

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Inhibice nikotinového acetylcholinové receptoru takrinem a jeho deriváty

**Inhibition of nicotinic acetylcholine
receptors by tacrine and its derivatives**

Diplomová práce

bc. Kristýna Skřenková

Vedoucí diplomové práce:
RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Praha 2014

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

V Praze 5.5.2014

Podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Krůškovi, CSc. za odborné vedení, podnětné diskuse a za trpělivost a pomoc při vypracovávání této práce. Mgr. Martině Kaniakové, Ph.D. za cenné připomínky a Magdě Kuntošové za přípravu tkáňových kultur. Dále bych ráda poděkovala všem členům oddělení Buněčné neurofyzologie Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. za přátelské pracovní prostředí. A v neposlední řadě děkuji své rodině za jejich podporu během mého studia.

Abstrakt

Nikotinové acetylcholinové receptory patří mezi ligandem aktivované kanály, které se nacházejí na nervosvalové synapsi a v centrálním a periferním nervovém systému. Aktivita nikotinového receptoru může být ovlivněna řadou farmakologických látek. V této práci jsme se zaměřili na studium inhibičního účinku takrinu a jeho derivátů na nikotinové acetylcholinové receptory svalového a neuronálního typu. Tyto deriváty působí jako inhibitory acetylcholinesterázy a interagují přímo také s nikotinovými acetylcholinovými receptory. Na inhibitorech cholinesteráz je založena převážná část dnešní terapie Alzheimerovy choroby. Mechanismus účinku takrinu a jeho derivátů jsme studovali pomocí metody terčíkové zámku (patch clamp) v konfiguraci měření proudů z celé buňky.

Klíčová slova

Nikotinový acetylcholinový receptor, takrin, 7-MEOTA, K-577, inhibitory acetylcholinesterázy

Abstract

Nicotinic acetylcholine receptors are ligand-gated ion channels which are located on neuromuscular junction and in central and periferic nervous system. Activity of nicotinic receptor might be modulated by variety of pharmacological agents. In this work, we have focused on the study of the inhibition effect of tacrine and its derivatives on the nicotinic acetylcholine receptors of muscle and neuronal type. These derivatives function as acetylcholinesterase inhibitors and also interact with nicotinic acetylcholine receptors. The majority of current forms of treatment of Alzheimer's disease is based on cholinesterase inhibitors. We have studied the mechanism of tacrine and its derivatives by using patch clamp method in the configuration of whole-cell recording.

Keywords

Nicotinic acetylcholine receptor, tacrine, 7-MEOTA, K-577, acetylcholinesterase inhibitors

Obsah

Seznam použitých zkratek	7
Úvod	8
1. Literární přehled	10
1.1. Struktura nAChR.....	10
1.1.1. Ligand vázající doména a aktivace receptoru.....	11
1.1.2. Iontový kanál a jeho propustnost.....	12
1.2. Podjednotkové složení nAChR	13
1.2. Ligandy nAChR.....	17
1.2.1. Agonisté.....	17
1.2.2. Antagonisté	18
1.2.3. Alosterické modulátory.....	19
1.3. Fyziologická role ACh a modulace cholinergního přenosu.....	20
1.3.1. Cholinergní transmise	21
1.3.2. Alzheimerova choroba a cholinergní hypotéza.....	22
1.3.3. Inhibitory acetylcholinesterázy (AChEI).....	24
1.3.3.1. AChEI a jejich účinek na nAChR	26
I. Takrin.....	27
II. 7-MEOTA	28
III. K-577	29
IV. Látky PC	30
2. Cíle diplomové práce	31
3. Materiál a metody	32
3.1. Elektrofyzilogická měření.....	32
3.1.1. Metoda terčíkového zámku	32
3.1.2. Potup měření.....	32
3.1.3. Aparatura pro elektrofyzilogická měření	33
3.2. Zpracování naměřených dat.....	34
3.3. Buněčné kultury.....	35
3.3.1. Buněčná linie COS	35
3.3.1.1. Transfekce COS buněk.....	35
3.3.2. Buněčná linie TE671.....	36
3.4. Příprava plasmidů.....	36
3.5. Použité chemikálie, roztoky a média.....	37
3.5.1. Roztoky pro elektrofyzilogická měření	37
3.5.2. Roztoky a média pro práce s buněčnými kulturami	38

3.5.3. Roztoky použité pro kultivaci bakterií.....	38
3.6. Rovnice použité k výpočtu	38
3.6.1. Inhibiční křivky.....	38
3.6.2. Napěťová závislost	39
4. Výsledky	40
4.1. Účinky takrinu, 7-MEOTA a K-577 na svalový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$	40
4.1.1. Takrin	40
4.1.2. 7-MEOTA.....	44
4.1.3. K-577	47
4.1.4. Porovnání míry inhibice takrinu, 7-MEOTA a K-577.....	50
4.2. Účinek látek PC na nAChR.....	51
4.2.1. Účinek látek PC na svalový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$	51
5.1.5. Porovnání účinku na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ a receptoru $\alpha4\beta2$	54
4.2.2. Účinek látek PC na neuronální receptor $\alpha4\beta2$	55
5. Diskuse	57
5.1. Takrin, 7-MEOTA a K-577.....	57
5.1.1. Takrin.....	58
5.1.2. 7-MEOTA.....	59
5.1.3. K-577	59
5.1.4. Inhibiční účinek takrinu, 7-MEOTA, K-577	60
5.2. Látky PC.....	63
6. Závěr	66
7. Použitá literatura	67

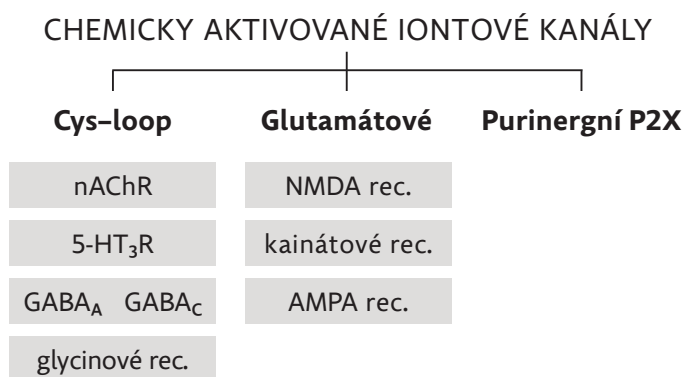
Seznam použitých zkratek

5-HT ₃	5-hydroxytryptamin (serotonin)
Acetyl-CoA	Acetyl-koenzym A
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChBP	acetylcholin vázající protein
AChE	acetylcholinesteráza
AChR	acetylcholinový receptor
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionátová kyselina
ApoE	apolipoprotein εA
ATP	adenosintrifosfát
Aβ	β-amyloidní protein
BuChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervová soustava
COS	buněčná linie používaná k expresi neuronálních nikotinových receptorů
Cys	aminokyselina cystein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC ₅₀	koncentrace agonisty při které odpověď dosahuje 50% maximální odpovědi
ECS	extracelulární roztok
GABA _A	receptor gamaaminomáselné kyseliny podtypu A
ChAT	cholin-acetyltransferáza
IC ₅₀	koncentrace antagonisty inhibující odpovědi na 50% kontroly
ICS	intracelulární roztok
LTD	dlouhodobá deprese
LTP	dlouhodobá potenciace
mAChR	muskarinový acetylcholinový receptor
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
NMDA	N-methyl-D-aspartátová kyselina
TC	(+)-tubokurarin
TE671	buněčná linie přirozeně exprimující svalový receptor
TM	transmembránová doména
Tyr	aminokyselina tyrosin
δ	relativní elektrická vzdálenost vazebného místa inhibitoru směrem z extracelulární strany

Úvod

Acetylcholinové receptory (AChR) jsou transmembránové proteiny nacházející se v buněčných membránách a jako mnoho ligandem aktivovaných receptorů mají dva hlavní subtypy - metabotropní a ionotropní. Oba tyto typy receptorů jsou aktivovány endogenním neurotransmiterem acetylcholinem a jsou exprimovány neuronálními i ne-neuronálními buňkami po celém těle. Tyto strukturně a funkčně odlišné receptory dostaly jméno podle specifických agonistů, které je aktivují - pro metabotropní typ je jím muskarin a pro ionotropní nikotin.

Nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR) jsou podle přítomnosti specifické Cys-kličky řazeny do "Cys-loop" rodiny ligandem otevíraných iontových kanálů, mezi které patří také GABA_A, GABA_C, glycinové a serotoninové 5-HT₃ receptory (Obr. 1) (Karlin 2002; Lester a kol. 2004). Nikotinové receptory se skládají z pěti podjednotek, které utvářejí centrální iontový kanál, jenž se v přítomnosti agonisty otevírá a propouští ionty Na⁺, K⁺ a v různé míře i ionty Ca²⁺. Podle lokalizace v organismu je lze dělit na svalové, které zprostředkovávají rychlý nervosvalový přenos, a nervové, které se nacházejí napříč centrálním a periferním nervovým systémem, ale i v ne-neuronálních buňkách (Macklin a kol. 1998; Maus a kol. 1998).



Obr. 1: Schématické rozdělení tří skupin chemicky aktivovaných iontových kanálů. První skupinou jsou pentamerické Cys-loop receptory, které mohou být kationtové nebo aniontové. Nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR) a serotoninem aktivované 5-hydroxytryptamin₃ (5-HT₃) receptory patří mezi kationtové kanály. Receptory γ -aminomáselné kyseliny (GABA) typu GABA_A a GABA_C patří společně s glycinovými receptory mezi aniontové kanály. Další skupinou jsou tetramerické glutamátové receptory, které se dělí na N-metyl-D-aspartátové (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropanové (AMPA) a kainátové receptory. Třetí skupinou jsou purinegní P2X receptory aktivované volným ATP.

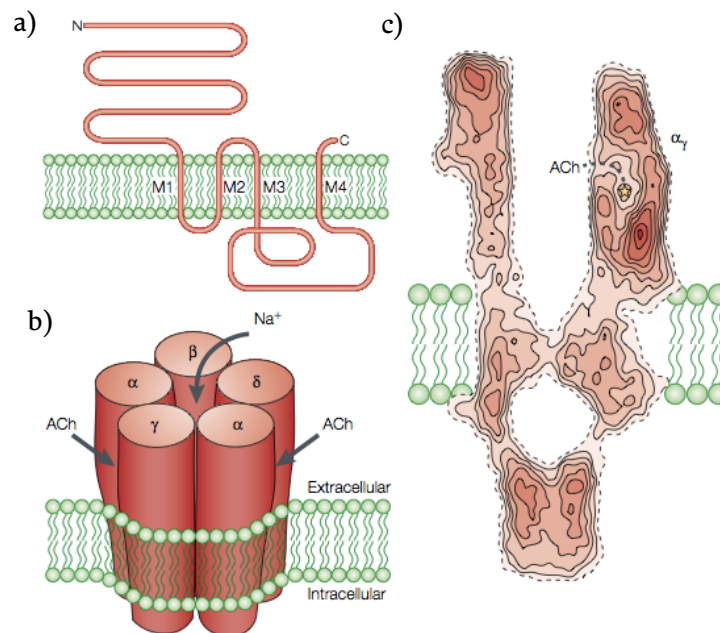
Svalový receptor byl již během let popsán poměrně detailně, existence neuronálního nikotinového receptoru však byla dlouhou dobu předmětem diskuse. Jelikož však mělo kouření tabáku psychoaktivní účinek, začal se hledat specifický receptor, který byl za účinek nikotinu v centrální nervové soustavě zodpovědný. V 80. letech minulého století se tak existence neuronálního nikotinového receptoru potvrdila (Romano a Goldstein 1980; Boulter a kol. 1986). Svalové a neuronální nikotinové receptory se ovšem neliší pouze svou lokalizací v organismu, ale také svým podjednotkovým složením. U obratlovců bylo doposud popsáno 17 různých podjednotek. Některé mohou tvořit homomery, ale mnohem častější jsou heteromerické receptory u nichž se podjednotky mohou různě kombinovat a vytvářet tak funkčně a farmakologicky odlišné receptorové podtypy. Dysfunkce, změna exprese či mutace nAChR může vést k rozvoji řady onemocnění jako je například myastenia gravis či dědičný epileptický syndrom (Lindstrom a kol. 1976; Chen a kol. 2009). Předpokládá se také, že změna funkce nAChR může v určité míře přispívat k rozvoji onemocnění jakými jsou Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a schizofrenie (Paterson a Nordberg 2000). Modulace funkce nAChR by tak mohla napomoci ovlivnit řadu fyziologických funkcí.

