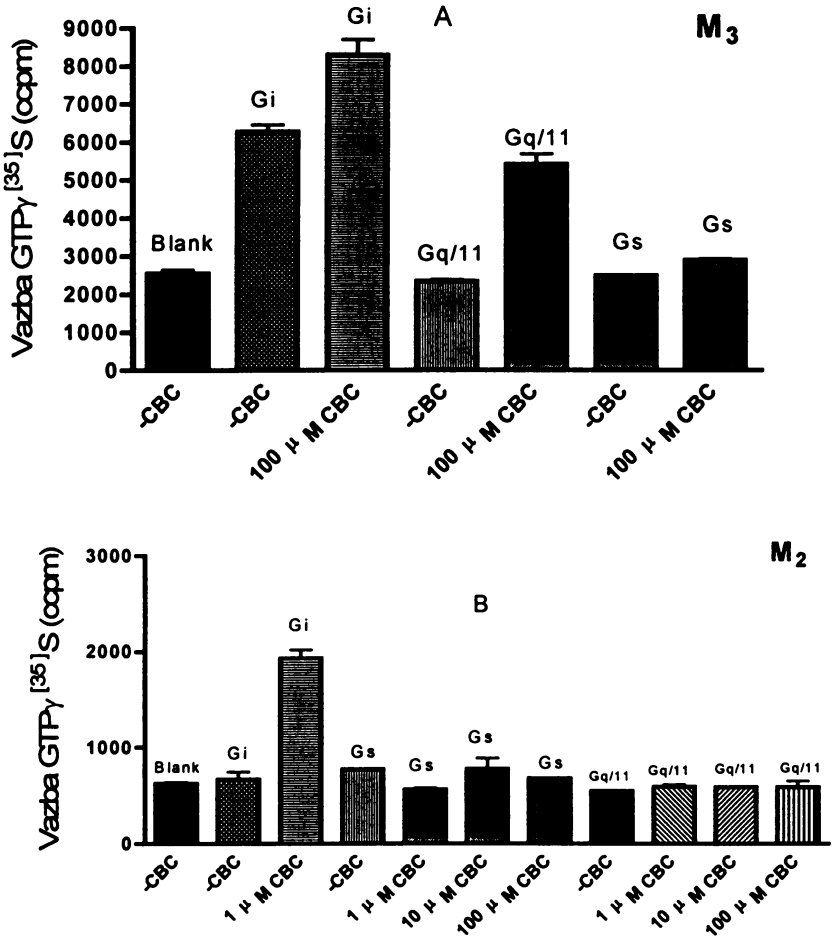
Pro nalezení podmínek k získání spolehlivě měřitelné odpovědi byla optimalizována jak koncentrace protilátek proti α podjednotkám, tak potřebná inkubační doba α podjednotek s protilátkami. Všechny použité protilátky byly od Santa Cruz Biotechnology (USA). Optimalizace byla provedena na α podjednotkách Gi-proteinů v membránách z CHO M_2 buněk, kde byly hledány podmínky k dosažení co nejvyššího výtěžku imunoprecipitace. Pro tento účel byly označeny GTPγ[35]S všechny α podjednotky během inkubace s radioligandem v nepřítomnosti GDP (celková vazba). Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo při vysoké koncentraci protilátek 1:100 a dlouhé době inkubace s protilátkou (přes noc, při 4 °C). Vyšší koncentrace protilátky ani delší doba inkubace nebyly dále zkoumány. Výsledky optimalizačních pokusů ukazuje (obrázek č. 20, str. 42)



Obrázek č. 20: Závislost účinnosti imunoprecipitace Gi α podjednotek na koncentraci použité protilátky a době inkubace. **A:** Membrány CHO M_2 (10 ug proteinů) byly po 60 minutové inkubaci s GTPγ$^{[35]}$S v nepřítomnosti GDP rozpuštěny v 1% Nonidet P-40 a 2 hodiny inkubovány při teplotě místnosti s protilátkami proti Gi α podjednotkám o koncentracích 1:100 - 1:300 - 1:1000. **B:** Membrány CHO M_2 (20 μg proteinů) byly po 20 minutové inkubaci GTPγ$^{[35]}$S rozpuštěny v 1% Nonidet P-40 a po dobu 1 hodiny - 2 hodin (při teplotě místnosti) - přes noc (při 4 °C) inkubovány s protilátkami proti Giα podjednotkám o koncentraci 1:100. V obou případech A i B následovala hodinová inkubace s 5 μl Protein-A agarosy při teplotě místnosti ukončená rychlou vakuovou filtrací. Výtěžek precipitace Gi α podjednotek s navázaným GTPγ$^{[35]}$S je vyjádřen v ccpm (osa y). Blanková hodnota udává nespecifické vychytávání GTPγ$^{[35]}$S ve vzorcích bez přidání protilátky.

11.5. Imunoprecipitace Gi, Gq/11 a Gs α podjednotek označených GTPγ $^{[35]}$S pomocí specifických protilátek a Protein-A agarosy

Prostřednictvím specifických protilátek a Protein-A agarosy byla testována možnost izolace jednotlivých α podjednotek Gi, Gq/11 a Gs G-proteinů z membrán CHO M_{1-4} buněk označených GTPγ$^{[35]}$S v klidu a za stimulace karbacholem. Všechny použité protilátky byly od Santa Cruz Biotechnology (USA). Zvýšení vazby GTPγ$^{[35]}$S po stimulaci karbacholem bylo prostřednictvím imunoprecipitace naměřeno v případě lichých podtypů mAChR $M_{1,3}$ na α podjenotkách jak preferenčních Gq/11, tak nepreferenčních G-proteinů. U sudých podtypů $M_{2,4}$ byl karbacholem stimulovaný nárůst vazby GTPγ$^{[35]}$S na α podjednotky naměřen pouze u preferenčních Gi G-proteinů. Vazba GTPγ$^{[35]}$S na α podjednotky Gs G-proteinů nebyla měřitelná po stimulaci žádného z podtypů zkoumaných muskarinových receptorů. Výsledky imunoprecipitace jednotlivých α podjednotek G-proteinů u membrán exprimujících liché podtypy muskarinových receptorů na membránách z CHO M_3 buněk a sudé podtypy na membránách z CHO M_2 buněk ukazuje (obrázek č. 21 A, B, str. 43)



