

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd



Vlivy cholesterolu na dynamiku chování acetylcholinových
muskarinových receptorů buněčné membrány

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Pavel Michal

Hradec Králové, 2010

Poděkování

Rád bych poděkoval především svému školiteli Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. 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 vedoucímu oddělení neurochemie Fyziologického ústavu AV ČR MUDr. Vladimíru Doležalovi, DrSc. a dále pak celému kolektivu oddělení neurochemie a katedry biologických a lékařských věd za vytvoření vynikajících pracovních podmínek, cenné rady a technickou spolupráci.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne: 1.4.2010

.....

Obsah

Obsah	2
Shrnutí	4
Shrnutí anglicky	5
Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	7
1.1. Úvod	8
1.2. Cíl práce	9
2. Teoretická část	
Muskarinové receptory a jejich interakce s G-proteiny	10
2.1. Receptory spřažené s G-proteiny	11
2.2. G-proteiny	15
2.3. Muskarinové receptory	22
2.3.1. Struktura a podtypy muskarinových receptorů	22
2.3.2. Spřažení muskarinových receptorů s G proteiny a efekty	28
2.3.3. Lipidické složení membrány a muskarinové receptory	32
3. Praktická část	
3.1. Biologický materiál a chemikálie	35
3.1.1. Biologický materiál	35
3.1.2. Chemikálie	35
3.1.3. Přístrojové vybavení	36
3.2. Metody	36
3.2.1. Pěstování a sklizení buněk	36
3.2.2. Příprava membrán	37
3.2.3. Ovlivnění obsahu membránového cholesterolu	37
3.2.4. Stanovení proteinů	37
3.2.5. Stanovení obsahu cholesterolu	38
3.2.6. Stanovení metabolické aktivity a buněčné integrity	38
3.2.7. Měření syntézy cAMP	32
3.2.8. Měření produkce inositolfosfátů	40
3.2.9. Měření internalizace receptorů	40

3.2.10. Vazebné pokusy	41
3.2.10.1. Principy měření vazebných vlastností receptorů	41
3.2.10.2. Saturační vazebné pokusy	41
3.2.10.3. Kompetiční vazebné pokusy	43
3.2.10.4. Stanovení rychlosti disociace ligandu	46
3.2.11. Zpracování výsledků	47
3.3. Výsledky	48
3.3.1. Stanovení postupu ovlivnění obsahu cholesterolu v CHO-M ₂ buňkách	48
3.3.2. Časový a koncentrační vliv MBCD a Cholesterol-MBCD	50
3.3.3. Účinek 10 mM MBCD a 2 mM Cholesterol-MBCD na obsah cholesterolu v CHO-M ₂ membránách	54
3.3.4. Vliv cholesterolu na obsah proteinů, metabolickou aktivitu a buněčnou integritu	55
3.3.5. Vliv obsahu cholesterolu na vazebné vlastnosti muskarinových M ₂ receptorů	56
3.3.5.1. Změny afinity a počtu muskarinových M ₂ receptorů	56
3.3.5.2. Ovlivnění vazby karcholu k M ₂ receptorům	59
3.3.5.3. Disociace [³ H]NMS z muskarinových M ₂ receptorů	62
3.3.5.4. Internalizace muskarinových M ₂ receptorů	64
3.3.6. Vliv obsahu cholesterolu na funkční vlastnosti muskarinových M ₂ receptorů	67
3.3.6.1. Syntéza cAMP v CHO-M ₂ buňkách	67
3.3.6.2. Produkce inositolfosfátů v CHO-M ₂ buňkách	71
3.4. Diskuse	75
3.5. Závěr	79
4. Literatura	82
Příloha Chemické vzorce a názvy použitých látek	89

Shrnutí

Muskarinový acetylcholinový M_2 receptor, který byl prvotně identifikován jako hlavní podtyp muskarinového receptoru v srdci se také hojně nachází v centrálním nervovém systému. Přenos signálu receptorem je realizován jednak prostřednictvím α_i podjednotky heterotrimerního G-proteinu, který inhibuje syntézu cAMP a jednak uvolněnými $\beta\gamma$ podjednotkami, které aktivují draselný a inhibují vápníkový kanál. Nicméně, muskarinové M_2 receptory exprimované v CHO buňkách (CHO- M_2) přímo aktivují signální dráhy všech tří hlavních podtypů G-proteinů, tzn. preferenčních $G_{i/o}$ proteinů a v koncentracích agonisty vyšších než je potřebná k inhibici syntézy cAMP aktivují také G_s a $G_{q/11}$ podtypy, které vyvolávají stimulaci syntézy cAMP a akumulaci inositolfosfátů. V našich pokusech jsme zkoumali vliv membránového cholesterolu na aktivaci těchto tří podtypů G-proteinů v CHO- M_2 buňkách nehydrolyzovatelným analogem acetylcholinu karbacholem. Inkubace buněk v přítomnosti methyl- β -cyclodextrinu snížila obsah cholesterolu v celých buňkách o 74% a v membránách připravených z těchto buněk o 39%. Opracování buněk methyl- β -cyclodextrinem saturovaným cholesterolem zvýšilo obsah cholesterolu o 169 % v buňkách a o 137% v membránách. Úbytek obsahu cholesterolu snížil afinitu M_2 receptorů pro radioaktivně značeného antagonistu [3 H]-N-methylscopolaminu a zvýšil množství receptorů v intaktních buňkách i v membránách zatímco zvýšení obsahu cholesterolu nemělo žádné účinky. Membrány z CHO- M_2 buněk vykazovaly vysoko a nízko afinitní vazebná místa pro agonistu karbachol a snížení obsahu cholesterolu zdvojnásobilo počet vysokoafinitních vazebných míst. V celých buňkách úbytek cholesterolu zpomalil a snížil rozsah receptorové internalizace vyvolané karbacholem. Zvýšení membránového cholesterolu potlačilo inhibici syntézy cAMP ($G_{i/o}$), stimulaci syntézy cAMP (G_s) a nemělo vliv na akumulaci inositolfosfátů ($G_{q/11}$) vyvolané karbacholem. Na druhé straně snížení membránového cholesterolu zvýšilo maximum inhibice i stimulace syntézy cAMP karbacholem, bez změny efektivní koncentraci EC_{50} pro karbachol. V případě akumulace inositolfosfátů došlo k snížení maxima akumulace i hodnoty EC_{50} pro karbachol. Změny obsahu membránového cholesterolu neovlivnily permeabilitu membrány, oxidativní aktivitu a relativní zastoupení G_s , $G_{i/o}$ a $G_{q/11}$ alfa podjednotek. Naše výsledky ukazují na významnou úlohu membránových lipidů v přenosu signálu muskarinovým receptorem.

Abstract

The muscarinic acetylcholine M₂ receptor that was originally identified as the predominant muscarinic receptor subtype in the heart is also widely distributed in the central nervous system. Its signal transduction is effected by both the βγ dimer of heterotrimeric G-protein that activates potassium or inhibits calcium conductance and the α_i subunit that preferentially inhibits cAMP synthesis. However, M₂ muscarinic receptors expressed in CHO cells (CHO-M₂) directly activate signalling pathways of all three major subclasses of G-proteins, i.e. preferred G_{i/o} subclass and at concentrations higher than needed for standard inhibition of forskolin-stimulated cAMP synthesis also G_s and G_{q/11} subclasses to cause stimulation of cAMP synthesis and accumulation of inositolphosphates (IP), respectively. In the present experiments we investigated influence of membrane cholesterol content on activation of signalling pathways of these three G-protein subclasses in CHO-M₂ cells by carbachol, a non-hydrolysable acetylcholine analogue. Treatment of cells with methyl-β-cyclodextrin decreased cell and membrane cholesterol content by 74% and 39%, respectively, and incubation in the presence of cholesterol-saturated methyl-β-cyclodextrin increased cholesterol content by 169% and 137%, respectively. Cholesterol depletion significantly decreased the affinity of M₂ receptors for the tritiated non-permeable antagonist [³H]-N-methylscopolamine binding and increased of plasma membrane receptor density in intact cells and membranes whereas the increase in cholesterol had no significant effect. Membranes displayed two-affinity agonist binding sites for carbachol and cholesterol depletion doubled the fraction of high-affinity binding sites. In intact cells the decrease of membrane cholesterol strongly decelerated and reduced the extent of receptor internalization induced by carbachol whereas cholesterol enrichment had no effect. The increase of membrane cholesterol suppressed efficacy of carbachol on cAMP synthesis inhibition (G_i), cAMP synthesis stimulation (G_s), and inositolphosphates accumulation (G_{q/11}). On the other hand, the decrease of membrane cholesterol increased efficacy, without change of potency, of carbachol on cAMP synthesis stimulation and inhibition while efficacy of stimulation of inositolphosphates accumulation was reduced and potency augmented. Noteworthy, modifications of membrane cholesterol had no effect on membrane permeability, oxidative activity, protein content, or relative expression of G_s, G_{i/o}, and G_{q/11} alpha subunits. These results demonstrate the important role of membrane cholesterol content that may underlie development of various pathological processes on signal transduction through muscarinic receptors.

Seznam použitých zkratek

AC	adenylylcyklasa
BARK	kinasa β -adrenergních receptorů
CH-MBCD	methyl- β -cyclodextrin nasycený cholesterolem
cAMP	3'-5' cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	3'-5' cyklický guanosinmonofosfát
CNS	centrální nervový systém
DAG	diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
G _i , G _s , G _q ,...	podtypy G proteinů
G _{i/o} , G _{q/11} ,...	podtřídy G proteinů
GPCR	receptory spřažené s G proteiny (G protein coupled receptors)
GRK	G proteinové receptorové kinasy
GTP	guanosintrifosfát
GTP γ S	guanosin-5'-O-(3-thio)trifosfát
CHO	Chinese hamster ovary, vaječníky křečka zlatého
IBMX	3-isobutyl-1-methylxantin
IP ₃	inositol-1,4,5-trisfosfát
MBCD	methyl- β -cyclodextrin
nH	Hillův koeficient
NMS	N-methylskopolamin
O.A.	octan amonný
o1, o2, o3	extracelulární smyčky receptoru
PIP2	fosfatidyl inositol bis fosfát
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
PLC	fosfolipasa C
PTX	toxin Bordetella pertussis
TM	transmembránový segment

1. Úvod

1.1. Úvod

Jedním z nejdůležitějších způsobů komunikace mezi buňkami je komunikace zprostředkovaná receptory, které jsou lokalizovány v buněčné membráně nebo v některém z intracelulárních kompartmentů (cytoplazma, jádro). Receptory, ať už jsou součástí buněčných membrán nebo se vyskytují v cytoplazmě, jsou velmi dynamickou strukturou, schopnou měnit v relativně krátkých intervalech svoji konformaci a tím i vlastnosti.

Muskarinové receptory jsou integrální membránové bílkoviny a patří do rodiny receptorů spřažených s G proteiny rhodopsinového typu. Významnou úlohu v aktivaci a přenosu signálu prostřednictvím muskarinových receptorů podobně jako i u ostatních membránových receptorů proto hraje lipidické složení membrány, ve kterém jsou receptory zabudovány. Změna lipidického složení membrán může vést následně také k narušení přenosu signálu. V této práci jsme se zabývali ději probíhajícími na muskarinových acetylcholinových receptorech, a to zejména na podtypu M_2 a jejich ovlivnění obsahem membránového cholesterolu.

Pokusy jsme prováděli na geneticky modifikovaných liniích CHO (Chinese hamster ovary) buněk stabilně exprimujících muskarinové receptory. Nejprve jsme se zaměřili na vypracování spolehlivé metody na ovlivnění obsahu membránového cholesterolu. V dalších částech se pak zabýváme vlivy obsahu cholesterolu v membráně na vazebné vlastnosti, na transdukci signálů a selektivitu spřažení s G-proteiny a na internalizaci muskarinových receptorů.

1.2. Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo objasnit vliv obsahu membránového cholesterolu na parametry muskarinové signalizace. Zaměřili jsme se na řešení následujících otázek.

- 1) Jak obsah membránového cholesterolu ovlivňuje vazebné charakteristiky (afinitu, počet receptorů a kinetiku vazby) muskarinových receptorů ?
- 2) Jak obsah membránového cholesterolu ovlivňuje účinnost transdukace a selektivitu spřáhování muskarinových receptorů s G-proteiny a efektorovými proteiny ?
- 3) Jak obsah membránového cholesterolu ovlivňuje internalizaci muskarinových receptorů?

2. Muskarinové receptory a jejich interakce s G-proteiny

2.1. Receptory spřažené s G proteiny

Receptory spřažené s G proteiny (GPCR) tvoří velkou skupinu membránových receptorů, jejichž společným rysem je jednak nutnost využít pro přenos informace jednoho z heterotrimerních G proteinů, jednak velká podoba základní struktury jejich molekul.

Jejich peptidický řetězec prochází membránou sedmkrát, přičemž N-konec je uložený extracelulárně a C-konec se nachází intracelulárně.

GPCR jsou v organismu velice rozšířené a využívá jich řada signálních molekul od klasických monoaminových mediátorů (adrenalin, acetylcholin, serotonin, histamin, dopamin) přes lipidy (prostaglandiny, endogenní canabinoidy), neuropeptidy (neuropeptid Y, substance P, opioidy), peptidické hormony (glukagon, bradykinin, angiotensin), malé proteiny jako jsou chemokiny, až po velké proteiny jako jsou glykoproteinové hormony nebo thrombin. Patří mezi ně také tzv. metabotropní receptory pro glutamát, receptory pro fotony v tyčinkách a čípcích oční sítnice (opsiny) a receptory pro odoranty v čichovém epitelu, kterých je více než sto druhů.

Velikost GPCR se může velmi lišit: tvoří je zhruba 300 aminokyselin u receptoru pro adrenokortikotropní hormon, 300-370 aminokyselin u receptorů pro odoranty v čichovém epitelu, 350-600 aminokyselin u receptorů pro peptidové hormony a monoaminy, 650-750 aminokyselin u receptorů pro velké proteiny a více než 1100 aminokyselin u metabotropních glutamátových receptorů (Beck-Sickinger, 1996).

Celá rodina GPCR má sedm transmembránových segmentů tvořených α helixy pospojovanými třemi intracelulárními (i1-i3) a třemi extracelulárními (o1-o3) kličkami. Obecně se předpokládá, že transmembránové segmenty všech GPCR jsou uspořádány do kruhu. Velikost transmembránových hydrofobních segmentů je mezi 19 – 24 aminokyselinami (Gudermann a spol., 1995). Smyčky, kterými jsou jednotlivé transmembránové segmenty spojeny, jsou velmi krátké (10-40 aminokyselin) s výjimkou třetí intracelulární smyčky (i3, mezi 5. a 6. transmembránovým segmentem), která je u všech GPCR dlouhá (více než 150 aminokyselin). Dalším společným rysem všech GPCR je přítomnost dvou vazebných oblastí. První vazebná oblast těchto receptorů je uložena extracelulárně a slouží k navázání agonisty ("prvého posla"). Její lokalizace se liší podle typu receptoru, jak je uvedeno níže. Druhá vazebná oblast těchto receptorů je uložena intracelulárně a realizuje funkční kontakt s G proteinem. Rozhodující úlohu v komunikaci s G proteiny hrají počáteční a konečný úsek třetí intracelulární smyčky (tj. blízko lipidické

dvouvrstvy); C-terminální úsek receptoru a druhá intracelulární smyčka se na interakci s G proteiny podílejí u různých receptorů v různé míře.

Dalším společným znakem GPCR je glykosylace receptoru na asparaginových zbytcích v N-koncové extracelulární doméně. Na glykosylaci receptoru nás upozorňuje zjištění, že molekulová hmotnost receptoru je vyšší než odpovídá jeho aminokyselinovému složení. Tato posttranslační modifikace má jen malý vliv na vazbu agonistů, ale může hrát důležitou roli v skládání a expresi receptoru na povrchu buňky.

Dalším společným znakem většiny GPCR je palmitoylace. K palmitoylaci dochází na cysteinových zbytcích u C-konce receptoru tvorbou thioesterových spojení (O'Dowd a spol., 1989). Kovalentně vázané palmitoylové zbytky se mohou vsunout do membránové dvouvrstvy a tím vytvořit čtvrtou cytoplazmatickou smyčku.

Dalším společným znakem naprosté většiny GPCR je přítomnost cysteinového disulfidického můstku mezi cysteinovým zbytkem blízko C-konce první extracelulární smyčky a cysteinovým zbytkem uprostřed druhé extracelulární smyčky. Cysteinový disulfidický můstek je velmi důležitý pro správnou terciární strukturu receptoru a pro vazbu ligandů k receptoru.

Podle struktury můžeme GPCR dělit do tří skupin: rhodopsinového typu, kalcitoninového typu a typu metabotropních glutamátových receptorů (Bockaert a spol., 1999).

Mezi GPCR rhodopsinového typu patří receptory pro biogenní aminy, lipidy, puriny, kininy, endothelin, opsiny a rhodopsin. N-koncový úsek je poměrně krátký a je glykosylován. Polární zbytky Asn18 v TM1, Asp10 v TM2, Arg26 v TM3, a Asn 16 v TM7 (vždy počítáno od N-konce příslušného transmembránového segmentu) jsou v této skupině ve stejné pozici a vytváří pravděpodobně síť vodíkových vazeb, které jsou důležité pro strukturu receptoru. Prolinové zbytky v TM4-7 jsou pravděpodobně důležité pro dynamiku receptoru např. při přechodu mezi aktivním a inaktivním stavem receptoru (Beck-Sickinger, 1996). Čtvrtá intracelulární smyčka může být vytvořena po palmitoylaci cysteinového zbytku u C-konce receptoru a může mít význam při receptorové desenzitizaci.

Vazebné místo pro malé agonisty (adrenalin, dopamin, acetylcholin atd.) se nachází v jamce, jejíž stěny vytváří všech sedm transmembránových segmentů molekuly receptoru (Ji a spol., 1998). V případě rhodopsinu (i dalších opsinů) hraje úlohu agonisty molekula retinalu, jež je ve stejné jamce kovalentně a trvale připojena k receptoru. Vlivem zachycení

fotonu se její konformace mění z "11-cis" na "all trans" a rhodopsin se touto konformační změnou aktivuje a přenáší svoji aktivaci na G protein transducin. Vazebné místo pro velké molekuly (peptidy a proteiny) se nachází na extracelulární N-koncové části receptoru, ale při nejmenším u některých peptidů se na vazbě podílí také jamka tvořená transmembránovými segmenty receptoru a první a druhá extracelulární smyčka.

Druhým typem GPCR je kalcitoninový typ, ke kterému patří hlavně receptory pro peptidické hormony a neuropeptidy jako glukagon, sekretin, vasoaktivní intestinální peptid a kalcitonin. Pro tento typ receptorů je charakteristický velký N-koncový segment (100-150 aminokyselin) obsahující šest cysteinových zbytků, které vytvářejí disulfidické můstky a hypoteticky formují globulární doménu pro vazbu.

Do třetí a zatím nejmenší skupiny GPCR patří především metabotropní glutamátové receptory. Pro tento typ receptorů je charakteristický ohromný N-koncový segment (500-600 aminokyselin) a podobně velká C-koncová doména. Mutační analýzy metabotropních glutamátových receptorů naznačují, že glutamát se váže mezi dvě velké subdomény v N-koncovém segmentu. Do této skupiny patří i receptory GABA-B (tj. metabotropní receptory pro γ -aminobutyryát) a receptory pro vápníkové ionty.

Společným rysem většiny GPCR je jejich desensitizace (Lefkowitz, 1998; Pitcher a spol., 1998) a následná internalizace při dlouhodobém působení agonisty. Desensitizace receptoru se projevuje jako snížení citlivosti receptoru k působení agonisty a nastává již po několikaminutovém působení agonisty. Při internalizaci receptorů dochází ke snížení počtu receptorů na povrchu buňky, neboť receptory jsou endocytozou přeneseny do nitra buňky. Zde mohou být odbourány anebo se odtud mohou vrátit zpět do povrchové membrány. Na desensitizaci receptoru se zpravidla podílí fosforylace receptoru na serinových a threoninových zbytcích. Desensitizaci receptoru můžeme rozdělit na homologní a heterologní. O homologní desensitizaci hovoříme tehdy, jestliže za snížení aktivity určitého receptoru odpovídá agonista, který tento receptor stimuloval. Jedním z enzymů, který je zodpovědný za tento typ desensitizace, je tzv. BARK (kinasa β -adrenergních receptorů), která je schopna fosforylovat pouze receptor obsazený agonistou. Fosforylace brání interakci mezi receptorem a G proteinem. Na fosforylovaný receptor se také může navázat protein arrestin, který překáží kontaktu receptoru s G proteinem. Jako heterologní desensitizaci označujeme stav, kdy dochází ke snížení citlivosti receptoru v důsledku aktivace jiného receptoru. Jde o situaci, při níž dochází k fosforylaci receptorů proteinkinázou A nebo C, která byla stimulována aktivací jiného typu receptoru.

GPCR se aktivuje navázáním agonisty do jeho vazebného místa. Navázáním agonisty se změní konformace receptoru, a to má za následek aktivaci heterotrimerního G proteinu, který je prostředníkem mezi receptorem a efektorovou molekulou (adenylylcyklasou, fosfoinozidasou, iontovým kanálem aj.). Při vazbě agonisty na receptor a aktivaci receptoru se pravděpodobně uplatňují dva mechanismy zároveň : konformační indukce a konformační selekce. Receptor se může nalézat ve více konformacích, z nichž některé jsou aktivní a jiné inaktivní. V klidu naprosto převažují konformace inaktivní, ale malý podíl receptorů je v aktivní konformaci a odpovídá za tzv. konstitutivní aktivitu receptoru, tj. za spontánní na agonistovi nezávislou aktivitu (Jakubík a spol., 1995). Představa o konformační indukci předpokládá, že se agonista může navázat na receptor v jakékoli konformaci, ale jeho navázání indukuje přechod receptoru do aktivní konformace (vnucuje mu aktivní konformaci, pokud v ní již nebyl). Představa o konformační selekci předpokládá, že se agonista navazuje na receptory v aktivní konformaci (vybírání si tuto konformaci), tím však posouvá rovnováhu mezi volnými receptory v inaktivní a aktivní konformaci, a způsobuje přechod stále více receptorů do konformace aktivní. Kompetitivní antagonisté soutěží s agonisty o jejich vazebné místo a tím snižují nebo zcela vylučují aktivaci receptoru agonistou. Někteří antagonisté nemění poměr mezi receptory v inaktivních a aktivních konformacích a proto nemění konstitutivní aktivitu receptoru. Označují se jako neutrální antagonisté. Jiní antagonisté způsobují, že všechny receptory přejdou do inaktivních konformací. Tím odstraňují konstitutivní aktivitu receptoru. Označují se jako inverzní agonisté anebo negativní antagonisté.

2.2. G-proteiny

Přenos informace z G proteinových receptorů do buňky se zásadně odehrává prostřednictvím heterotrimerních GTP vázících proteinů, jež se skládají ze tří odlišných podjednotek, označovaných písmeny α (350-380 aminokyselin), β (340 aminokyselin) a γ (68 – 75 aminokyselin). G proteiny se klasifikují podle α podjednotek a dělí se do čtyř základních skupin, z nichž každá obsahuje ještě určité podtypy : G_s (G_s, G_{olf}), G_i ($G_i, G_o, G_t, G_{gust}, G_z$), G_q ($G_q, G_{11}, G_{14}, G_{16}$) a G_{12} (G_{12}, G_{13}). Nejdůležitější funkce hlavních typů G proteinů jsou tyto :

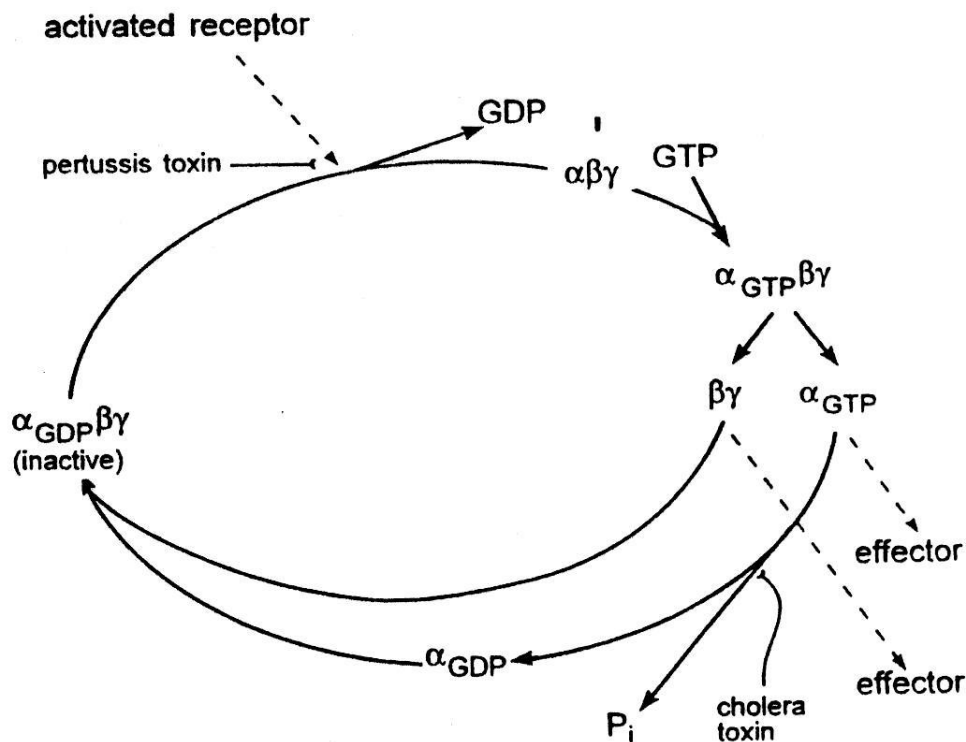
- 1) G_s : aktivují adenylylcyklasu a kalciové kanály (Iyengar, 1993)
- 2) G_i : inhibují adenylylcyklasu , aktivují K^+ (Clapham a Neer, 1993) a inhibují Ca^{++} kanály
- 3) G_q : aktivují fosfolipasu C β specifickou pro fosfoinositidy a některé další enzymy
- 4) G_t : aktivují fosfodiesterasu cGMP

Všechny G proteiny se podobají cyklem interakcí, které při přenosu signálu z receptoru na efektorovou molekulu prodělávají. V klidovém stavu existují jako trimery, na jejichž α podjednotku je navázán GDP. Některé trimery jsou spřaženy s receptory, jiné jsou volné. Receptor v komplexu s G proteinem má vyšší afinitu pro agonisty nežli receptor volný. Navázání agonisty na receptor zvyšuje afinitu receptoru pro G protein, mění konformaci receptoru a spouští dramatickou konformační změnu v α podjednotce G proteinu. Tato konformační změna vede k snížení afinity α podjednotky pro GDP, disociaci GDP a navázání GTP, který je v buňce přítomen v mnohem větší koncentraci nežli GDP. Obsazením nukleotidového vazebného místa na α podjednotce G proteinu molekulou GTP dochází k aktivaci α podjednotky a snížení afinity α podjednotky jak k receptoru tak i ke komplexu $\beta\gamma$. Podjednotka α a komplex $\beta\gamma$ se odpoutávají od receptoru i od sebe navzájem.