1. Literární přehled

1.1. Struktura nAChR

První experimentální strukturální informace o nAChR byly získány elektronovou mikroskopií receptorů *Torpedo* (Unwin 1993). Tento receptor je exprimován v elektrickém orgánu parejnoka *Torpedo californica* a je ve velké míře homologický k embryonálnímu svalovému receptoru (Raftery a kol. 1980; Hall a Sanes 1993). Časem se podařilo získat strukturální data s rozlišením 4,6 Å (Obr. 2.) (Miyazawa a kol. 1999; Unwin 2005).

Další strukturální informace byly získány rentgenovou analýzou krystalů acetylcholin vázajícího proteinu (AChBP), který je sekretován gliovými buňkami hlemýždě *Lymnaea* a má roli v modulaci synaptické transmise (Smit a kol. 2001). Jedná se o malý ve vodě rozpustný protein, který tvoří pentamery a s vysokou afinitou váže



Obr. 2: Struktura nikotinového acetylcholinového receptoru. a) Znáznornění průchodu podjednotky membránou. b) Schématické znázornění struktury nikotinové receptoru s dvěma vazebnými místy pro ACh. c) Řez strukturou embryonálního svalového receptoru získaný elektronovou mikroskopií s rozlišením 4,6 Å *Torpedo* (Karlin 2002).

acetylcholin (ACh). Díky tomu, že sdílí 20-24% sekvenční podobnost s ligand vázající doménou nikotinového receptoru, je AChBP dobrým modelem pro studium vazby ligandů k tomuto receptoru. Tento model však nemůže poskytnout informace o konformačních změnách, kterými nAChR prochází při navázání ligandu, neboť tento protein nemá transmembránovou část s iontovým kanálem. Také je nejasné zda tento protein prochází konformačními změnami související s alosterií a desenzitizací (Brejc a kol. 2001; Celie a kol. 2004).

Nikotinový receptor je glykoprotein s molekulární hmotností 290 kD. Je tvořen pěti podjednotkami, které jsou zanořené v lipidové dvojvrstvě a vytvářejí vodou vyplněný pór. Každá podjednotka je tvořena několika doménami: 1) extracelulární N-terminální doménou složenou přibližně z 200 aminokyselin a obsahující takzvanou Cys-kličku; 2) transmembránovou částí složenou ze čtyř transmembránových segmentů TM1-TM4, kde druhý transmembránový segment TM2 tvoří vnitřek iontového kanálu; 3) intracelulární smyčkou oddělující TM3 a TM4; 4) krátkým extracelulárním C-terminálním koncem. Základní struktura svalového a neuronálního receptoru je více méně homologická (Karlin 2002; Dani a Bertrand 2007; Felpin a Lebreton 2009).

1.1.1. Ligand vázající doména a aktivace receptoru

Agonista nAChR se váže do vazebného místa, které se nachází na rozhraní ligand vázajících domén dvou sousedících podjednotek. Na svalovém receptoru jsou tato vazebná místa vždy dvě. Podle toho, zda se jedná o embryonální či dospělý typ svalového receptoru, se vazebné místo pro agonistu nachází buďto na rozhraní podjednotek α - γ a α - δ (embryonální typ) nebo na rozhraní podjednotek α - ϵ a α - δ (dospělý typ) (Unwin 2005). U embryonálního receptoru navíc nejsou tato vazebná místa ekvivalentní a navázání agonisty není pozitivně kooperativní. To je dáno tím, že vazebné místo mezi podjednotkou α - δ má mnohem větší afinitu k agonistovi než vazebné místo na rozhraní podjednotek α - γ . U dospělého receptoru, který obsahuje dvě ekvivalentní vazebná místa, je vazba agonisty pozitivně kooperativní (Krusek a kol. 2004). Neuronální nikotinové receptory se mohou skládat z více typů podjednotek a tím mají mnohem větší variabilitu ve vazebných místech pro agonistu. Nejčastěji se však skládají ze dvou stejných α podjednotek a tří stejných β podjednotek. Na takovém receptoru pak vznikají dvě ekvivalentní vazebná místa pro agonistu, která se nacházejí na rozhraní podjednotky α a β . Tím že mohou být neuronální receptory složeny z více jak dvou podjednotek α , mohou obsahovat více

než dvě vazebná místa pro agonistu. Homomerický $\alpha 7$ receptor jich například obsahuje celkem pět (Andersen a kol. 2013).

Pro vazbu agonisty je nezbytná Cys-klička, kterou obsahuje α podjednotka. Tato klička je nejspíše důležitá pro konformační změnu vedoucí k otevření kanálu po vazbě agonisty. Cys-klička obsahuje dva cysteinové zbytky, které jsou od sebe oddělené 13 aminokyselinami (Cys 128 a Cys 142, číslování podle α podjednotky *Torpedo*) (Sine a Engel 2006). Pro navázání agonisty je dále vyžadována přítomnost Cys-páru (Cys 191 a Cys 192) a čtyř hydrofóbních aromatických zbytků (α Tyr 93, α Tyr 149, α Tyr 190, α Tyr 198) (Karlin a kol. 1986b; Grutter a kol. 2004). Tímto přispívá k vazbě agonisty α podjednotka. Přesněji podjednotky $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 6, \alpha 7$ a $\alpha 9$. Podjednotka $\alpha 5$ a $\alpha 10$ nejsou schopny poskytnout tuto část vazebného místa a pro formování funkčního receptoru je nezbytná přítomnost dalších α podjednotek v receptoru. Druhou část vazebného místa mohou poskytovat non- α podjednotky a některé z α podjednotek (Karlin 2002; Felpin a Lebreton 2009).

Naváže-li se agonista na receptor, stabilizuje ho v otevřeném stavu (Colquhoun a Sakmann 1985). Po aktivaci přechází receptor do stavu desensitizovaného, což je dlouhodobě zavřený receptor s navázaným agonistou. Po odstranění agonisty se receptor postupně (v řádu milisekund až sekund) navrácí zpět do aktivovatelného stavu. Rychlost vstupu do desensitizace je ovlivněna aplikovaným agonistou a podjednotkovým složením receptoru. Návrat z ní již typem agonisty ovlivněn není. Existuje však více typů desensitizace. Například při dlouhodobé přítomnosti nízké koncentraci některých agonistů může receptor přecházet do desensitizovaného stavu aniž by před tím došlo k aktivaci receptoru. Návrat z tohoto typu desensitizace je pomalý (v rádech sekund až minut) a může vést k navýšení počtu receptorů. Desensitizace má nejspíše fyziologickou roli v ochraně buňky před její přílišnou stimulací a významně ovlivňuje cholinergní transmisí. Na její úlohu se nesmí zapomínat při snaze zvýšit cholinergní signalizaci farmakologickým blokováním acetylcholinesterázy (Elenes a Auerbach 2002; Giniatullin a kol. 2005).

1.1.2. Iontový kanál a jeho propustnost

Nikotinový receptor je každou podjednotkou zanořen do buněčné membrány čtyřmi transmembránovými helixy TM1-TM4. Vnitřek kanálu je tvořen helixem TM2, který rozhoduje o jeho selektivě a vodivosti. V zavřeném stavu receptoru jsou TM2 helixy natočeny tak, aby jejich hydrofobní aminokyselinové zbytky směřovaly do kanálu a tím znemožňovaly průchod hydratovaných iontů. Po vazbě agonisty dojde

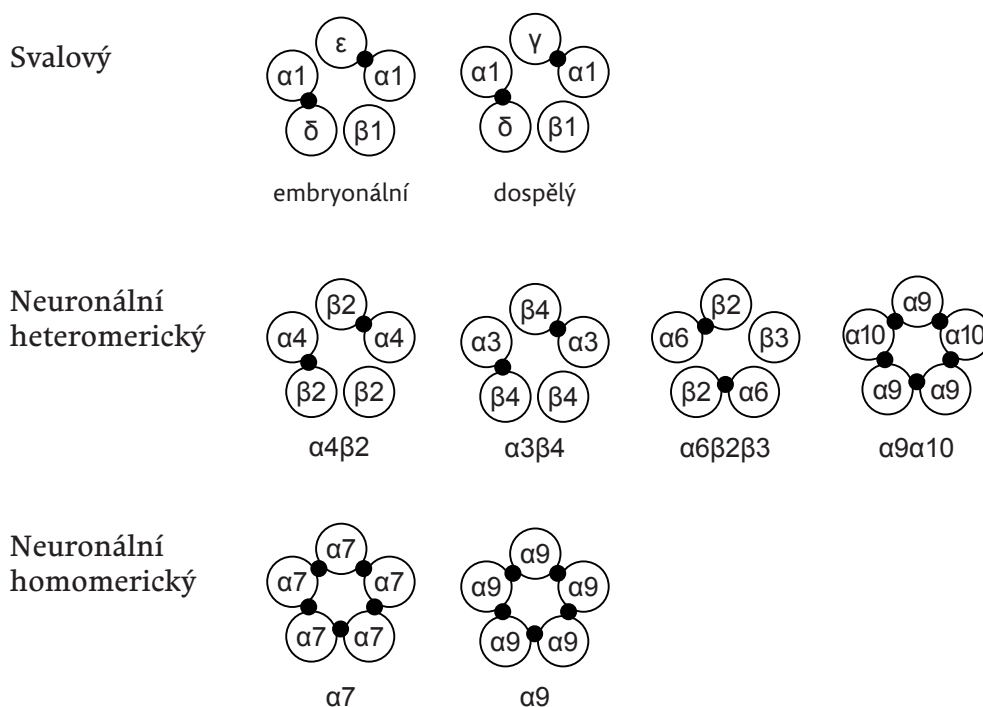
ke konformační změně receptoru, která vede k rotaci TM2 helixů. Tím se jejich hydrofilní části přetočí směrem do iontového kanálu, což následně umožní vtok iontů (Felpin a Lebreton 2009). nAChR jsou běžně propustné pro malé monovalentní a bivalentní kationty. Selektivitu kanálu určují konzervované aminokyseliny směřující do vnitřku kanálu v jeho otevřeném stavu. Zdá se, že rozhodující je zde zejména přítomnost prolinu v krátkém intracelulárním segmentu mezi TM1 a TM2, negativně nabitý glutamát v ústí kanálu a přítomnost polárního treoninu nebo valinu v TM2. Zamění-li se tyto aminokyseliny za zbytky lemující kanál GABA_A receptoru, dojde ke změně selektivity kanálu z kationtové na aniontovou (Galzi a kol. 1992). K otevření kanálu dochází v několika mikrosekundách po navázání agonisty. Proto musí být receptor schopný rychlé konformační změny a sekvence, které to umožňují, jsou konzervované (Marini a Guerrini 2007; Engel 2008).

1.2. Podjednotkové složení nAChR

Nikotinový receptor obratlovců může být složen z několika podjednotek. Díky této podjednotkové diverzitě je umožněna specifita jednotlivých nAChR podtypů. Funkci receptoru ovlivňuje i uspořádání jednotlivých podjednotek - stechiometrie. Receptorové podtypy nikotinového receptoru tak mohou mít odlišnou afinitu k ligandům, iontovou selektivitu, propustnost či rychlost desensitizace. Podjednotky nikotinového receptoru se primárně dělí na α podjednotky ($\alpha 1$ - $\alpha 10$) a non- α podjednotky ($\beta 1$ - $\beta 4$, δ , γ a ϵ). Toto dělení je dáno jejich odlišnou rolí ve vazbě agonisty - α podjednotky poskytují hlavní část vazebného místa a non- α podjednotky poskytují pomocnou část vazebného místa. Tato odlišná role je určena přítomností druhého Cys-Cys páru, který se nachází v blízkosti TM1 domény (Karlin a kol. 1986a).

Svalový nikotinový receptor je složen z pěti různých podjednotek $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , γ a ϵ , které jsou uspořádány v ustáleném pořadí. Dospělý svalový receptor je složen z podjednotek $\alpha \epsilon \alpha \delta \beta$ a nachází se na dospělé nervosvalové synapsi. Embryonální receptor je složen z podjednotek $\alpha \epsilon \alpha \gamma \beta$ a nachází se na buněčných membránách embryonálních a denervovaných svalů (Beranek a Vyskocil 1967). Neuronální receptor je složen pouze z α a β podjednotek, které se u heteromerického receptoru mohou různě kombinovat z podjednotek $\alpha 2$ - $\alpha 6$ a $\beta 2$ - $\beta 4$. Podjednotky $\alpha 7$ a $\alpha 9$ jsou navíc schopny utvářet funkční homomerický receptor a podjednotka $\alpha 10$ může vytvářet heteromerický receptor s podjednotkou $\alpha 9$ (podjednotka $\alpha 8$ zatím u savců nalezena nebyla) (Dani a Bertrand 2007; Albuquerque a kol. 2009). Teoreticky by se tedy mohly

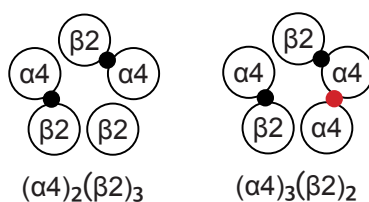
vyskytovat receptory různého podjednotkového složení. Přirozeně se ale vyskytují jen některé z nich a to navíc v ustáleném uspořádání. Mezi nejvíce prostudované podtypy nAChR patří svalové receptory a neuronální podtypy $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 3\beta 4$ (Obr. 3).