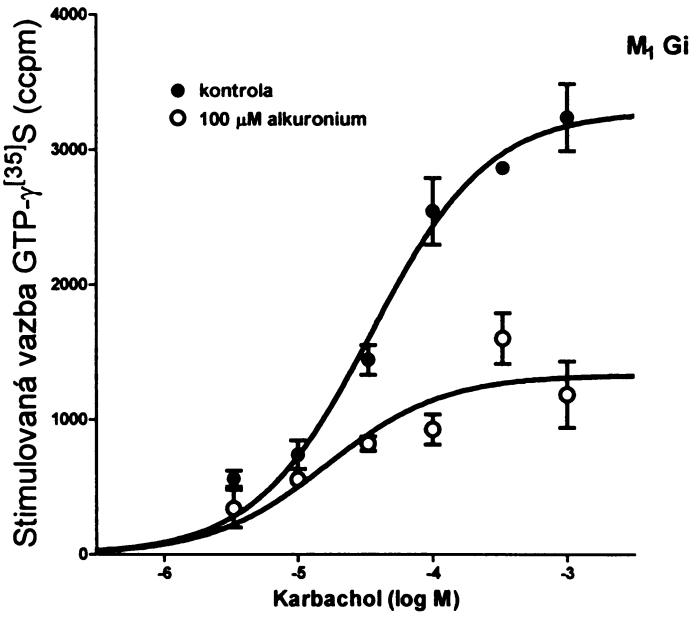
Obrázek č. 21: Imunoprecipitace jednotlivých α podjednotek G-proteinů u membrán z CHO M_3 a CHO M_2. Membrány připravené z CHO M_3 (**A**; 10 μg proteinů) a CHO M_2 (**B**; 6 μg proteinů) buněk byly inkubovány 20 minut v přítomnosti 1μM GDP (A), 20 μM GDP (B), 500 pM GTPγ$^{[35]}$S ± v přítomnosti různých koncentrací karbacholu (CBC), poté byly rozpuštěny v 1% Nonidet P-40 a inkubovány přes noc s protilátkami proti Gi, Gq/11 a Gs α podjednotkám o koncentraci 1:100. Následovala hodinová inkubace s 5 μl Protein-A agarosy ukončená rychlou vakuovou filtrací. Množství imunoprecipitovaných jednotlivých α podjednotek s navázaným GTPγ$^{[35]}$S je vyjádřeno v ccpm (osa y). Blanková hodnota udává nespecifickou vazbu GTPγ$^{[35]}$S ve vzorcích bez přidání protilátky.

11.6. Vliv alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ$^{[35]}$S na α podjenotky G-proteinů v membránách připravených z *CHO M_{1-4} buněk*

Karbacholem stimulovaná vazba GTPγ$^{[35]}$S na α podjednotky Gi a Gq/11 G-proteinů v případě membrán exprimujících liché podtypy receptoru a na α podjednotky Gi G-proteinů v případě membrán exprimujících sudé podtypy receptoru byla měřena, podobně

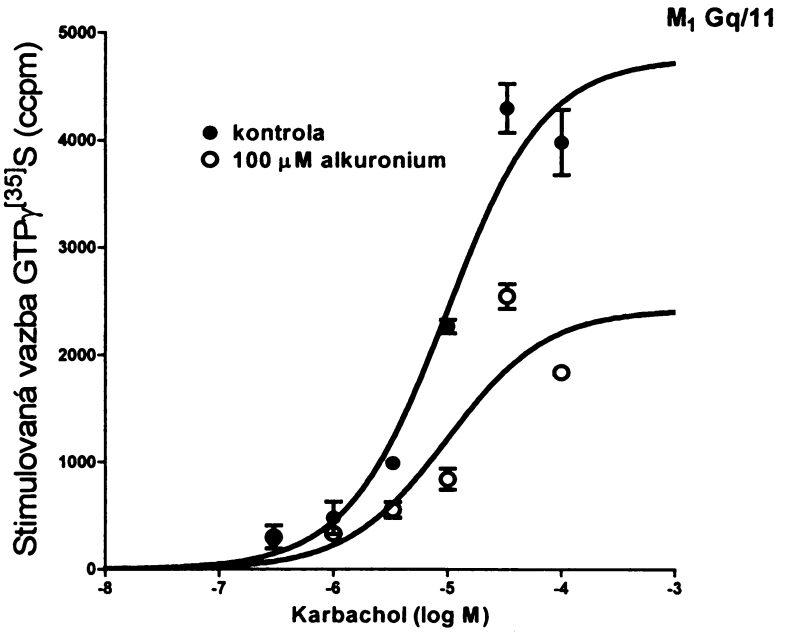
jako při měření na membránách bez rozlišování α podjednotek jednotlivých G-proteinů, jako čistý nárůst vazby GTPγ[35]S nad bazální hodnotu (v nepřítomnosti karbacholu).

Statisticky významný posun EC_{50} pro karbachol směrem k vyšším koncentracím vyvolalo alkuronium pouze u stimulované vazby GTPγ[35]S na α podjednotky Gi G-proteinů u membrán exprimujících M_2 receptory (obrázek č. 24, str. 46 a tabulky č. 5 a 7, str. 48, 50). U ostatních podtypů muskarinových receptorů nemělo alkuronium na EC_{50} pro karbachol u stimulované vazby GTPγ[35]S na α podjednotky Gi G-proteinů vliv (obrázky č. 22, 25, 27, str. 44, 46, 48 a tabulky č. 5 a 7, str. 48, 50). Alkuronium rovněž nemělo vliv na EC_{50} karbacholu pro stimulaci vazby GTPγ[35]S na α podjednotky Gq/11 G-proteinů u membrán exprimujících liché podtypy muskarinových receptorů (obrázky č. 23 a 26, str. 45, 47 a tabulky č. 5 a 7, str. 48, 50). Maximální stimulace vazby GTPγ[35]S karbacholem byla alkuroniem snížena na α podjednotky Gi a Gq/11 G-proteinů u membrán exprimujících M_1 receptory (obrázky č. 22 a 23, str. 44, 45 a tabulka č. 5, str. 48). U membrán exprimujících $M_{2,3,4}$ receptory nemělo alkuronium vliv na Emax karbacholem stimulované vazby GTPγ[35]S na zkoumané α podjednotky (obrázky č. 24-27, str. 46-48 a tabulka č. 5, str. 48).

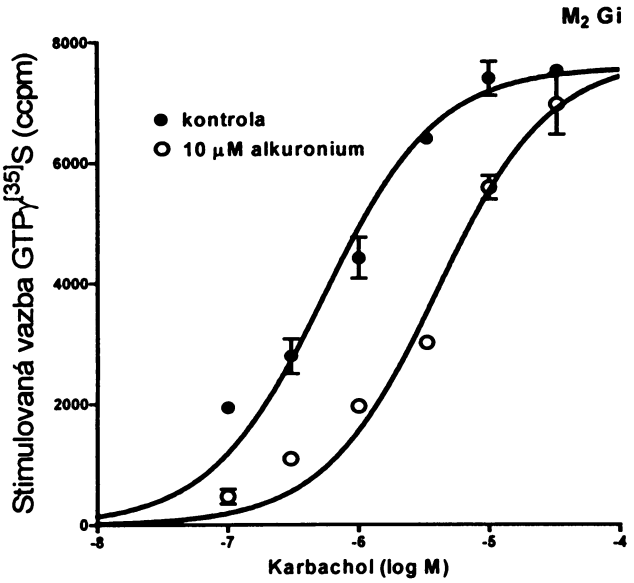


Obrázek č. 22: Vliv alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ[35]S na Gi α podjednotky v membránách CHO M_1 buněk (*reprezentativní pokus).* Membrány (13 µg proteinu) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ[35]S, 1 µM GDP a různých koncentrací karbacholu (osa x; log M) v kontrolních podmínkách (plné symboly) nebo v přítomnosti 100 µM alkuronia (prázdné symboly). Následně byly rozpuštěny v 1% Nonidet P-40 a přes noc inkubovány s protilátkou proti Gi α podjednotkám v ředění 1:100 a poté hodinu s Protein-A agarosou. Vychytané značené α podjednotky byly odděleny rychlou