Tento proces tedy generuje volné α podjednotky s navázaným GTP a $\beta\gamma$ komplexy. Oba komplexy jsou biologicky aktivní a mohou regulovat aktivitu efektorových molekul v buňce. Volná α podjednotka s navázaným GTP zůstává v aktivním stavu potud, pokud její vlastní GTPasová aktivita nepřemění její GTP na GDP. Pak se α podjednotka odpoutá od efektorové molekuly a znovu vytvoří trimer s $\beta\gamma$ komplexem. Tento inaktivní heterotrimer

je připraven pro další aktivační cyklus. K amplifikaci receptorového signálu dochází jednak tím, že jeden komplex hormonu s receptorem může aktivovat několik G proteinů za sebou, jednak také tím, že aktivace efektorové molekuly trvá určitou dobu, během níž se vytvoří řada molekul druhého posla.

Cyklus interakcí mezi receptorem, G proteinem a efektoem, jak je znázorněn na obr. 2.2.1., může být ovlivněn účinkem ADP-ribosylujících toxinů *Vibrio cholerae* a *Bordetella pertussis*. Účinkem cholerového toxinu se modifikuje konservovaný argininový zbytek v podjednotkách proteinu $G\alpha_s$ a $G\alpha_t$. ADP-ribosylací se potlačí vlastní GTPasová aktivita podjednotky α , která pak zůstává v aktivované formě pokud je na ni navázán GTP. Prodlouží se tedy doba, po kterou α podjednotka například stimuluje adenylylcyklasu, což vede k nadprodukcí cyklického AMP. Toxin bacilu černého kašle ADP-ribosyluje podjednotky α_i , α_o a α_t . Místem modifikace je konservovaný cysteinový zbytek. ADP-ribosylace brání G proteinu v interakci s receptorem. Výsledkem je například to, že receptory, které inhibují adenylylcyklasu prostřednictvím G_i proteinu, zcela ztrácejí svůj inhibiční účinek na tento enzym.



Obr. 2.2.1. Schéma interakcí mezi receptorem, G proteinem, GDP a GTP. α , β a γ representují $G\alpha$, $G\beta$ a $G\gamma$ podjednotky G proteinu. Toxin pertuse zabraňuje G proteinu v interakci s receptorem, zatím co toxin cholery ruší GTPasovou aktivitu podjednotky α .

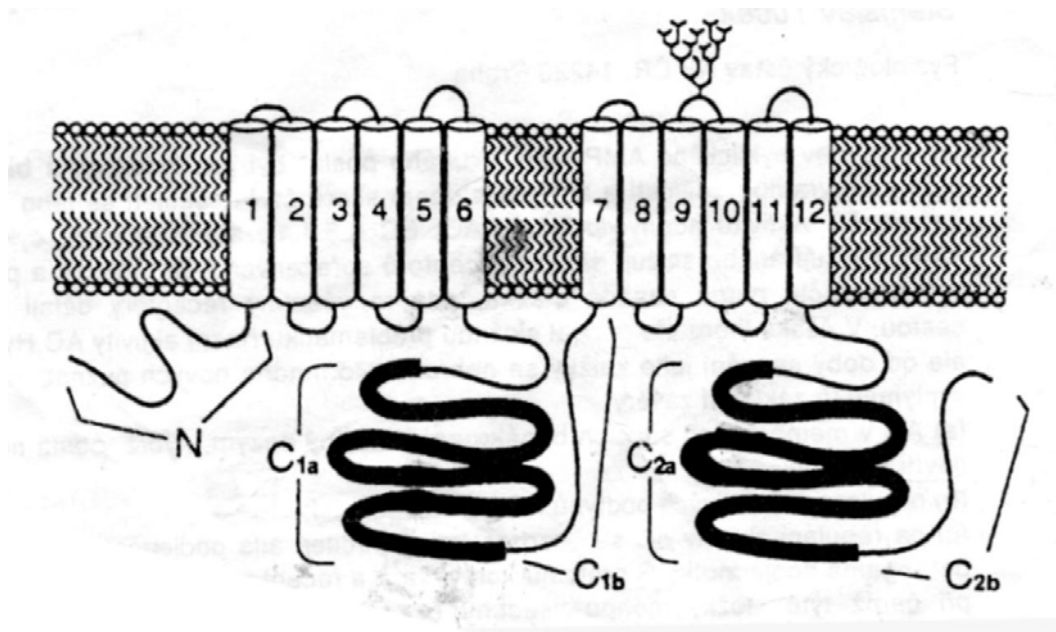
V experimentální práci se do funkčního cyklu G proteinů zasahuje tím, že se používají nehydrolyzovatelné analogy GTP, například GTP γ S, ve kterém je jedna OH skupina γ fosfátu nahrazena SH skupinou (guanosin-5'-O-(3-thio)trifosfát).

Každá α podjednotka se skládá ze dvou domén. GTPasová doména (pravděpodobně její C-koncová část) obsahuje místa pro vazbu guaninových nukleotidů, $\beta\gamma$ komplexu, receptoru a efektorových molekul. Přesná funkce druhé domény je zatím neznámá; pravděpodobně přispívá k stabilitě nukleotidových vazebných míst. Všechny α podjednotky s výjimkou transducinu jsou ve své N-koncové doméně na cysteinových zbytcích modifikovány palmitoylací, která umožňuje ukotvení α podjednotky k membráně (Mumby a spol., 1994). Palmitoylace je reverzibilní proces. Aktivačně závislá depalmitoylace se může podílet na uvolnění α podjednotky do cytozolu.

Při přenosu signálu z receptoru na efektorovou molekulu hrají důležitou úlohu také podjednotky $\beta\gamma$. V současnosti je známo pět podjednotek β a deset podjednotek γ (Ray a spol., 1995). Podjednotky β mají mezi sebou vysoký stupeň homologie na rozdíl od podjednotek γ , které jsou více heterogenní a mohou funkčně odlišovat komplexy $\beta\gamma$. Podjednotky $\beta\gamma$ jsou spolu spřáhány skoro nerozlučně, takže se nedají od sebe oddělit bez denaturace. Podjednotky $\beta\gamma$ jsou především nezbytné pro interakci G proteinu s receptorem, protože samotná α podjednotka nemůže být receptorem aktivována. K membráně jsou připoutány hlavně díky isoprenylaci γ podjednotky na cysteinových zbytcích na jejím C-konci (Rando, 1996). Podjednotky $\beta\gamma$ mohou samostatně reagovat s některými efektorovými molekulami. Přímou aktivují určité typy draselných kanálů, fosfolipasu A_2 a $C\beta$. Adenylylcyklasy mohou inhibovat, pokud jsou ve velké koncentraci, a to tím, že na sebe váží aktivované podjednotky $G_s \alpha$. Podjednotky $\beta\gamma$ mohou přímo aktivovat podtyp II a IV a inhibovat podtyp I adenylylcyklasy, ale podmínkou pro aktivační účinek na podtypy II a IV je současné působení podjednotky α_s . Dále umožňují fosforylaci receptorů G proteinovými receptorovými kinasami (GRK), která způsobuje desenzitizaci receptorů. GRK jsou za basálních podmínek v cytoplazmě a nemohou přijít do kontaktu s membránovým receptorem; jestliže se však od $\beta\gamma$ komplexu odpoutá aktivovaná α podjednotka, $\beta\gamma$ podjednotka zůstává v membráně a má nyní volnou C-koncovou doménu, na kterou se váže GRK, jež se tak může přiblížit k receptoru a fosforylovat jej.

Jedním z nejdůležitějších efektorových enzymů, který je řízen G proteiny, je adenylylcyklasa (EC 4.6.1.1.). Substrát pro adenylylcyklasu je komplex Mg^{2+} a ATP, ze kterého enzym syntetizuje cAMP vytvořením cyklické fosfodiesterové vazby z α -fosfátu ATP za současného uvolnění pyrofosfátu. Cyklický AMP působí prostřednictvím cAMP-dependentní proteinkinasy (PKA), která mění aktivitu enzymů a jiných proteinových substrátů fosforylací jejich serinových a threoninových zbytků. Účinky PKA jsou ukončeny působením proteinových fosfatů, které katalyzují odnětí fosfátu z fosforylovaných proteinů. Působení cAMP se ukončí působením enzymu fosfodiesterasy. Fosfodiesterasa mění cAMP na 5'-AMP, který již nemá signální vlastnosti cAMP. Experimentálně se využívají inhibitory fosfodiesterasy, které vedou k nahromadění cAMP uvnitř buňky. Jedním z nejvíce používaných inhibitorů fosfodiesterasy je 3-isobutyl-1-metylxanthin (IBMX).

V současnosti je popsáno devět podtypů adenylylcyklasy (Hurley, 1999). Molekula adenylylcyklasy (obr.2.2.2.) je glykoprotein, jehož bílkovinnou složku tvoří řetězec 1064-1353 aminokyselin.



Obr. 2.2.2. Schematické znázornění předpokládané struktury adenylylcyklasy (podle Sunahara, 1996).

Adenylylcyklasa se skládá ze dvou membránových a dvou cytoplazmatických domén. Krátký N-konec směřuje do cytoplazmy, za ním následuje šest hydrofobních transmembránových úseků (doména M1), dlouhá klička v cytoplazmě (doména C1,

obsahující 360-484 aminokyselin), dalších šest hydrofobních transmembránových úseků (doména M2) a dlouhý C-koncový úsek v cytoplazmě (doména C2, obsahující 255-356 aminokyselin). Domény C1 a C2 můžeme ještě rozdělit na subdomény *a* a *b*, přičemž subdomény *a* se nacházejí blíže N-konci adenylylcyklasy. Právě subdomény C1*a* a C2*a* jsou nositeli katalytické aktivity adenylylcyklasy.

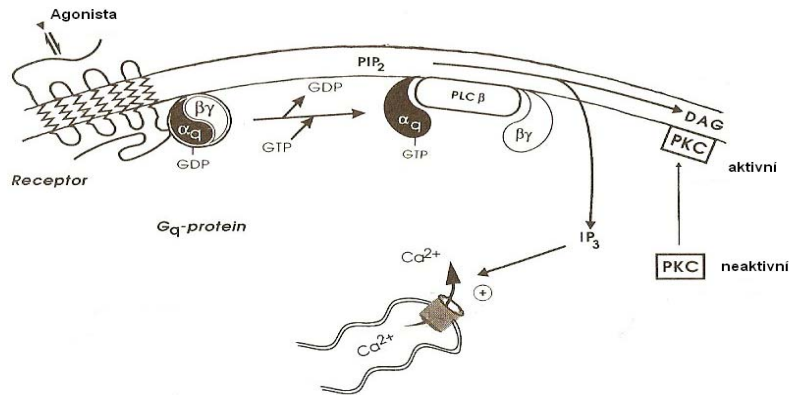
V nervové soustavě se vyskytují všechny podtypy adenylylcyklasy, přičemž podtypy I a VIII se jinde nevyskytují. V srdci se vyskytují hlavně podtypy V a VI a pro čichový epitel je charakteristický podtyp III.

Mechanismy regulace adenylylcyklasy (tab. 2.2.1.) se podtypově liší, nicméně čtyři látkové faktory mají na všechny podtypy stejný vliv. Všechny podtypy adenylylcyklasy se aktivují α podjednotkou G_s proteinu a diterpenem forskolinem (mimo podtypu devět; Hurley, 1999). Všechny podtypy AC se inhibují vysokou koncentrací vápníkových iontů ($>100 \mu\text{mol/l}$) a působením adenosinu a 3'-AMP a jejich deoxyanalogů. Podle faktorů, kterými jsou jednotlivé podtypy adenylylcyklasy ovlivněny, je můžeme rozdělit do tří skupin. Pro první skupinu, podtypy I, III a VIII, je charakteristická aktivace α podjednotkou G_s proteinu a Ca^{++} -kalmodulinem. Do druhé skupiny patří podtypy II a IV, jejichž společným rysem je synergická aktivace α podjednotkou G_s proteinu a $\beta\gamma$ podjednotkami. Třetí skupinu tvoří podtypy V a VI a jejich společným rysem je inhibice α podjednotkou G_i a nízkou koncentrací Ca^{++} . Adenylylcyklasa je ovlivněna také fosforylací prostřednictvím PKA a PKC (Premont a spol., 1992). Fosforylace působením PKA inhibuje podtypy adenylylcyklasy V a VI. PKC naopak aktivuje podtypy adenylylcyklasy II a V.

Podtyp	α_s	α_i	α_o	$\beta\gamma$	Kalcium	Proteinkinasy	lokalizace
I	+	-	-	-	+ Ca-CM		jen v nervové soustavě
II	+	-		+		+ PKC	mozek, čichový epitel, plíce
III	+				+ Ca-CM (při současné stimulaci α_s)		převážně v čichovém epitelu
IV	+			+			mozek, ledviny, játra, srdce
V	+	-			-Ca ⁺⁺ (0,1-1 mM)	+ PKC - PKA	<u>srdce</u> , mozek, ledviny, játra
VI	+	-			-Ca ⁺⁺ (0,1-1 mM)	- PKA	<u>srdce</u> , mozek
VII	+						mozek, srdce, ledviny, játra, varle
VIII	+				+ Ca-CM		jen v nervové soustavě
IX	+						mozek, kostní sval, další tkáně

Tab. 2.2.1. Regulace podtypů adenylycyklasy. Znaménko + značí stimulaci, znaménko – značí inhibici.

Dalším důležitým efektorovým enzymem, který je řízen G proteiny, je fosfolipasa C β (PLC β). Fosfolipasa C β katalyzuje hydrolýzu tzv. minoritních inositolových fosfolipidů v buněčné membráně, ze kterých vznikají dvě signální molekuly. První z nich je inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃), který mobilizuje Ca⁺⁺ z endogenních zásobáren. Druhá signální molekula je diacylglycerol. Diacylglycerol aktivuje proteinkinasu C (PKC). Fosfolipasa C β má nejméně čtyři isoformy (PLC β 1–4). (Rhee a Choi.,1992). Všechny isoformy PLC β mohou být stimulovány prostřednictvím α_q podjednotky G proteinů a také $\beta\gamma$ podjednotkami Gi proteinů.



Obr. 2.2.3.: Hydrolýza inositolfosfátů prostřednictvím PLC β . (převzato a upraveno z Watson a Arkinstall, 1994)

2.3. Muskarinové receptory

2.3.1. Struktura a podtypy muskarinových receptorů

Acetylcholin je jedním z hlavních neurotransmiterů jak v centrálním, tak periferním nervovém systému. Historicky prvotní rozdělení acetylcholinových receptorů na muskarinové a nikotinové vycházelo z pozorování, že první z nich jsou selektivně aktivovatelné muskarinem a druhé nikotinem. Obecně platí, že účinek muskarinu lze blokovat atropinem a účinek nikotinu (+)tubokurarinem.

Muskarinové receptory se vyskytují ve vysoké hustotě v centrálním nervovém systému. Aktivace muskarinových receptorů může vést jak k aktivaci, tak i k inhibici neuronů. V centrální nervové soustavě se muskarinové receptory uplatňují při řízení vegetativních, sensorických i pohybových funkcí, hrají významnou úlohu při regulaci stavu bdělosti a spánku, při udržení pozornosti, v emočních pochodech a v průběhu stresových reakcí. Muskarinové receptory v mozkové kůře a v hippocampu se účastní integračních a psychických funkcí jako je paměť a učení. Snížení počtu nebo funkce muskarinových receptorů je průvodným jevem řady neurologických poruch. Parasympatická aktivace muskarinových receptorů v periferních orgánech vyvolá dobře známé projevy jako negativně inotropní a chronotropní účinky na srdce, sekreci exokrinních žláz trávicího systému a zvýšenou motilitu střev.

Již na počátku osmdesátých let bylo zřejmé, že muskarinové receptory nejsou homogenní. Muskarinové receptory byly zpočátku rozděleny farmakologicky na M_1 a M_2 muskarinové receptory podle jejich odlišné afinity k muskarinovému antagonistovi pirenzepinu. Pirenzepin má vysokou afinitu k M_1 receptorům a nízkou afinitu k M_2 receptorům (Hammer a spol., 1980). Světlo do problémů okolo podtypů muskarinových receptorů vneslo klónování DNA kódující muskarinové receptory (Kubo a spol., 1986; Peralta a spol., 1987; Bonner a spol., 1987) a její následná analýza. Bylo identifikováno 5 podtypů muskarinových receptorů a jejich geny. Počet podtypů je konzervativní od octomilky až po člověka a receptory vykazují vysokou mezidruhovou homologii. Muskarinové receptory nemají na rozdíl od mnoha jiných receptorů spřažených s G proteiny (receptory pro glutamát, serotonin a dopamin) sestříhové varianty.

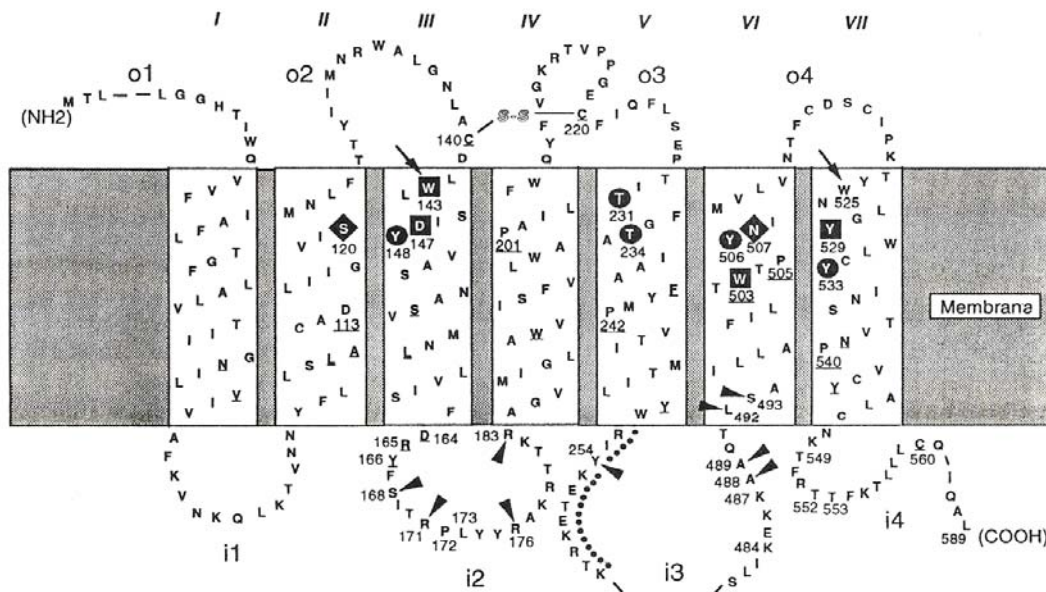
Distribuce podtypů muskarinových receptorů v tkáních byla stanovena na základě výskytu mRNA kódující jednotlivé podtypy muskarinových receptorů použitím Northern

blot analýzy a in situ hybridizací a na základě farmakologické analýzy. M₁ podtyp se nachází především v mozkové kůře a v hippocampu (Kubo a spol., 1986; Bonner a spol., 1987). M₂ podtyp byl detekován hlavně v srdci a také v prodloužené míše, mozečku a Varolově mostu. Pouze malé množství M₂ receptorů bylo detekováno v mozkové kůře a corpus striatum (Peralta a spol., 1987). M₃ podtyp byl detekován převážně v exokrinních žlázách (pankreas, slinné a mléčné žlázy), v hladkých svalech, mozkové kůře a hippocampu (Bonner a spol., 1987; Peralta a spol., 1987). M₄ podtyp se nalézá v mozkové kůře a striatu. M₅ podtyp se nachází v některých oblastech mozku. Jeho mRNA se zdá být mnohem méně rozšířená než mRNA ostatních podtypů (Bonner a spol., 1988). Základní informace o rozložení muskarinových receptorů v organismu je shrnuta v tabulce 2.3.1.1.

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		

Tab. 2.3.1.1. Rozložení muskarinových receptorů v organismu podle Wesse (1996) a Hulmeho a spol. (1990).

Muskarinové receptory jsou integrální membránové bílkoviny, které tvoří cca 450 až 500 aminokyselin. Patří do rodiny receptorů spřažených s G proteiny rhodopsinového typu. Kombinací řady přístupů byla struktura rhodopsinu dobře prozkoumána. Vyznačuje se sedmi hydrofobními transmembránovými segmenty (TM1 až TM7), tvořenými α helixy pospojovanými třemi intracelulárními (i1 až i3) a třemi extracelulárními (o1 až o3) kličkami, přičemž N-konec směřuje ven z buňky a C-konec do nitra buňky. Stavba muskarinových receptorů se jí podobá. Struktura potkaního M₃ receptoru je na obr. 2.3.1.1.



Obr. 2.3.1.1. Struktura potkaního muskarinového receptoru M₃. Aminokyselinové (AK) zbytky konzervativní ve všech známých GPCR jsou podtrženy. AK zbytky esenciální pro vazbu jak agonistů tak antagonistů jsou označeny černými čtverečky. AK zbytky esenciální pro vazbu agonistů, ale ne antagonistů, jsou označeny černými kolečky. AK zbytky esenciální pro vazbu antagonistů, nikoliv však pro vazbu agonistů, jsou označeny černými káry. AK zbytky nezbytné pro aktivaci G proteinu G_{q/11} jsou označeny šipkami bez popisu. Zbytky esenciální pro vazbu alosterického ligandu galaminu jsou označeny černými trojúhelníky. Podle Wesse (1996).

Transmembránové segmenty muskarinových receptorů jsou variabilní ve své hydrofobicitě. TM7 obsahuje zvláště vysoký podíl hydrofilních aminokyselin. TM3 a TM7 jsou oba silně amfifilní a po celé délce helixu obsahují aminokyseliny vytvářející vodíkové vazby (Tyr, Ser, Thr, Asn, Trp, Asp). Ostatní transmembránové úseky jsou stejnoměrně hydrofobní.

Při srovnání sekvencí muskarinových podtypů získáme nejvyšší homologii mezi těmiž segmenty u různých podtypů v pořadí TM2 = TM3 = TM7 > TM6 > TM4 > TM5. TM1 je mnohem více variabilní. Smyčky i1, i2 a o3 vykazují vysokou homologii. Velmi variabilní jsou muskarinové receptory na N-konci, v i3 a na C-konci. Proliny nacházející se uvnitř TM 4, 5, 6 a 7 jsou lokalizovány v 2-4 obratu od extracelulárního konce helixu. Jejich pravděpodobný efekt je stočit řetězec cca o 30°.

Všechny GPCR mají pár cysteinových zbytků ve smyčkách o1 a o2. Pro muskarinové receptory jsou důkazy, že tyto cysteiny tvoří disulfidický můstek. Disulfidický můstek je důležitý pro stabilizaci receptoru, ale není nezbytný pro vazbu

ligandů. Dva cysteinové zbytky se nacházejí také v smyčce o3, ale zřejmě nevytvářejí disulfidickou vazbu.

Všechny muskarinové receptory mají mezi dvěma a pěti potenciálními N-glykosylačními místy (Asn-X-Ser/Thr) v N-koncové sekvenci. Inhibice glykosylace pomocí inhibitoru tunikaminu způsobila snížení počtu muskarinových receptorů na povrchu buněk NIE-115 (Liles a Nathanson, 1986), ale použití glykosidasy mělo jen malý účinek na vazbu QNB k atriálním muskarinovým receptorům (Herron a Schimerlik, 1983).

Muskarinové receptory mají pět konservovaných kyselých zbytků. Dva z nich, Asp v TM2 a Asp na C-konci TM3, se nachází na stejném místě ve všech GPCR. Asp na C-konci TM3 se vyskytuje v tripletu aminokyselin Asp-Arg-Tyr, který je vysoce konservován a pravděpodobně se účastní rozpoznání G proteinu. N-konec TM3 obsahuje dva Asp zbytky, jeden u samého extracelulárního konce TM3 (hned vedle cysteinové disulfidické vazby), druhý hlouběji v lipidické dvouvrstvě (viz obr. 2.3.1.1). Přítomnost tohoto druhého Asp je charakteristická pro kationtové aminové receptory a pravděpodobně interaguje s amoniovou skupinou ligandů, vázajících se k muskarinovým receptorům.

Přítomnost tyrosinového zbytku v TM7 koreluje s distálním Asp v TM3. Interakce mezi dvojicí Asp v TM3 a Tyr v TM7, vyskytující se pouze u kationtových aminových receptorů, má rozhodující význam při vazbě ligandů a receptorové aktivaci.

Vazebné místo pro muskarinové ligandy je tvořeno všemi sedmi transmembránovými segmenty (TM1-TM7). Ty vytvářejí cylindrický útvar, v jehož středu se nachází jamka, otevřená směrem ven z buňky, a v ní dochází k vazbě ligandů.