Obr. 3: Znázornění několika možných kombinací podjednotkového složení nikotinového receptoru. Černě jsou označena vazebná místa pro ACh na rozhraní podjednotek.

Nejčastěji se vyskytující podtyp neuronálního nikotinového receptoru je $\alpha 4\beta 2$. Tento receptor má z neuronálních receptorů nejvyšší afinitu k ACh a středně rychlou desenzitizaci. Receptory $\alpha 4\beta 2$ mají pravděpodobně účast na vzniku nikotinové závislosti a jejich dysfunkce se může podílet na rozvoji řady psychiatrických a neurodegenerativních onemocnění (Picciotto a kol. 2001). Například bylo zjištěno, že v časných fázích Alzheimerovy choroby (AD) dochází k redukci nAChR obsahujících zejména podjednotky $\alpha 4$ (Picciotto a Zoli 2002). Z toho důvodu je tento receptor důležitým terapeutickým cílem. Receptor $\alpha 4\beta 2$ se může vyskytovat ve dvou stechiometriích, které se liší v mnoha parametrech a vytvářejí tak dva funkčně odlišné receptory. Původně se předpokládalo, že přirozeně se vyskytujícím typem je receptor o stechiometrii $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, která obsahuje dvě vysokoafinitní vazebná místa pro agonistu (Anand a kol. 1991; Cooper a kol. 1991). Časem se ovšem začala hromadit data, která nasvědčovala tomu, že přirozeně by se mohl vyskytovat i podtyp se stechio-

metrií $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, který má mnohem nižší afinitu k ACh a mnohem rychleji desensitivizuje (Zwart a Vijverberg 1998). Nejprve se myslelo, že by se mohlo jednat o experimentální artefakt, který vzniká expresí v cizorodém buněčném systému. Nyní je však již mnoho důkazů potvrzujících, že se v savčím mozku přirozeně vyskytují obě tyto stechiometrie $\alpha 4\beta 2$ receptoru (Nelson a kol. 2003; Moroni a kol. 2006; Harpsøe a kol. 2011). Nižší senzitivita k aktivaci u $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ receptoru je vysvětlována vznikem třetího vazebného místa pro agonistu na rozhraní $\alpha 4$ - $\alpha 4$ podjednotek. Toto vazebné místo má sníženou afinitu k ACh a jelikož je k aktivaci receptoru pravděpodobně zapotřebí obsazení všech tří vazebných míst, ve výsledku dochází ke snížení sensitivity k aktivaci takto složeného receptoru (Obr. 4) (Moroni a kol. 2008; Harpsøe a kol. 2011). K pozměnění stechiometrie ve prospěch $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ receptoru může docházet při heterologní expresi například při větší dostupnosti $\beta 2$ podjednotky, snížením inkubační teploty na 29°C nebo při dlouhodobé expozici nikotinu, což by mohlo napomoci k pochopení vzniku závislosti na této látce (Nelson a kol. 2003).



Obr. 4: Znázornění vazebných míst pro agonistu na receptoru $\alpha 4\beta 2$. a) Stechiometrie $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ - černě jsou znázorněna dvě vazebná místa pro ACh nacházející se na rozhraní α a β podjednotek. b) Při stechiometrii receptoru $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ vzniká nejspíše ještě třetí vazebné místo na rozhraní podjednotek $\alpha 4$, které má nižší afinitu k ACh - znázorněno červeně. Upraveno podle: Harpsøe a kol. 2011.

Mezi častěji zastoupené receptory patří také homomerické receptory složené z $\alpha 7$ podjednotek. Tento receptor je charakteristický rychlou desensitivizací a vysokou propustností pro ionty vápníku. Tím jeho aktivací dochází ke spuštění Ca^{2+} -dependentních drah, které modulují řadu neuronálních funkcí (Quik a kol. 1997; Broide a Leslie 1999; Corringer a kol. 1999). Receptory $\alpha 7$ byly nalezeny v hipokampu na GABAergních interneuronech a na presynaptických glutamátergních neuronech. Zde díky své propustnosti pro vápník pomáhají výlevu glutamátu na synapsi a posilují vznik dlouhodobé potenciace (LTP). Proto jsou nAChR spojovány se schopností učení a vzniku paměti a jsou tedy jedním z možných terapeutických cílů pro zlepšení kognitivních funkcí (Mansvelder a McGehee 2000).

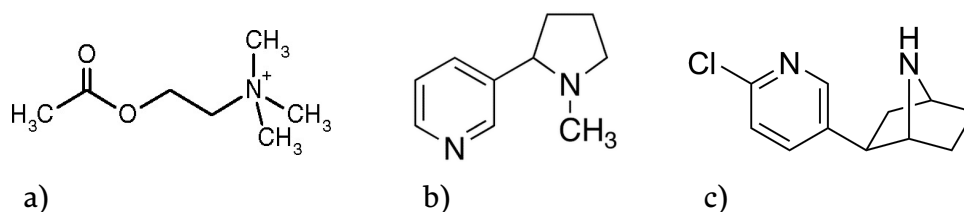
Receptory $\alpha 3\beta 4$ s pomalejší desensitizací patří mezi méně zastoupené neuronální receptory (Fenster a kol. 1997; Wang a kol. 2002). Vyskytují se zejména v autonomních gangliích, kde mají důležitou roli při udržování homeostáze, a u potkana byly nalezeny také ve větším množství v epifýze a mozečku (Hernandez a kol. 2004; Turner a Kellar 2005; Gotti a kol. 2006). Receptor $\alpha 3\beta 4$ není citlivý k inhibici α -bungarotoxinem a může být částečně aktivován cholinem (Papke a kol. 1996; Alkondon a kol. 1997).

1.2. Ligandy nAChR

S nikotinovými receptory interaguje mnoho přírodních a syntetických látek. Podle jejich účinku na nAChR je lze klasicky dělit do několika skupin. Hranice mezi nimi však nemusí být vždy úplně zřetelná, neboť jejich účinek je často komplexnější. Zjednodušeně se však tyto látky mohou řadit mezi agonisty, které receptor aktivují, antagonisty, které brání jeho aktivaci, nebo alosterické modulátory, které jinak upravují aktivitu receptoru. Alosterická modulace může být pozitivní či negativní. Účinek jedné látky se navíc může lišit v závislosti na podjednotkovém složení receptoru. Terapeuticky zajímavé jsou zejména látky, které se selektivně váží jen k určitému podtypu receptoru. Takových látek ale bylo doposud pro nAChR popsáno poměrně málo.

1.2.1. Agonisté

Agonisté nAChR se váží do vazebného místa na rozhraní dvou podjednotek a jejich navázání způsobuje konformační změnu vedoucí k otevření iontového kanálu a tedy k aktivaci receptoru. Přírodním endogenním agonistou nAChR je acetylcholin (ACh) (Obr. 5a). Jeho afinita k receptoru se liší v závislosti na podjednotkovém složení a svalový receptor má obecně k ACh vyšší afinitu než receptor neuronální. Dalším agonistou nAChR je nikotin, rostlinný alkaloid produkovaný rostlinou *Nicotiana tabacum*, který byl použit ke klasifikaci tohoto receptoru (Obr. 5b). Neuronální nAChR jsou k nikotinu až 50 x senzitivnější než svalové receptory (Woolf a kol. 1996). Nikotin aktivuje všechny typy nAChR s výjimkou $\alpha 9$ a $\alpha 9\alpha 10$ subtypů, které naopak inhibuje (Elgoyhen a kol. 1994; Elgoyhen a kol. 2001). Některé typy nAChR mohou být aktivovány cholinem, který vzniká při štěpení ACh. Cholin je plným agonistou $\alpha 7$ receptoru a parciálním agonistou $\alpha 3\beta 4$ receptoru. Receptory $\alpha 4\beta 2$ cholinem aktivovány nejsou (Papke a kol. 1996; Alkondon a kol. 1997). Mezi další agonisty



Obr. 5: Struktura vybraných agonistů nAChR
a) acetylcholin b) nikotin c) epibatidin

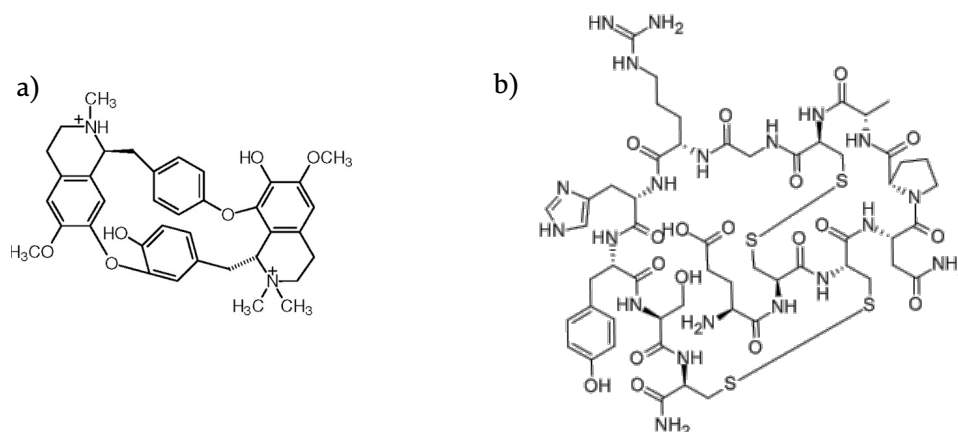
nAChR patří epibatidin, alkaloid nacházející se v kůži ekvádorské žáby *Epipedobates tricolor*. Epibatidin má vysokou afinitu k nAChR a může jejich přílišnou aktivací navozovat toxický efekt (Obr. 5c) (Badio a Daly 1994).

1.2.2. Antagonisté

Antagonisté svým navázáním naopak zabraňují aktivaci receptoru. Můžeme rozlišovat kompetitivní a nekompetitivní antagonisty. Kompetitivní "kompetují" s agonistou o jeho vazebné místo a jejich účinek lze snížit zvýšením množství agonisty. Mezi tyto látky patří řada toxinů produkovaných organismy za účelem ochrany před predátory nebo naopak pro usnadnění chycení kořisti. Jelikož nAChR zajišťují nervosvalový přenos, který je zodpovědný za pohyb, jedná se o velice dobrý cíl těchto toxinů, neboť mohou znemožnit útěk kořisti nebo naopak paralyzovat nepřítele. K cílení na tyto receptory nahrává i to, že struktura ligand vázající domény nAChR se v průběhu evoluce příliš neměnila (Daly 2005).

Jedním z představitelů kompetitivních antagonistů nAChR je (+)-tubokurarin (TC), izolovaný z jihoamerického keře *Chondodendron tomentosum* (Obr. 6a). Tuto látku používali jihoameričtí indiáni k lovu a je známa jako šípový jed (Bertrand a kol. 1992b; Chavez-Noriega a kol. 1997). S přibývajícemi studiemi se ovšem začalo ukazovat, že ani TC, který byl dlouhou dobu považován za ukázkového kompetitivního antagonistu, není čistým kompetitivním antagonistou a mechanismus jeho účinku může být na některých podtypech receptorů komplexnější a může působit i jako slabý agonista či blokátor otevřeného kanálu (Bertrand a kol. 1992a). Ke studiu nAChR velice přispěl α -bungarotoxin, produkovaný taiwanským hadem *Bungarus multicinctus*. Tento toxin se s velkou specifitou váže ke svalovému nAChR téměř kovalentní vazbou. Toho se hojně využívalo v izolaci receptoru a řadě vazebných studií. Nyní se používá zejména pro odlišení svalových a neuronálních receptorů. Mezi další hadí toxiny inhibující nAChR patří α -cobratoxin (Obr. 6b). Účinek tohoto toxinu není omezen na svalové receptory, a naopak se preferenčně váže na neuronální receptory obsahující podjednotky $\alpha 3$ a $\beta 4$ (Loring a kol. 1989; Felpin a Lebreton 2009). Mezi další podjednotkově selektivní antagonisty patří konotoxiny, které produkují mořští plži rodu *Conus* žijící v jižním Pacifiku. Konotoxiny tvoří rozsáhlou rodinu proteinů, které způsobují paralýzu oběti, a některé z nich působí přes vazbu na nAChR. Využití α -konotoxinů je nyní především v identifikaci jednotlivých subtypů nAChR (Olivera 2002; Azam a McIntosh 2009).