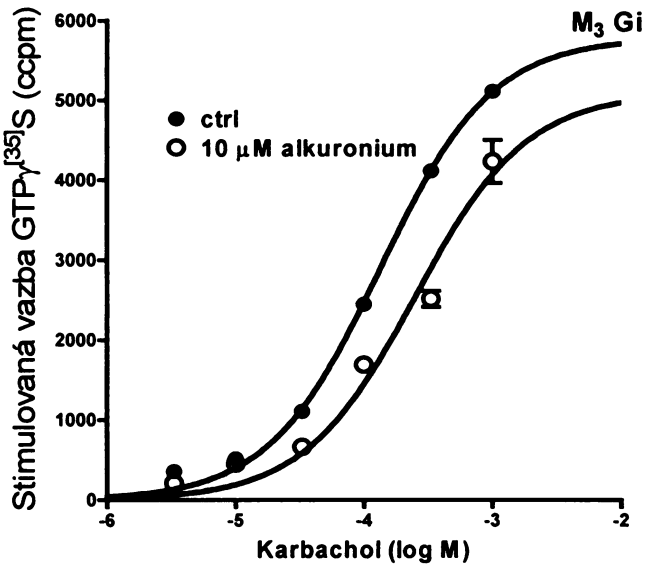
vakuovou filtrací. Vazba GTP-γ $^{[35]}$S stimulovaná karbacholem je vyjádřena jako čistý vzestup vazby v ccpm (osa y) nad bazální hodnotu (kontrolní podmínky: 3574 ± 262; v přítomnosti alkuronia: 3825 ± 65 ccpm). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M. stanovení v triplikátu.



Obrázek č. 23: Vliv alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ$^{[35]}$S na Gq/11 α podjednotky v membránách CHO M_1 buněk *(reprezentativní pokus)*. Membrány (9 µg proteinu) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ$^{[35]}$S, 1 µM GDP a různých koncentrací karbacholu (osa x; log M) v kontrolních podmínkách (plné symboly) nebo v přítomnosti 100 µM alkuronia (prázdné symboly). Následně byly rozpuštěny v 1% nonidet P-40 a přes noc inkubovány s protilátkou proti Gq/11 α podjednotkám v ředění 1:100 a poté hodinu s Protein-A agarosou. Vychytané značené α podjednotky byly odděleny rychlou vakuovou filtrací. Vazba GTPγ$^{[35]}$S stimulovaná karbacholem je vyjádřena jako čistý vzestup vazby v ccpm (osa y) nad bazální hodnotu (kontrolní podmínky: 1815 ± 236; v přítomnosti alkuronia: 1610 ± 29 ccpm). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M. stanovení v triplikátu.

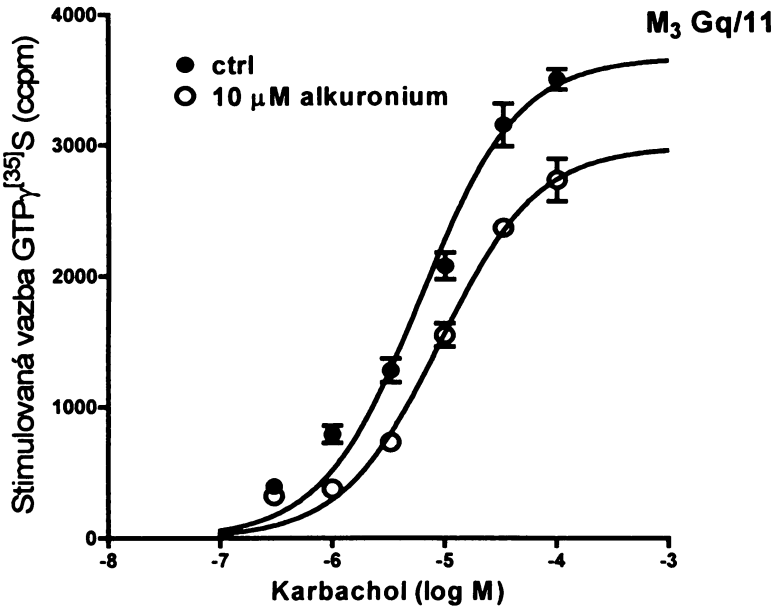


Obrázek č. 24: Vliv 10 μM alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ[35]S na Gi α podjednotky v membránách CHO M_2 buněk *(reprezentativní pokus)*. Membrány (13 μg proteinu) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ[35]S, 20 μM GDP a různých koncentrací karbacholu (osa x; log M) v kontrolních podmínkách (plné symboly) nebo v přítomnosti 100 μM alkuronia (prázdné symboly). Následně byly rozpuštěny v 1% nonidet P-40 a přes noc inkubovány s protilátkou proti Gi α podjednotkám v ředění 1:100 a poté hodinu s Protein-A agarosou. Vychytané značené α podjednotky byly odděleny rychlou vakuovou filtrací. Vazba GTPγ[35]S stimulovaná karbacholem je vyjádřena jako čistý vzestup vazby v ccpm (osa y) nad bazální hodnotu (kontrolní podmínky: 2120 ± 32; v přítomnosti alkuronia: 1522 ± 164 ccpm). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M. stanovení v triplikátu.

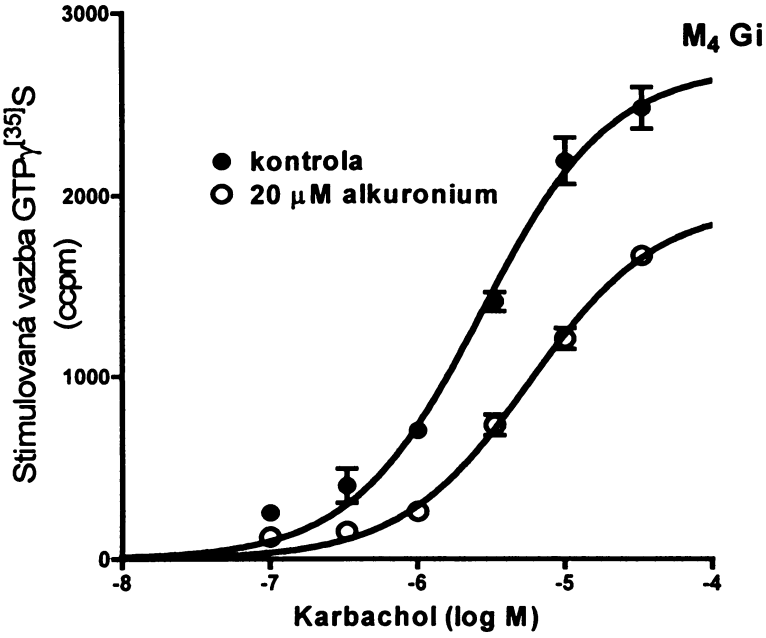


Obrázek č. 25: Vliv 10 μM alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ[35]S na Gi α podjednotky v membránách CHO M_3 buněk *(reprezentativní pokus)*. Membrány (7 μg proteinu) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ[35]S, 1 μM GDP a různých koncentrací karbacholu (osa x;