Aminokyseliny, účastnící se na vazbě muskarinových ligandů, byly rozpoznány na základě výsledků s bodovými mutacemi (Fraser a spol., 1989; Wess a spol., 1991,1992) a pokusů s vazbou kovalentních muskarinových ligandů (N-(2-chlorethyl)-N-propyl-N-benzylhydroxyethylamonia) a (N-(2-chlorethyl)-N-methyl-2-aminoethylacetátu) (Curtis a spol., 1989; Spalding a spol., 1994). Výsledky těchto pokusů jsou podkladem pro obecně přijímanou představu, že Asp 147 (TM3; číslováno podle M₃ receptoru) interaguje s kladným nábojem trimethylamoniové skupiny ligandu, Thr 231 (TM5) interaguje s esterovou skupinou ligandu, Tyr 148 (TM3) stabilizuje interakci Asp 147 s trimethylamoniovou skupinou ligandu, Asn 507 (TM6) interaguje s karbonylovou skupinou ligandu a Tyr 506 (TM6) stabilizuje intrakci mezi Asn 507 a karbonylovou skupinou ligandu. Mutace Thr 234 (TM5), Tyr 529 (TM7) a Tyr 533 (TM7) narušují interakce mezi receptorem a ligandem, ale přímá funkce těchto zbytků zatím není známa.

Tyto aminokyselinové zbytky jsou uspořádány do jakési kapsy, situované zhruba v polovině tloušťky plazmatické membrány, tj. asi 1,0-1,5 nm od povrchu membrány.

Navázáním agonisty do vazebného místa dojde k aktivaci muskarinového receptoru. Podle molekulárních modelů se předpokládá, že ohnutí v α -helixech TM V a TM VII, způsobené proliny v pozicích 242 a 540, vytváří pákový systém, který je udržován v rovnováze interakcemi s Asp 113 a Asn 539 a interakcemi dalších párů aminokyselin. Navázání agonisty způsobí sblížení TM III a TM VII v oblasti vazebného místa a prostřednictvím pákového systému vyvolává oddálení TM III a TM VII v oblasti kontaktu s cytoplazmou, čímž dojde k zpřístupnění sekvencí i2 a N- a C-koncové oblasti i3 pro interakci receptoru s G proteinem (Blin a spol., 1995; Liu a spol., 1995).

Vazebné místo muskarinových receptorů vykazuje vysoký stupeň homologie mezi jednotlivými podtypy, která se pohybuje nad 85 %. Z tohoto důvodu je obtížné najít selektivní ligandy pro jednotlivé podtypy muskarinových receptorů. Zatím je známo podstatně více selektivních muskarinových antagonistů než agonistů, což může být způsobeno tím, že muskarinová antagonisté jsou obecně větší molekuly než agonisté. To jim dovoluje interagovat s postranními řetězci v méně konzervativních oblastech receptoru. Afinity některých selektivních antagonistů jsou uvedeny v tabulce 2.3.1.2.

Podtyp	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Ligand					
Pirenzepin	8	6,5	6,9	7,8	6,7
AF-DX 116	6,5	7,1	5,9	6,6	6,6
Methoktramin	7,3	8,1	6,6	7,4	7,1
4-DAMP	9	8,3	9,1	8,9	9
Himbacin	8,1	7,1	7,1	8,4	6,3
pFHHSiD	7,3	6,4	7,8	7,5	7
AF-DX 384	7,4	8,7	7,5	8,3	6,3

Tab. 2.3.1.2. Podtypová selektivita vybraných muskarinových ligandů. Čísla vyjadřují záporný logaritmus rovnovážné disociační konstanty (K_d) pro vazbu ligandu na jednotlivé podtypy muskarinových receptorů. 4-DAMP=4-difenylacetoxymethylpiperidin; p-FHHSiD=p-fluoro-hexahydrosiladifenidol. Na základě přehledů Caulfielda (1993) a Hulmeho a spol. (1990).

Jako selektivní agonisté byly zatím popsány pouze deriváty spironu a xanomelinu (selektivní pro podtyp M_1). Výraznou podtypovou selektivitu vykazují alosterické ligandy muskarinových receptorů, a to nejčastěji pro podtyp M_2 .

Muskarinové receptory můžeme rozdělit do dvou skupin. Podtypy M_1 , M_3 a M_5 předávají svůj signál prostřednictvím G proteinů podtřídy $G_{q/11}$, kdežto M_2 a M_4 receptory předávají svůj signál prostřednictvím G proteinů podtřídy $G_{i/o}$. G proteinovou specifitu muskarinových receptorů určuje 8-12 aminokyselin v N- a C-koncových úsecích smyčky i3. Na interakci s G proteinem se podílí také smyčka i2 a C-konec receptoru. C-konec receptoru může být palmitoylován na cysteinových zbytcích a prostřednictvím palmitoylových zbytků vázán k plazmatické membráně. Takto vytvořená čtvrtá intracelulární smyčka i4 může interagovat s N- a C-koncem i3 a pomáhat vazbě G proteinu.

Podle výsledků bodových mutací (Wess a spol., 1992, 1996) jsou pro interakci mezi muskarinovým receptorem a G proteinem důležité aminokyseliny, které se nacházejí jednak v i2 (bráno podle podtypu M_3 jsou to Asp 164, Arg 165, Tyr 166, Ser 168, Arg 171, Leu 173, Arg 176, Ala 177, Arg 183), jednak na N- a C- konci i3 (Tyr 254, Ala 488, Ala 489), a dále Leu 492 nacházející se v TM VI. Práce Hulmeho skupiny (Lu a spol., 1997) zpochybňuje roli Asp 164 a Tyr 166 a vyzdvihuje úlohu Arg 165.

O dalších aminokyselinách se podle výsledků studií s bodovými mutacemi (Fraser a spol., 1989, Wess a spol., 1996) předpokládá, že jsou důležité pro konformační změnu, která nastává při aktivaci receptoru a je nutná pro aktivaci G proteinu; platí to zejména o (číslování opět podle podtypu M_3) Asp 113 (TM II), Asp 164 (i2), Pro 242 (TM V), Tyr 254 (i3), Asn 507 (TM VI), Asn 539 (TM VI), a Pro 540 (TM VII).

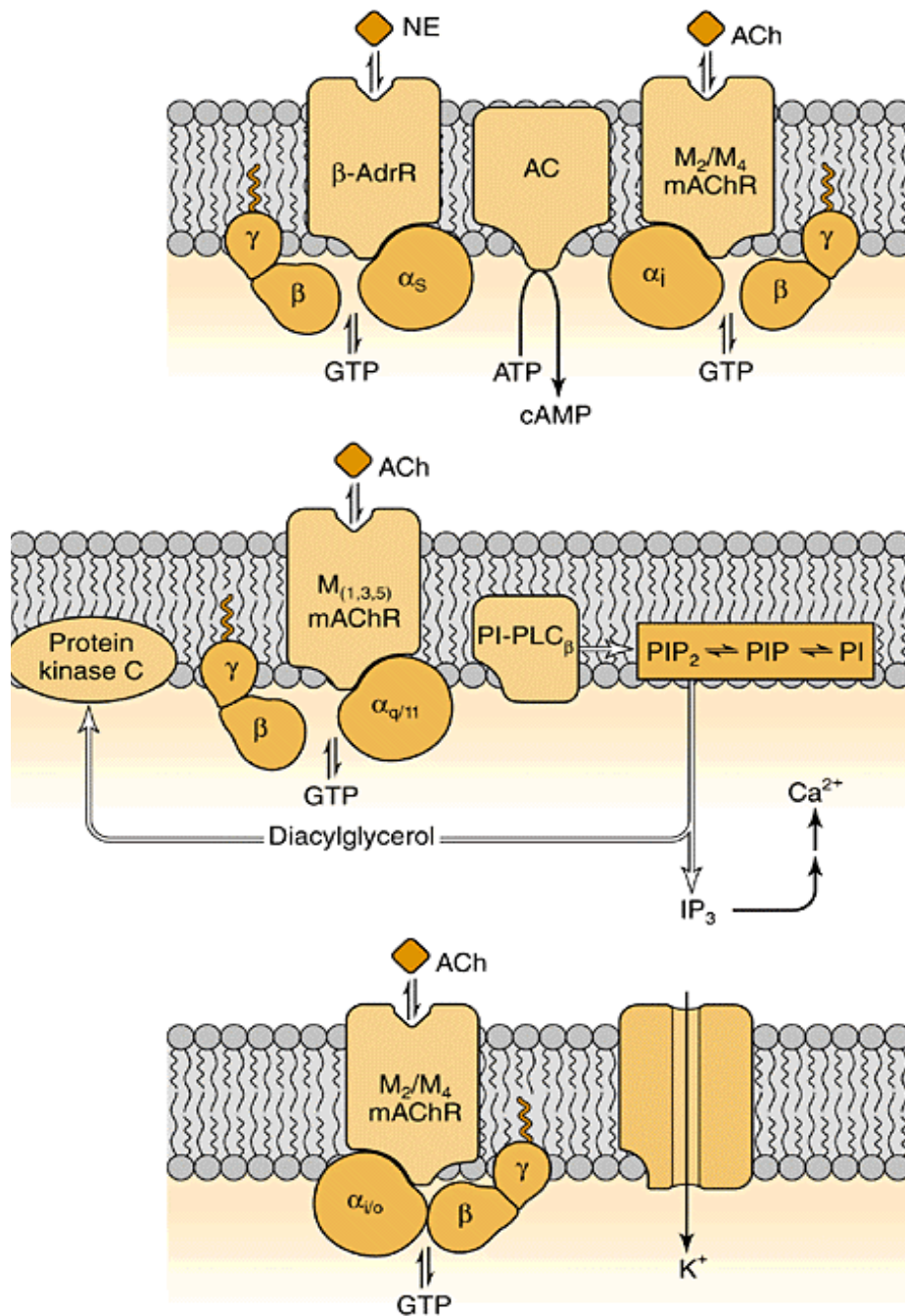
2.3.2. Spřažení muskarinových receptorů s G proteiny a efekty

Muskarinové receptory lze podle G proteinu, na který se z nich signál přenáší, rozdělit do dvou skupin.

Do první skupiny patří podtypy muskarinových receptorů M_1 , M_3 a M_5 , které předávají svůj signál prostřednictvím G proteinů podtřídy $G_{q/11}$, a to nejčastěji na fosfolipasu C specifickou pro fosfoinositidy. Její aktivace vede k rozštěpení fosfatidylinositolbisfosfátu na inositoltrisfosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). IP_3 a DAG fungují v buňce jako druzí poslové. Primární funkcí IP_3 je uvolňování Ca^{++} z endoplazmatického retikula. IP_3 se váže na specifický receptor složený ze čtyř stejných jednotek, které tvoří kanál pro uvolnění Ca^{++} . DAG společně s dalšími faktory (hlavně fosfatidylserinem a Ca^{++}) aktivuje proteinkinasu C (PKC).

Do druhé skupiny patří podtypy M_2 a M_4 , které předávají svůj signál prostřednictvím G proteinů podtřídy $G_{i/o}$. Stimulace muskarinových receptorů podtypů M_2 a M_4 má nejčastěji za následek inhibici adenylylcyklasy a snížení hladiny cAMP. Tento efekt je výraznější, když adenylylcyklasa je stimulována např. aktivací adrenergických receptorů katecholaminy nebo forskolinem. Snížení tvorby cAMP má za následek snížení aktivace cAMP dependentních proteinkinas (PKA) a úbytek fosforylovaných substrátů. Stimulace muskarinových receptorů podtypů M_2 a M_4 vede také k rychlé aktivaci draslíkových kanálů označovaných symbolem GIRK (G protein-coupled, inwardly rectifying potassium channel). Tyto kanály se aktivují $\beta\gamma$ podjednotkami uvolněnými z trimérních G_i a G_o proteinů. Signální dráhy, které vedou k inhibici adenylylcyklasy a aktivaci GIRK, lze inhibovat toxinem produkovaným bakterií *Bordetella pertussis* (toxin pertuse, PTX), který ADP-ribosyluje proteiny G_i , G_o a G_t .

Primární biochemické signály zprostředkované muskarinovými receptory



Obr. 2.3.2.1. M_2 a M_4 muskarinové acetylcholinové receptory (mAChR) interagují s proteiny G_i a inhibují adenylycyklasu (AC). M_1 , M_3 a M_5 mAChR interagují s proteiny G_q a G_{11} a aktivují fosfolipasu C specifickou pro fosfoinositidy. M_2 a M_4 mAChR regulují GIRK (G-protein-coupled, inwardly rectifying potassium channel) prostřednictvím $\beta\gamma$ podjednotek G_i a G_o . NE, norepinefrin (noradrenalin); β -AdrR, β -adrenergní receptory; PI, fosfatidylinositol; PIP, fosfatidylinositol-4-fosfát; PIP $_2$, fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát.; PI-PLC $_{\beta}$, fosfolipasa C specifická pro fosfoinositidy (Siegel a spol.,1998).

Fosfolipasa C je rodina enzymů, která se rozděluje na tři třídy, označované β , γ a δ , přičemž jednotlivé třídy se ještě dále dělí na podskupiny označované číslicemi. Rekonstituční experimenty s purifikovaným M_1 receptorem, G proteinovými podjednotkami a fosfolipasou C naznačují, že β_1 podtyp fosfolipasy C slouží jako primární efektor pro M_1 receptor a že reaguje s α podjednotkami G_q a G_{11} (Berstein a spol., 1992). Stimulace M_5 receptorů však vedla k následné aktivaci jak fosfolipasy $C\beta$ tak i fosfolipasy $C\gamma$ (Gusovsky a spol., 1993). Výše uvedené rozdělení muskarinových receptorů podle jejich efektorů však není absolutní, neboť bylo popsáno, že i klonované M_2 a M_4 receptory mohou stimulovat fosfolipasu C prostřednictvím PTX sensitivních G proteinů. M_2 a M_4 receptory však stimulovaly fosfolipasu C s nižší účinností nežli muskarinové receptory M_1 a M_3 .

Adenylycyklasa je další efektor, který je ovlivňován muskarinovými receptory. Muskarinové receptory podtypů M_2 a M_4 působí prostřednictvím α_i podjednotek inhibiční adenylycyklasy podtypů I, II, V a VI. Dále tyto podtypy působí prostřednictvím podjednotek $\beta\gamma$ uvolněných při aktivaci G_i a G_o proteinů. Podjednotky $\beta\gamma$ inhibují adenylycyklasu podtypu I a aktivují podtypy II a IV, pokud dochází k současné stimulaci adenylycyklasy podjednotkami α_s . Po inhibici adenylycyklasy dochází k snížení aktivity proteinkinasy A, což může zmenšovat snížení aktivity adenylycyklasy podtypů V a VI.

Je však nutné podotknout, že selektivita muskarinových receptorů k jednotlivým podtypům G proteinů není absolutní, ale pouze relativní, což je třeba mít na paměti zvláště při studiu umělých systémů, jako jsou buněčné linie transfektované geny pro muskarinové receptory. Muskarinové receptory interagují za určitých podmínek také s nepreferenčními G-proteiny a aktivují jejich signální dráhy (Migeon a Nathanson, 1994; Vogel a spol., 1995; Michal a spol., 2001; Jakubík a spol., 2006, Michal a spol., 2007). Přímé spřáhování muskarinových M_1 a M_2 receptorů s nepreferenčními G-proteiny jsme pomocí siRNA prokázali v poslední době (Michal a spol., 2007).

Muskarinové receptory podtypů M_1 , M_3 a M_5 mohou působit na adenylycyklasu prostřednictvím podjednotek $\beta\gamma$ uvolněných při aktivaci G proteinů podtřídy $G_{q/11}$, jak již bylo uvedeno výše. Dále tyto podtypy muskarinových receptorů aktivují PLC, která prostřednictvím IP_3 zvyšuje obsah intracelulárního vápníku. Vápníkové ionty ve vazbě na kalmodulin aktivují adenylycyklasu podtypů I, III a VIII. Naproti tomu však mají (bez účasti kalmodulinu) inhibiční účinek na podtypy V a VI. PLC dále aktivuje proteinkinasu

C prostřednictvím DAG. Proteinkinasa C může mít aktivační účinky na adenylylcyklasu podtypů II a V (přehled Tuček, 1997).

Transfektované receptory podtypů M_1 , M_3 a M_5 exprimované v buňkách liniích stimulovaly adenylylcyklasu, přičemž byly popsány jak na kalcium závislé, tak i na kalcium nezávislé mechanismy stimulace. Burford a Nahorski (1995) pozorovali, že receptory M_1 exprimované v CHO buňkách nejenom stimulují PLC prostřednictvím G_q , ale též stimulují adenylylcyklasu prostřednictvím G_s . Tato stimulace byla na vápníku nezávislá, blokovatelná protilátkami proti G_s .

Muskarinové receptory ovlivňují také fosfolipasu A_2 , která katalyzuje hydrolyzu membránových fosfolipidů a generuje volnou arachidonovou kyselinu. Arachidonová kyselina je dále přeměněna na řadu bioaktivních eikosandů zahrnující prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny atd.. Muskarinové receptory stimulovaly uvolnění arachidonové kyseliny v srdci, mozku a svalech (Abdel-Latif a spol., 1986). Ukázalo se, že aktivace fosfolipasy A_2 je spojena s muskarinovými receptory M_1 , M_3 a M_5 a že uvolňování arachidonové kyseliny je insensitivní k PTX, což vylučuje účast G_i a G_o proteinů. M_2 a M_4 receptory exprimované ve fyziologické koncentraci se nepodílí na aktivaci fosfolipasy A_2 .

Signální dráhy a iontové kanály ovlivněné muskarinovými receptory jsou shrnuty v tabulce 2.3.2.1.

	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5
Adenylylcyklasa	+/-	--	+	--	+
PLA2	++		++		++
PLC β	++	+/-	++	+	++
PLC γ	++				++
Zvýšení intracelulárního Ca^{++}	++		++		++
K^+ kanál (IR)		++		++	
Tyrosinové proteinkinasy	++				++

Tab. 2.3.2.1. Efektorové systémy muskarinových receptorů. Znaménko + označuje aktivační, - inhibiční účinek; u kanálů je to buď jejich otevření (+) nebo zavření (-). PL = fosfolipasa; (IR) = inward rectifier; (Ca) = vápníkem řízený; (M) = řízený muskarinovým receptorem; Podle Feldera (1995) a Browna (1995)

2.3.3. Lipidické složení membrány a muskarinové receptory

Poruchy v metabolismu lipidů vyvolávají dobře známé projevy v oblasti kardiovaskulárního a nervového systému a doprovázejí i další metabolické poruchy. V oblasti CNS je prokázán jako jeden z významných rizikových faktorů v patogenezi vzniku sporadické (pozdní) formy Alzheimerovy choroby (ACH) charakterizované degenerací a destrukcí neuronů především cholinergního systému a tvorbou plaků z agregovaného toxického β amyloidu. β amyloid vzniká štěpením z amyloidového prekurzorového proteinu (APP) pomocí enzymu β -sekretázy. Působením enzymu α -sekretázy vznikají z APP rozpustné fragmenty, které mají neuroprotektivní vliv. Štěpení APP je částečně ovlivněno také muskarinovými M_1 receptory, které zvyšují aktivitu α -sekretázy (Nitsch a spol., 1992; Wolf a spol., 1995; Rossner a spol., 1998). Zvýšená hladina cholesterolu naopak zvyšuje aktivitu β -sekretázy, usnadňuje tvorbu plaků a potlačuje aktivitu α -sekretázy (Sparks, 1996; Hartmann, 2007; Grimm, 2008). Na druhé straně snížení membránového cholesterolu inhibitory HMGCoA reductázy a MBCD (methyl-beta-cyklodextrin, cholesterolový chelátor) zvyšovalo aktivitu α -sekretázy (Kojro, 2001). Vliv $\omega 3$ polynenasycených mastných kyselin, zejména pak DHA na snížení hladiny cholesterolu a β amyloidu byl prokázán na transgenním myším modelu Alzheimerovy choroby (Oksman a spol., 2006). Není proto překvapující, že v prevenci a léčbě ACH se kromě inhibitorů acetylcholinestery také uplatňují látky snižující hladinu cholesterolu – statiny a $\omega 3$ polynenasycené mastné kyseliny, které mají také protizánětlivé a antioxidační účinky (Farooqui a spol., 2007).

Významnou úlohu v aktivaci a přenosu signálu prostřednictvím muskarinových receptorů podobně jako i u ostatních membránových receptorů hraje lipidické složení membrány, ve kterém jsou receptory zabudovány. Změna lipidického složení membrán během stárnutí vede následně také k narušení přenosu signálu. V případě muskarinových receptorů byly popsány změny v hustotě receptorů, snížení schopnosti vytvoření vysokoafinitního stavu po receptorové aktivaci a snížení hydrolýzy fosfatidylinositolbisfosfátů a to jak v srdci tak v CNS (Roth, 1995).

Lipidické složení membrány není homogenní, nacházejí se zde domény s vysokým obsahem cholesterolu označované „lipidické rafty“ se kterými jsou membránové receptory

často asociovány (Simons a van Meer, 1988; Brown a London, 1998; Simons a Toomre, 2000). Porušení těchto raftů může vést ke změně v transdukci signálu (Pike, 2003).

Cholesterol může modulovat membránové receptory dvěmi odlišnými cestami (Burger a spol., 2000). Za prvé přímo se vázat k receptoru a měnit jeho konformaci, například Colonzo, 2007 navrhl, že cholesterol se váže přímo k muskarinovému M_2 receptoru a působí jako alosterický modulátor. Za druhé nepřímo, prostřednictvím změny biofyzikálních vlastností membrány a tak mechanicky ovlivňovat vazbu k receptoru a jeho funkční vlastnosti.

Vliv membránového cholesterolu na transdukci signálu G-proteinovými receptory byl popsán u rhodopsinu a oxytocinového receptoru. V případě rhodopsinu, vysoká hladina membránového cholesterolu kompletně blokovala jeho aktivaci (Gimpl a spol., 2002; Mitchell a spol., 1990), u oxytocinového receptoru vedla k posunu z vysokoafinitního do nízkoafinitního vazebného stavu (Klein a spol., 1995).

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1. Biologický materiál, chemikálie a přístroje

3.1.1. Biologický materiál

Pokusy jsme prováděli na celých buňkách a membránách z geneticky modifikovaných liniích CHO (Chinese hamster ovary, fibroblasty z ovárií zlatého křečka) buněk stabilně exprimujících muskarinové receptory podtypu M₂, které byly laskavě poskytnuty Profesorem T. I. Bonnerem (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). (CHO-M₂; Buckley a spol., 1989).

3.1.2. Chemikálie

[³H] adenin 851 GBq/mmol (GE Healthcare,UK)
[¹⁴C] cAMP 8,88 GBq/mmol/l (GE Healthcare,UK)
[¹⁴C] IP (inositol 5-fosfát) 8,88 GBq/mmol/l (GE Healthcare,UK)
[³H] *myo*-inositol 851 GBq/mmol (GE Healthcare,UK)
[³H] N-methylscopolamin ([³H]-NMS) 2650 GBq/mmol (Perkin Elmer ,USA)
Atropin (Sigma - Aldrich, Česká republika)
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma - Aldrich, Česká republika)
DOWEX AG 1X8-200 (Sigma - Aldrich, Česká republika)
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) (Serva, Německo)
Filtry ze skleněných vláken - GF/B a GF/A (Whatman, UK)
Fluorescenční sonda Amplex Red (Molecular Probes, USA)
Folinovo činidlo (Folin - Ciocolteau; Dr Kulich Pharm. s.r.o., Česká republika)
Forskolin (Sigma - Aldrich, Česká republika)
Geneticin (Sigma - Aldrich, Česká republika)
GTP (Sigma - Aldrich, Česká republika)
GTPγS (Sigma - Aldrich, Česká republika)
Hovězí fetální sérum (Sigma - Aldrich, Česká republika)
Cholesterol MBCD (Sigma - Aldrich, Česká republika)
Cholesterol PEG 600 (Sigma - Aldrich, Česká republika)
IBMX (Sigma - Aldrich, Česká republika)
Karbachol (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Kyselá alumina typ WA-1 (Sigma - Aldrich, Česká republika)
MBCD (Sigma - Aldrich, Česká republika)
MgCl₂ (Lachema, Česká republika)
NaCl (Penta, Česká republika)
Na-HEPES (Sigma - Aldrich, Česká republika)
NaOH (Penta, Česká republika)
Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma - Aldrich, Česká republika)
Scintilační roztok - Rotiszint eco plus (Roth, Německo)
Trypsin (Sigma - Aldrich, Česká republika)

3.1.3. Přístrojové vybavení

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-60HI PLUS Thermo Shaker (Boeco, Německo)
Grant-bio (P-lab a.s., Česká republika)
Filtrační zařízení: Brandel Cell harvester (USA)
Čtečka destiček Wallac VictorTM (Finsko)

3.2 Metody

3.2.1. Pěstování a sklizení buněk

CHO buňky stabilně exprimující lidské muskarinové receptory M₂ jsme pěstovali při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂ 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). Buňky jsme sklízeli jemnou trypsinizací (0,05% trypsin) po sedmi dnech růstu v kultuře a následně rozsazovali.

3.2.2. Příprava membrán

Buňky pěstované v Petriho miskách (průměr 10cm, 75-78 cm²) jsme sklízeli po čtyřech dnech růstu v kultuře. Nejprve jsme je opláchli dvakrát 5 ml fosfátového izotonického roztoku (PBS; Phosphate Buffered Saline) následně umístili na led a podrobili osmotické lýze ve 4 ml hypotonického média. Poté jsme provedli izotonizaci 4M NaCl. Hrubé fragmenty jsme odstranili nízkootáčkovou centrifugací při 300 g po dobu 3 minut a 4 °C. Supernatant jsme rozdělili do mikrozkušavek po 2 ml a centrifugovali 60 min při 25000 g a 4 °C. Po odsátí supernatantu jsme membrány zamrazili při -80 °C. Před pokusem jsme membrány resuspendovali v inkubačním médiu. Osmotická lýza byla vhodnější pro přípravu membrán z CHO-buněk nežli homogenizace v homogenizátoru Ultra-Turrax, při které roztok značně pěnil a výtěžky membrán byly nižší.