Aktivaci receptoru mohou také bránit látky vážící se mimo vazebné místo agonisty. Takovým látkám se říká nekompetitivní antagonisté a jelikož „nekompetují“ o své vazebné místo s agonistou, jejich účinek nelze zvrátit zvýšením koncentrace agonisty. Jedním z mechanismů nekompetitivní inhibice je blokáda otevřeného kanálu. Takto může působit řada kladně nabitých látek, které jsou po aktivaci receptoru elektrickými silami vtahovány do iontového kanálu a tím znemožňují průchod iontů kanálem. Jiné látky mohou naopak stabilizovat receptor v desenzitizovaném či klidovém stavu a působit jako alosterické inhibitory (Sine a Steinbach 1984; Papke a kol. 2000; Arias a kol. 2006).



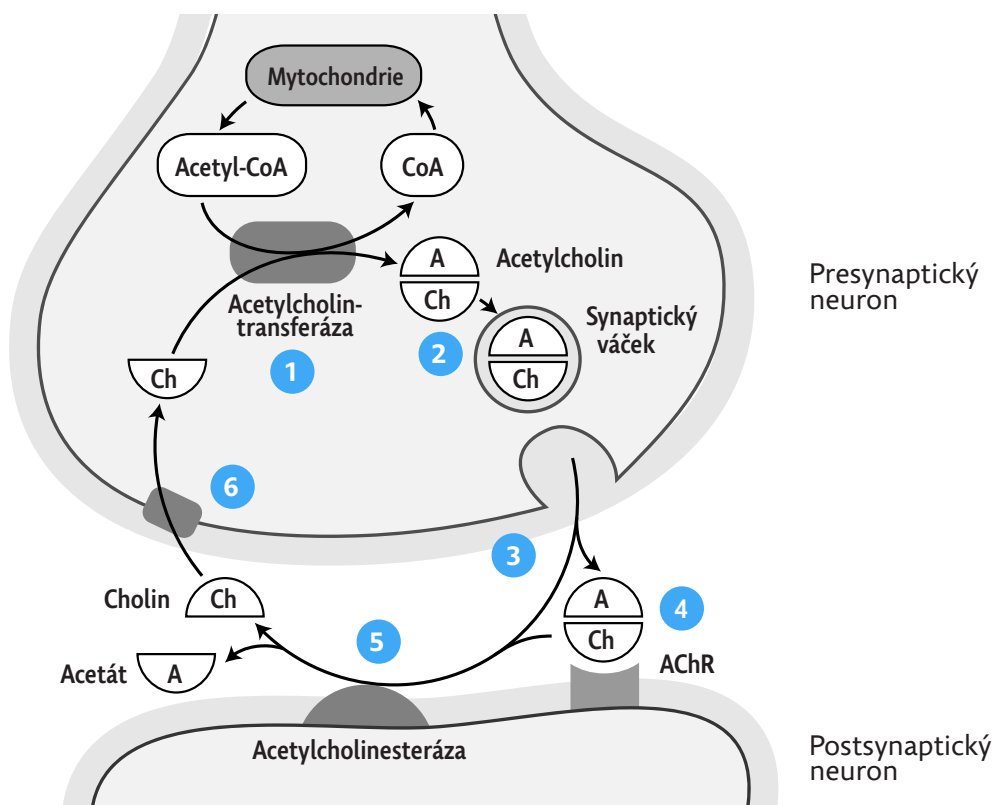
Obr. 6: Struktura vybraných antagonistů nAChR
a) (+)-tubokurarin (TC) b) α -konotoxin

1.2.3. Alosterické modulátory

Modulace funkce receptorů pomocí alosterických modulátorů nabízí mnoho terapeutických výhod oproti agonistům či antagonistům. Lze jejich pomocí docílit snížení či zvýšení účinku standardně se uvolňujícího endogenního agonisty, aniž by způsobily trvalou inhibici nebo aktivaci receptoru. Alosterické modulátory se mohou vázat na různá vazebná místa na receptoru, čímž lze docílit jemnější modulace jejich funkce. Především je snaha nalézt takové pozitivní alosterické modulátory, které se budou vázat jen na specifické podjednotky, což umožní specializovanou modulaci receptorové funkce. Z toho důvodu by se mohlo jednat o látky s méně vedlejšími účinky, které by mohly být bezpečnější a specifičtější (Dani a Bertrand 2007). Příkladem toho, že alosterické modulátory mohou neurotransmisi upravovat lépe než agonisté či antagonisté, jsou benzodiazepiny, které fungují jako pozitivní alosterické modulátory GABA_A receptoru tím, že zvyšují pravděpodobnost jejich otevírání (Olsen a kol. 1986).

1.3. Fyziologická role ACh a modulace cholinergního přenosu

Nikotinové receptory mohou být lokalizovány na těle neuronu a jeho dendritech, preterminálním axonu, terminálním axonu a na myelinizovaném axonu. Přirozeně jsou aktivovány ACh, který je syntetizován v cytoplasmě presynaptického neuronu z acetyl-CoA a cholinu pomocí enzymu acetylcholintransferázy. Vzniklý ACh je následně transportován do synaptického váčku, ze kterého je po depolarizaci akčním potenciálem uvolňován do synaptické štěrbině, kde se váže na AChR a vyvolává příslušnou odpověď. Uvolňovaný ACh však musí být ze synaptické štěrbině odstraněn. V tomto případě není ACh zpětně vychytáván do neuronů nebo do glií, ale je nejprve hydrolyzován acetylcholinesterázou (AChE), což je velice rychlý a účinný enzym, který rozkládá ACh na acetát a cholin (Obr. 7).



Obr. 7: Znázornění cholinergní synapse.

- 1) Acetylcholintransferáza syntetizuje ACh z cholinu a Acetyl-CoA
- 2) ACh je přenesen transportérem do synaptického váčku
- 3) po depolarizaci presynaptického neuronu dojde ke vtoku Ca^{2+} , což dá signál k uvolnění obsahu váčku do synaptické štěrbině
- 4) v synaptické štěrbině se ACh váže na AChR
- 5) uvolněný ACh je velice rychle štěpen AChE, která rozkládá ACh na cholin a acetát
- 6) cholin je transportován zpět do presynaptického neuronu a je znovu použit k syntéze ACh.

AChE je bohatě distribuovaná po celé centrální nervové soustavě (CNS) a dokonce i na místech, která neodpovídají běžnému výskytu uvolňování ACh. To by mohlo nasvědčovat důležitosti difusní transmise, při které dochází k působení ACh daleko od místa svého uvolnění (Kawaja a kol. 1990). Částečně aktivovat a desensitivizovat některé typy nAChR může i cholin, který vzniká štěpením ACh, a může tedy také hrát roli v difusní transmisi (Papke a kol. 1996; Alkondon a Albuquerque 2006).

1.3.1. Cholinergní transmise

Rychlý nikotinický synaptický přenos se vyskytuje zejména na nervosvalové ploténce a v autonomních gangliích. V savčím mozku bylo doposud popsáno jen velmi málo případů rychlého synaptického přenosu (Alkondon a kol. 1998; Frazier a kol. 1998). Tento nedostatek důkazů ovšem nemusí nutně znamenat, že se v něm přirozeně nevyskytuje. Může to být dáno například řídkou distribucí cholinergních neuronů v mozku, které inervují větší oblasti, což se experimentálně obtížně studuje.

Doposud byl v CNS nejlépe popsán účinek nAChR při modulaci synaptického přenosu jiných neurotransmiterů. Aktivace presynaptických nAChR může vést ke zvýšenému uvolňování řady neurotransmiterů, mezi které patří například dopamin, serotonin, GABA, glutamát nebo noradrenalin. Například aktivací presynapticky lokalizovaného receptoru $\alpha 7$, který má zvýšenou propustnost pro vápník, dochází ke vtoku vápníku do presynaptického neuronu. To následně přispívá k uvolňování neurotransmiterů ze synaptických váčků a tím k posílení neurotransmise. Ostatní nAChR sice nepropouští vápník v takové míře, aby přímo spustily Ca^{2+} -dependetní výlev váčků, ale jejich aktivace vede k depolarizaci, která aktivuje napěťově závislé vápníkové kanály v presynaptickém zakončení, což vede ke vtoku vápníku do buňky a tedy k posílení výlevu neurotransmiterů (Dani a Bertrand 2007).

Tímto mechanismem může být posilována indukce LTP. Neboť je-li dobře načasovaná aktivace presynaptických nAChR těsně před aktivaci glutamátových receptorů, zvýší se množství uvolněného glutamátu, což zvyšuje indukcí LTP. Tohoto děje se mohou účastnit i postsynapticky lokalizované nAChR, které depolarizují postsynaptický neuron a tím způsobí uvolnění Mg^{2+} , který blokuje NMDA receptor. Zásadní je zde ovšem načasování jednotlivých dějů. Pokud nebude aktivace receptorů dobře synchronizována, místo indukce LTP může docházet k indukcí dlouhodobé deprese (LTD) (Ji a kol. 2001; Ge a Dani 2005). Je již poměrně mnoho důkazů nasvědčujících, že látky interagující s nikotinovými receptory mají vliv na učení a paměť. Například nikotin a další agonisté nAChR mohou zlepšovat kognitivní funkce (Wilson a kol. 1995), zatímco jejich antagonisté je mohou zhoršovat (Newhouse a kol. 1994).

Cholinergní transmise ovšem nemusí končit vždy pouze na synapsi. Naopak se předpokládá, že většina kortikální a hipokampální cholinergní transmise se děje nonsynapticky a má tak modulační účinek na další neurotransmitery, jako například na monoaminy (Umbriaco a kol. 1994; Descarries a kol. 1997). Jak je však ACh schopný působit daleko od místa svého uvolnění není úplně jasné. Uvolněný ACh má běžně velice krátkou životnost, neboť AChE je efektivní enzym, který velmi rychle uvolněný ACh rozkládá. Není tedy příliš pravděpodobné, že by byl ACh ve větší míře schopný difundovat příliš daleko. Tuto nejasnost by mohla vysvětlovat přítomnost extracelulární cholin-acetyltransferázy (ChAT) v mozkomíšním moku a plasmě (Vijayaraghavan a kol. 2013). Podle této studie se v lidském mozkomíšním moku a plasmě vyskytuje vysoká koncentrace funkční ChAT, která je uvolňována ne-neuronálními buňkami (v CNS jsou těmito buňkami astrocyty a v plasmě především lymfocyty). Je ovšem nutné si uvědomit, že i kdyby se ChAT extracelulárně vyskytovala, pro syntézu ACh jsou ještě zapotřebí jeho prekurzory. Cholin se do extracelulárního prostředí dostává působením AChE, která štěpí ACh. Otázkou ale zůstává, kde by se získával acetyl-CoA, který je společně s cholinem potřebný pro tvorbu ACh. Vijayaraghavan et al. (2013) předpokládají, že by se Acetyl-CoA mohl uvolňovat z astrocytů společně s ChAT. Přítomnost ChAT v extracelulárním prostředí by sice dobře vysvětlovala, jak je ACh schopný působit daleko od místa svého uvolnění, zůstává zde však ještě řada nejasností, které bude potřeba v budoucnu objasnit.

1.3.2. Alzheimerova choroba a cholinergní hypotéza

Alzheimerova choroba (AD) je nejběžnější formou demence a postihuje téměř 6% lidí starších 65 let a pravděpodobnost jejího výskytu se zvyšuje s věkem (Burns a Iliffe 2009). Přes všechny snahy pochopit patologii tohoto onemocnění je AD stále neléčitelná. Vzniklo mnoho hypotéz (cholinergní, amyloidní, tau, excitotoxická, oxidativní, vaskulární, atd.), které se snažily pochopit a popsat příčinu tohoto onemocnění a nalézt tak vhodnou léčbu. Pomocí žádné z nich se ale doposud nepodařilo nalézt lék pro toto onemocnění. Hledání léčby AD navíc ztěžuje, že se poměrně obtížně studuje její časná fáze. A právě ta je nejdůležitější k pochopení vzniku a rozvoje tohoto onemocnění a odlišení příčin od důsledků.