log M) v kontrolních podmínkách (plné symboly) nebo v přítomnosti 10 μM alkuronia (prázdné symboly). Následně byly rozpuštěny v 1% nonidet P-40 a přes noc inkubovány s protilátkou proti Gi α podjednotkám v ředění 1:100 a poté hodinu s Protein-A agarosou. Vychytané značené α podjednotky byly odděleny rychlou vakuovou filtrací. Vazba GTPγ[35]S stimulovaná karbacholem je vyjádřena jako čistý vzestup vazby v ccpm (osa y) nad bazální hodnotu (kontrolní podmínky: 2237 ± 60; v přítomnosti alkuronia: 2245 ± 60 ccpm). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M. stanovení v triplikátu.



Obrázek č. 26: Vliv 10 μM alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ[35]S na Gq/11 α podjednotky v membránách CHO M_3 buněk *(reprezentativní pokus)*. Membrány (18 μg proteinu) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ[35]S, 1 μM GDP a různých koncentrací karbacholu (osa x; log M) v kontrolních podmínkách (plné symboly) nebo v přítomnosti 10 μM alkuronia (prázdné symboly). Následně byly rozpuštěny v 1% nonidet P-40 a přes noc inkubovány s protilátkou proti Gq/11 α podjednotkám v ředění 1:100 a poté hodinu s Protein-A agarosou. Vychytané značené α podjednotky byly odděleny rychlou vakuovou filtrací. Vazba GTPγ[35]S stimulovaná karbacholem je vyjádřena jako čistý vzestup vazby v ccpm (osa y) nad bazální hodnotu (kontrolní podmínky: 1830 ± 159; v přítomnosti alkuronia: 1833 ± 54 ccpm). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M. stanovení v triplikátu.



Obrázek č. 27: Vliv 20 μM alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ[35]S na Gi α podjednotky v membránách CHO M_4 buněk *(reprezentativní pokus)*. Membrány (13μg proteinu) byly inkubovány 20 minut při 30 °C v přítomnosti 500 pM GTPγ [35]S, 20 μM GDP a různých koncentrací karbacholu (osa x; log M) v kontrolních podmínkách (plné symboly) nebo v přítomnosti 100 μM alkuronia (prázdné symboly). Následně byly rozpuštěny v 1% Nonidet P-40 a přes noc inkubovány s protilátkou proti Gi α podjednotkám v ředění 1:100 a poté hodinu s Protein-A agarosou. Vychytané značené α podjednotky byly odděleny rychlou vakuovou filtrací. Vazba GTPγ[35]S stimulovaná karbacholem je vyjádřena jako čistý vzestup vazby v ccpm (osa y) nad bazální hodnotu (kontrolní podmínky: 1187 ± 58; v přítomnosti alkuronia: 1041 ± 30 ccpm). Jednotlivé body představují průměr ± S.E.M. stanovení v triplikátu.

Tabulka č. 5: Vliv alkuronia na vazbu GTPγ[35]S na α podjednotky Gi a Gq/11 G-proteinů CHO M_{1-4} buněk stimulovanou karbacholem. Souhrn sledovaných parametrů EC_{50} (μM) a Emax (ccpm/μg proteinu) karbacholem stimulované vazby GTPγ[35]S na α podjednotky Gi a Gq/11 G-proteinů v kontrolních podmínkách a přítomnosti alkuronia jsou průměry ± S.E.M hodnot minimálně ze tří pokusů provedených v triplikátech. Reprezentativní pokusy jsou znázorněny na obrázcích 24-27. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; statisticky významně odlišné od kontrol podle párového t-testu.

		EC_{50} (μM)		Emax (ccpm/μg)	
receptor	**G-protein**	**kontrola**	**alkuronium**	**kontrola**	**alkuronium**
M1	**Gi**	42,92 ± 5,81	54,07 ± 14,69	335 ± 43	178 ± 34*
	Gq/11	7,62 ± 1,33	8,97 ± 2,13	390 ± 60	190 ± 36**
M2	**Gi**	0,58 ± 0,06	5,89 ± 1,00*	514 ± 39	593 ± 35
M3	**Gi**	109,7 ± 41,0	328,1 ± 176,7	594 ± 199	643 ± 198
	Gq/11	8,38 ± 2,95	12,87 ± 4,68	148 ± 31	131 ± 24
M4	**Gi**	2,29 ± 0,50	5,14 ± 0,74	186 ± 11	161 ± 14

Vliv alkuronia na bazální vazbu GTPγ[35]S (v nepřítomnosti agonisty) jak na membrány, vyjadřující vazbu GTPγ[35]S na všechny podtypy G-proteinů, tak na jednotlivé α podjednotky popisuje tabulka č. 6, str. 49. Snížení bazální vazby v přítomnosti alkuronia bylo zjištěno u membrán exprimujících M_2 a M_4 receptory, α podjednotek Gq/11 G-proteinů u membrán exprimujících M_1 receptory a α podjednotek Gi G-proteinů u membrán exprimujících M_4 receptory.

Tabulka č. 6: Vliv alkuronia na bazální vazbu GTPγ[35]S na membrány a α podjednotky Gi a Gq/11 G-proteinů CHO M_1-M_4 buněk. Hodnoty bazální vazby GTPγ[35]S na membrány a α podjednotky Gi a Gq/11 G-proteinů v kontrolních podmínkách a přítomnosti alkuronia jsou průměry ± S.E.M hodnot z (n) nezávislých pokusů provedených minimálně v triplikátech. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; signifikantně odlišné od kontrol podle párového t-testu.