Hypotonické médium: 5 mM Na-HEPES, 2 mM EDTA, pH 7,4

Inkubační médium: 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Na-HEPES, pH 7,4

3.2.3. Ovlivnění obsahu membránového cholesterolu

Z předběžných pokusů vyplynulo jako optimální použít hodinovou inkubaci s 10 mM chelátorem cholesterolu MBCD (metyl-beta-cyklodextrin) pro snížení a 2 mM cholesterol-MBCD pro zvýšení obsahu cholesterolu v membráně. Podrobnější postupy jsou uvedeny u příslušných typů pokusů.

3.2.4. Stanovení proteinů

Množství proteinů jsme stanovovali spektrofotometricky při 690 nm Lowryho metodou (Lowry a spol., 1951) v Petersonově modifikaci (Peterson, 1977). Stanovení jsme provedli v triplicátech v mikrotitračních 96-jamkových destičkách. Vzorky jsme rozpouštěli v 1 M roztoku NaOH. Kalibrační křivka byla tvořena roztoky lidského sérového albuminu o výsledných koncentracích 0-0,625-1,25-2,5-5-10-20-40 µg/jamku s přidáním roztoku 1 M NaOH v množství odpovídajícím aliquotu stanovovaných vzorků, pro zachování stejného pH jako u stanovovaných vzorků.

3.2.5. Stanovení obsahu cholesterolu

Obsah cholesterolu v buňkách a membránách jsme stanovili pomocí fluorescenční sondy Amplex Red (Molecular Probes). Podstata stanovení spočívá nejdříve v hydrolýze esterů cholesterolu enzymem cholesterolesterasou, dále pak v oxidaci cholesterolu pomocí enzymu cholesteroxidasy, při které se uvolňuje peroxid vodíku. Ten potom v přítomnosti peroxidasy přeměňuje látku Amplex Red na fluorescenční resorufin. Fluorescence byla stanovena na čtečce destiček VictorTM při excitaci/emisi 544/590 nm. Pro porovnání poměru volného a esterifikovaného cholesterolu jsme stanovili obsah cholesterolu s a bez enzymu cholesterolesterasy.

3.2.6. Stanovení metabolické aktivity a buněčné integrity

Metabolickou aktivitu jsme odvodili ze stanovení oxidace fluoresceinu, integrity membrány podle relativní retence kalceinu (Nováková a spol., 2005). CHO-M₂ buňky rostly tři dny v kultuře, poté byly opracovány hodinovou inkubací s 10 mM MBCD pro snížení obsahu cholesterolu a 2 mM CH-MBCD pro jeho zvýšení. Pro stanovení retence kalceinu jsme kontrolní a opracované buňky inkubovali 2 hodiny při 37 °C v Krebs-Hepes médiu obsahující 10 μM fluorescenční sondy kalcein AM. Po inkubaci jsme měřili fluorescenci na čtečce destiček VictorTM při excitaci/emisi 485/535 nm. Signál z extracelulárního kalceinu byl zhasen 0,1 mM MgCl₂. Při stanovení oxidační aktivity jsme buňky inkubovali 1 hodiny při 37 °C v Krebs-Hepes médiu obsahující 10 μM fluorescenční sondy 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát poté jsme měřili fluorescenci na čtečce destiček VictorTM při excitaci/emisi 485/535 nm. Výsledky jsme vyjádřili jako procentuální poměr k neopracovaným buňkám.

3.2.7. Měření syntézy cAMP

Měření vlivu membránového cholesterolu na průběh syntézy cAMP jsme prováděli na intaktních buňkách pěstovaných v 24-jamkových destičkách. Po třech dnech od nasazení jsme buňky opláchli PBS a poté přidali 0,2 ml DMEM s [³H]adeninem v koncentraci 10 μCi / ml a preinkubovali 12 hodin. Během této preinkubace se z

[³H]adeninu v buňkách vytvořil [³H]ATP a z něj mohl vznikat [³H]cAMP. Následně jsme k buňkám přidali 0,8 ml DMEM s 12,5 mM MBCD pro snížení obsahu cholesterolu, s 2,5 mM cholesterol-MBCD pro jeho zvýšení a samotné DMEM v případě kontrol. Konečné koncentrace byly 10 mM a 2 mM. Po ukončení preinkubace jsme buňky opláchli 2x v PBS a inkubovali s 0,4 ml roztoku 1,25 mM IBMX (kvůli inhibici fosfodiesterasy) 15 minut a následně jsme přidali 0,1 ml 10 μM forskolinu (ke stimulaci adenylylcyklasy) společně s různými koncentracemi karbacholu (10 nM – 1 mM) na 10 minut. Inkubaci jsme ukončili 0,2 ml 20% TCA, 0,1 ml [¹⁴C]cAMP a 1,2 ml deionizované vody. Inkubaci jsme prováděli při 37°C v DMEM médiu. Po ukončení inkubace jsme destičky s buňkami umístili 30 minut na led a z buněk extrahovali [³H]cAMP. Od [³H]adeninu a jeho metabolitů jsme jej oddělili chromatograficky. Postup pro separaci cAMP byl následující : na kolonu s 1,5 g kyselých aluminy se nanese 1,5 ml TCA extraktu, poté se přidalo 8 ml deionizované vody, následně pak 2 ml 0,2 M octanu amonného. Poslední 3 ml vytékajícího octanu amonného obsahovaly cAMP. Sbírali jsme je do plastických scintilačních lahvíček a smíchali je s 8 ml scintilačního roztoku Rotiszint eco plus. Množství [³H]cAMP nacházející se v eluátu jsme korigovali podle účinnosti separace (výtěžku [¹⁴C]cAMP), která se pohybovala mezi 80-90%. Pro zjištění celkové radioaktivity jsme měřili radioaktivitu v 0,1 ml TCA extraktu a po rozpuštění v 1 M NaOH také v TCA fixovaných buňkách na dně destičky. Množství cAMP jsme vyjádřili jako promile [³H]cAMP v celkové radioaktivitě. Radioaktivita byla měřena na Beckmannově scintilačním počítači.

Použití toxinu pertuse

Toxin produkovaný *Bordetella pertussis* je bakteriálním toxinem typu A-B. Podobně jako toxin cholery má dvě podjednotky, enzymaticky aktivní podjednotku A a komponentu B, která se váže k buněčnému povrchu a umožňuje podjednotce A vstup do buňky. Podjednotka A je protein (28 kDa) mající NAD⁺ glukohydrolasovou a ADP-ribosyltransferasovou aktivitu. Komponenta B je složena z pěti podjednotek, na které se váží ATP a fosfolipidy, které indukují disociaci složek A a B. NAD⁺ glukohydrolasová a ADP-ribosyltransferasová aktivita se projeví, až když se podjednotka A rozdělí redukcí disulfidické vazby mezi dvěma cysteiny intracelulárním glutathionem. Substrátem pro ADP-ribosylaci toxinem pertuse je konzervovaný cysteinový zbytek lokalizovaný blízko C-konce α_i , α_o a α_t podjednotek G proteinů. Důsledkem ADP-ribosylace toxinem pertuse je ztráta schopnosti G proteinů komunikovat s receptory. Účinek toxinu pertuse jsme

využili k vyřazení funkce Gi proteinu při některých pokusech se syntézou cAMP, ve kterých jsme buňky preinkubovali s toxinem (0,1 µg/ml) po 24 hodin.

3.2.8. Měření produkce inositolfosfátů

Měření jsme prováděli v 24-jamkových destičkách. Postup preinkubace byl obdobný jako v případě měření cAMP s tím rozdílem, že buňky jsme preinkubovali s [³H]myo-inositolem v koncentraci 10 µCi / ml. Během této preinkubace se z [³H]myo-inositolu v buňkách vytvořil [³H]PIP₂ a z něj mohly vznikat [³H]inositolfosfáty. Po ukončení preinkubace jsme buňky opláchli 2x v PBS a inkubovali 15 minut s 10 mM LiCl (kvůli inhibici fosfatasy) a následně pak 20 minut s různými koncentracemi karcholu. Inkubaci jsme ukončili 0,2 ml 20% TCA. Inkubaci jsme prováděli při 37°C v DMEM médiu. Po ukončení inkubace jsme destičky s buňkami umístili 30 minut na led a z buněk extrahovali [³H]inositolfosfáty (převážně inositolmonofosfát (IP)). Od [³H]inositolu jsme jej oddělili chromatograficky. Nezareagovaný [³H]PIP₂ zůstával ve fixovaných buňkách a do TCA extraktu nepřecházel. Postup pro separaci inositolfosfátů byl následující : na kolonu s 1,2 g DOWEX AG 1X8-200 (iontoměnič), se nanesl 0,5 ml TCA extraktu, poté se přidalo 10 ml deionizované vody, následně pak 20 ml 60 mM mravenčanu amonného s 5 mM tetraboritanu sodného. Sbírali jsme 4 ml 1 M mravenčanu amonného s 0,1mM kyseliny mravenčí do plastických scintilačních lahvíček a smíchali je s 10 ml scintilačního roztoku Rotiszint eco plus. Množství [³H]inositolfosfátu nacházející se v eluátu jsme korigovali podle účinnosti separace (výťažku [¹⁴C]IP), která se pohybovala okolo 60%. Pro zjištění celkové radioaktivity jsme postupovali stejně jako v případě měření syntesy cAMP. Množství inositolfosfátů jsme vyjádřili jako procento [³H]inositolfosfátů v celkové radioaktivitě.

3.2.9. Měření internalizace receptorů

Měření jsme prováděli v 24-jamkových destičkách, internalizaci jsme vyvolali muskarinovým agonistou karcholem. Po určitém časovém intervalu jsme karchol důkladně odmyli 4x v PBS. Pro zjištění počtu receptorů jsme následně inkubovali destičky při 4°C (k zabránění tvorby nových receptorů na povrchu membrány) se supersaturující (2nM) koncentrací [³H]-NMS v DMEM médiu po dobu 16 hodin. Po opláchnutí volného

[³H]-NMS jsme buňky rozpustili v 0,5 ml 1M NaOH, 0,4 ml jsme použili na měření radioaktivity, zbytek na stanovení proteinů. Pro charakterizaci průběhu internalizace jsme stanovili jednak koncentrační závislost (10 nM - 1 mM karbachol) průběhu internalizace při 20 minutové inkubaci a dále pak časový průběh internalizace (2-60 minut) v přítomnosti 10 μM a 1 mM karbacholu.

3.2.10. Vazebné pokusy

3.2.10.1. Principy měření vazebných vlastností receptorů

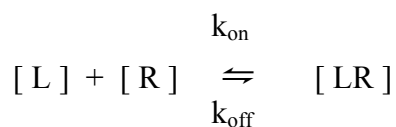
Při studiu vazebných vlastností membránových receptorů se široce uplatňují metody, při nichž se měří množství specifických radioligandů, které se navázaly na určitý typ receptoru v závislosti na koncentraci radioligandu, čase, přítomnosti neznačených ligandů a dalších faktorech. Technický princip těchto pokusů spočívá v tom, že se receptory v membránách a specifický radioligand společně inkubují ve vhodném médiu a v určitém okamžiku se inkubace ukončí, a to tak, aby se přitom co nejrychleji od sebe oddělil radioligand navázaný na receptory a radioligand volný. K tomuto účelu se nejčastěji používá metoda rychlého odfiltrování, při níž volný ligand proteče filtrem a je ztracen, kdežto ligand vázaný na receptory v membránách se zachytí na filtru a jeho množství se pak určí změřením jeho radioaktivity.

V dalším popíši tři základní typy vazebných pokusů, které jsme uplatnili v naší práci. Jednalo se o saturační vazebné pokusy, kompetiční pokusy a disociační pokusy.

3.2.10.2. Saturační vazebné pokusy - stanovení počtu a afinity receptorů

Teoretické základy

Jestliže membrány s receptory R inkubujeme společně s odpovídajícím specifickým radioligandem L po určitou dobu, vytvoří se radioligand-receptorový komplex LR. Tento proces může být popsán rovnicí



kde k_{on} je rychlostní konstanta asociace a k_{off} je rychlostní konstanta disociace. Rovnováhy je dosaženo, když se rychlost disociace rovná rychlosti asociace

$$[L] \times [R] \times k_{on} = [LR] \times k_{off}$$

Z této rovnice můžeme odvodit rovnovážnou disociační konstantu K_d .

$$[L] \times [R] / [LR] = k_{off} / k_{on} = K_d$$

K_d je vyjádřena v jednotce mol na liter a je to koncentrace ligandu, při které je v rovnovážném stavu obsazeno 50% receptorů.

Relativní obsazenost receptoru ligandem po dosažení rovnováhy je funkcí koncentrace ligandu.

$$\begin{aligned} [LR] / [R]_{total} &= [LR] / ([R] + [LR]) = \\ &= [L] / ([L] + K_d) \end{aligned}$$

Tato rovnice se při zpracování vazebných pokusů obvykle používá v transformované podobě jako

$$B = B_{max} \times [L] / (K_d + [L])$$

kde B je množství radioligandu navázaného na receptor při koncentraci volného radioligandu rovné $[L]$ a B_{max} je celkový počet receptorů $[R]_{total}$. Koncentraci volného radioligandu $[L]$ obvykle můžeme nahradit celkovou koncentrací radioligandu, pokud se celková koncentrace navázáním L na R nesnížila o více než 10 %. Při saturačních pokusech měříme celkovou vazbu, nespecifickou vazbu a koncentraci radioligandu. Celková vazba, kterou naměříme, je vždy součet vazby specifické a nespecifické. Nespecifická vazba je vazba radioligandu k nereceptorovým místům a je zpravidla přímo úměrná koncentraci radioligandu. Specifickou vazbu získáme odečtením nespecifické vazby od celkové vazby radioligandu. Specifická vazba stoupá s koncentrací radioligandu až do obsazení všech receptorů. Po obsazení všech receptorů je specifická vazba radioligandu maximální a označuje se B_{max} . B_{max} a K_d určujeme na základě rovnice 7 nelineární regresí.

Praktický postup

Saturační vazebné pokusy jsme prováděli na celých buňkách a na membránách. V případě pokusů na celých buňkách jsme je nejdříve sklídili z Petriho misek (průměr 10 cm) po třech dnech růstu jemnou trypsinizací (0,05% trypsin) a centrifugovali 3 minuty při 300g. Sediment jsme resuspendovali v DMEM médiu s 10mM MBCD pro snížení obsahu

cholesterolu, s 2 mM cholesterol-MBCD pro jeho zvýšení a v samotném DMEM v případě kontrol. K množství buněk z 1 misky jsme přidali 10 ml media. Buňky jsme inkubovali 1 hodinu při 37 °C a poté centrifugovali a resuspendovali v DMEM médiu a použili do pokusu.

Při pokusech na membránách jsme Petriho misky s buňkami opláchli PBS a přidali k nim DMEM médium s 10 mM MBCD pro snížení obsahu cholesterolu, s 2 mM cholesterol-MBCD pro jeho zvýšení a samotné DMEM médium v případě kontrol. Množství média bylo 10 ml na misku. Buňky jsme inkubovali 1 hodinu při 37 °C. Z takto připravených buněk jsme připravili membrány dle postupu 3.2.2. .

Membrány nebo buňky jsme resuspendovali v inkubačním nebo DMEM médiu v koncentraci 30 µg proteinu na zkumavku. Membrány jsme inkubovali v konečném objemu 0,8 ml se značeným [³H]-NMS o koncentracích 2000-1000-500-250-125-62,5 pM, 45 minut v triplicátech. Teplota inkubace v případě membrán byla 30°C a v případě celých buněk 37°C. Pro určení nespecifické vazby jsme navíc ke každé koncentraci radioligandu přidali do reakční směsi atropin v supersaturující koncentraci 10 µM. Inkubaci jsme ukončili rychlou vakuovou filtrací (Brandel Cell Harvester) za použití Whatmann GF/F filtrů namočených pro snížení nespecifické vazby v 3% roztoku polyethyleniminu. Filtr se zachycenou radioaktivitou jsme vložili do scintilační lahvičky s 2 ml scintilačního roztoku Rotiszint eco plus. Radioaktivita byla měřena na Beckmannově scintilačním počítači. Koncentrace značeného ligandu jsme stanovili ze známé specifické radioaktivity [³H]-NMS a z radioaktivity v médiu. Naměřené hodnoty jsme vyjádřili jako specifickou vazbu [³H]-NMS vztaženou na proteiny (pmol/mg).

3.2.10.3. Kompetiční pokusy - stanovení afinity neznačených ligandů

Teoretické základy

Při kompetičních pokusech měříme rovnovážnou vazbu radioligandu v přítomnosti různých koncentrací neznačeného ligandu, který se váže na totéž vazebné místo a o toto místo kompetuje. Neznačený ligand snižuje vazbu značeného ligandu a podle toho, při jakých koncentracích neznačeného ligandu nastává inhibice vazby značeného ligandu, je možno určit afinitu mezi neznačeným ligandem a receptorem.

Model popisující interakci radioligandu L a kompetitivního ligandu I s receptorem R je:



kde $[IR]$ je koncentrace receptorů obsazená inhibitorem I. Za podmínek rovnováhy platí pro obsazenost receptoru R radioligandem L v přítomnosti inhibitoru I rovnice:

$$[LR] / [R_{\text{total}}] = [LR] / ([R] + [LR] + [IR])$$

a pro obsazenost receptoru R inhibitorem I v přítomnosti radioligandu L platí rovnice :

$$[IR] / [R_{\text{total}}] = [IR] / ([R] + [LR] + [IR])$$

$$= [I] / ((K_i \times (1 + [L] / K_d) + [I])) \quad (14)$$

kde K_i je rovnovážná disociační konstanta kompetitoru.

Při vlastním měření afinity neznáčeného ligandu I k receptorům R získáme hodnotu IC_{50} , která charakterizuje afinitu inhibitoru I k receptorům R a je definována jako koncentrace inhibitoru, která blokuje 50% receptorů obsazených radioligandem bez přítomnosti inhibitoru. Hodnota IC_{50} je závislá na koncentraci radioligandu L a je vždy větší než hodnota K_i . Z hodnoty IC_{50} vypočítáme hodnotu K_i podle rovnice, kterou navrhli Cheng a Prusoff (Cheng a Prusoff, 1973).

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$$

V kompetičním pokusu je vazba radioligandu snižována zvyšující se koncentrací inhibitoru. Jestliže označíme koncentraci receptorů obsazenou radioligandem L v přítomnosti inhibitoru I jako B, koncentraci receptorů obsazenou radioligandem L v nepřítomnosti inhibitoru I jako B_0 pak můžeme frakci receptorů obsazenou radioligandem v přítomnosti inhibitoru I tzn. B / B_0 vyjádřit jako :

$$B / B_0 = IC_{50} / (IC_{50} + [I])$$

Hodnotu IC_{50} počítáme na základě této rovnice nelineární regresi.

Hillův koeficient

Při analýze kompetičních pokusů se můžeme setkat s kompetitory, jejichž vazba k receptorovým preparátům ne zcela odpovídá uvedeným předpokladům např. se váží k více než jedné populaci receptorů. Tyto odchylky se projeví na kompetičních křivkách jejich odlišnou strmostí. Strmost křivek může být kvantifikována pomocí Hillova koeficientu (nH). Odpovídá li vazba kompetitoru předpokladům zmíněným výše, kompetiční křivka má $nH = 1$.

U strmější kompetiční křivky je $n_H > 1$ a u méně strmé je $n_H < 1$. Ke kvantifikaci strmosti kompetičních křivek fitujeme naměřená data podle následující rovnice :

$$B / (B_0 - B) = [I]^{n_H} / IC_{50}$$

Údaje o Hillově koeficientu n_H se obvykle interpretují takto :

$n_H = 1$: ligand se váže na jednu populaci receptorů, tato vazba se řídí předpoklady shrnutými výše.

$n_H > 1$: pozitivní kooperativita mezi vazebnými místy

$n_H < 1$: negativní kooperativita mezi vazebnými místy, více vazebných míst pro jeden ligand

Jeli kompetitor agonista, Hillův koeficient je menší než jedna, neboť agonista G-proteinových receptorů obsazuje tzv. vysokoafinitní (receptor obsazený G-proteinem bez GDP) a nízkoafinitní (receptory s G-proteinem obsazeným GDP a receptory bez G-proteinu) vazebná místa.

Agonista je schopen změnit interakci receptoru s G proteinem a následkem toho může receptor změnit afinitu k agonistovi. Převedení vysokoafinitních vazebných míst na nízkoafinitní se dosáhne přidáním GTP nebo jeho nehydrolyzovatelných analogů. Jestliže kompetitor je agonista, analyzujeme výsledky kompetičního pokusu podle rovnice pro dvě vazebná místa :

$$[B] = [B_{vys}] / (1 + [I] / IC_{50\ v\ v\ s}) + [B_{niz}] / (1 + [I] / IC_{50\ n\ i\ z})$$

F-test

F-test je důležitý pro rozhodování zda hodnoty získané z pokusu budeme analyzovat podle jedno nebo dvou místného modelu. Obecně vícemístný model je flexibilnější a proto vždy u něho napočítáme nižší hodnotu součtu čtverců tzn. „lepší proložení“.

$$F = \{ (SS1 - SS2) / SS2 \} / \{ (DF1 - DF2) / DF2 \}.$$

SS1, SS2 součet čtverců pro jedno nebo dvou místný model; DF1, DF2 stupně svobody pro jedno nebo dvou místný model

Jestliže F je blízko 1, platí jedno místný model, jeli mnohem vyšší platí dvou místný model.

Praktický postup

Kompetiční pokusy jsme prováděli na celých buňkách a membránách. Změna membránového cholesterolu a inkubační podmínky byly obdobné jako v případě saturačních pokusů. Buňky nebo membrány jsme nejdříve preinkubovali 20 minut

s 600pM [³H]-NMS. Poté se inkubovaly 45 minut v přítomnosti radioligandu a různých koncentrací (100 pM až 10 mM) karbacholu. Inkubaci jsme ukončili filtrací na filtračním zařízení firmy Brandel přes GF/F filtry firmy Whatman. Filtry se před použitím po 30 minut namočily v 0,3 % roztoku polyethyleniminu. Nespecifická vazba se měřila v přítomnosti 10 μM atropinu. V některých pokusech na membránách médium obsahovalo také 0,5 mM GTP. Naměřené hodnoty jsme vyjádřili jako % radioaktivity s a bez karbacholu.

3.2.10.4. Stanovení rychlosti disociace ligandu (disociační pokusy)

Teoretické základy

Při disociačních pokusech měříme rychlost disociace radioligandu z receptoru, která je vyjádřena jako rychlostní disociační konstanta k_{off} . Radioligand se inkubuje s receptory po dobu nutnou pro vytvoření dostatečného počtu radioligand-receptorových komplexů. Ačkoli není nutné dosáhnout rovnováhy, je vhodnější pracovat za podmínek rovnováhy.

Rychlost spontánní disociace radioligandu se odhalí tím, že se od určitého okamžiku znemožní zpětná asociace molekul radioligandu, které se odpoutaly od vazby na receptor, anebo se silně sníží pravděpodobnost takové zpětné asociace. K zabránění vazby oddisociovaného radioligandu k receptoru se používá buď nejméně padesátinásobné naředění vzorku anebo přidání přebytku neznačeného (stejného nebo kompetujícího) ligandu. Koncentrace neznačeného ligandu má být nejméně stonásobek koncentrace, která obsadí 50 % přítomných receptorů, tj. $100 \times IC_{50}$ z receptoru.

Disociace je obecně proces prvního řádu. Rychlost změny koncentrace radioligand-receptorového komplexu je definována jako :

$$d[B] / dt = -k_{off} \times [B]$$

Po integraci rovnice dostaneme

$$\ln ([B] / [B_0]) = - k_{off} \times t$$

kde $[B]$ je specifická vazba radioligandu v čase t , $[B_0]$ je specifická vazba v čase $t = 0$ a k_{off} je rychlostní disociační konstanta. Poločas disociace $t_{1/2}$ je definován jako čas, za který klesne počáteční specifická vazba $[B_0]$ na polovinu. Po dosazení do rovnice je poločas disociace $t_{1/2}$:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{off} = 0,693 / k_{off}$$

Praktický postup

Vliv membránového cholesterolu na rychlost disociace [³H]-NMS jsme měřili v disociačních pokusech na celých buňkách a membránách z CHO-M₂ buněk. Opracování buněk bylo stejné jako v případě saturačních pokusů. Nespecifická vazba byla určena v přítomnosti 10 μM atropinu. Inkubační teplota byla 30°C v případě membrán a 37°C v případě celých buněk. Membrány z CHO buněk se nejdříve preinkubovaly 30 minut s 600 pM [³H]NMS a poté byla vyvolána disociace přidáním 10 μM atropinu.

3.2.11. Zpracování výsledků

Hodnoty IC₅₀, K_d, K_i, B_{max}, nH (Hillův koeficient), f_{vys} a EC₅₀ jsme vypočítali programem GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

Pro analýzu dvoufázového účinku karcholu na syntézu cAMP jsme použili následující rovnici :

$$Y = 100 \times (1 - \text{Inhibice}) \times (1 + \text{Stimulace}),$$

kde Y = je vyjádření syntézy cAMP v přítomnosti dané koncentrace agonisty ,

$$\text{Inhibice} = ((100 - \text{MI})/100) \times 10^X / (10^X + 10^{\log \text{IC}_{50}})$$

$$\text{Stimulace} = ((\text{MS} - \text{MI})/\text{MI}) \times 10^X / (10^X + 10^{\log \text{EC}_{50}})$$

kde X = log koncentrace agonisty, MI a MS je maximum inhibice a maximum stimulace.