Klinicky je AD charakterizována jako postupné zhoršování paměti a progresivní deficity v kognitivních funkcích související s degradací cholinergního systému a pozměněním funkce glutamatergního a serotoninergního systému (Toledano-Gasca 1988). Je známo, že dochází k morfologickým změnám zahrnujícím akumulaci extracelulárních plaků obsahující β -amyloidní protein ($A\beta$), vznik

intracelulárních shluků z hyperfosforylovaného tau proteinu a ztrátu neuronů, zejména těch exprimujících nAChR (Whitehouse a kol. 1982; Kendziorra a kol. 2011).

Dříve převažovala teorie, že hlavní příčinou AD je samotná tvorba amyloidních plaků. Tato teorie byla založena na zjištění, že A β vlákna indukují neuronální smrt (Pike a kol. 1991; Geula a kol. 1998). Časem se však ukázalo, že v časně fázi AD ještě nedochází k neuronální smrti, ale pouze k synaptickým dysfunkcím. Zhoršování paměti tedy nemůže být vysvětleno pouze přítomností amyloidních plaků. Je tedy možné, že než vzniknou amyloidní plaky z A β , vznikají nejprve A β oligomery. Tyto oligomery se formují již v časně fázi AD a jejich přítomnost nevede k neuronální smrti, ale pouze k narušení synaptické plasticity. To může mimo jiné vést k pozměnění neurotransmise a ke snížení výlevu neurotransmiterů v hipokampu (Watanabe a kol. 2009).

Známým rizikovým faktorem AD je alela ϵ A apolipoproteinu (ApoE) (Saunders a kol. 1993). Tento protein je schopný interagovat s A β , AChE a butyrylcholinesterázou (BuChE), která také rozkládá ACh a vyskytuje se v krvi. Interakcí těchto struktur dochází k formování BuChE/AChE-A β -ApoE (BA β AC) komplexu, který zásadně ovlivňuje fungování AChE a BuChE (Darreh-Shori a kol. 2011). A β zde funguje jako alosterický hyperaktivátor těchto dvou enzymů a jeho přítomnost vede ke zrychlení štěpení ACh. Přítomnost A β tedy může být jakýmsi spouštěčem pro zrychlení hydrolýzy ACh. A jelikož A β jsou ve větší míře přítomny v mozku pacientů s AD, mohlo by tato teorie vysvětlovat deficity v cholinergní signalizaci (Vijayaraghavan a kol. 2013).

Jak již bylo zmíněno, při AD dochází ke zhoršování kognitivních funkcí, což vede ke zhoršování paměti, narušení schopnosti učení, k jazykovým problémům a emoční nestabilitě. K tomu dochází v důsledku poškozené neurotransmise v CNS a pravděpodobně je v tomto procesu zahrnuto několik neurotransmiterových systémů. Zdá se, že cholinergní deficity v CNS tomu významně přispívají. Cholinergní hypotéza AD vychází z toho, že s poklesem cholinergní signalizace dochází ke zhoršování kognitivních funkcí. Tudíž podpoření cholinergní transmise by mělo být klinicky výhodné a mělo by pomoci snížit nebo dokonce odstranit kognitivní deficity (Perry a kol. 1978). Tuto hypotézu podporují mnohé studie. Post mortem byly například pozorovány změny ve vysokoafinitním vylučování cholinu, narušený výlev ACh a deficity v expresi nAChR a mAChR (Auld a kol. 2002). Původně se předpokládalo, že cholinergní deficity při AD byly způsobovány především dysfunkcí muskarinových receptorů (Davis a Yamamura 1978). Později se však ukázalo, že dochází spíše ke ztrátě nikotinových receptorů (Nordberg a Winblad 1986; Nordberg a kol. 1995; Perry a kol. 1995). Navíc bylo zjištěno, že u kuřáků je nižší výskyt AD než u nekuřáků

(Nitta a kol. 1994). To by mohlo být vysvětleno zvýšením exprese nAChR v mozku kuřáků (Perry a kol. 1999). Otázkou však zůstává, zda by pouze narušení cholinergní transmise vedlo k tak rozsáhlému narušení dalších neurotransmiterových systémů. Bylo však pozorováno, že snížení exprese presynaptických nAChR na glutamatergní synapsi vede ke snížení výlevu glutamátu, což má za následek narušení schopnosti učení a paměti. Ztráta presynaptických nAChR na serotonergní synapsi by zase mohla vysvětlovat změny nálad, které jsou s AD asociovány (Albuquerque a kol. 1997; Alkondon a kol. 2000).

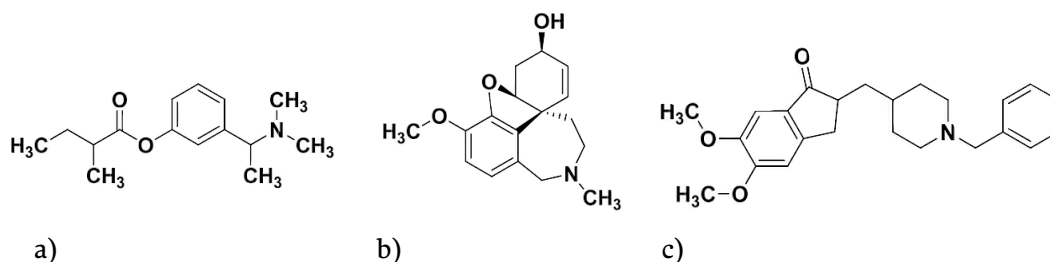
Změny v centrálním cholinergním systému tedy nevedou pouze ke zhoršení kognitivních funkcí, ale mohou vést k dalším behaviorálním symptomům, které se u AD pacientů vyskytují. Patří mezi ně například deprese, agresivní chování, psychózy a změny nálad. Tyto příznaky zhoršují průběh a léčbu tohoto onemocnění a jsou dalším důvodem, který ztěžuje domácí péči (Minger a kol. 2000; Eustace a kol. 2002). A právě léčba založená na cholinergní hypotéze pomáhá alespoň z části zlepšovat mnohé tyto behaviorální příznaky, což je dalším důvodem podporujícím použití této terapie (Terry a Buccafusco 2003).

1.3.3. Inhibitory acetylcholinesterázy (AChEI)

Jednou z možností, jak zvýšit cholinergní transmissi je zpomalit odstraňování ACh ze synaptické štěrbině. ACh je běžně rozkládán dvěma enzymy - acetylcholinesterázou (AChE), která se nachází v synaptické štěrbině, a butyrylcholin-esterázou (BuChE), jež se vyskytuje v krvi a jejíž funkce není doposud plně objasněna. Přestože bývá BuChE často opomíjena, může být její role při rozvoji AD důležitá, neboť v nejvíce postižených částech mozku, jako je hipokampus či temporální kortex, narůstá její aktivita o 40-90% (Geula a Darvesh 2004).

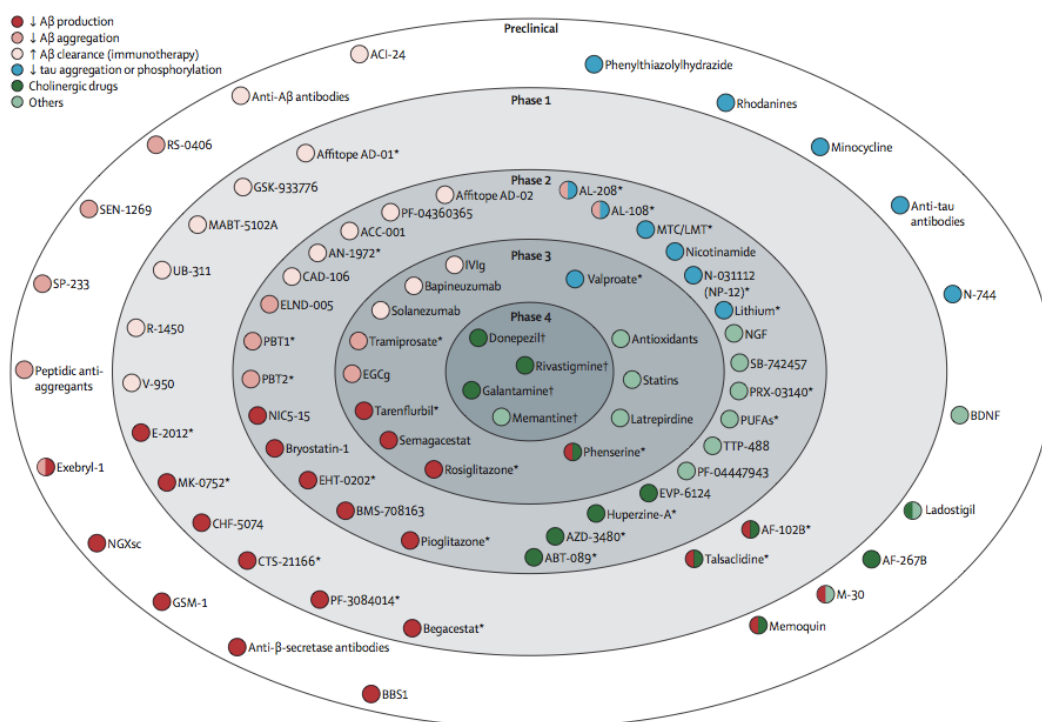
V současně používané terapii AD se kontrolovaně inhibuje část enzymu AChE, což mírně prodlouží čas, kdy je ACh přítomný v synaptické štěrbině a může tak déle aktivovat zbývající nAChR a tím je kompenzován jejich úbytek (Perry a kol. 1978; Gura 2008). V současné době jsou k terapii AD schválené čtyři látky, z čehož tři jsou inhibitory AChE - rivastigmin, donepezil a galantamin (Obr. 8). Používán je také memantin - antagonist NMDA receptorů. Všechny tyto látky pomáhají stabilizovat postupné zhoršování kognitivních funkcí. Jedná se ovšem pouze o symptomatickou léčbu, která pouze zmírňuje příznaky tohoto onemocnění (Davis a kol. 1999; DeKosky a kol. 2002). Její efektivnost je sice občas zpochybňována, ale pozitivní účinek inhibitorů cholinesteráz při léčbě AD byl již potvrzen v mnoha klinických testech (Trinh a kol. 2003; Birks 2006). Je důležité podotknout, že přestože jiné hypotézy

vzniku AD se mohou zdáti přesvědčivější, doposud se na jejich základě nepodařilo do klinické praxe zavést jinou a lepší léčbu, než kterou poskytují inhibitory AChE (Obr. 9). Z toho důvodu je zaměření na cholinergní hypotézu více než opodstatněné a inhibitory AChE zatím poskytují téměř jediné, byť ne úplně optimální, řešení při zmírňování příznaků AD. V jedné meta-studii dokonce došli k závěru, že AChEI zpomalují progresi AD až o 2 měsíce každý rok (Green a kol. 1993).



Obr. 8: Současně používané AChEI při symptomatické léčbě AD.

a) Rivastigmin (EXELON®) b) Galantamin (REMINYL®) c) Donepezil (ARICEPT®).



Obr. 9: Léčiva vyvinutá pro léčbu Alzheimerovy choroby. Schématické znázornění postupu léčiv jednotlivými fázemi testování. † látky schválené pro léčbu AD * látky u kterých bylo ukončeno testování pro AD (Mangialasche a kol. 2010).

1.3.3.1. AChEI a jejich účinek na nAChR

Účinek inhibitorů AChE je mnohem komplexnější a není omezen pouze na inhibici AChE. Ukázalo se, že některé z těchto látek interagují také s nAChR. Je tedy možné, že jejich terapeutický efekt nemusí být dán pouze jejich schopností bránit rozkladu ACh, ale v určité míře se na něm může podílet i jejich interakce s nAChR. To by mohlo vysvětlovat, proč klinický účinek těchto látek někdy nekoreluje s jejich anticholinesterázovou aktivitou. Například galantamin podporuje cholinergní transmissi i po ukončení podávání, což by mohlo naznačovat, že jeho účinek nemusí být omezen pouze na inhibici AChE, ale mohl by zahrnovat i systematické změny. Jedním z mechanismů jeho účinku by mohla být právě interakce s nAChR. Na tyto receptory galantamin pravděpodobně působí jako pozitivní alosterický modulátor (Schrattenholz a kol. 1996; Maelicke a kol. 2001; Barik a kol. 2005).