Receptor		Bazální vazba GTPγ[35]S (ccpm/μg proteinu)		Změna bazální vazby GTPγ[35]S (násobek)	(n)
		kontrola	alkuronium		
M1	membrány	1071 ± 46	994 ± 24	0,90 ± 0,02	3
	Gi	329 ± 29	311 ± 19	1,00 ± 0,04	4
	Gq/11	194 ± 10	170 ± 8*	0,90 ± 0,01	3
M2	membrány	552 ± 31	444 ± 36**	0,80 ± 0,03	4
	Gi	147 ± 10	128 ± 9	0,90 ± 0,08	3
M3	membrány	1087 ± 101	952 ± 100	0,90 ± 0,05	3
	Gi	286 ± 59	283 ± 67	1,00 ± 0,04	3
	Gq/11	78 ± 16	81 ± 16	1,00 ± 0,02	3
M4	membrány	255 ± 20	220 ± 13*	0,90 ± 0,02	3
	Gi	111 ± 11	97 ± 11*	0,90 ± 0,03	3

Shrnutí výsledků vlivu saturující koncentrace alkuronia (pro M_1 100 μM, M_2 a M_3 10 μM a M_4 20 μM) na EC_{50} aktivace G-proteinů jednotlivými podtypy muskarinových receptorů po stimulaci agonistou karbacholem je uvedeno v (tabulce č. 7., str. 50). Posuny hodnot EC_{50} pro vazbu GTPγ[35]S jak na membrány, vyjadřující vazbu GTPγ[35]S na všechny podtypy G-proteinů, tak na jednotlivé α podjednotky jednotlivých G-proteinů, jsou srovnány s faktory kooperativity vazby mezi alkuroniem a karbacholem, stanovenými na srovnatelných membránových preparátech *Jakubíkem a spol. /1997/.*

Tabulka č. 7: Srovnání alosterického účinku alkuronia na afinitu jednotlivých podtypů muskarinových receptorů pro karbachol a jeho schopnosti aktivovat G-proteiny. Snížení afinity karbacholu k jednotlivým podtypům muskarinového receptoru v přítomnosti alkuronia (zvýšení rovnovážné disociační konstanty) je vyjádřeno jako násobek zvýšení rovnovážné disociační konstanty. Změny afinity karbacholu, které byly změřeny na membránách připravených z CHO M_1-M_4 buněk, jsou převzaty */Jakubík a spol., 1997/*. Změny EC_{50} karbacholu pro aktivaci všech přítomných G-proteinů a podtříd Gi a Gq/11 G-proteinů jednotlivými podtypy muskarinových receptorů vyvolané alkuroniem jsou vyjádřeny jako násobky kontrolních hodnot v nepřítomnosti alkuronia. #, statistická významnost viz tabulky č. 4 a 5, str. 41 a 48.

receptor	**zvýšení EC_{50} karbacholu pro stimulaci vazby $GTP\gamma^{[35]}S$ (násobek)**			**zvýšení K_d karbacholu (násobek)** */Jakubík a spol., 1997/*
	membrány	**Gi**	**Gq/11**	
M_1	3,9 ± 0,9 #	1,3 ± 0,8	1,2 ± 0,2	3,1
M_2	8,0 ± 1,4 #	10,5 ± 3,1 #	-	9,5
M_3	1,0 ± 0,4	2,7 ± 0,9	1,5 ± 0,0	9,9
M_4	5,1 ± 0,9 #	2,7 ± 1,4	-	2,9

12. Diskuze

Jak ukazují dřívější studie */Hilf a spol., 1989, Lazareno a Birdsall, 1993, Offermanns a spol., 1994, Burford a spol., 1995, Jakubík a spol., 1996/*, může být jako funkční stanovení aktivace receptorů a jejich signálních drah v buňkách i tkáních sledováno prostřednictvím agonistou stimulované vazby $GTP\gamma^{[35]}S$ (nehydro-lyzovatelného analogu GTP) na buněčné membrány s využitím techniky rychlé filtrace. Tímto způsobem je monitorována výměna nukleotidů na α podjednotkách G-proteinů, tedy jejich aktivace, při přenosu signálu přes membránu po navázání agonisty. Výhodou tohoto funkčního stanovení je, že výměna nukleotidů je v kaskádě událostí při přenosu signálu velmi časný krok, který je málo ovlivňován ostatními buněčnými procesy */Milligan, 2003/*, a lze ho sledovat i na membránovém preparátu při dobře definovaných podmínkách.

Cílem mé práce bylo zjistit, zda a jak alosterický modulátor muskarinových receptorů alkuronium, který vykazuje v kombinaci s použitým muskarinovým orthosterickým agonistou karbacholem u zkoumaných podtypů muskarinových receptorů negativní kooperativitu (tj. snižuje afinitu receptoru pro karbachol) */Jakubík a spol., 1997/*, ovlivňuje jejich spřahování s G-proteiny (aktivaci signálních drah). Nejzajímavějším nálezem této práce je zjištění, že popsané 3-10ti násobné alosterické snížení afinity vazby karbacholu (zvýšení rovnovážné disociační konstanty K_d, tj. koncentrace karbacholu potřebné pro poloviční saturaci receptorů) pro M_1, M_2 a M_4 receptory v membránovém preparátu je doprovázeno předpokládaným srovnatelným zvýšením EC_{50} (zvýšením koncentrace karbacholu potřebné pro dosažení poloviny maximálního účinku) pro stimulaci vazby $GTP\gamma^{[35]}S$ na membrány, zatímco téměř desetinásobné snížení afinity karbacholu pro M_3 receptory alkuroniem nemá na EC_{50} stimulace vazby $GTP\gamma^{[35]}S$ vliv (tabulka č. 7, str. 50).

Pro zvýšení exprese vnesených podtypů muskarinových receptorů jsme stabilně transfekované CHO buňky pěstovali v přítomnosti butyrátu */Dion a spol., 1997/* (viz kapitola 10.1 str. 27). Pomocí saturačních vazebných pokusů s radioaktivně značeným muskarinovým antagonistou ^{3}H-NMS jsme proto ověřovali úroveň jejich exprese v plazmatické membráně a afinitu k ^{3}H-NMS. Úroveň exprese receptorů byla u všech čtyř zkoumaných podtypů poměrně vysoká (tabulka č. 2, str. 32). V případě M_1, M_3 a M_4 receptorů byla u různých preparátů přibližně stejná, zatímco u M_2 receptorů se v jednotlivých preparátech výrazně lišila. Nejnižší afinitu pro ^{3}H-NMS jsme nalezli u podtypu M_2, afinity pro M_1 a M_3 byly srovnatelné a nejvyšší afinitu jsme pozorovali u podtypu M_4 (tabulka č. 2, str. 32). Tento vazebný profil je dobře srovnatelný se studií na

membránách z CHO M_{1-4} buněk provedenou *Jakubíkem a spol. /1997/*, kde byla nejnižší afinita k ^{3}H-NMS zjištěna rovněž u M_2 receptorů a vyšší srovnatelná afinita u ostatních tří podtypů. Je tedy nepravděpodobné, že nepřítomnost účinku alkuronia na karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ$^{[35]}$S u membrán exprimujících M_3 receptory byla způsobena odlišnými vazebnými vlastnostmi orthosterického vazebného místa nebo stupněm exprese M_3 receptoru. Zvýšení EC_{50} karbacholu pro stimulaci vazby GTPγ$^{[35]}$S jsme pozorovali na membránách se srovnatelně vysokou (M_1 a M_4) i nepravidelnou a nižší (M_2) expresí receptorů.