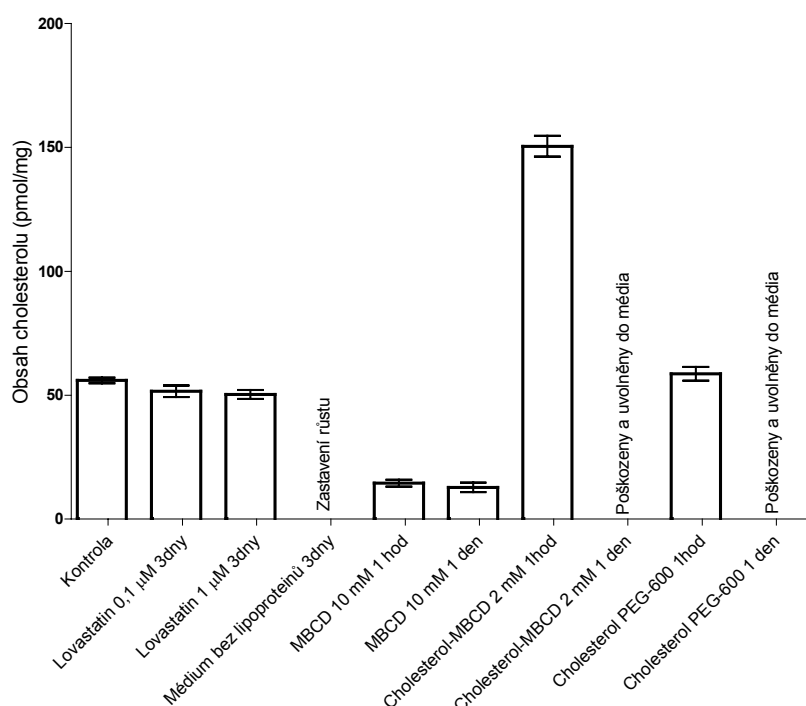
3.3. Výsledky

3.3.1. Stanovení postupu ovlivnění obsahu cholesterolu v CHO-M₂ buňkách

Snižování obsahu cholesterolu jsme se snažili docílit pěstováním buněk v médiu s fetálním sérem bez lipoproteinů, pomocí inhibitoru syntézy cholesterolu lovastatinu nebo pomocí chelátoru cholesterolu methyl- β -cyclodextrinu (MBCD). V médiu s fetálním sérem bez lipoproteinů buňky téměř nerostly. Lovastatin způsobil pouze nepatrné (přibližně 5%) snížení obsahu cholesterolu v buňkách.

Zvyšování obsahu cholesterolu jsme se snažili dosáhnout přidáním rozpustných forem cholesterolu Cholesterol-PEG600 a Cholesterol-MBCD do kultivačního média. Cholesterol-PEG600 nezvyšoval obsah cholesterolu v CHO-M₂ buňkách ani při vysokých koncentracích (60 mg/ml) zatímco Cholesterol-MBCD způsoboval časově a koncentračně závislé zvýšení obsahu cholesterolu v buňkách. Při dlouhodobém působení (1-2 dny) obě látky buňky značně poškodily.

Z těchto pokusů vyplynulo jako optimální použít MBCD pro snížení a Cholesterol-MBCD pro zvýšení obsahu cholesterolu. Výsledky pokusů jsou uvedeny v obr. 3.3.1. a tab. 3.3.1. .



Obr. 3.3.1. Účinky zkoumaných látek na hladinu cholesterolu v CHO-M₂ buňkách vyjádřené jako pmol cholesterolu v mg buněčného proteinu. Hodnoty představují průměr (\pm S.E.M.) 6 až 9 stanovení.

	<i>Délka působení</i>	<i>Obsah cholesterolu (pmol/mg)</i>
<i>Kontrola</i>	0	56,0 ± 1,1
<i>Snižování obsahu cholesterolu</i>		
Lovastatin 0,1 µM	3 dny	51,6 ± 2,3
Lovastatin 1 µM	3 dny	50,3 ± 1,8
Médium bez lipoproteinů	3 dny	zastavení růstu
MBCD 10 mM	1 hod	14,5 ± 1,4
	1 den	12,8 ± 1,9
<i>Zvyšování obsahu cholesterolu</i>		
Cholesterol-MBCD 2 mM	1 hod	150,5 ± 4,2
	1 den	Poškozeny a volněny do média
Cholesterol PEG-600	1 hod	58,7 ± 2,8
	1 den	Poškozeny a volněny do média

Tab. 3.3.1. Účinky zkoumaných látek na hladinu cholesterolu v CHO-M₂ buňkách vyjádřené jako pmol cholesterolu v mg buněčného proteinu. Hodnoty představují průměr (± S.E.M.) 6 až 9 stanovení.

3.3.2. Časový a koncentrační vliv MBCD a Cholesterol-MBCD na obsah cholesterolu v CHO-M₂ buňkách

V dalších pokusech jsme se zaměřili na stanovení vhodné koncentrace a délky působení těchto látek. Obě látky vykazovaly časový a koncentrační účinek na hladinu cholesterolu.

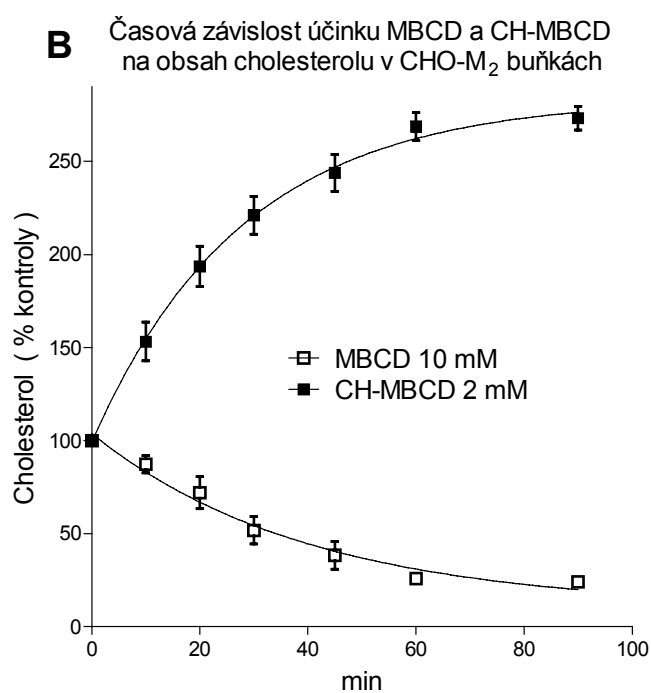
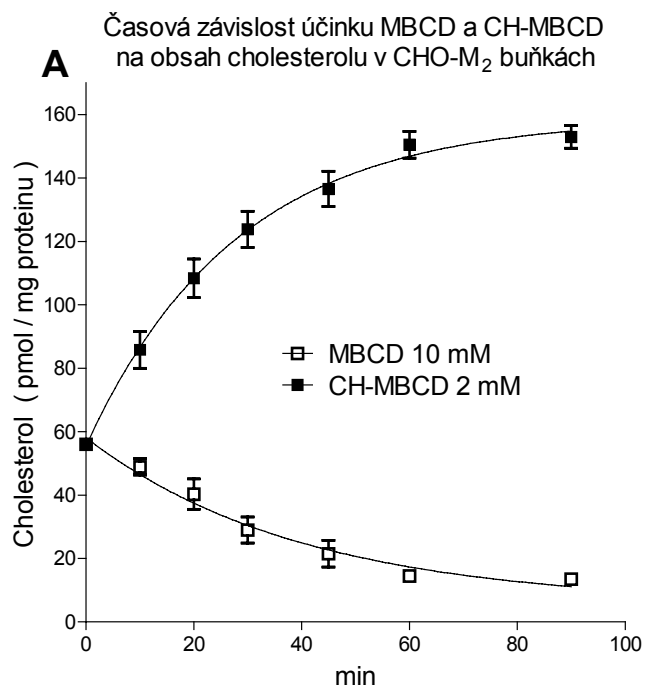
Účinek 2 mM CH-MBCD a 10 mM MBCD v čase je ukázán na obr. 3.3.2.1. a v tab. 3.3.2.1. . Z nich vyplývá, že po 1 hodině se hladina cholesterolu již významněji nemění a ustálila se na určité hodnotě, rovněž rozdíly mezi jednotlivými pokusy byly nejmenší.

Koncentrační závislost popisuje tab. 3.3.2.2. a obr. 3.3.2.2., 10 mM MBCD a 2 mM CH-MBCD vykazovaly maximum účinku, které se při zvyšující koncentraci příliš neměnilo.

Pro další výzkum jsme zvolili hodinovou inkubaci s 10 mM MBCD pro snížení a 2 mM CH-MBCD pro zvýšení obsahu cholesterolu v buňce.

Čas min	Účinek pmol / mg		Účinek % kontroly	
	MBCD 10 mM	CH-MBCD 2 mM	MBCD 10 mM	CH-MBCD 2 mM
0	56,0 ± 1,1	56,0 ± 1,1	100,0 ± 2,0	100,0 ± 2,0
10	48,9 ± 2,6	85,8 ± 5,8	87,3 ± 4,6	153,2 ± 10,4
20	40,3 ± 4,8	108,4 ± 6,1	72,3 ± 8,6	193,6 ± 10,9
30	29,0 ± 4,1	123,8 ± 5,7	51,8 ± 7,3	221,1 ± 10,2
45	21,5 ± 4,2	136,6 ± 5,6	38,4 ± 7,5	243,9 ± 10,0
60	14,5 ± 1,4	150,5 ± 4,2	25,9 ± 2,5	268,8 ± 7,4
90	13,5 ± 1,5	153,0 ± 3,6	24,1 ± 2,6	273,2 ± 6,4

Tab. 3.3.2.1. Časová závislost účinku 10 mM MBCD a 2 mM CH-MBCD na hladinu cholesterolu v CHO-M₂ buňkách. Čas 0 min znamená kontrolu. Účinky jsou vyjádřeny jako pmol cholesterolu v mg buněčného proteinu (pmol/mg) a v % kontroly. Hodnoty představují průměr (± S.E.M.) 6 až 9 stanovení.

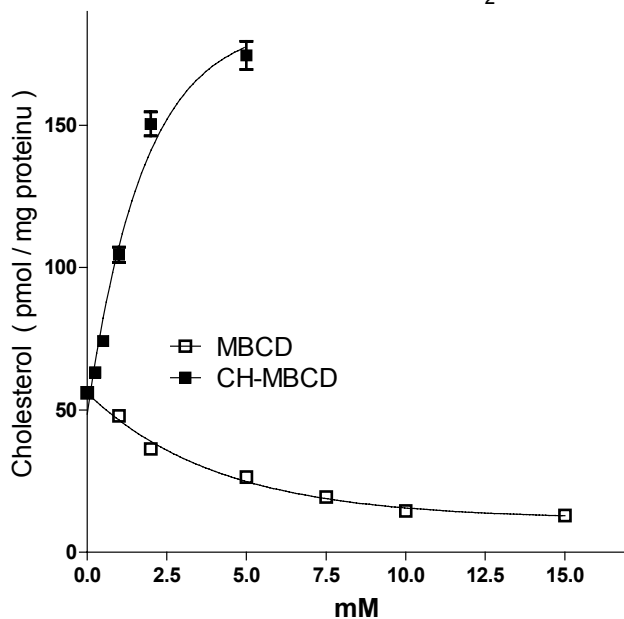


Obr. 3.3.2.1. Časová závislost účinku 10 mM MBCD a 2 mM CH-MBCD na hladinu cholesterolu v CHO-M₂ buňkách. Na ose x je vynesena čas inkubace v minutách a na ose y účinek vyjádřený jako pmol cholesterolu v mg buněčného proteinu (pmol/mg) **A** nebo jako % kontroly **B**. Data jsou průměrem (\pm S.E.M.) 6 až 9 stanovení.

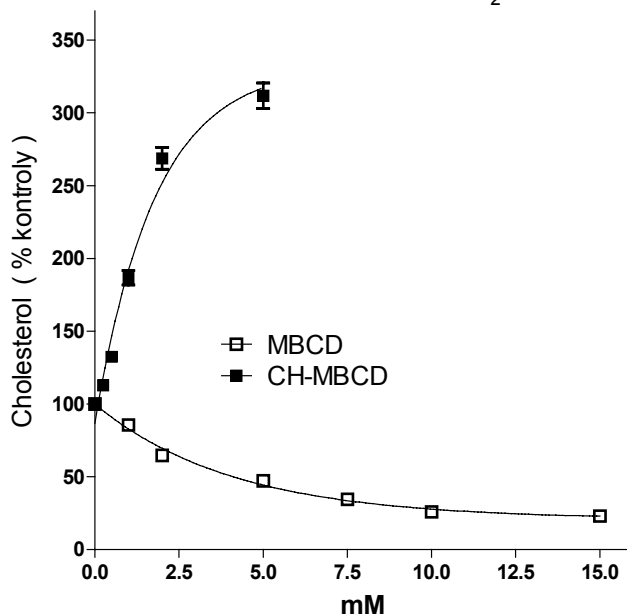
<i>Koncentrace mmol / l</i>	Účinek pmol / mg		Účinek % kontroly	
	MBCD	CH-MBCD	MBCD	CH-MBCD
0	56,0 ± 1,1	56,0 ± 1,1	100,0 ± 2,0	100,0 ± 2,0
0,25		63,3 ± 1,0		112,8 ± 2,9
0,5		74,2 ± 2,7		132,5 ± 1,7
1	47,9 ± 1,0	104,6 ± 2,7	85,6 ± 1,7	186,7 ± 4,9
2	36,3 ± 1,3	150,5 ± 4,2	64,8 ± 2,4	268,8 ± 7,5
5	26,4 ± 1,0	174,6 ± 4,9	47,2 ± 1,8	311,8 ± 8,7
7,5	19,4 ± 1,6		34,6 ± 2,9	
10	14,5 ± 1,4		25,9 ± 2,5	
15	12,9 ± 1,7		23,1 ± 2,7	

Tab. 3.3.2.2. Koncentrační závislost účinku MBCD a CH-MBCD na hladinu cholesterolu v CHO-M₂ buňkách. Koncentrace 0 min znamená kontrolu. Účinky jsou vyjádřeny jako pmol cholesterolu v mg buněčného proteinu (pmol/mg) a v % kontroly. Hodnoty představují průměr (± S.E.M.) 6 až 9 stanovení.

A Koncentrační závislost účinku MBCD a CH-MBCD na obsah cholesterolu v CHO-M₂ buňkách



B Koncentrační závislost účinku MBCD a CH-MBCD na obsah cholesterolu v CHO-M₂ buňkách



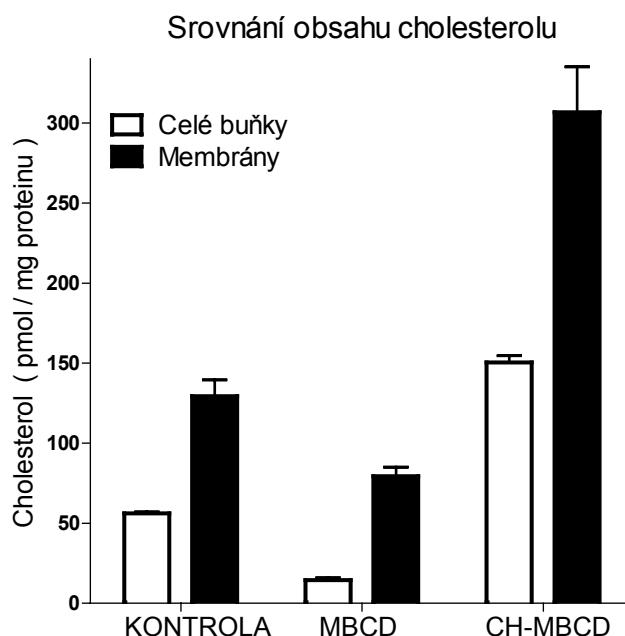
Obr. 3.3.2.2. Koncentrační závislost účinku MBCD a CH-MBCD na hladinu cholesterolu v CHO-M₂ buňkách během hodinové inkubace. Na ose x je vynesena koncentrace v mmol/l a na ose y účinek vyjádřený jako pmol cholesterolu v mg buněčného proteinu (pmol/mg) **A** nebo jako % kontroly **B**. Data jsou průměrem (\pm S.E.M.) 6 až 9 stanovení.

3.3.3. Účinek 10 mM MBCD a 2 mM Cholesterol-MBCD na obsah cholesterolu v CHO-M₂ membránách během hodinové inkubace

Účinek 10 mM MBCD a 2 mM Cholesterol-MBCD na obsah cholesterolu jsme také měřili na membránách připravených z CHO-M₂ buněk, neboť membrány jsme používali v saturačních a kompetičních pokusech uvedených dále. Data z těchto pokusů jsou shrnuta v tabulce 3.3.3. a vynesena na obrázku 3.3.3.. Pro srovnání jsou ukázány data z pokusů na celých buňkách. Z těchto hodnot je patrné, že v membránách je soustředěna podstatná část buněčného cholesterolu.

	<i>Obsah cholesterolu (pmol / mg proteinu)</i>	
	Buňky	Membrány
Kontrola	56,0 ± 1,1	129,4 ± 10,1
MBCD 10 mM	14,5 ± 1,4	79,5 ± 5,6
CH-MBCD 2 mM	150,5 ± 4,2	306,7 ± 28,2

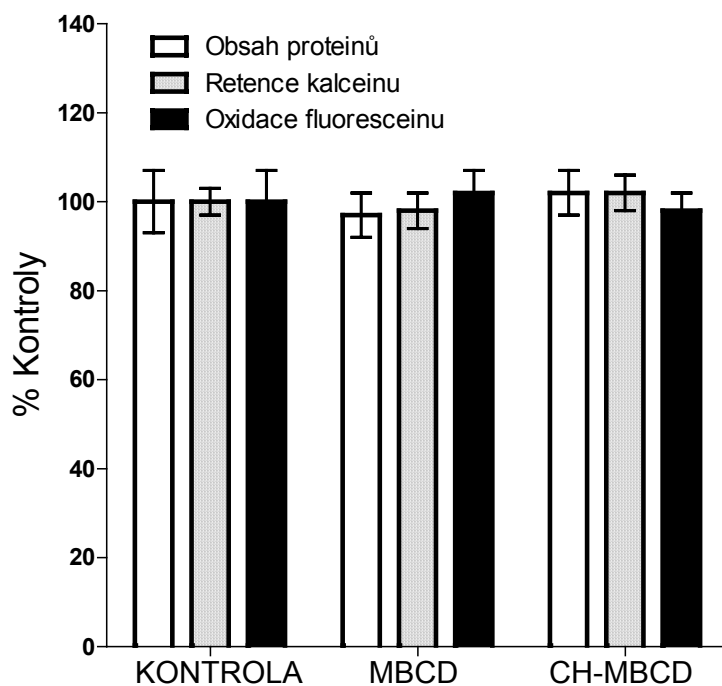
Tab. 3.3.3. Srovnání obsahu cholesterolu v celých buňkách a membránách z CHO-M₂ buněk. Data jsou průměrem (± S.E.M.) 6 až 9 stanovení.



Obr. 3.3.3. Srovnání obsahu cholesterolu v celých buňkách a membránách z CHO-M₂ buněk výjádřené pmol cholesterolu v mg buněčného proteinu (pmol/mg). Data jsou průměrem (± S.E.M.) 6 až 9 stanovení.

3.3.4. Vliv cholesterolu na obsah proteinů, metabolickou aktivitu a buněčnou integritu

Z hlediska dalšího výzkumu bylo velmi důležité zjistit, zda manipulace s obsahem cholesterolu nenaruší metabolickou aktivitu a integritu buněk. V našich pokusech změna obsahu cholesterolu nepůsobila na žádný ze zkoumaných parametrů (obr.3.3.4.). Metabolickou aktivitu jsme odvodili ze stanovení oxidace fluoresceinu, integritu membrány podle relativní retence kalceinu a obsahu proteinů (Nováková a spol., 2005). Rovněž nedocházelo ke změně relativního zastoupení α podjednotek G_s , $G_{i/o}$ a $G_{q/11}$ G-proteinů v kontrolních, MBCD a CH-MBCD opracovaných membránách, které prováděl kolega Rudajev (Michal a spol., 2009).



Obr. 3.3.4. Vliv manipulace s obsahem cholesterolu na obsah proteinů, metabolickou aktivitu a buněčnou integritu v CHO-M₂ buňkách. Výsledky jsou znázorněny jako % hodnot měřených na neopracovaných buňkách. Data jsou průměrem (\pm S.E.M.) 9 stanovení.

3.3.4. Vliv obsahu cholesterolu na vazebné vlastnosti muskarinových M₂ receptorů

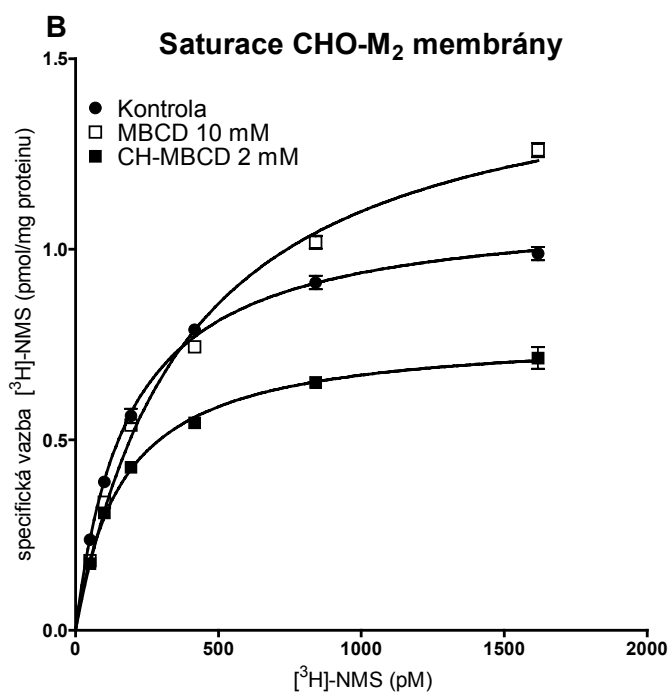
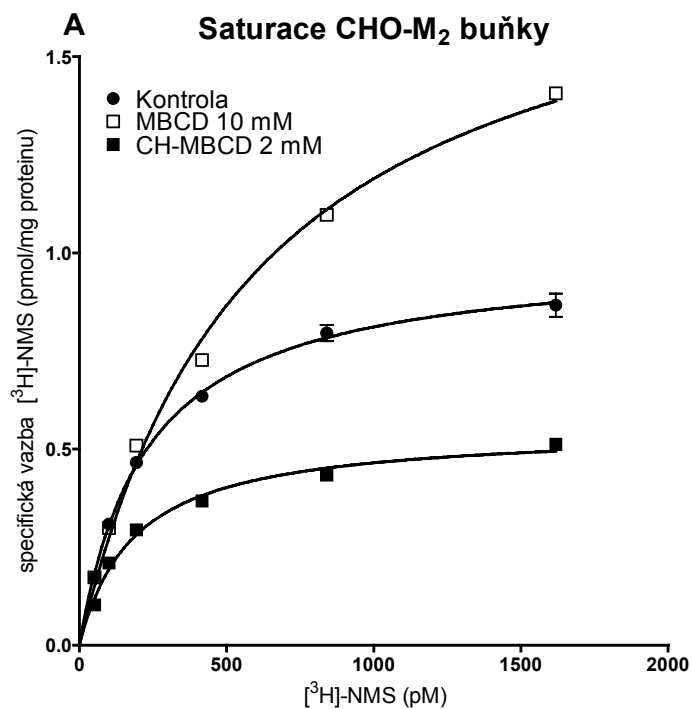
3.3.4.1. Změny afinity a počtu muskarinových M₂ receptorů obsahem cholesterolu

Hustotu (B_{max}) a afinitu (K_d) vazebných míst pro [³H]NMS jsme měřili v saturačních vazebných pokusech jednak na celých buňkách, jednak na membránách z CHO-M₂ buněk.

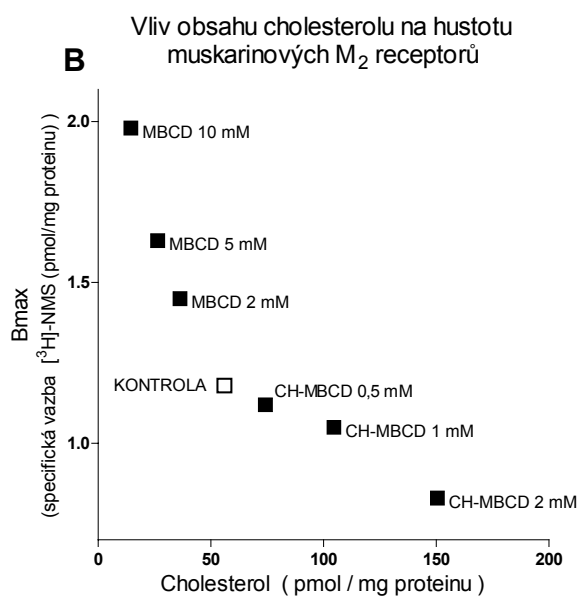
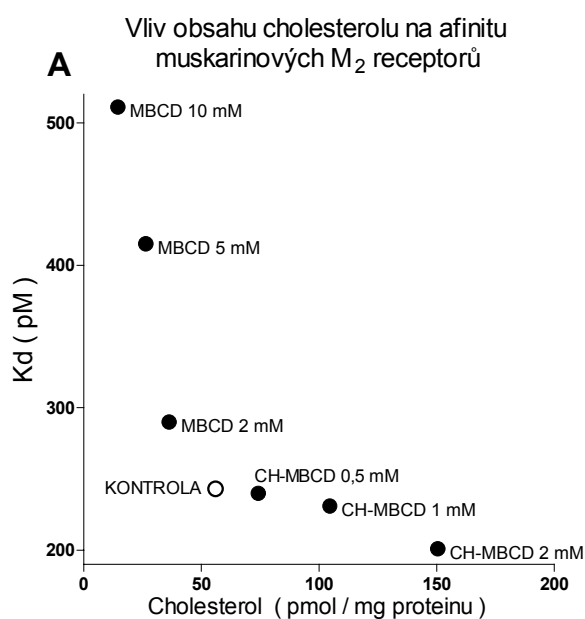
Pro snížení obsahu cholesterolu jsme zvolili tři koncentrace MBCD : 2,5 mM; 5 mM a 10 mM MBCD. Pro zvýšení obsahu cholesterolu také 3 koncentrace CH-MBCD: 1 mM; 2 mM a 5 mM. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.3.4.1., na obrázku 3.3.4.1. jsou ukázány výsledky kontrolního pokusu a pokusy s 10 mM MBCD a 2 mM CH-MBCD. Závislost obsahu cholesterolu na K_d a B_{max} ukazuje obrázek 3.3.4.2. . Z těchto výsledků je patrné, že snížení obsahu cholesterolu mělo za následek zvýšení počtu receptorů a snížení afinity pro [³H]NMS jak v pokusech na celých buňkách tak i membránách. Naopak zvýšení obsahu cholesterolu mělo opačný účinek. Změny počtu receptorů byly výraznější na celých buňkách.