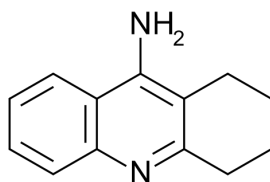
Schopnost zvyšovat aktivitu nAChR mají i další inhibitory AChE. Tyto látky většinou nemají schopnost samy aktivovat nAChR, ale při nízké koncentraci agonisty mají často schopnost potencovat proudové odpovědi na jeho aplikaci. Tímto způsobem potencují nAChR například takrin či fysostigmin (Zwart a kol. 2000; Svobodova a kol. 2006). Při vysokých koncentracích AChEI však začíná převažovat jejich inhibiční účinek na nAChR. Mechanismus účinku AChEI na nAChR zatím není plně objasněn.

Pokud by se jednalo o alosterické modulátory, mělo by to pro regulaci funkce nAChR mnohé výhody. U agonistů je například problematické dávkování, neboť při jejich vyšších koncentracích může docházet vlivem jejich účinku ke zvýšené desenzitizaci receptorů (Maelicke a Albuquerque 1996). Z toho důvodu jsou občas výhodnější látky s nižší afinitou k AChR (Potter a kol. 1999). Podobně je tomu u inhibitorů. Následkem předávkování AChEI může docházet k nežádoucí přílišné stimulaci nAChR. Příkladem je otrava insekticidy nebo bojovými plyny, které působí jako ireverzibilní inhibitory AChE. AChEI používané v terapii AD tedy musí být reverzibilní a s nižší potencí. Nižší afinita těchto látek tedy nemusí být na škodu a může být naopak z klinického použití výhodou, jelikož se tím snižují možné nežádoucí účinky plynoucí z předávkování. Výhodou alosterické modulace je zejména zachování přirozeného časování a lokalizace sekrece ACh. Jejím účinkem dochází pouze k posílení cholinergní transmise a nedochází tak k nežádoucí stimulaci na jiných místech. Omezen je i vliv na desenzitizaci receptoru.

I. Takrin

Takrin (1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amin) byl pod komerčním názvem Cognex® první schválenou látkou k léčbě AD (Obr. 10)(Crismon 1994). Jedná se o jeden z nejúčinnějších inhibitorů AChE s velkým klinickým efektem a komplexním farmakologickým profilem. Kromě inhibice cholinesterázy takrin interaguje také s K⁺kanály (Drukarch a kol. 1987; Osterrieder 1987), Na⁺ kanály (Rogawski 1987), Ca²⁺ kanály (Osterrieder 1987) a muskarinovými receptory (Flynn a Mash 1989). Brzy po schválení byl ovšem stažen z trhu, pro výskyt nežádoucích vedlejších účinků. Zejména z důvodu jeho silné hepatotoxicity, potencionální karcinogeneze a způsobování nevolnosti, průjmu a močové inkontinence. Všechny tyto vedlejší účinky vedly k tomu, že tuto léčbu byli schopni tolerovat jen někteří pacienti. Mezi další nevýhody takrinu patřila také jeho špatná biodostupnost při perorálním užívání a nutnost podávání čtyřikrát denně (Farlow a kol. 1992; Knapp a kol. 1994; Watkins a kol. 1994; Zeiger a kol. 1997). Přestože se takrin v léčbě AD již nepoužívá, využívá se pro návrh látek s podobným farmakologickým účinkem. Cílem je nalézt takovou látku, která by podporovala cholinergní systém, ale byla bez zmíněných nežádoucích vedlejších účinků (Romero a kol. 2013).

Takrin podobně jako jiné AChEI přímo interaguje také s nAChR. Mechanismus jeho účinku však zatím není úplně jasný. Ve vysokých koncentracích byl pozorován jeho inhibiční účinek na nAChR, zatímco při jeho nízkých koncentracích byla na některých receptorových podtypech pozorována jeho schopnost potencovat ACh odpovědi (Svensson a Nordberg 1996; Canti a kol. 1998; Zwart a kol. 2000; Maelicke a kol. 2001; Prince a kol. 2002; Krusek a kol. 2013; Soukup a kol. 2013).



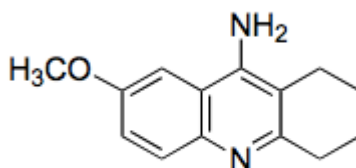
Obr. 10: Struktura takrinu (1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amin)

II. 7-MEOTA

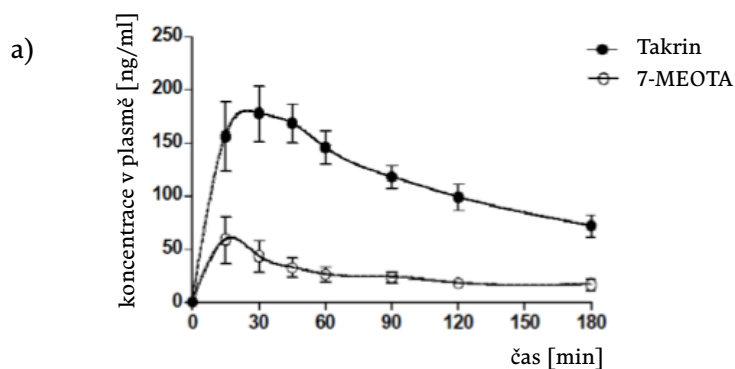
7-MEOTA (7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amin) je derivátem takrinu, který byl prvně syntetizován v České republice jako potencionální nový lék pro léčbu AD (Obr. 11) (Patočka 1986; Patočka a kol. 1994). 7-MEOTA sice nebyla doposud prostudována tak detailně jako tomu bylo u takrinu, ale ve studiích, které se jí věnovaly, byly pozorovány mnohé její výhody. Přestože se o nich vědělo již dříve, byla tato látka jen v pár preklinických testech a pouze v jedné klinické studii. Její další testování poté bylo z finančních důvodů přerušeno. Jelikož se však nyní začalo při hledání léčby AD opět navracet k AChEI, vrátila se pozornost také zpět na látku 7-MEOTA (Romero a kol. 2013; Soukup a kol. 2013). Podobně jako u takrinu, byla i u 7-MEOTA pozorována přímá interakce s nAChR, pravděpodobně s podobným mechanismem účinku (Krusek a kol. 2013; Soukup a kol. 2013).

Hlavní výhodou 7-MEOTA oproti takrinu je zejména její mnohem nižší toxicita *in vivo*. Je to dáno pravděpodobně jejím odlišným metabolickým zpracováním. Přestože jsou obě tyto látky odstraňovány podobnou metabolickou dráhou, některé produkty metabolismu takrinu mohou být farmakologicky aktivní a působit toxicky. 7-MEOTA oproti tomu v experimentech *in vivo* nevykazovala žádné známky hepatotoxicity a to ani při chronickém podávání (Patočka a Bielavsky 1991; Patočka a kol. 2008; Soukup a kol. 2013).

Nevýhodou 7-MEOTA je však její horší biodostupnost. 7-MEOTA má oproti takrinu velmi pozměněný farmakokinetický profil a její biodostupnost je oproti takrinu téměř 4x nižší (Obr. 12) (Soukup a kol. 2013). To je jedna z mála doposud zjištěných vlastností 7-MEOTA, která ukazuje v její neprospěch pro použití v terapii AD. Vzhledem k její snížené biodostupnosti by bylo nutné podávat vyšší dávky s ještě větší frekvencí než s jakou se dříve podával takrin. A již užívání takrinu (Cognexu®) bylo problematické právě kvůli nutnosti aplikace 4-krát za den. Pokud by se 7-MEOTA musela užívat ještě častěji, mohla by právě její zhoršená biodostupnost velmi zkomplikovat její užívání.



Obr. 11: Struktura 7-MEOTA (7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amin)



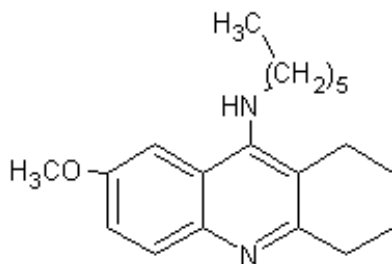
b)

Látka	C_{max} (ng.ml ⁻¹)	T_{max} (min)	AUC_{0-180} (min.ng.ml ⁻¹)
Takrin	184 ± 27	35,0 ± 5,0	20837 ± 2100
7-MEOTA	53 ± 20	22,5 ± 7,5	3989 ± 1200

Obr. 12: Farmakokinetický profil po perorální administraci takrinu a 7-MEOTA potkanům. Měřila se koncentrace v krevní plasmě po perorálním podání ekvimolárních dávek takrinu a 7-MEOTA. Hodnoty byly stanoveny nekomplementární analýzou plasmatické koncentrace těchto látek. Hodnoty jsou zobrazeny jako průměr ± SEM. a) Grafické zobrazení absorpce takrinu a 7-MEOTA. b) Tabulka s farmakokinetickými parametry takrinu a 7-MEOTA. C_{max} je maximální koncentrace vstřebené látky; T_{max} je čas dosažení maximální koncentrace; AUC je množství vstřebené látky v čase (Soukup a kol. 2013).

III. K-577

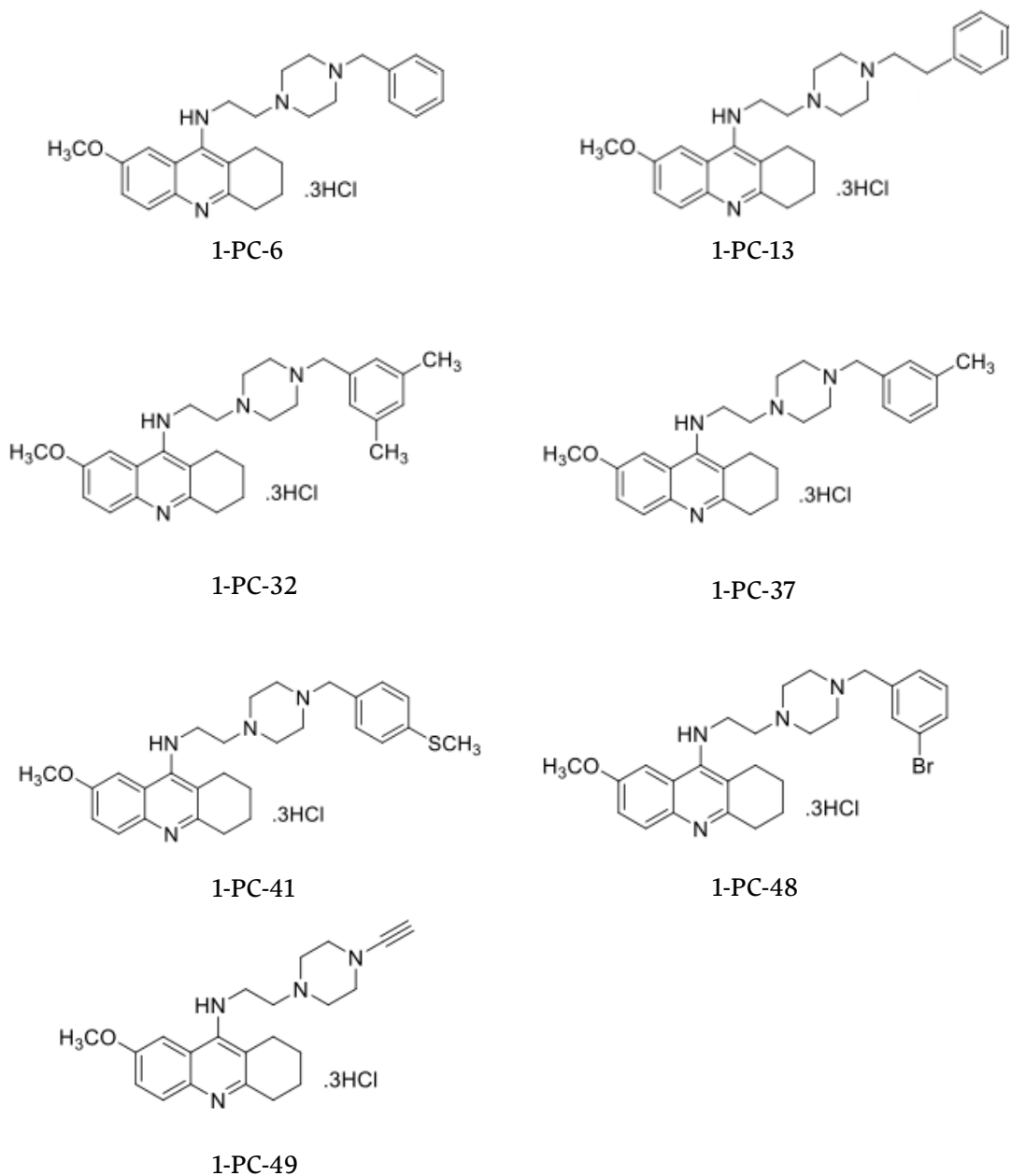
K-577 (N-hexyl-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amin) je novým derivátem takrinu, který má schopnost inhibovat AChE a interagovat s nAChR. O účincích této látky se toho doposud příliš mnoho neví, ale zdá se, že na nAChR má podobný účinek jako takrin a 7-MEOTA (Obr. 13) (Krusek a kol. 2013).