Nevýhodou membránového preparátu při srovnání s intaktními buňkami je, že alkuronium, které neprochází buněčnou membránou, může působit i z vnitřní strany membrány a tak nespecificky přímo vyvolávat nebo ovlivňovat aktivaci G-proteinů. Možnost nespecifického působení alkuronia přímo na G-proteiny však nesouhlasí s pozorovanými změnami bazální vazby GTPγ$^{[35]}$S v přítomnosti alkuronia, které by v případě nespecifického působení měly být u všech preparátů stejné. V případě membrán exprimujících M_2 a M_4 receptory však alkuronium statisticky významně snižovalo bazální vazbu, kdežto v případě membrán exprimujících M_1 a M_3 receptory nemělo vliv. Tento rozdíl mezi membránami exprimujícími sudé a liché podtypy lze vysvětlit snížením konstitutivní aktivity sudých podtypů receptorů */Jakubík a spol., 1995/* alkuroniem, ale ne jeho přímým působením na G-protein, které by se muselo projevit u všech preparátů. Toto vysvětlení podporuje i nález statisticky významného snížení bazální vazby na Gi α podjednotku u membrán, které exprimují M_4 receptor (tabulka č. 6, str. 49).

Sledováním karbacholem stimulované vazby GTPγ$^{[35]}$S na buněčné membrány monitorujeme aktivaci všech membránových G-proteinů, které se spřahují s muskarinovými receptory. Avšak díky vyšší bazální vazbě GTPγ$^{[35]}$S na α podjednotky Gi G-proteinů a jejich vyšší expresi vzhledem k ostatním G-proteinům je významná stimulace ostatních G-proteinů často maskována příspěvkem právě Gi G-proteinů */Milligan, 2003/*. Možnou strategií měření vazby GTPγ$^{[35]}$S na α podjednotky jednotlivých G-proteinů, která byla v pokusech použita, je jejich izolace pomocí imunoprecipitace prostřednictvím specifických protilátek. Použitelnost a spolehlivost tohoto postupu byla potvrzena u různých receptorových modelů */Al-Aoukaty a spol., 1997, Barr a spol., 1997, Fukushima a spol., 1998/* i přímo na modelu muskarinových receptorů exprimovaných v CHO buňkách */Akam a spol., 2001/*. Vazba GTPγ$^{[35]}$S na Gi α podjednotky byla prostřednictvím imunoprecipitace specifickými protilátkami a Protein-A agarosy měřitelná

po stimulaci všech čtyř podtypů muskarinových receptorů, přičemž pro liché podtypy $M_{1,3}$ se jedná o nepreferenční a pro $M_{2,4}$ o preferenční G-protein. V případě Gq/11 se podařilo měřit stimulovanou vazbu pouze prostřednictvím stimulace lichých podtypů muskarinových receptorů (obrázek č. 21, str. 43). Tento výsledek je v souladu s nálezy */Akam a spol., 2001/*, ale v rozporu s průkazem přímého spřahování Gq/11 G-proteinů s M_2 receptory */Jakubík a spol., 2006; Michal a spol., 2007/*. Prokázáno bylo rovněž přímé spřahování muskarinových receptorů s Gs G-proteiny a se stimulací produkce cAMP v intaktních buňkách u sudých i lichých podtypů / *Jakubík a spol., 2006; Michal a spol., 2001 a 2007/*. V našem případě se však u žádného ze čtyř zkoumaných podtypů receptoru detekovat karbacholem stimulovanou vazbu GTPγ$^{[35]}$S prostřednictvím imunoprecipitace nepodařilo (obrázek č. 21, str. 43). Důvodem selhání detekce stimulované vazby GTPγ $^{[35]}$S by mohla být nedostatečná účinnost imunoprecipitace nebo pravděpodobněji je poměr signálu vůči pozadí tak malý, že použitý postup není dostatečně citlivý.

V případě karbacholem stimulované vazby GTPγ$^{[35]}$S na měřené α podjednotky různých G-proteinů jsme statisticky významný posun EC_{50} pozorovali pouze u membrán exprimujících M_2 receptory v případě preferenčních Gi α podjednotek (viz. tabulka č. 5, str. 48). V ostatních případech se EC_{50} v přítomnosti alkuronia nelišily od kontrol. Pravděpodobným vysvětlením může být nižší přesnost oddělování Protein-A agarosy s vychytanými značenými α podjednotkami filtrací, která byla značně ztrátová a tím méně přesná. Filtrace označených membrán byla spolehlivější oproti filtraci agarosy a tudíž je možné, že menší posuny EC_{50}, které jsme očekávali alespoň v případě preferenčních Gi α podjednotek u membrán exprimujících M_4 receptory nebo preferenčních Gq/11 α podjednotek u membrán exprimujících M_1 receptory, nemusely být zaznamenány. Nicméně předpokládaný desetinásobný posun v případě preferenčních Gq/11 nebo nepreferenčních Gi α podjednotek u membrán exprimujících M_3 receptory by byl, podobně jako u Gi α podjednotek u membrán exprimujících M_2 receptory, měřitelný.

V případě membrán exprimujících M_1 a M_4 receptory bylo pozorováno snížení Emax (maximální odpovědi) vazby GTPγ$^{[35]}$S po stimulaci karbacholem. Toto snížení bylo výrazné u membrán exprimujících M_1 receptor jak při měření na membránách (snížení o 36 %), tak i na preferenční Gq/11 (snížení o 47 %) nebo nepreferenční Gi (snížení o 51 %) α podjednotky (tabulky č. 4 a 5, str. 41, 48). U membrán exprimujících M_4 receptory bylo malé, ale statisticky významné snížení patrné pouze u měření na membránách (snížení o 6%). Je pravděpodobné, že se zde jedná o účinek vyšších koncentrací alkuronia.

V pokusech byly použity saturující koncentrace alkuronia pro alosterická vazebná místa na jednotlivých podtypech muskarinového receptoru, které jsou 10 μM pro M_2 a M_3 receptory, 20 μM pro M_4 receptory a 100 μM pro M_1 receptory. Jak je patrné, pozorované změny Emax se ztrácejí se zmenšující se koncentrací alkuronia. Podobné snížení celkové stimulované vazby GTPγ $^{[35]}$S bylo pozorované na membránách CHO M_1 buněk */Birdsall a spol., 1999/* při použití 100 μM a vyšších koncentrací alosterického modulátoru brucinu, jehož struktura je odvozena podobně jako u alkuronia od strychninu.