	<i>Celé buňky</i>			<i>Membrány</i>		
	<i>Obsah cholesterolu</i> (pmol/mg)	<i>K_d</i> (pmol/mg)	<i>B_{max}</i> (pmol/mg)	<i>Obsah cholesterolu</i> (pmol/mg)	<i>K_d</i> (pmol/mg)	<i>B_{max}</i> (pmol/mg)
Kontrola	56,0 ± 1,1	243 ± 21	1,18 ± 0,11	129,4 ± 10,1	334 ± 54	1,87 ± 0,30
MBCD 2,5 mM	36,3 ± 1,3	290 ± 31	1,45 ± 0,12	116,3 ± 3,2	360 ± 12	2,02 ± 0,11
MBCD 5 mM	26,4 ± 1,0	415 ± 21	1,63 ± 0,14	96,8 ± 4,2	403 ± 11	2,21 ± 0,12
MBCD 10 mM	14,5 ± 1,4	511 ± 21	1,98 ± 0,12	79,5 ± 5,6	500 ± 43	2,53 ± 0,37
CH-MBCD 0,5 mM	74,2 ± 2,7	240 ± 32	1,12 ± 0,11	139,2 ± 3,6	340 ± 21	1,91 ± 0,12
CH-MBCD 1 mM	104,6 ± 2,7	231 ± 12	1,05 ± 0,05	184,6 ± 5,9	311 ± 21	1,51 ± 0,09
CH-MBCD 2 mM	150,5 ± 4,2	201 ± 44	0,83 ± 0,06	306,7 ± 28,2	316 ± 48	1,60 ± 0,31

Tab. 3.3.4.1. Závislost hodnot K_d a B_{max} na obsahu cholesterolu v celých buňkách a membránách z CHO-M₂ buněk. Data jsou průměrem (± S.E.M.) 6 až 9 stanovení.



Obr. 3.3.4.1.1. Vliv obsahu cholesterolu na specifickou vazbu [³H]NMS k muskarinovým M₂ receptorům v celých buňkách (A) a membránách (B) z CHO-M₂ buněk. Na ose x je vynesena koncentrace [³H]NMS v pmol / l a na ose y specifická vazba [³H]NMS vyjádřená jako pmol vazebných míst v mg proteinu (pmol/mg). Data jsou průměrem (± S.E.M.) ze tří saturačních pokusů s inkubacemi provedenými v triplicátech.



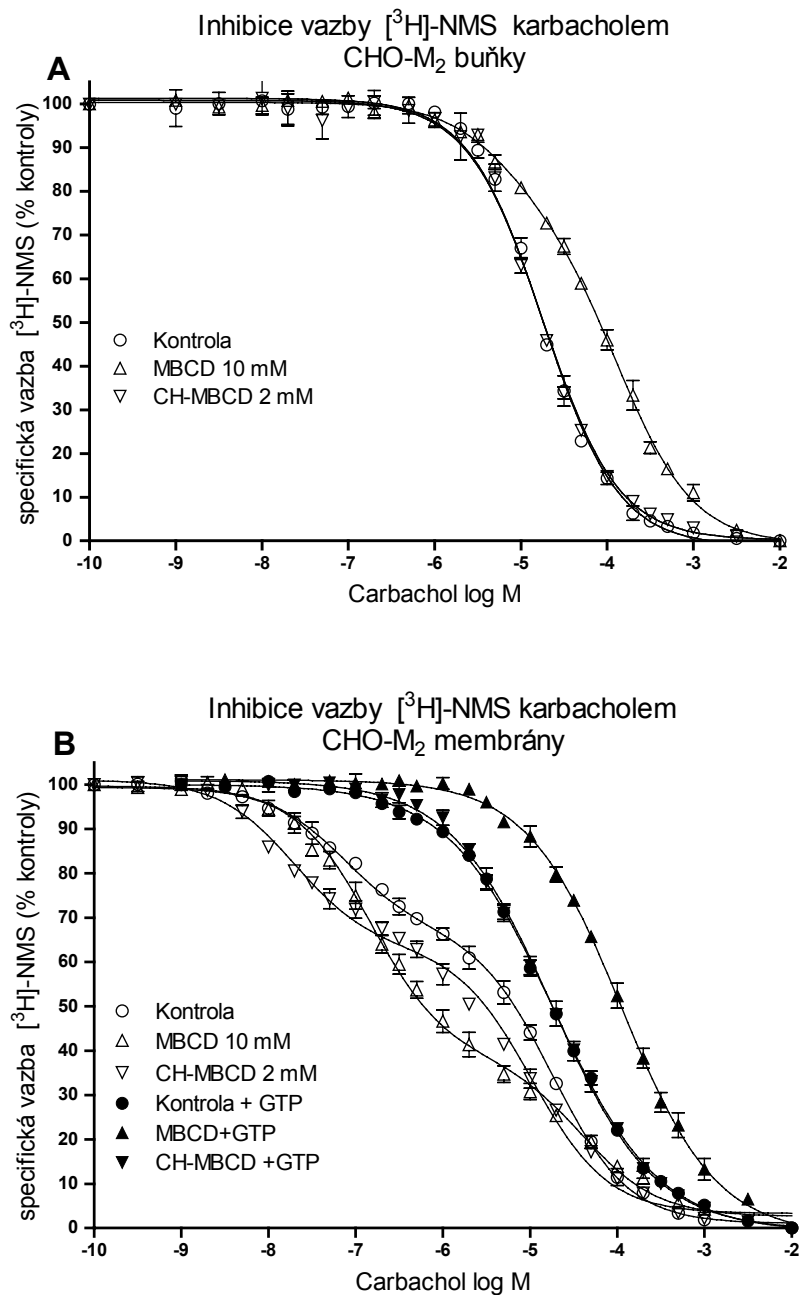
Obr. 3.3.4.1.2. Vliv obsahu cholesterolu v CHO-M₂ buňkách na hodnoty K_d (A) a B_{max} (B) pro vazbu [³H]NMS k muskarinovým M₂ receptorům. Hodnoty K_d a B_{max} byly stanoveny v saturačních vazebných pokusech jejichž výsledky jsou zobrazeny v tabulce 3.3.4.1.1. . Na ose x je vynesena koncentrace cholesterolu v buňce jako pmol cholesterolu v mg buněčného proteinu (pmol/mg), na ose y hodnoty K_d (A) a B_{max} (B). Data jsou průměrem (± S.E.M.) 6 až 9 stanovení.

3.3.4.2. Ovlivnění vazby karchacholu k muskarinovým M_2 receptorům cholesterolem

Vazbu agonisty karchacholu k muskarinovým M_2 receptorům v celých buňkách a membránách z CHO- M_2 buněk jsme měřili v kompetičních vazebných pokusech v přítomnosti 600 pM [3 H]NMS a zvyšujících se koncentracích karchacholu (1nM-10mM). Snížení obsahu cholesterolu bylo dosaženo hodinovou inkubací s 10 mM MBCD, zvýšení hodinovou inkubací s 2 mM CH-MBCD.

Jak ukazuje obrázek 3.3.4.2., vazba [3 H]NMS k celým buňkám (obr. A) a membránám (obr. B) z CHO buněk exprimujících muskarinové receptory podtypu M_2 se karchacholem snižovala. Kompetiční křivky na celých buňkách kontrolních a se zvýšeným obsahem cholesterolu vykazovaly jedno vazebné místo s podobnou hodnotou K_i 4,9 a 4,3 μ M. Naproti tomu proložení kompetiční křivky na celých buňkách se sníženým obsahem cholesterolu bylo signifikantně lepší, když bylo založeno na předpokladu dvou vazebných míst (24 % vysokoafinitních vazebných míst s K_i 3,6 μ M, 76 % nízkoafinitních vazebných míst s K_i 72,6 μ M), tzn. snížení obsahu cholesterolu způsobilo posun části receptorů do nízkoafinitní vazebné konformace.

Kompetiční křivky na membránách vykazovaly dvě vazebná místa za všech podmínek. Vysokoafinitní vazebná místa (receptor obsazený G-proteinem bez GDP) a nízkoafinitní vazebná místa (receptory s G-proteinem obsazeným GDP a receptory bez G-proteinu). Podíl vysokoafinitních vazebných míst byl zřetelně nejvyšší u membrán se sníženým obsahem cholesterolu (33 % u kontrolních; 63% u membrán se sníženým a 39% u membrán se zvýšeným obsahem cholesterolu). Afinita pro vysoko a nízkoafinitní vazebná místa byla nejnižší v případě membrán se sníženým obsahem cholesterolu (K_i pro vysokoafinitní vazebné místo : 18; 66; 4 nM a pro nízkoafinitní : 17,8; 4,7; 2,4 μ M u kontrolních membrán, u membrán se sníženým a se zvýšeným obsahem cholesterolu). Přidání 0,5 mM GTP způsobilo očekávané rozpojení komplexu receptor – G-protein a posun kompetičních křivek doprava směrem k vyšším hodnotám K_i . Výsledky kompetičních pokusů jsou shrnuty v tab. 3.3.4.2..



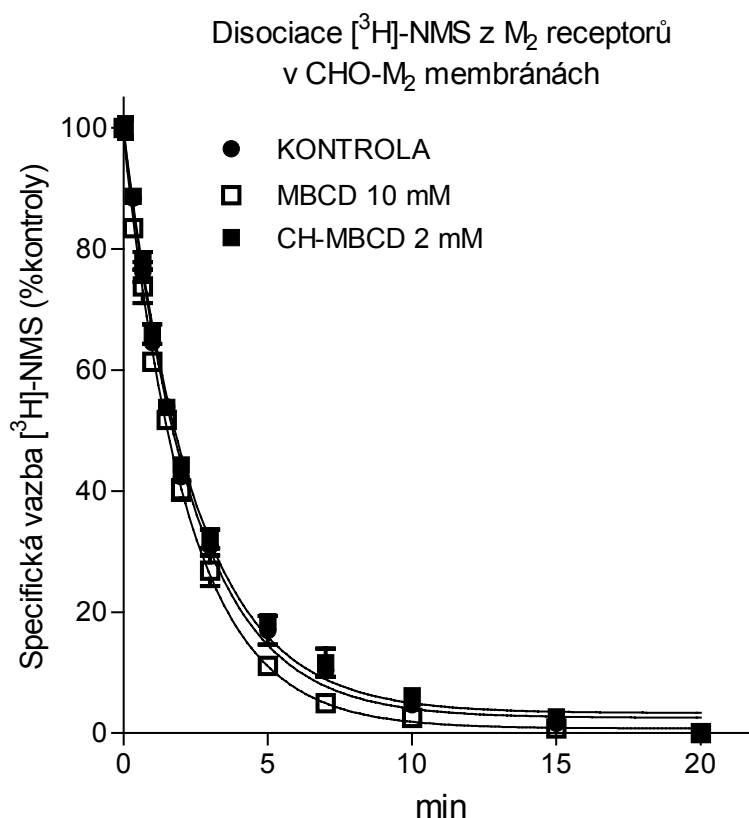
Obr. 3.3.4.2. Vliv membránového cholesterolu na inhibici vazby 600 pM [³H]NMS karbacholem v celých buňkách (A) a membránách (B) z CHO-M₂ buněk. Snížení obsahu cholesterolu bylo dosaženo hodinovou inkubací s 10 mM MBCD, zvýšení obsahu pak hodinovou inkubací s 2 mM CH-MBCD. Na ose x je vynesena koncentrace karbacholu (log M), na ose y specifická vazba [³H]NMS vyjádřená jako % vazby v nepřítomnosti karbacholu. Parametry křivek jsou ukázány v tabulce 3.3.4.2. . Data jsou průměrem (\pm S.E.M.) třech pokusů s inkubacemi provedenými v triplicátech.

	Kontrola	MBCD 10 mM	CH-MBCD 2 mM
<i>Celé buňky</i>			
Jedno místný model pK _i	5,30 ± 0,01	(4,44 ± 0,02)	5,36 ± 0,01
Dvou místný model		Upřednostněný	
pK _{i-vys}	-	5,45 ± 0,08	-
pK _{i-níz}	-	4,14 ± 0,03	-
f _{vys}	-	0,24 ± 0,02	-
<i>Membrány</i>			
Jedno místný model pK _i	(5,84 ± 0,04)	(6,66 ± 0,04)	(6,29 ± 0,05)
Dvou místný model	Upřednostněný	Upřednostněný	Upřednostněný
pK _{i-vys}	7,73 ± 0,08	7,18 ± 0,03	8,38 ± 0,05
pK _{i-níz}	5,33 ± 0,02	4,75 ± 0,05	5,61 ± 0,03
f _{vys}	0,33 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,39 ± 0,01
<i>Membrány + 0,5 mM GTP</i>			
Jedno místný model pK _i	(5,37 ± 0,02)	(4,38 ± 0,02)	(5,42 ± 0,02)
Dvou místný model	Upřednostněný	Upřednostněný	Upřednostněný
pK _{i-vys}	5,89 ± 0,06	5,02 ± 0,16	5,86 ± 0,05
pK _{i-níz}	4,76 ± 0,07	4,06 ± 0,08	4,73 ± 0,03
f _{vys}	0,52 ± 0,05	0,32 ± 0,09	0,57 ± 0,04

Tab. 3.3.4.2. Vliv membránového cholesterolu na afinitu karcholu k celým buňkám a membránám z CHO-M₂ buněk. Snížení obsahu cholesterolu bylo dosaženo hodinovou inkubací s 10 mM MBCD, zvýšení obsahu pak hodinovou inkubací s 2 mM CH-MBCD. Hodnoty pK_i znamenají záporný log K_i. K_{i-vys} a K_{i-níz} značí afinitu pro vysoko a nízkoafinitní místa, f_{vys} značí frakci receptorů s vysokou afinitou pro karchol. Hodnoty K_i byly vypočítány z kompetičních křivek zobrazených na obrázku 3.3.4.1. . Pomocí F-testu (str.45) byl zvolen jedno nebo dvou místný model. Data jsou průměrem (±S.E.M.) třech pokusů s inkubacemi provedenými v triplicátech.

3.3.4.3. Disociace [³H]NMS z M₂ receptorů ovlivněná obsahem cholesterolu v membránách z CHO-M₂ buněk

Vliv obsahu cholesterolu na rychlost disociace [³H]NMS jsme měřili v disociačních pokusech na membránách z CHO-M₂ buněk kontrolních, se sníženým a se zvýšeným obsahem cholesterolu. Výsledky těchto pokusů jsou shrnuty v tabulce 3.3.4.3. a vyneseny na obrázku 3.3.4.3. . Z nich je patrné, že disociace [³H]NMS z M₂ receptorů v membránách se sníženým obsahem cholesterolu byla nesignifikantně vyšší oproti kontrolním membránám a membránám se zvýšeným obsahem cholesterolu.



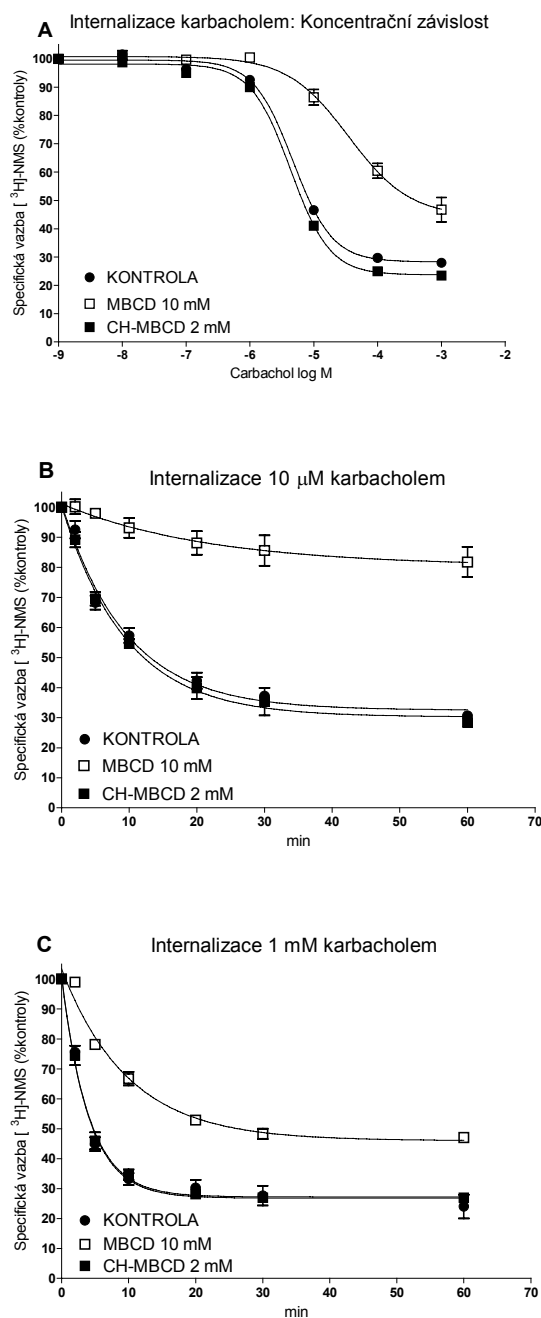
Obr.3.3.4.3. Disociace [³H]NMS z muskarinových M₂ receptorů v membránách z CHO-M₂ buněk kontrolních, se sníženým a se zvýšeným obsahem cholesterolu. Disociace byla vyvolaná 10 μM atropinem. Na ose x je vynesena čas v minutách a na ose y jsou procenta ze specifické vazby [³H]NMS na muskarinové receptory v membránách v čase 0. Data jsou průměrem (± S.E.M.) ze třech pokusů provedených v triplikátech.

	Kontrola	MBCD 10 mM	CH-MBCD 2 mM
<i>k_{off}</i> (min⁻¹)	0,418±0,041	0,451±0,053	0,407±0,48
<i>t_{1/2}</i> (min)	1,66±0,21	1,53±0,28	1,70±0,24

Tab. 3.3.4.3. Disociace [³H]NMS z muskarinových M₂ receptorů v membránách z CHO-M₂ buněk kontrolních, se sníženým a se zvýšeným obsahem cholesterolu. Hodnoty *k_{off}* a *t_{1/2}* jsou počítány jako průměr (± S.E.M.) ze třech pokusů provedených v triplikátech, znázorněných na obr. 3.3.4.3. .

3.3.4.4. Internalizace muskarinových M₂ receptorů ovlivněná obsahem cholesterolu

Vliv obsahu cholesterolu na internalizaci muskarinových M₂ receptorů jsme měřili na celých buňkách vazbou [³H]NMS v saturující koncentraci 2nM. Snížení obsahu cholesterolu bylo dosaženo hodinovou inkubací s 10 mM MBCD, zvýšení hodinovou inkubací s 2 mM CH-MBCD. Internalizace byla vyvolána agonistou karbacholem. Pro charakterizaci průběhu internalizace (obr. 3.3.4.4., tab. 3.3.4.4.) jsme stanovili jednak koncentrační závislost (10 nM - 1 mM karbachol) průběhu internalizace při 20 minutové inkubaci (obr. A) a dále pak časový průběh internalizace (2-60 minut) v přítomnosti 10 μM (obr. B) a 1 mM karbacholu (obr. C). Koncentrace karbacholu jsme zvolili podle pokusů se syntézou cAMP, kdy při 10 μM bylo dosaženo maxima inhibice a při 1 mM maxima stimulace. Z těchto pokusů vyplynulo, že snížení obsahu cholesterolu zřetelně sníží rychlost internalizace (prodloužení poločasu internalizace z 6,6 (kontrola) na 15 minut vyvolané 10 μM karbacholem a z 2,8 na 6,8 minut vyvolané 1 mM karbacholem), sníží počet internalizovaných muskarinových receptorů (z 67,5% (kontrola) na 19,7% v případě 10 μM karbacholu a z 71,5% na 54% v případě 1 mM karbacholu) a zvýší hodnotu EC₅₀ pro karbacholem vyvolanou internalizaci (z 4,7 μM na 34 μM). Zvýšený obsah cholesterolu v membráně neměl na průběh internalizace receptorů podstatný vliv.



Obr. 3.3.4.4. Internalizace muskarinových M_2 receptorů vyvolaná karcholem ovlivněná obsahem cholesterolu v CHO- M_2 buňkách. **A**: Koncentrační závislost účinku karcholu během 20 minutové inkubace, na ose x je vynesena log koncentrace karcholu a na ose y počet receptorů vyjádřených jako % kontroly (bez karcholu). **B** a **C** : časový průběh internalizace vyvolané 10 μM (B) nebo 1 mM (C) karcholem, na ose x je čas v minutách, na ose y počet receptorů vyjádřených jako % kontroly (čas 0). Hodnoty jsou průměrem (\pm S.E.M.) šesti stanovení. Parametry internalizace jsou ukázány v tab. 3.3.4.4. .

	Kontrola	MBCD 10 mM	CH-MBCD 2 mM
<i>Koncentrační závislost</i>			
E_{\max} (% kontroly)	$73,7 \pm 2,7$	$54,5 \pm 1,5$	$78,3 \pm 2,7$
pEC_{50}	$5,32 \pm 0,09$	$4,46 \pm 0,06$	$5,38 \pm 0,09$
<i>Internalizace vyvolaná 10 μM karbacholem</i>			
Rychlostní konstanta (min^{-1})	$0,104 \pm 0,008$	$0,046 \pm 0,017$	$0,104 \pm 0,009$
Poločas (min)	$6,64 \pm 0,06$	$15,15 \pm 0,08$	$6,64 \pm 0,05$
Plató	$32,5 \pm 1,5$	$80,3 \pm 3,1$	$30,2 \pm 1,7$
<i>Internalizace vyvolaná 1 mM karbacholem</i>			
Rychlostní konstanta (min^{-1})	$0,249 \pm 0,017$	$0,103 \pm 0,010$	$0,246 \pm 0,019$
Poločas (min)	$2,78 \pm 0,06$	$6,84 \pm 0,05$	$2,81 \pm 0,08$
Plató	$26,8 \pm 1,1$	$46,0 \pm 1,5$	$27,2 \pm 1,2$

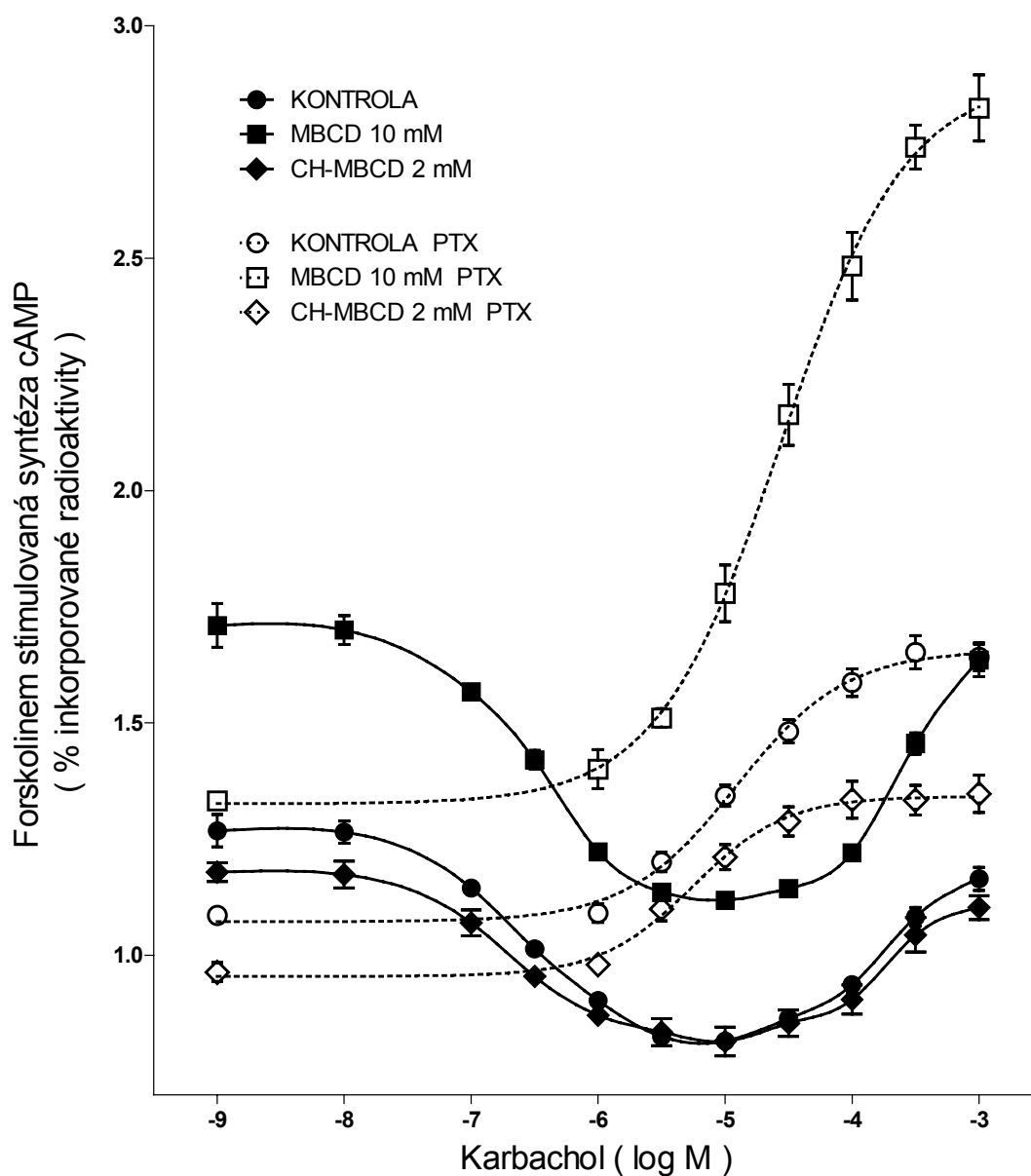
Tab. 3.3.4.4. Internalizace muskarinových M_2 receptorů karbacholem ovlivněná obsahem cholesterolu v CHO- M_2 buňkách. E_{\max} znamená maximální počet internalizovaných receptorů v % kontroly (bez karbacholu) a pEC_{50} znamená záporný log EC_{50} . Parametry internalizace jsou průměrem (\pm S.E.M.) šesti stanovení a byly vypočítány z křivek ukázaných na obr. 3.3.4.4. .