Obr. 13: Struktura K-577 (N-hexyl-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amin)

IV. Látky PC

Látky PC nejsou odvozeny přímo od takrinu, ale od jeho derivátu 7-MEOTA, který v mnoha ohledech vykazoval lepší terapeutické vlastnosti než samotný takrin. Tyto látky byly syntetizovány Centrem biomedicínského výzkumu Univerzitní nemocnice v Hradci Králové jako nové inhibitory cholinesterázy (Obr. 14).



Obr. 14: Struktura jednotlivých látek PC odvozených od 7-MEOTA.

2. Cíle diplomové práce

1. Podrobně prostudovat účinek takrinu, 7-MEOTA a K-577 na svalovém nikotinovém receptoru.
2. Zjistit, zda nové deriváty 7-MEOTA (PC) interagují s nAChR a pokud ano, jaký je mechanismus jejich účinku.

3. Materiál a metody

3.1. Elektrofyziologická měření

3.1.1. Metoda terčíkového zámku

Metoda terčíkové zámku (patch clamp) je elektrofyziologická technika umožňující studium iontových kanálů na membránách buněk. Používá se zejména ke studiu excitabilních buněk jako jsou neurony, svalová vlákna a kardiomyocyty, ale umožňuje práci i na jiných buňkách a membránách. Metoda terčíkového zámku byla vyvinuta Erwinem Neherem a Bertem Sakmanem v letech 1976-1981 a v roce 1991 za objevy spojené s touto metodou získali Nobelovu cenu (Neher a Sakmann 1976; Hamill a kol. 1981). Pomocí této metody jsme nyní schopni zaznamenávat proudy z jednotlivých iontových kanálů nebo sumární proudy z celých buněk.

Principem je přisátí skleněné elektrody o průměru 2-3 μm k buněčné membráně. Toto spojení vytváří mezi vnitřkem mikroelektrody a vnějším roztokem elektrický odpor řádově $\text{G}\Omega$. Při měření membránového proudu je možno udržovat konstantní napětí (voltage clamp) nebo při měření membránového potenciálu nulový nebo konstantní proud (current clamp). V našem případě jsme používali konfiguraci měření proudu z celé buňky a při nastavení konstantního napětí na membráně a měřili jsme sumární změny proudu protékajícího kanály při aplikaci roztoků různých chemických látek na povrch buňky.

3.1.2. Potup měření

Před měřením jsme buňky narostlé na krycím sklíčku vložili do průhledné polystyrenové mističky s extracelulárním roztokem (ECS). Mističku jsme poté vložili do invertovaného optického mikroskopu (Olympus CKX 41). Buňky byly po celou dobu měření omývány čistým ECS, který byl aplikován pomocí aplikačního systému (Dittert a kol. 2006), současně byl roztok stále odsáván. Proudící roztok ECS zajišťoval, aby se k povrchu buňky dostávaly studované látky jen ve stanovených časech. K pokusu byly vybírány pouze buňky přiměřené velikosti a tvaru, které byly přichyceny ke sklíčku a nebyly obklopeny dalšími buňkami. K takové buňce jsme se přiblížili skleněnou

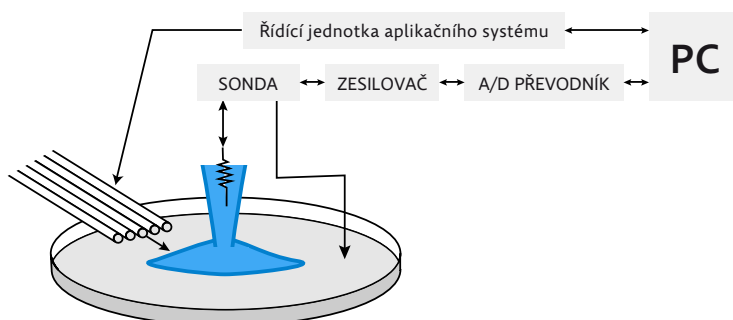
elektrodou, kterou jsme pohybovali pomocí mikromanipulátoru (MP225 Sutter Instruments). Tato elektroda z borosilikátového skla měla odpor mezi 3 až 5 M Ω a byla vytažena na horizontálním tahači a otavena, aby její hrot měl průměr okolo 2-3 μm . Naplněna byla intracelulárním roztokem (ICS). Uvnitř skleněné elektrody byla umístěna argentchloridová elektroda, která byla tvořena stříbrným drátkem pokrytým AgCl a která vodivě spojovala vnitřek mikroelektrody se vstupem hybridního vstupního zesilovače. Argenchloridová byla i referenční elektroda, která byla umístěna v ECS v misce.

Buňky byly snímány v konfiguraci snímání z celé buňky (whole cell), kdy se elektroda napojí na vnitřek buňky, což umožňuje snímání proudů z celé buňky. K měření jsme používali pouze buňky jejichž parametry nepřesahovaly hodnoty 100 pF pro kapacitu membrány a 10 M Ω pro sériový odpor. Tento odpor jsme kompenzovali z 85%. Při pokusu jsme udržovali buňky na napětí -40 mV. Výjimkou byla pouze měření napěťové závislosti, kdy jsme měřili proudy při napětích v rozmezí -80 mV až +20 mV. Měření byla prováděna při pokojové teplotě.

3.1.3. Aparatura pro elektrofyzilogická měření

Při měření jsme používali aparaturu, která se skládala ze zesilovače Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), jenž byl napojen na AD/DA převodník DIGIDATA 1320A (Axon Instruments). Tento převodník umožňoval propojení s osobním počítačem vybaveným programem pClamp 10.0 (Axon Instruments), který umožňoval řízení experimentu, kontrolu membránového potenciálu, digitalizování naměřeného proudu a ukládání záznamu. Aplikace roztoků byla řízena programovatelnou ovládací jednotkou aplikačního systému. Pomocí programu WAS02 jsme byli schopni vytvořit časový protokol aplikací roztoků. Tato aplikace roztoků byla synchronizována se snímáním dat. Testované roztoky a ECS byly umístěny v zásobnících, ze kterých vedly teflonové trubičky. Průtok jimi byl ovládán pomocí solenoidových ventilů. Všechny trubičky nakonec ústily do svazku dvanácti skleněných trubiček, které bylo možno polohovat a společně s ventily softwarově řídit (Obr. 15)(Dittert a kol. 1998).

Mezi další vybavení patřil antivibrační stůl (MICRO-g 63-530, Technical Manufacturing Company, Peabody, USA), Faradayova klec, inverzní mikroskop Olympus CKX 41 a mikromanipulátor (MP225, Sutter Instrument Co., Novato, CA USA).



Obr. 15: Schématické znázornění elektrické soustavy pro měření metodou terčíkového zámku. Signály z buňky jsou získávány napojením skleněné mikroelektrody na cytoplasmu buňky. Mikroelektroda je vodivě spojena s buňkou a vstupním zesilovačem. Elektrický signál je poté zesilován a filtrován pomocí zesilovače a digitalizován A/D převodníkem. Signál převedený do digitální podoby je následně zpracováván softwarem v osobním počítači. Pomocí počítačového softwaru je řízena také jednotka aplikačního systému, která aplikuje roztoky na snímanou buňku.

3.2. Zpracování naměřených dat

Měřená data byla ukládána na disk v podobě časového záznamu membránového proudu. Byl tak zaznamenán klidový membránový proud a proud protékající přes membránu během aplikace roztoků. Vyhodnocovali jsme zejména maximální velikost amplitudy proudu. Tuto hodnotu jsme získali odečtením hodnoty klidového proudu od maximální hodnoty amplitudy. Klidový proud nemusí být vždy roven nule, neboť může být ovlivněn řadou parametrů. Vliv na něj může mít kvalita spojení membrány s elektrodou, přítomnost dalších kanálů v membráně či složení ECS a ICS. Mezi další parametry, které lze vyhodnocovat, patří například tvar a průběh desensitizace receptorů či čas od počátku aplikace agonisty, kdy dojde k maximální odpovědi.

K analýze proudových odpovědí jsme používali program Clampfit 10.0, který je součástí balíku programů pro snímání a vyhodnocování elektrofyziologických dat pClamp (Molecular Devices, USA). K dalšímu vyhodnocování a zpracování výsledků jsme používali program Microsoft Excel (Microsoft, USA), Numbers (Apple Software, USA), SigmaPlot (Systat Software, USA) a volně dostupný program chemicalize.org (ChemAxon, Maďarsko). Výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr \pm standardní chyba (SEM).

3.3. Buněčné kultury

Buňky byly inkubovány v termostatu Sanyo MCO-18AIC (SANYO E&E Europe BV, Velká Británie) za standardních podmínek 37°C, 5% koncentrace CO₂ a absolutní vlhkosti. Pěstovány byly v kultivačním médiu DMEM s přidavkem 10% fetálního telecího séra na polystyrénových Petriho miskách o průměru 3,5 cm.

3.3.1. Buněčná linie COS

Pro měření s neuronálními receptory jsme používali buněčnou linii COS-1 nebo COS-7, které přirozeně neexprimují AChR nikotinového ani muskarinového typu. Tyto buněčné linie jsou odvozeny z ledvinových opičích buněk CV1, jež vznikly transformací s mutovaným opičím polyomavirem SV40 kódujícím T-antigen (Gluzman 1981). COS buněky byly transfekovány expresními plasmidy pCDNA3.1. s vloženou cDNA kódující příslušné podjednotky neuronálního nikotinového receptoru. Účinná exprese genů vložených do plasmidu pCDNA3.1 je řízena CMV promotorem.

COS buňky byly pravidelně každý třetí až čtvrtý den pasážovány. Postup pasážování byl následující: v misce bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty roztokem PBS; pro disociaci buněk bylo přidáno malé množství roztoku trypsin/EDTA, ve kterém se buňky inkubovaly 5 minut při 37°C; nakonec se k buňkám přidalo nové médium, rozsuspendovaly se a nasadily na nové misky. K experimentům jsme používali buňky až do 18. pasáže. Jeden až dva dny před transfekcí jsme buňky nasadili na 24-jamkové kultivační plato.

3.3.1.1. Transfekce COS buněk

Pro transfekci byly používány buňky 1 až 2 dny po pasážování narostlé na 24-jamkovém platu. Plasmidy s vybranými podjednotkami nikotinového receptoru byly do COS buněk vnášeny pomocí transfekčního činidla Lipofectamin™ 2000. Pro vyhodnocení úspěšnosti transfekce jsme používali fluorescenční protein GFP, jehož plasmid jsme transfekovali společně s plasmidy pro jednotlivé podjednotky. Buňky ve kterých transfekce proběhla úspěšně, jsme rozeznali pomocí fluorescenčního mikroskopu se sadou filtrů optimalizovaných pro GFP. Pro zlepšení exprese neuronálních receptorů jsme přidávali gen kódující protein hRIC3. Přítomnost tohoto proteinu zlepšuje účinnost exprese některých typů neuronálních nikotinových

receptorů a napomáhá jejich správnému sestavení (Halevi a kol. 2003). Exprese proteinů byla nejvyšší 3. až 4. den po transfekci, kdy byly buňky vhodné k elektrofyziologickému měření.

Postup transfekce:

1. první mikrozkušavka obsahovala 50 μ l Optimemu a celkem 1100 ng transfekčních plasmidů - 350 ng podjednotky α , 350 ng podjednotky β , 200 ng GFP a 200 ng proteinu hRIC3
2. druhá mikrozkušavka obsahovala 50 μ l Optimemu a 2,3 μ l Lipofectaminu™ 2000
3. po 5 minutách inkubace za laboratorní teploty byly oba roztoky smíchány
4. po 25 minutách inkubace za laboratorní teploty byla transfekční směs přidána na kultivační jamky s buňkami
5. po 5 hodinách inkubace v termostatu byly buňky rozpasážovány do kultivačních misek s vloženým sklíčkem.