Výsledky provedených pokusů lze tedy shrnout tak, že alosterický účinek alkuronia na vazebné vlastnosti agonisty karbacholu */Jakubík a spol., 1997/* se u M_3 receptorů liší od jeho vlivu na aktivaci interagujících G-proteinů. Toto pozorování je v souladu s představou, že receptor zaujímá více než jen jednu aktivní a jednu neaktivní konformaci (multiple receptor conformations */Kenakin, 2003, Kobilka, 2007/*). Průkaz odlišného účinku alosterického modulátoru na afinitu vazby agonisty a na aktivaci G-proteinu je důležitý pro testování alosterických modulátorů. Ve farmakologii nachází využití mnoho látek působících jako orthosteričtí agonisté nebo antagonisté muskarinových receptorů. Předpokládané využití alosterických modulátorů muskarinových receptorů na poli farmakologie však skýtá mnoho výhod a mohlo by tak otevřít zcela nové možnosti a přístupy. Klasické vazebné místo jednotlivých podtypů muskarinových receptorů je homologní a je proto velmi obtížné najít podtypově selektivní agonisty. Výhodou alosterických ligandů je právě vysoká podtypová selektivita daného páru alosterický/orthosterický ligand, což dává teoretický základ pro vývoj nových léků, které by na jednotlivých podtypech velmi selektivně zvyšovaly nebo snižovaly afinitu buď pro podtypově neselektivní endogenní nervový přenašeč acetylcholin nebo pro používané exogenní orthosterické ligandy. Další výhoda alosterické modulace přenosu signálu spočívá v tom, že její účinek nezávisí na koncentraci alosterického ligandu, ale na stupni kooperativity. Zvyšování koncentrace alosterického modulátoru nad saturující koncentraci jeho účinek na afinitu orthosterického ligandu nezvyšuje a alosterický modulátor je tedy v tomto smyslu nepředávkovatelný. Využití alosterické modulace účinku přirozeného mediátoru acetylcholinu dále poskytuje možnost působení na synapsi pouze v jejím aktivním stavu, což je žádoucí. Pokusy o zvýšení aktivace muskarinových M_1 receptorů u pacientů s Alzheimerovou chorobou prostřednictvím klasických částečně M_1 selektivních agonistů vedou k jejich permanentní aktivaci, což neodpovídá fyziologickému časování synaptické aktivity, a navíc i k rychlejší desensitizaci trvale aktivovaných receptorů.

Vhodný alosterický ligand, který by zvyšoval afinitu M_1 receptoru pro přirozený mediátor acetylcholin, by usnadňoval jejich aktivaci jen v době fyziologického uvolňování acetylcholinu. Získané výsledky ukazují, že při hledání farmakologicky využitelných alosterických modulátorů je nezbytné provádět nejenom vazebné pokusy ke zjištění alosterického ovlivnění afinity klasického ligandu, ale i funkční testy, které charakterizují alosterické ovlivnění účinnosti přenosu signálu přes membránu a lépe tak předpovídají skutečné ovlivnění intracelulárních signálních drah.

13. Shrnutí

V předkládaných pokusech jsem studovala vliv alosterického modulátoru muskarinových receptorů alkuronia na aktivaci G-proteinů v membránách CHO buněk, které selektivně exprimují podtypy muskarinových receptorů M_{1-4}. Koncentrační závislost stimulace vazby GTPγ$^{[35]}$S muskarinovým agonistou karbacholem vykazuje zvýšení EC_{50} v přítomnosti saturující koncentrace alosterického modulátoru muskarinových receptorů alkuronia u membrán exprimujících podtypy muskarinových receptorů M_1, M_2 a M_4. Toto zvýšení EC_{50} (3,9 x u M_1, 8,0 x u M_2 a 5,1 x u M_3 podtypu) odpovídá svou velikostí alosterickému zvýšení rovnovážné disociační konstanty karbacholu alkuroniem, popsaném u M_{1-4} muskarinových receptorů (3,1 x u M_1, 9,5 x u M_2 a 2,9 x u M_4 podtypu *Jakubíkem a spol., /1997/*). V kontrastu s těmito výsledky nemá alkuronium u M_3 podtypu receptoru, přestože vykazuje silnou negativní kooperativitu s karbacholem (zvýšení rovnovážné disociační konstanty 9,9 x */Jakubík a spol., 1997/*), vliv na EC_{50} karbacholem stimulované vazby GTPγ$^{[35]}$S. Alkuronium v souladu s vlivem na EC_{50} u membrán zvyšovalo EC_{50} karbacholu při aktivaci α podjednotky preferenčního Gi G-proteinu u membrán exprimujících M_2 podtyp receptoru (10,5 x), ale nemělo vliv na aktivaci α podjednotek ani preferenčního Gq/11 ani nepreferenčního Gi G-proteinu u membrán exprimujících M_3 podtyp receptoru. Tato pozorování podporují předpoklad existence více aktivních konformací muskarinových receptorů a poukazují na nezbytnost provádění funkčních pokusů, které lépe předpovídají skutečné ovlivnění intracelulárních signálních drah, při hledání alosterických modulátorů vhodných pro případné terapeutické využití.

F: Seznam citované literatury

Akam, E.C., Challiss, R.A., Nahorski, S.R.: Br. J. Pharmacol. 132, 950-958 (2001)

Al-Aoukaty, A., Rolstad, B. a Maghazachi, A.A.: J. Biol.Chem. 272, 31604-31608 (1997)

Ashkenazi, A., Winslow, J.W., Peralta, E.G., Peterson, G.L., Schimerlik, M.I., Capon, D.J., Ramachandran, J.: Science 238, 672 - 675 (1987)

Baldwin, J.M.: EMBO J. 12, 1693-1703 (1993)

Baldwin, J.M.: Curr. Opin. Cell. 6, 180-190 (1994)

Barr, A.J., Brass, L.F., Manning, D.R.: J.Biol. Chem. 272, 2223-2229 (1997)

Birdsall, N.J., Farries, T., Gharagozloo, P., Kobayashi, S., Lazareno, S., Sugimoto, M.: Mol. Pharmacol. 55, 778-786 (1999)

Birdsall, N.J., Lazareno, S., Popham, A., Saldanha, J.: Life Sci. 68, 2517-2524 (2001)

Bonner, T.I., Buckley, N.J., Young A.C., Brann M.R.: Science 237, 527-532 (1987)

Burford, N.T., Tobin, A.B. a Nahorski, S.R.: Eur. J. Pharmacol. 289, 343-351 (1995)

Burford, N.T., Nahorski, S.R.: Biochem. J. 315, 883-888 (1996)

Caulfield, M.P.: Pharmac. Ther. 58, 319-379 (1993)

Clark, A.L., Mitchelson, F.: Br. J. Pharmacol. 58, 323-331 (1976)

DeLapp, N.W., McKinzie, J.H., Sawyer, B.D., Vandergriff, A., Falcone, J., McClure, D., Felder, C.C.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 289, 946-955 (1999)

Dion, L.D., Goldsmith, K.T., Tang, D.C., Engler, J.A., Yoshida, M., Garver, R.I. Jr.: Virology. 231, 201 - 209 (1997)

Dong, G.Z., Kameyama, K., Rinken, A., Haga, T.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 274, 378 - 384 (1995)

Duman, R.S., Nestler, E.J.: Cyclic Nucleotides, v knize Basic neurochemistry, Molecular, cellular and medical aspects, (Siegel, J. ed.) Lippincott-Raven Publishers, New York str.433 - 451 (1999)

Dunlap, J., Brown, J.H.: Mol. Pharmacol. 24, 15-22 (1983)

Ellis, J., Huyler, J., Brann, M.R.: Biochem. Pharmacol. 42, 1927-1932 (1991)