3.3.4. Vliv obsahu cholesterolu na funkční vlastnosti muskarinových M_2 receptorů

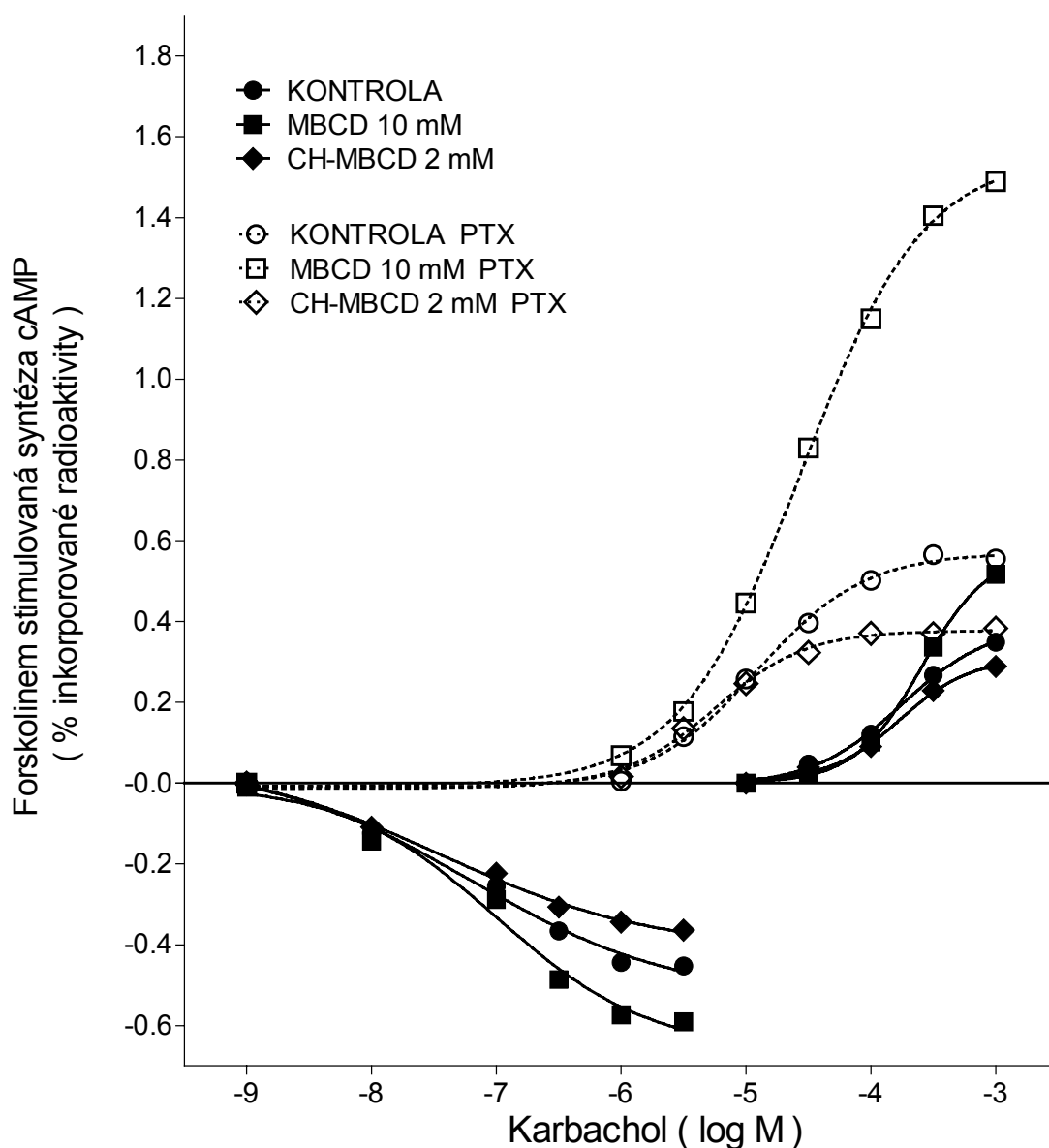
3.3.4.1. Syntéza cAMP v CHO- M_2 buňkách a její ovlivnění obsahem cholesterolu

Forskolinem stimulovanou syntézu cAMP jsme měřili na kontrolních buňkách a buňkách opracovaných pertusis toxinem (PTX buňky; vyřazení $G_{i/o}$ proteinů). Snížení obsahu cholesterolu bylo opět dosaženo hodinovou inkubací s 10 mM MBCD, zvýšení hodinovou inkubací s 2 mM CH-MBCD. Syntézu cAMP jsme vyjádřili jako % inkorporované radioaktivity [3H] adeninu. Inkorporovaná radioaktivita byla mírně zvýšena u buněk se sníženým obsahem cholesterolu : 10944 ± 93 u kontrolních buněk, 11688 ± 73 u buněk se sníženým a 10304 ± 107 dpm/mg proteinu u buněk se zvýšeným obsahem cholesterolu. V případě PTX opracovaných buněk byla podobná : 8793 ± 118 u kontrolních buněk, 8484 ± 113 u buněk se sníženým a 8562 ± 110 dpm/mg proteinu u buněk se zvýšeným obsahem cholesterolu. Vzorky obsahovaly přibližně 200 μ g proteinu.

Účinek karchocholu na syntézu cAMP u kontrolních buněk vykazoval očekávané dvoufázové působení, inhibiční část křivky (aktivace $G_{i/o}$ G-proteinů) kde inhibice postupně narůstala až do 10 μ M karchocholu a stimulační část křivky (současná aktivace G_s G-proteinů) kde se inhibice postupně snižovala. Po vyřazení inhibičních $G_{i/o}$ G-proteinů pertusis toxinem karchochol pouze stimuloval syntézu cAMP (obr. 3.3.4.1.). Snížení obsahu cholesterolu mělo za následek zvýšení syntézy cAMP vyvolané samotným forskolinem oproti kontrolním buňkám a buňkám se zvýšeným obsahem cholesterolu. Tento účinek jsme pozorovali také na PTX buňkách (obr. 3.3.4.2.2., tab. 3.3.4.2.2.). Inhibice vyvolaná karchocholem byla maximální u buněk se sníženým obsahem cholesterolu naopak maximum inhibice u buněk se zvýšeným obsahem cholesterolu bylo nižší oproti kontrolním buňkám. Hodnoty EC_{50} pro inhibici se významně nelišily. Podobný trend jsme pozorovali i pro maximum stimulace u stimulační části křivky vyvolané 1 mM karchocholem. Hodnoty EC_{50} pro stimulační část křivky byly podobné. Na PTX buňkách jsme pozorovali pouze stimulaci syntézy cAMP. Maximum stimulace jsme pozorovali opět u buněk se sníženým obsahem cholesterolu, buňky se zvýšeným obsahem cholesterolu měly maximum stimulace nižší oproti kontrolním buňkám. Pro názornost účinků cholesterolu na syntézu cAMP jsme odečetli minima jednotlivých odpovědí, tzn. účinek samotného forskolinu v případě inhibiční části křivky u neopracovaných buněk a buněk opracovaných PTX, v případě stimulační části křivky jsme odečetli účinek 10 μ M karchocholu (obr. 3.3.4.1. B).



Obr. 3.3.4.1.1. Vliv obsahu cholesterolu na koncentrační závislost účinku karbacholu na forskolinem stimulovanou syntézu cAMP v CHO-M₂ buňkách a PTX opracovaných buňkách. Na ose x je vyjádřen log koncentrace karbacholu, na ose y % inkorporované radioaktivity. Hodnoty jsou průměrem (\pm S.E.M.) 12 stanovení. Parametry získané proložením bodů jsou ukázány v tab. 3.3.4.1. .



Obr. 3.3.4.1.2. Vliv obsahu cholesterolu na koncentrační závislost účinku karbacholu na forskolinem stimulovanou syntézu cAMP v CHO-M₂ buňkách a PTX opracovaných buňkách. Pro názornost účinků cholesterolu na syntézu cAMP jsou odečtena minima jednotlivých odpovědí, tzn. účinek samotného forskolinu v případě inhibiční části křivky u neopracovaných buněk a buněk opracovaných PTX, v případě stimulační části křivky je odečten účinek 10 μM karbacholu. Na ose x je vyjádřen log koncentrace karbacholu, na ose y % inkorporované radioaktivity. Hodnoty jsou průměrem (± S.E.M.) 12 stanovení. Parametry získané proložením bodů jsou ukázány v tab. 3.3.4.1. .

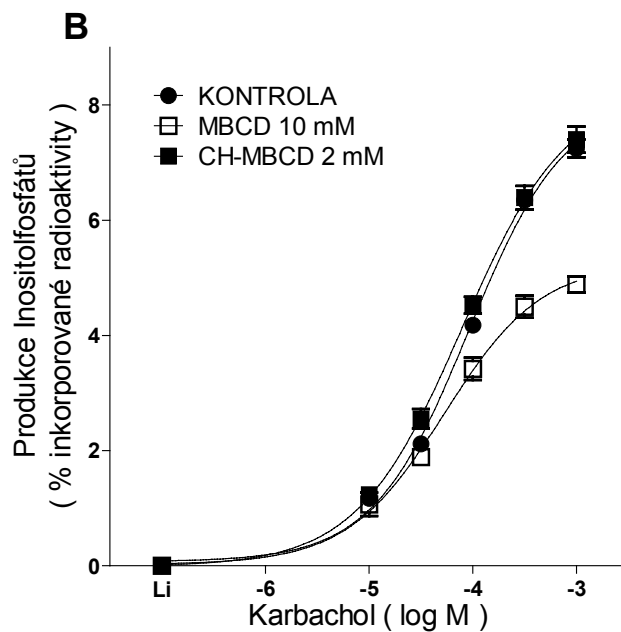
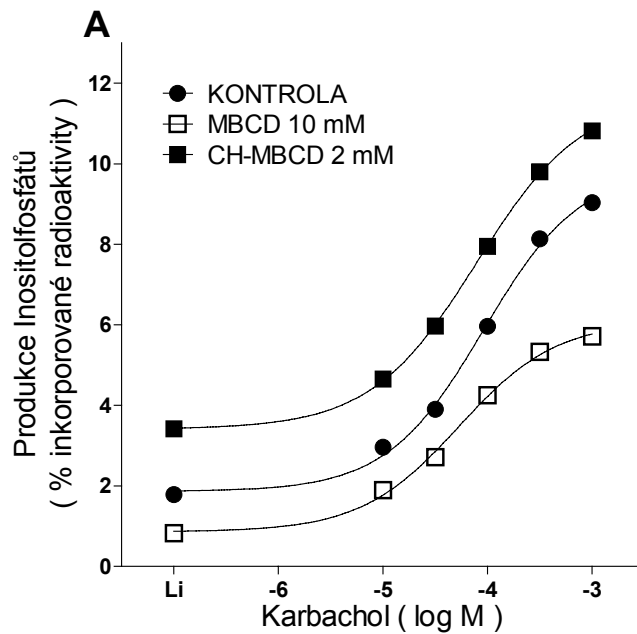
		KONTROLA	MBCD 10 mM	CH-MBCD 2mM
CHO-M₂ buňky				
Inhibice	E _{max}	0,48 ± 0,02	0,65 ± 0,04	0,37 ± 0,02
	pEC ₅₀	6,53 ± 0,08	6,43 ± 0,08	6,55 ± 0,07
Stimulace	E _{max}	0,45 ± 0,04	0,76 ± 0,07	0,37 ± 0,03
	pEC ₅₀	3,76 ± 0,11	3,51 ± 0,11	3,65 ± 0,16
CHO-M₂ PTX buňky				
Stimulace	E _{max}	0,57 ± 0,01	1,51 ± 0,03	0,38 ± 0,01
	pEC ₅₀	4,88 ± 0,05	4,69 ± 0,04	4,90 ± 0,06

Tab. 3.3.4.1. Vliv obsahu cholesterolu na koncentrační závislost účinku karbacholu na forskolinem stimulovanou syntézu cAMP v CHO-M₂ buňkách a PTX opracovaných buňkách. Parametry jsou vypočítány z křivek ukázaných na obr. 3.3.4.1. . E_{max} znamená maximální odpověď karbacholu v % inkorporované radioaktivity, pEC₅₀ znamená záporný log EC₅₀. Výsledky jsou průměrem (± S.E.M.) 12 stanovení.

3.3.4.2. Produkce inositolfosfátů v CHO-M₂ buňkách a její ovlivnění obsahem cholesterolu

Snížení obsahu cholesterolu bylo opět dosaženo hodinovou inkubací s 10 mM MBCD, zvýšení hodinovou inkubací s 2 mM CH-MBCD. Produkce inositolfosfátů jsme vyjádřili jako % inkorporované radioaktivity [³H]myo-inositolu. Inkorporovaná radioaktivita se obsahem cholesterolu neměnila : 1592 ± 15 u kontrolních buněk, 1578 ± 15 u buněk se sníženým a 1552 ± 14 dpm/mg proteinu u buněk se zvýšeným obsahem cholesterolu. Vzorke obsahovaly přibližně 200 µg proteinu.

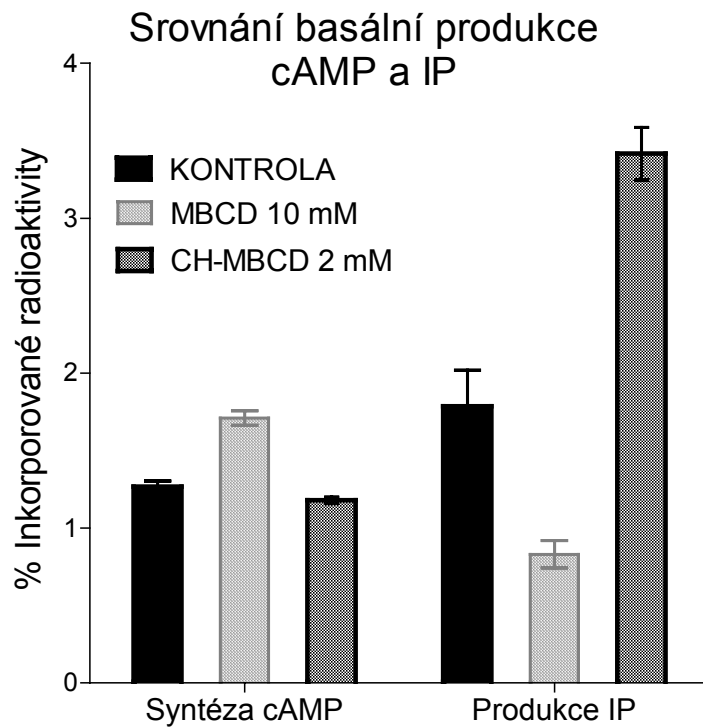
Oproti syntéze cAMP se produkce inositolfosfátů lišila v několika parametrech. Basální produkce (pouze v přítomnosti 10mM LiCl) byla snížena o 54% u buněk se sníženým obsahem cholesterolu naopak zvýšení basální produkce o 91% jsme pozorovali u buněk se zvýšeným obsahem cholesterolu ve srovnání s kontrolními buňkami. Basální produkce byla v kontrolních buňkách 1,79 ± 0,16; v buňkách se sníženým 0,83 ± 0,15 a v buňkách se zvýšeným obsahem cholesterolu 3,42 ± 0,21 % inkorporované radioaktivity. Srovnání basální produkce inositolfosfátů a basální syntézy cAMP je na obr. 3.3.4.2.2. a tab. 3.3.4.2.2. . Buňky se sníženým obsahem cholesterolu také vykazovaly snížení maxima odpovědi a snížení hodnoty EC₅₀ (obr. 3.3.4.2., tab. 3.3.4.2.). Samotný průběh akumulace inositolfosfátů vyvolaný karcholem byl podobný u kontrolních buněk a buněk bohatých na cholesterol.



Obr. 3.3.4.2.1. Vliv obsahu cholesterolu na koncentrační závislost účinku karcholu na produkci inositolfosfátů v CHO-M₂ buňkách (A). Pro názornost účinků cholesterolu na produkci inositolfosfátů je odečtena basální produkce, tzn. produkce v přítomnosti samotného 10 mM LiCl (B). Na ose x je vyjádřen log koncentrace karcholu, na ose y % inkorporované radioaktivity. Hodnoty jsou průměrem (\pm S.E.M.) 9 stanovení. Parametry získané proložením bodů jsou ukázány v tab. 3.3.4.2.1. .

<i>CHO-M₂ buňky</i> <i>Produkce IP</i>	KONTROLA	MBCD 10 mM	CH-MBCD 2mM
E_{max}	7,88 ± 0,21	5,15 ± 0,022	7,80 ± 0,26
pEC₅₀	4,08 ± 0,04	4,31 ± 0,07	4,17 ± 0,05

Tab. 3.3.4.2.1. Vliv obsahu cholesterolu na koncentrační závislost účinku karcholu na produkci inositolfosfátů (IP) v CHO-M₂ buňkách. Parametry jsou vypočítány z křivek ukázaných na obr. 3.3.4.2.1. . E_{max} znamená maximální odpověď karcholu v % inkorporované radioaktivity, pEC₅₀ znamená záporný log EC₅₀. Výsledky jsou průměrem (± S.E.M.) 9 stanovení.



Obr. 3.3.4.2.2. Srovnání basální produkce inositolfosfátů (IP) a cAMP v CHO-M₂ buňkách kontrolních, se sníženým obsahem cholesterolu (MBCD) a se zvýšeným obsahem cholesterolu (CH-MBCD). Na ose x je vynesena produkce inositolfosfátů v % inkorporované radioaktivity. Výsledky jsou průměrem (\pm S.E.M.) 9 stanovení (inositolfosfáty) nebo 12 stanovení (syntéza cAMP).

<i>Basální syntéza</i> (%inkorporované radioaktivity)	Kontrola	MBCD 10 mM	CH-MBCD 2 mM
IP	1,78 \pm 0,22	0,83 \pm 0,08	3,21 \pm 0,17
cAMP	1,27 \pm 0,03	1,71 \pm 0,04	1,17 \pm 0,02

Tab. 3.3.4.2.2. Srovnání basální produkce inositolfosfátů (IP) a cAMP v CHO-M₂ buňkách kontrolních, se sníženým obsahem cholesterolu (MBCD) a se zvýšeným obsahem cholesterolu (CH-MBCD). Výsledky jsou průměrem (\pm S.E.M.) 9 stanovení (inositolfosfáty) nebo 12 stanovení (syntéza cAMP).

3.4. Diskuse

Cholesterol je nezastupitelnou součástí živočišných membrán a hraje významnou úlohu v uspořádání, dynamice a funkci membrány. Muskarinové receptory společně s ostatními G-proteinovými receptory jsou integrální membránové bílkoviny a tvoří velkou skupinu molekul účastnící se přenosu signálu z extracelulárního prostředí přes membránu do nitra buňky. Významnou úlohu v přenosu signálu prostřednictvím muskarinových receptorů proto může hrát obsah cholesterolu v membráně, ve které jsou receptory zabudovány. Změna hladiny cholesterolu v membráně v důsledku patologických dějů proto může vést k narušení přenosu signálu. Cílem mé práce bylo ozřejmit jak změna obsahu cholesterolu v plazmatické membráně ovlivní parametry muskarinové signalizace.

Zpočátku naší práce jsme se zaměřili na vypracování spolehlivé metody ovlivnění obsahu cholesterolu v CHO-M₂ buňkách. Z námi testovaných látek se nejlépe osvědčil chelátor cholesterolu methyl- β -cyclodextrin (MBCD) pro snížení obsahu cholesterolu a methyl- β -cyclodextrin satureovaný cholesterolem (CH-MBCD) pro zvýšení obsahu cholesterolu. Hodinová inkubace s 10 mM MBCD snížila obsah cholesterolu o 74 % zatímco 2 mM CH-MBCD zvýšil jeho obsah o 170 %. Za těchto podmínek nedošlo k poškození buněk, neměly vliv na obsah proteinů, permeabilitu membrány měřenou jako zadržení kalceinu a ani na metabolickou aktivitu měřenou jako oxidace fluoresceinu. Malou účinnost inhibitoru syntézy cholesterolu Lovastatinu jsme si vysvětlovali tím, že buňky doplňují cholesterol z fetálního séra, které je nutné pro pěstování CHO buněk, bohužel použití fetálního séra bez lipoproteinů s nízkým obsahem cholesterolu způsobilo zastavení růstu buněk.

Vazebné vlastnosti muskarinových M₂ receptorů jsme studovali v saturačních a kompetičních pokusech. Výsledky saturačních vazebných pokusů s nesespecifickým antagonistou muskarinových receptorů [³H] N-methylscopolaminem na buňkách se sníženým obsahem cholesterolu ukázaly snížení afinity a překvapivé zvýšení hustoty receptorů. Jednou z možností vysvětlení změny afinity je přímé alosterické působení cholesterolu na receptor (Colozo a spol., 2007), neboť zvýšení obsahu cholesterolu nepatrně zvýšilo afinitu k receptoru. Jiné vysvětlení pak spočívá ve změně receptorové konformace v důsledku změny biofyzikálních parametrů membrány v závislosti na obsahu cholesterolu. Obecně cholesterol zvyšuje rigiditu a snižuje fluiditu membrán tzn. snížením jeho obsahu zvýšíme tekutost membrány. Tato změna pak může usnadnit přístup hydrofilního radioligandu k dalším receptorům a tímto způsobem detekujeme zvýšení

počtu receptorů v plazmatické membráně. Tento předpoklad také podporují kompetiční pokusy s agonistou karcholem na celých buňkách. Kontrolní buňky a buňky se zvýšeným obsahem cholesterolu ukazyvaly jedno vazebné místo pro karchol s podobnou hodnotou K_i 4,9 a 4,3 μM . Buňky se sníženým obsahem cholesterolu však ukazyvaly dvě vazebná místa, jedno s hodnotou K_i 3,6 μM , která je podobná výše zmíněným hodnotám a druhou odlišnou hodnotou K_i 72 μM . Z těchto pokusů tedy vyplývá, že snížení obsahu cholesterolu způsobí objevení dalšího vazebného místa s nižší afinitou. Za účelem získání podrobnějších informací jsme provedli také kompetiční pokusy na membránách. Kompetiční křivky za všech podmínek ukázaly vysokoafinitní (receptory obsazené G-proteinem bez GDP) a nízkoafinitní vazebná místa (receptory s G-proteinem obsazeným GDP a receptory bez G-proteinu). Nicméně, membrány s nízkým obsahem cholesterolu vykazovaly přibližně dvojnásobný počet vysokoafinitních vazebných míst (33% v kontrolních, 63% v membránách se sníženým obsahem a 39% v membránách se zvýšeným obsahem cholesterolu). Kompetiční pokusy na membránách tedy ukázaly, že snížení obsahu cholesterolu v plazmatické membráně způsobí zlepšení podmínek pro vazbu receptoru s G-proteinem. Tato změna mohla být jednou z příčin zesílení signálů muskarinových M_2 receptorů v pokusech se syntézou cAMP. Přidání GTP do inkubačního média způsobilo očekávaný výrazný posun kompetičních křivek na membránách pro karchol směrem doprava.

Snížení obsahu cholesterolu mělo také výrazný vliv na internalizaci muskarinových receptorů. Poločas internalizace vyvolaný 10 μM karcholem se prodloužil více jak dvojnásobně z 6,6 na 15,2 minut. Rovněž se snížil počet internalizovaných receptorů (z 77% na 20 %) a hodnota EC_{50} se zvýšila sedminásobně (tzn. k snížení počtu receptorů o 50% bylo při 20 minutové inkubaci potřeba koncentrace 34 μM oproti 4,7 μM u kontroly).

Internalizace muskarinových receptorů může probíhat jak klatrinovou cestou tak i prostřednictvím kaveol (Shmuel a spol., 2007; Tolbert, 1996; Ma a spol. 2008) v závislosti na typu receptoru a buněk. V případě muskarinových M_2 receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách byla popsána na klatrinu nezávislá cesta internalizace (Claing a spol., 2000; Rossebery a Hosey, 2001), rovněž Feron a spol. (1997) popsal internalizaci muskarinových M_2 receptorů v kardiomyocytech prostřednictvím kaveol. CHO buňky podobně jako ostatní fibroblasty se vyznačují jejich vysokou koncentrací (Huang a spol., 2007). Kaveoly jsou charakterizovány značným obsahem cholesterolu a jsou tvořeny proteinem kaveolinem, jehož oligomery tvoří „kostru“ kaveol. Kaveolin má vazebná místa jak pro signální proteiny tak pro cholesterol. Použitím chelátoru cholesterolu MBCD dojde

k rozpadu těchto mikrodomén a zároveň k uvolnění navázaných signálních proteinů. Tímto mechanismem bylo popsáno nejen zpomalení internalizace muskarinových M_1 (Shmuel a spol., 2007) a M_2 receptorů (Feron a spol., 1997), ale také zvýšení aktivace G_i -proteinů po stimulaci opioidních μ receptorů v CHO-buňkách (Huang a spol., 2007) a zvýšená aktivace adenylylcyklasy po stimulaci β adrenergických receptorů (Allen a spol., 2009). V našich pokusech jsme pozorovali také zpomalení internalizace, zvýšení vazby G-proteinů na M_2 receptory projevující se zdvojnásobením frakce vysokoafinitních receptorů v kompetičních pokusech na membránách a rovněž zesílení muskarinové signalizace ve funkčních pokusech se syntézou cAMP.