Fukushima, N., Kimura. Y, Chun, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 6151-6156 (1998)

Gilman, A,G.: Annu. Rev. Biochem. 56, 615-649 (1987)

Gnagey, A.L., Seidenberg, M., Ellis, J.: Mol. Pharmacol. 56, 1245-1253 (1999)

Gudermann, T., Nürnberg, B., Schultz, G.: J. Mol. Med. 73, 51-63 (1995)

Hamm, H.E., Gilchrist, A.: Curr. Opin. Cell Biol. 8, 189-196 (1996)

Herve, D., Levi-Strauss, Marey-Semper, M., I.: J. Neurosci. 13, 2237-2248 (1993)

Hilf, G., Gierschik, P. a Jakobs, K.H.: Eur. J. Biochem. 186, 725-731 (1989)

Huang, C.L., Slesinger, P.A., Casey, P.J., Jan, Y.N., Jan L.Y.: Neuron 15, 1133-1143 (1995)

Hulme, E.C. Lu, Z.L., Bee, M.S.: Receptors Channels 9, 215-228 (2003)

Christopoulos, A., Lanzafame, A., Mitchelson, F.: Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 25, 185-194 (1998)

Inglese, J., Koch, W.J., Touhara, K., Lefkowitz, R.: Trends Biochem. Sci. 20, 151-155 (1995)

Jakubík, J., Bačáková, L., EL-Fakahany, E.E., Tuček, S.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 274, 1077-1083 (1995)

Jakubík, J., Bačáková, L., Lisá, V., El-Fakahany, E.E., Tuček, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 8705-8709 (1996)

Jakubík, J., Bačáková, L., El-Fakahany, E.E., Tuček, S.: Mol. Pharmacol. 52, 172-179 (1997)

Jakubík, J., Haga,T., Tuček, S: Mol. Pharmacol. 54, 899-906 (1998)

Jakubík, J., Krejčí, A., Doležal, V.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 313, 688-696 (2005)

Jakubík, J., El-Fakahany, E.E., doležal, V.: Mol.Pharmacol. 70, 656-666 (2006)

Kenakin, T.: Trends. Pharmacol. Sci. 27, 346-354 (2003)

Kenakin, T.: A Pharmacology Primer: Theory, application, and methods. Elsevier Academic press, San Diego (2004)

Kobilka, B.K.: Biochim. Biophys. Acta. 1768, 794-807 (2007)

Krejčí, A., Tuček, S.: Mol. Pharmacol. 60, 761-767 (2001)

Lazareno, S. a Birdsall, N.J.M.: Br. J. Pharmcol. 109, 1120-1127 (1993)

Lazareno, S., Birdsall, N.J.: Mol. Pharmacol. 48, 362-378 (1995)

Lazareno, S., Popham, A., Birdsall, N.J.: Mol. Pharmacol. 58, 194-207 (2000)

Lazareno, S., Popham, A., Birdsall, N.J.: Mol. Pharmacol. 62, 1492-505 (2002)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

Migeon, J.C., Thomas, S.L., Nathanson, N.M.: J. Biol. Chem. 270, 16070-16074 (1995)

Michal, P., Lysíková, M., Tuček, S.: Br. J. Pharmacol. 132, 1217-1228 (2001)

Michal, P., El-Fakahany, E.E., Doležal, V.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 320, 607-614 (2007)

Milligan, G., Parenti, M.,Magee, A.:Trends Biochem. Sci. 20, 181-185 (1995)

Milligan, G.: Trends. Pharmacol. Sci. 24, 87-90 (2003)

Mumby, S.M., Kleuss, C., Gilman, A.G.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 25001-25008 (1994)

Nedoma, J., Tuček, S., Danilov, A.F., Shelkovnikov, S.A.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 236, 219-223 (1986)

Neer, E.J.:Cell 80, 249-257 (1995)

Nestler, E.J., Duman, R.S.: G proteins, v knize Basic neurochemistry, Molecular, cellular and medical aspects, (Siegel, J. ed.) Lippincott-Raven Publishers, New York str. 401 - 414 (1999)

Nürnberg, B., Gudermann, T., Schultz, G.: J. Mol. Med. 73, 123-132 (1995)

Offermanns, S., Wieland, T., Homann, D., Sandmann, J., Bombien, E., Spicher, K., Schultz, G., Jakobs, K.H.: Mol. Pharmacol. 45, 890 - 898 (1994)

Peralta, E.G., Winslow, J.W., Peterson, G., Smith, D.H., Ashkenazi, A., Ramachandran, J., Schimerlik, M.I., Capon, D.J.: Science 236, 600 - 605 (1987)

Peterson, G.L.: Anal.Biochem. 83, 652-660 (1977)

Proška, J., Tuček, S.: Mol Pharmacol 45, 709-717 (1994)

Rando, R.R.: Biochim. Biophys. Acta. 1330, 5-16 (1996)

Rhee, S.G., Choi, K.D.: J. Biol. Chem. 267, 12393-12396 (1992)

Ross, E.M.: Curr. Biol. 5, 107 - 109 (1995)

Schertler, G.F.X., Villa, C., a Henderson, R.: Nature, 362, 770 (1993)

Schneider, T., Igelmund, P., Hescheler, J.: Trends Pharmacol. Sci. 18, 8-11 (1997)

Stockton, J.M., Birdsall, N.J., Burgen, A.S., Hulme, E.C.: Mol. Pharmacol. 23, 551-557 (1983)

Tuček, S., Musílková, J., Nedoma, J., Proška, J., Shelkovnikov, S., Vorlíček, J.: Mol. Pharmacol. 38, 674-680 (1990)

Tuček, S.: Přenos signálu povrchovými membránami buněk, v knize Molekulární biologie a genetika VII. (Kolektiv autorů, Jonák, J. ed.) Pobočka ČSVTS ÚMG AVČR, Praha a Koordinační rada biomedicínské sekce Centra interdisciplinárních studií UK, Praha, str. 187-205 (1995)

Tuček, S., Jakubík, J., Doležal, V., EL-Fakahany, E.E.: J. Physiol. Paris. 92, 241-243 (1998)

Tuček, S., Michal, P., Vlachová, V.: Trends. Pharmacol. Sci. 23, 171-176 (2002)

Vogel, W.K., Mosser, V.A., Bulseco, D.A., Schimerlik, M.I.: J. Biol. Chem. 270, 15485-15493 (1995)

Watson, S., Arkinstall, S.: The G-protein linked receptor FactsBook. Academic Press, London (1994)

Wedegaertner, P., Wilson, P., Bourne, H.R.: J. Biol. Chem. 270, 503-505 (1995)

Wess, J.: Crit. Rev. Neurobiol. 10, 69-99 (1996)

Xie, R., Li, L., Goshima, Y., Strittmater, S.M.: Brain Res. Dev. Brain Res. 87, 77-86 (1995)

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

Jméno a příjmení s adresou	*Číslo OP*	Datum vypůjčení	Poznámka