Naše dřívější práce se selektivním vyřazení podtypů G-proteinů pomocí RNA interference ukázala, že muskarinové M_2 receptory exprimované v CHO buňkách aktivují nejenom preferenční $G_{i/o}$, ale také G_s a $G_{q/11}$ G-proteiny (Michal a spol., 2007). Data ze současných pokusů ukazují také aktivaci těchto podtypů G-proteinů. Aktivaci $G_{i/o}$ a G_s G-proteinů jsme odvodili z průběhu syntézy cAMP. Účinek karcholu na syntézu cAMP u kontrolních buněk vykazoval očekávané dvoufázové působení, inhibiční část křivky (aktivace $G_{i/o}$ G-proteinů) při které inhibice postupně narůstala až do 10 μ M karcholu a stimulační část křivky (současná aktivace G_s G-proteinů) kde se inhibice postupně snižovala. Po vyřazení inhibičních $G_{i/o}$ G-proteinů pertusis toxinem (PTX-buňky) karchol pouze stimuloval syntézu cAMP prostřednictvím G_s proteinů. Z pokusů jasně vyplývalo, že snížení obsahu cholesterolu zvýší maxima těchto odpovědí a naopak zvýšení obsahu cholesterolu dané odpovědi potlačí. Maximum inhibice vyvolané 10 μ M karcholem bylo o 35 %, maximum stimulace 1 mM karcholem o 69 % a v případě PTX buněk o 165 % vyšší oproti kontrole (tab. 3.3.4.1.). Hodnoty EC_{50} pro sledované odpovědi byly podobné. Ke zvýšení transdukce signálu mohlo přispět jednak zvýšení počtu receptorů detekované v saturačních pokusech, zvýšení vazby G-proteinů na receptor ukázané v kompetičních pokusech a také potlačení internalizace muskarinových M_2 receptorů.

Odlišnou situaci však ukázala produkce inositolfosfátů. Hodnota EC_{50} byla sice nejnižší u MBCD buněk, ale maximum odpovědi se snížilo o 35 % oproti kontrole. Z těchto pokusů by tedy vyplývalo, že snížení cholesterolu selektivně snižuje aktivaci $G_{q/11}$ proteinů a zároveň zvyšuje aktivaci G_s a G_i G-proteinů (pokusy se syntézou cAMP). Na druhé straně produkce IP je až další krok přenosu signálu, zprostředkovaný fosfolipasou $C\beta$, která štěpí PIP2. Z hodnot basální produkce IP tzn. bez aktivace muskarinových receptorů vyplývá, že zvýšení obsahu cholesterolu způsobí zdvojnásobení basální produkce

zatímco snížení obsahu cholesterolu způsobí dvojnásobné snížení basální produkce oproti kontrolním buňkám. Z tohoto důvodu se domníváme, že snížení hladiny cholesterolu zlepší aktivaci $G_{q/11}$ proteinů projevující se snížením EC_{50} , ale zhorší podmínky pro štěpení PIP2 fosfolipásou $C\beta$, které detekujeme jako snížení maxima odpovědi.

Pro podrobnější informace o vlivu obsahu membránového cholesterolu na spřáhování muskarinových M_2 receptorů plánujeme měření aktivace G-proteinů pomocí vazby ^{35}S -GTP γ S (guanosin-5'-O-(3-thio)trifosfát) a metodou SPA (scintillation proximity assay; DeLapp, 1999), která je schopna selektivně rozlišit aktivaci jednotlivých podtypů G-proteinů. Sledování změny hustoty receptorů a průběhu internalizace jsme se snažili také vizualizací muskarinových M_2 receptorů v membráně pomocí imunofluorescenční detekce, bohužel jsme však zatím nenalezli vhodnou protilátku pro označení receptoru. Rovněž plánujeme rozšíření studie na ostatní podtypy muskarinových receptorů, zvláště pak M_1 podtyp, který hraje významnou úlohu v patogenezi Alzheimerovy choroby. Tyto pokusy by byly součástí mé rigorózní práce.

Naše výsledky potvrzují, že transdukce signálu prostřednictvím muskarinových M_2 receptorů je snížením obsahu membránového cholesterolu zvýšena. Muskarinové M_2 receptory se dominantně a ve velké hustotě nachází v srdeční tkáni. Za fyziologických podmínek převažuje hlavně aktivace $G_{i/o}$ podtřídy G-proteinů, tedy inhibice syntézy cAMP s funkčními projevy aktivace parasymptiku. Stojí za úvahu zda patologicky zvýšená hladina cholesterolu, zvláště pak LDL frakce nezpůsobí zvýšený obsah cholesterolu v srdeční tkáni a následné potlačení aktivace parasymptiku s funkčním převážením symptiku.

3.5. Závěr

Výsledky této práce jednoznačně potvrdily, že obsah membránového cholesterolu významně ovlivňuje vazebné a funkční vlastnosti muskarinových M_2 receptorů. Za zvláště zajímavá a důležitá pokládáme tato pozorování.

- 1) V saturačních vazebných pokusech snížení membránového cholesterolu způsobilo zřetelné zvýšení počtu M_2 receptorů v membráně a zároveň snížení jejich afinity. Zvýšení cholesterolu mělo méně výrazné opačné účinky.
- 2) Kompetiční vazebné pokusy s agonistou karbacholem ukázaly, že snížení membránového cholesterolu způsobí zvýšenou vazbu G-proteinů na receptor, projevující se zdvojnásobením vysokoafinitní vazebné frakce. Zvýšení cholesterolu nemělo žádný vliv na sledované parametry.
- 3) Internalizace muskarinových M_2 receptorů vyvolaná agonistou karbacholem byla významně zpomalena snížením obsahu cholesterolu v membráně.
- 4) Aktivace $G_{i/o}$ a G_s proteinů měřených prostřednictvím syntézy cAMP na kontrolních a PTX opracovaných buňkách byla zvýšena u buněk se sníženým obsahem cholesterolu. Zvýšení membránového cholesterolu mělo opačné účinky.
- 5) Maximum produkce IP se snížením obsahu cholesterolu snížilo, avšak došlo i ke snížení hodnoty EC_{50} . Basální produkce IP odhalila, že snížení maxima odpovědi může být důsledkem snížené aktivity fosfolipázy $C\beta$.

Z těchto výsledků je patrné, že snížení obsahu membránového cholesterolu posílí transdukcii signálu muskarinového M_2 receptoru.

4. Literatura

4. Literatura

- Abdel-Latif A.A., Howe P.H., Akhtar R.A. (1986) Polyphosphoinositides, phosphoproteins, and receptor function in rabbit iris smooth muscles. *Prog. Brain. Res.* 69, 51-63.
- Allen JA, Yu JZ, Dave RH, Bhatnagar A, Roth BL, Rasenick MM., (2009) Caveolin-1 and lipid microdomains regulate Gs trafficking and attenuate Gs/adenylyl cyclase signaling. *Mol Pharmacol.* 76, 1082-93.
- Alvarez R., Daniels D.V. (1992) A separation method for the assay of adenylyl cyclase, intracellular cyclic AMP, and cyclic-AMP phosphodiesterase using tritium-labeled substrates. *Anal. Biochem.* 203, 76-82.
- Beck-Sickinger A.G. (1996) Structural characterization and binding sites of G-protein-coupled receptors. *Drug Dev. Today* 1, 502-513.
- Berstein G., Blank J.L., Jhon D.Y., Exton J.H., Rhee S.G., Ross E.M. (1992) Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell.* 70, 411-418.
- Blin N., Yun J., Wess J. (1995) Mapping of single amino acid residues required for selective activation of Gq/11 by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 17741-17747.
- Bockaert J., Pin J.P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors : an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723-1729.
- Bonner T.I., Young A.C., Brann M.R., Buckley N.J. (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1, 403-410.
- Bonner T.I., Buckley N.J., Young A.C., Brann M.R. (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptors genes. *Science* 237, 527-532.
- Brown DA, London E., (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14, 111-36.
- Buckley N.J., Bonner T.I., Buckley C.M., Brann M.R. (1989) Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol. Pharmacol.* 35, 469-476.

- Burford N.T., Nahorski S.R. (1996) Muscarinic m1 receptor-stimulated adenylate cyclase activity in Chinese hamster ovary cells is mediated by G_s alpha and is not a consequence of phosphoinositidase C activation. *Biochem. J.* 315, 883-888
- Burford N.T., Tobin A.B., Nahorski S.R. (1995) Differential coupling of m1, m2 and m3 muscarinic receptor subtypes to inositol 1,4,5-trisphosphate and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate accumulation in Chinese hamster ovary cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 134-142.
- Burger K, Gimpl G, Fahrenholz F, (2000) Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci.* 57,1577-92.
- Caulfield M.P. (1993) Muscarinic receptors - characterization, coupling and function. *Pharmacol. Therapeut.* 58, 319-379.
- Clapham D.E., Neer E.J. (1993) New roles for G-protein beta gamma-dimers intramembrane signalling. *Nature* 365, 403-406.
- Colozo, A.T., Park, P.S., Sum, C.S., Pisterzi, L.F., Wells, J.W., (2007) Cholesterol as a determinant of cooperativity in the M2 muscarinic cholinergic receptor. *Biochem. Pharmacol.* 74, 236–255.
- Curtis C.A.M., Wheatley M., Bansai S., Birdsall N.J.M., Eveleigh P., Pedder E.K., Poyner D., Hulme E.C. (1991) Propylbenzilylcholine mustard labels an acidic residue in transmembrane helix 3 of the muscarinic receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 489-495.
- DeLapp NW, McKinzie JH, Sawyer BD, Vandergriff A, Falcone J, McClure D, Felder CC, (1999) Determination of [³⁵S]guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate binding mediated by cholinergic muscarinic receptors in membranes from Chinese hamster ovary cells and rat striatum using an anti-G protein scintillation proximity assay. *J Pharmacol Exp Ther.* 289, 946-55.
- Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA, Chen P, Farooqui T., (2007) Comparison of biochemical effects of statins and fish oil in brain: the battle of the titans. *Brain Res Rev.* 56, 443-71.
- Felder C.C. (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* 9, 619-625.
- Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly RA., (1997) Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 272, 17744-8.

- Fraser C.M., Arakawa S., McCombie W.R., Venter J.C. (1989) Cloning, sequence analysis, and permanent expression of a human α_2 -adrenergic receptor in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 264, 11754-11761.
- Fraser C.M., Wang C.D., Robinson D.A., Gocayne J.D., Venter J.C. (1989) Site-directed mutagenesis of m1 muscarinic acetylcholine receptors: Conserved aspartic acids play important roles in receptor function. *Mol. Pharmacol.* 36, 840-845.
- Gimpl G, Burger K, Politowska E, Ciarkowski J, Fahrenholz F, (2000) Oxytocin receptors and cholesterol: interaction and regulation. *Exp Physiol.* 85,41-49.
- Grimm MO, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C., (2008) Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem.* 283, 11302-11.
- Gudermann T., Kalkbrenner F., Schultz G. (1996) Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 429-459.
- Gudermann T., Nürnberg B., Schultz G. (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. *J. Mol. Med.* 73, 51-63.
- Gusovsky F., Lueders J.E., Kohn E.C., Felder C.C. (1993) Muscarinic receptor-mediated tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma. An alternative mechanism for cholinergic-induced phosphoinositide breakdown. *J. Biol. Chem.* 268, 7768-7772.
- Haga K., Haga T., Ichiyama A. (1986) Reconstitution of the muscarinic acetylcholine receptor. Guanine nucleotide-sensitive high affinity binding of agonists to purified muscarinic receptors reconstituted with GTP-binding proteins (G_i and G_o). *J. Biol. Chem.* 261, 10133-10140.
- Hammer R., Berrie C.P., Birdsall N.J.M., Burgen A.S.V., Hulme E.C. (1980) Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 238, 90-92.
- Hartmann, T., Kuchenbecker, J., Grimm, M.O., (2007) Alzheimer's disease: the lipidconnection. *J. Neurochem.* 103, 159–170.
- Herron G.S., Schimerlik M.I. (1983) Glycoprotein properties of the solubilized atrial muscarinic acetylcholine receptor. *J. Neurochem.* 41, 1414-1420.
- Huang P, Xu W, Yoon SI, Chen C, Chong PL, Unterwald EM, Liu-Chen LY., (2007) Agonist treatment did not affect association of mu opioid receptors with lipid

- rafts and cholesterol reduction had opposite effects on the receptor-mediated signaling in rat brain and CHO cells. *Brain Res.* 1184, 46-56.
- Hulme E.C., Birdsall N.J., Buckley N.J. (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 633-673.
- Hurley J.H. (1999) Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 274, 7599-7602.
- Cheng Y.C., Prusoff W.H. (1973) Relation between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108.
- Ikonen E, Parton R.G., (2000) Caveolins and cellular cholesterol balance. *Traffic.* 1, 212-7.
- Iyengar R. (1993) Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J.* 7, 768-775.
- Jakubík J., Bačáková L., El-Fakahany E.E., Tuček S. (1995) Constitutive activity of the M1 - M4 subtypes of muscarinic receptors in transfected CHO cells and of muscarinic receptors in the heart cells revealed by negative antagonists. *FEBS Lett.* 18, 275-279.
- Jakubík, J., El-Fakahany, E.E., Doležal, V., (2006) Differences in kinetics of xanomeline binding and selectivity of activation of g proteins at m1 and m2 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* 70, 656–666.
- Ji T.H., Grossmann M., Ji I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 273, 17299-17302.
- Johnson R.A., Alvarez R., Salomon Y. (1994) Determination of adenylyl cyclase catalytic activity using single and double column procedures. *Methods. Enzymol.* 238, 31-56.
- Kenakin T. (1997) Protean agonists. Keys to receptor active states? *Ann. NY Acad. Sci.* 812, 116-125.
- Klein, U., Gimpl, G., Fahrenholz, F., (1995) Alteration of thymometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34, 13784–13793.
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F., (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 5815-20.

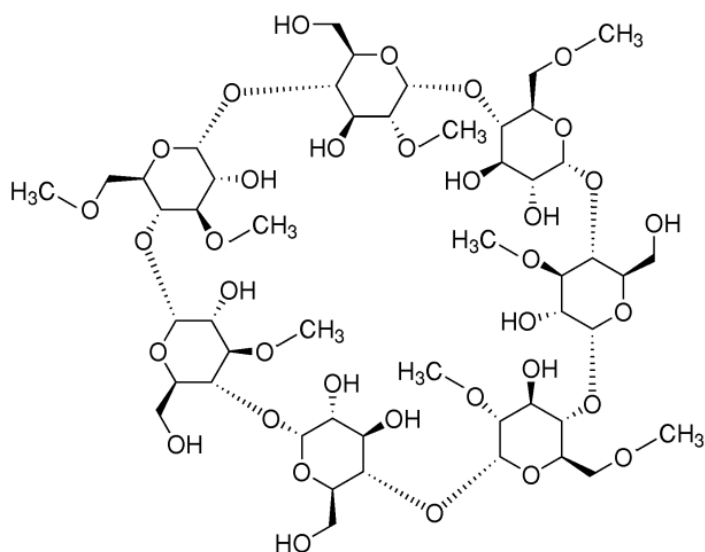
- Kubo T., Fukuda K., Mikami A., Maeda A., Takahashi H.; Mishina M., Haga T., Haga K., Ichiyama A., Kangawa K. (1986) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 323, 411-416.
- Lefkowitz R.J. (1998) G protein-coupled receptors. *J.Biol.Chem.* 273, 18677-18680.
- Liles W.C., Nathanson N.M. (1986) Regulation of neuronal muscarinic acetylcholine receptor number by protein glycosylation. *J.Neurochem.* 46, 85-95.
- Limbird L.E. (1986) *Cell Surface Receptors: a Short Course on Theory and Methods.* Martinus Nijhoff Publish , Boston, 3. vydání.
- Liu J., Conklin B.R., Blin N., Yun J., Wess J. (1995) Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signalling specificity and G-protein activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11642.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.
- Lu Z.L., Curtis C.A., Jones P.G., Pavia J., Hulme E.C. (1997) The role of the aspartate-arginine-tyrosine triad in the m1 muscarinic receptor: mutations of aspartate 122 and tyrosine 124 decrease receptor expression but do not abolish signaling. *Mol. Pharmacol.* 51, 234-241.
- Ma AW, Pawagi AB, Wells JW., (2008) Heterooligomers of the muscarinic receptor and G proteins purified from porcine atria. *Biochem Biophys Res Commun.* 374, 128-33.
- Milligan G. (1997) Is promiscuity of G protein interaction an issue in the classification of receptors? *Ann. NY Acad. Sci.* 812, 126-132.
- Michal, P., Lysíková, M., Tuček, S., (2001) Dual effects of muscarinic M2 acetylcholine receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: dependence on time, receptor density and receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1217–1228.
- Michal, P., El-Fakahany, E.E., Doležal, V., (2007) Muscarinic M2 receptors directly activate Gq/11 and Gs G-proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 607–614.
- Michal P, Rudajev V, El-Fakahany EE, Dolezal V, (2009) Membrane cholesterol content influences binding properties of muscarinic M2 receptors and differentially impacts activation of second messenger pathways. *Eur J Pharmacol.* 15, 606,50-60.

- Mitchell, D.C., Straume, M., Miller, J.L., Litman, B.J., (1990) Modulation of metarhodopsin formation by cholesterol-induced ordering of bilayer lipids. *Biochemistry* 29, 9143–9149.
- Mumby S.M., Kleuss C., Gilman A.G. (1994) Receptor regulation of G-protein palmitoylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 25001-25008.
- Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J., Growdon, J.H., (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258, 304–307.
- Nováková J, Mikasová L, Machová E, Lisá V, Dolezal V., (2005) Chronic treatment with amyloid beta(1-42) inhibits non-cholinergic high-affinity choline transport in NG108-15 cells through protein kinase C signaling. *Brain Res.* 1062, 101-110.
- O'Dowd B.F., Hnatowich M., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Bouvier M. (1989) Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 7564-7569.
- Oksman M, Iivonen H, Höggyes E, Amtul Z, Penke B, Leenders I, Broersen L, Lütjohann D, Hartmann T, Tanila H., (2006) Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis.*23,563-72.
- Peralta E.G., Winslow J.W., Peterson G.L. Smith D.H., Ashkenazi A., Ramachandran J. Schimerlik M.I., Capon D.J. (1987) Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science* 236, 600-605.
- Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- Pike, L.J., (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44, 655–667.
- Pitcher J.A., Freedman N.J., Lefkowitz R.J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 653-692.
- Premont R.T., Jacobowitz O., Iyengar R. (1992) Lowered responsiveness of the catalyst of adenylyl cyclase to stimulation by Gs in heterologous desensitization: a role for adenosine 3',5'-monophosphate-dependent phosphorylation. *Endocrinology* 131, 2774-2783.
- Rando R.R. (1996) Chemical biology of protein isoprenylation/methylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1330, 5-16.

- Ray K., Kunsch C., Bonner L.M., Robishaw J.D. (1995) Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *J. Biol. Chem.* 270, 21765-21771.
- Rhee S.G., Choi K.D. (1992) Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267, 12393-12396.
- Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V., (1998) The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol.* 56, 541-69.
- Roth SG, Mason AJ (1995) Membrane alterations as causes of impaired signal transduction in Alzheimer's disease and aging. *Trends Neurosci.* 18, 203-206.
- Shmuel M, Nodel-Berner E, Hyman T, Rouvinski A, Altschuler Y., (2007) Caveolin 2 regulates endocytosis and trafficking of the M1 muscarinic receptor in MDCK epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 18, 1570-85.
- Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K., Uhler M.D. (1998) *Basic Neurochemistry*, Lippincott-Raven, 236.
- Simons K, van Meer G, (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry.* 27, 6197-202.
- Simons, K., Toomre, D., (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.
- Sparks DL., (1996) Intraneuronal beta-amyloid immunoreactivity in the CNS. *Neurobiol Aging.* 17, 291-9.
- Sunahara R.K., Dessauer C.W., Gilman A.G. (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 461-480.
- Tolbert LM, Lamah J., (1996) Human Muscarinic Cholinergic Receptor Hm1 Internalizes via Clathrin-coated Vesicles. *J Biol Chem.* 271, 17335-17342.
- Tuček S. (1997) Is the R and R* dichotomy real? *Trends Pharmacol Sci* 18, 414-416.
- Vogel, W.K., Mosser, V.A., Bulseco, D.A., Schimerlik, M.I., (1995) Porcine m2 muscarinic acetylcholine receptor-effector coupling in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 270, 15485-15493.
- Wess J. (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit. Rev. Neurobiol.* 10, 69-99.
- Wess J. (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.* 80, 231-264.

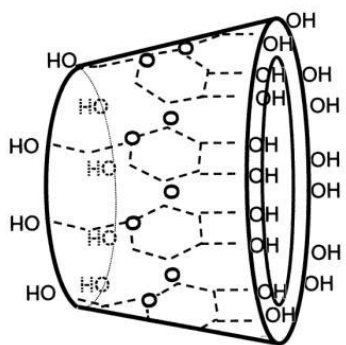
- Wess J., Gdula D., Brann M.R. (1991) Site-directed mutagenesis of the m3 muscarinic receptor: identification of a series of threonine and tyrosine residues involved in agonist but not antagonist binding. *EMBO J.* 10, 3729-3739.
- Wess J., Maggio R. Palmer J.R., Vogel Z. (1992) Role of conserved threonine and tyrosine residues in acetylcholine binding and muscarinic receptor activation. A study with m3 muscarinic receptor point mutants. *J. Biol. Chem.* 267, 19313-19318.
- Wolf BA, Wertkin AM, Jolly YC, Yasuda RP, Wolfe BB, Konrad RJ, Manning D, Ravi S, Williamson JR, Lee VM., (1995) Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid beta-protein production in human neuronal NT2N cells. *J Biol Chem.* 270, 4916-22.

Příloha Chemické vzorce a názvy použitých látek

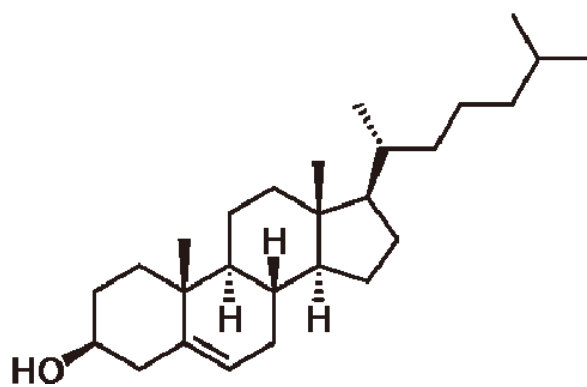


Methyl-β-cyclodextrin

sedm α-D-glucopyranosidových jednotek spojených do kruhu



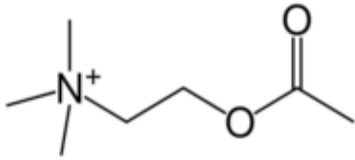
dutina pro vazbu cholesterolu



CHOLESTEROL

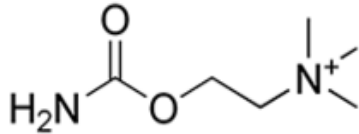
5-Cholesten-3β-ol

Agonisté



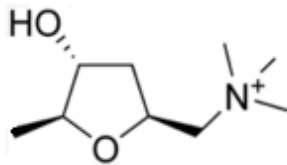
ACETYLCHOLIN

2-Acetoxy-*N,N,N*-trimethylethanamonium



KARBACHOL

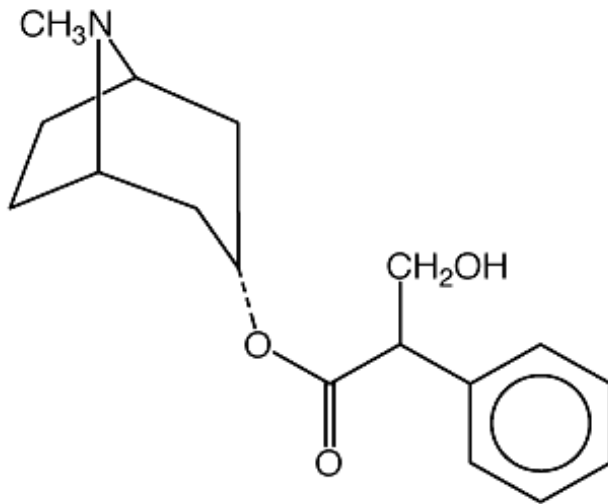
(2-Hydroxyethyl)trimethylammonium karbamát



MUSKARIN

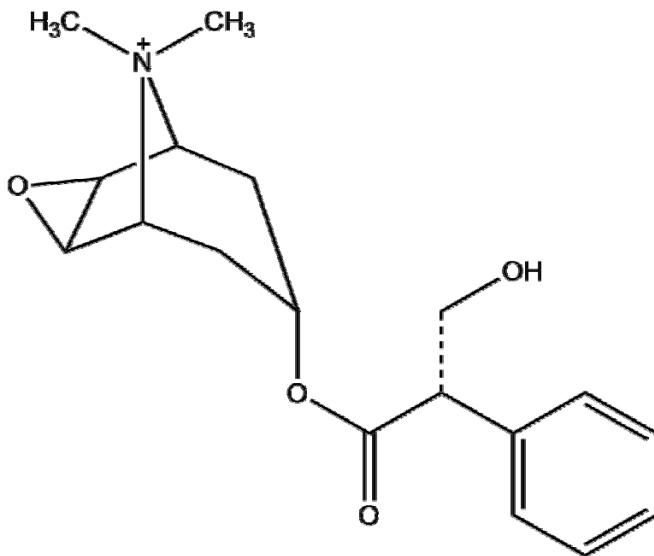
Tetrahydro-4-hydroxy-*N,N,N*,5-tetramethyl-2-furanmethanammonium

Antagonist



ATROPIN

(8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl) 3-hydroxy-2-phenylpropanoát



N-METHYL SKOPOLAMIN

(1*R*,2*R*,4*S*,7*S*)-7-[[*(2S)*-3-hydroxy-2-phenylpropanol]oxy]-9,9-dimethyl-3-oxa-9-azoniatricyclo[3.3.1.0^{2,4}]nonan