3.3.2. Buněčná linie TE671

Pro studium svalových receptorů jsme používali buněčnou linii TE671, která přirozeně exprimuje lidské nikotinové receptory svalového typu (Luther a kol. 1989; Beeson a kol. 1996). Převážně exprimují embryonální podtyp, který má podjednotkové složení $\alpha\beta\gamma\delta$. Tato linie je odvozena z lidského rhabdomyosarkomu. Pro zvýšení exprese svalových receptorů se do kultivačního media DMEM s 10% fetálním telecím sérem přidávalo 100 μ M nikotinu 2 dny před měřením.

3.4. Příprava plasmidů

cDNA kódující podjednotky nikotinového receptoru jsme získali od Dr. S. Heinemanna (Salk Institute, San Diego, USA), plasmid nesoucí hRIC3 od prof. M. Treinin a GFP z Takara (Otsu, Japonsko). Plasmidy kódující jednotlivé podjednotky receptoru jsme připravili z genů pro dané podjednotky, které jsme zaklonovali do vhodného expresního vektoru, v našem případě do pCDNA 3.1. vhodného pro COS buňky. Úspěšnost klonování jsme ověřili sekvenací plasmidů.

Pomocí metody teplotního šoku jsme transformovali bakterie *Escherichia coli* kmene JM109 připravenými plasmidy. Tyto bakterie jsme následně vyseli na agarové plotny s LB médiem a ampicilinem. Toto antibiotikum nám umožnilo selekci úspěšně

transformovaných bakterií, které nesly námi připravené plasmidy jež obsahovaly mimo jiné i gen pro ampicilinovou rezistenci. Jednu narostlou kolonii jsme naočkovali do kapalného média a nechali narůst přes noc při stálém třepání a teplotě 37°C. Z namnožených bakterií jsme poté izolovali plasmidovou DNA pomocí High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan). Čistotu a koncentraci izolované DNA jsme ověřovali na spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). DNA podjednotek jsme skladovali při -20°C.

3.5. Použité chemikálie, roztoky a média

3.5.1. Roztoky pro elektrofyziologická měření

Extracelulární roztok (ECS)

Extracelulární roztok používaný na omývání buněk během elektrofyziologického měření měl složení (mM): 160 NaCl, 2,5 KCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 glukóza, 10 HEPES; pH 7,3 (pH jsme dorovnávali pomocí NaOH). Pro přípravu ECS byla použita deionizovaná přečištěná voda. ECS jsme skladovali při -20°C a rozmrazili těsně před experimentem.

Intracelulární roztok (ICS)

Skleněné mikroelektrody používané při měření byly naplněny intracelulárním roztokem, který měl složení (mM): 110 CsF, 30 CsCl, 7 MgCl₂, 2 EGTA, 5 Na₂ATP, 10 HEPES; pH 7,4 (pH jsme dorovnali pomocí CsOH). Pro přípravu ICS byla použita deionizovaná přečištěná voda. ICS jsme skladovali při -20°C a během pokusu byl uložen v ledové tříšti, aby nedocházelo k rozkladu ATP.

Aplikované látky

Během pokusu jsme na buňky aplikovali roztoky ligandů v příslušné koncentraci v ECS. Jako agonistu nikotinového receptoru jsme používali acetylcholin (S.A.F.Hoffmann - La Roche & Co., Basilej, Švýcarsko). Dále jsme používali látky: takrin, 7-MEOTA, K-577, 1-PC-6, 1-PC-13, 1-PC-32, 1-PC-37, 1-PC-41, 1-PC-48 a 1-PC-49. Tyto látky jsme získali ve spolupráci s Centrem biomedicínského výzkumu Univerzitní nemocnice v Hradci Králové.

3.5.2 Roztoky a média pro práce s buněčnými kulturami

- Kultivační médium: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s 10% fetálním sérem (Gibco, Invitrogen, USA).
- PBS (mM): 138 NaCl, 5,4 KCl, 7,8 Na₂HPO₄·12 H₂O, 1,4 KH₂PO₄; pH 7,3
- Optimem (Gibco, Invitrogen, USA).
- Trypsin/EDTA: 0,05% trypsinu v 50 ml PBS s 10 mg EDTA; pH 7,3.

3.5.3. Roztoky použité pro kultivaci bakterií

Abychom mohli izolovat plasmidy vybraných podjednotek, bylo nejprve potřeba pomnožit bakterie transformované těmito plasmidy. Bakterie rostly na LB médiu, které mělo složení: 1 l destilované vody, 10 g peptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl. Připravené médium se poté dalo do autoklávu, kde bylo 10 minut při teplotě 105°C. Toto médium se používalo ke kultivaci buď jako kapalné nebo po přidání agaru jako pevné na agarových plotnách (do 300 ml LB média se přidalo 6 g agaru). Před použitím se k němu přidal ampicilin v koncentraci 100 µg/ml média.

3.6. Rovnice použité k výpočtu

3.6.1. Inhibiční křivky

Inhibici, u které jsme předpokládali jeden mechanismus účinku, jsme popisovali jednoduchou inhibiční rovnicí. Experimentální body jsme vynesli do grafu a proložili inhibiční křivkou podle inhibiční funkce:

$$\frac{Y_i}{Y_c} = \frac{IC_{50}^H}{IC_{50}^H + c^H} \quad (I.)$$

kde Y_i je proudová odpověď amplitudy po aplikaci agonisty a inhibitoru; Y_c je kontrolní proudová odpověď na aplikaci samotného agonisty; IC_{50} je koncentrace inhibitoru, která inhibuje 50% z kontrolní odpovědi; H je Hillův koeficient pro daný inhibitor (H se rovnalo 1 pokud není uvedeno jinak) a c je koncentrace inhibitoru.

Testované látky, které vykazovaly dvojí mechanismus účinku, jsme prokládali upravenou inhibiční funkcí, která popisovala zvláště mechanismus účinku inhibice při nízké koncentraci a při vysoké koncentraci inhibitoru:

$$\frac{Y_i}{Y_c} = a \cdot \left(\frac{IC_{50(I)}^H}{IC_{50(I)}^H + c^H} \right) + (1 - a) \cdot \left(\frac{IC_{50(II)}^H}{IC_{50(II)}^H + c^H} \right) \quad (\text{II.})$$

kde Y_i je proudová odpověď amplitudy po aplikaci agonisty a inhibitoru; Y_c je kontrolní proudová odpověď na aplikaci samotného agonisty; IC_{50} je koncentrace inhibitoru, která inhibuje 50% kontrolní odpovědi z příslušné fáze inhibičního efektu; H je Hillův koeficient pro daný inhibitor (H se rovnalo v tomto případě vždy 1); c je koncentrace inhibitoru a a je poměrné zastoupení první fáze křivky.

3.6.2. Napěťová závislost

Napěťovou závislost inhibice jsme prokládali upravenou Boltzmannovou funkcí (Woodhull 1973; Hille 1992; Aidley a Stanfield 1996):

$$IC_{50}(V_m) = IC_{50}(0) \cdot e^{-V_m \delta \frac{F}{RT}}$$

kde $IC_{50}(V_m)$ je inhibiční konstanta při daném membránovém potenciálu V_m ; $IC_{50}(0)$ je inhibiční konstanta extrapolované hodnoty pro nulový membránový potenciál; δ je relativní elektrická vzdálenost vazebného místa inhibitoru směrem z extracelulární strany; F je Faradayova konstanta ($F=9,648.104 \text{ C.mol}^{-1}$); R je univerzální plynová konstanta ($R=8,315 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$); T je absolutní teplota ($T=298 \text{ K}$).

Tuto funkci jsme poté z důvodu linearizace upravili na:

$$pIC_{50}(V_m) = pIC_{50}(0) + (2,303.V\delta \frac{F}{RT}) \quad (\text{III.})$$

kde $pIC_{50}(V_m)$ a $pIC_{50}(0)$ jsou záporně vzaté dekadické logaritmy hodnot inhibičních konstant IC_{50} při daném membránovém potenciálu.

4. Výsledky

4.1. Účinky takrinu, 7-MEOTA a K-577 na svalový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$

Takrin a jeho deriváty 7-MEOTA a K-577 působí jako inhibitory AChE. U mnohých inhibitorů AChE včetně takrinu byla pozorována přímá interakce s nAChR. Zajímalo nás, zda tuto schopnost interagovat s nAChR potvrdíme také u 7-MEOTA a K-577 a porozumíme lépe mechanismu jejich účinku. U takrinu již byla přímá interakce s nAChR pozorována vícekrát, ale navrhované mechanismy jeho účinku byly často v rozporu (Svensson a Nordberg 1996; Canti a kol. 1998; Zwart a kol. 2000; Maelicke a kol. 2001; Prince a kol. 2002). V naší laboratoři jsme již tyto látky testovali na neuronálním nikotinovém receptoru $\alpha4\beta2$ a zjistili jsme jejich přímou interakci s tímto receptorovým podtypem. Na účinku těchto látek na receptor $\alpha4\beta2$ bylo zajímavé to, že při vyšší koncentraci ACh měly inhibiční účinek a naopak při nízké koncentraci ACh měla jejich aplikace společně s agonistou schopnost potencovat ACh odpovědi (Krusek a kol. 2013). Zjišťovali jsme tedy, jaký účinek budou mít tyto látky na svalový nikotinový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$. Jako model jsme zvolili lidské embryonální svalové receptory $\alpha\beta\gamma\delta$ endogenně exprimované v linii buněk TE671.

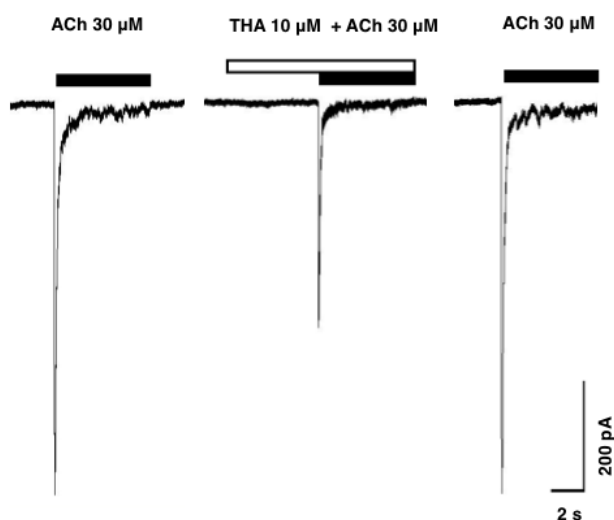
4.1.1. Takrin

Nejprve jsme zjišťovali, zda samotná aplikace takrinu na povrch buněk vyvolá nějaké proudové odpovědi. Testovali jsme různé koncentrace takrinu od 0,001 μM až po 100 μM . Při žádné této koncentraci jsme nepozorovali agonistický účinek takrinu na $\alpha\beta\gamma\delta$ receptor. Dále jsme zjišťovali jaký účinek bude mít takrin, bude-li aplikován společně s agonistou. V našem případě jsme zvolili jako srovnávacího agonistu ACh. Z předběžných experimentů jsme věděli, že účinky takrinu nenastupují okamžitě, ale v průběhu několika sekund. Proto jsme se rozhodli testovanou látku vždy nejprve samostatně preaplikovat na buněčný povrch po dobu 5 s a až poté aplikovat ACh společně s testovanou látkou dalších 5 s. Díky tomuto schématu aplikace měla testovaná látka vždy dostatek času se navázat na receptor. Mezi jednotlivými aplikacemi jsme dodržovali intervaly 30 s, což je doba, která svalovému receptoru stačí

pro navrácení do aktivovatelného stavu. Během této doby byla buňka omývána roztokem ECS. Podle stejného časového schématu jsme postupovali u všech měření prováděných na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$.

Postupně jsme na buňky aplikovali různé koncentrace takrinu v rozmezí od 0,003 μM do 100 μM . Koncentrace ACh byla 30 μM ($\text{EC}_{50} = 7 \mu\text{M}$). Výsledkem bylo, že jsme pozorovali různý stupeň inhibice ACh odpovědi v závislosti na koncentraci takrinu. Stupeň inhibice jsme zjišťovali tak, že jsme porovnávali velikost proudové odpovědi na aplikaci ACh společně s takrinem s velikostí kontrolních proudových odpovědí, které vyvolala samostatná aplikace ACh na buněčný povrch (Obr. 16). Protože proudové odpovědi buněk TE671 mají s časem určitou variabilitu, dělili jsme velikost inhibované odpovědi aritmetickým průměrem dvou sousedních kontrolních odpovědí.

Naměřené body ukazují, že účinek takrinu má průběh odpovídající dvěma mechanismům inhibice s různými hodnotami inhibičních konstant. Proto jsme experimentální body proložili funkcí dle rovnice II, která zvláště popisovala mechanismus účinku takrinu při jeho vysokých koncentracích a zvláště při jeho nízkých koncentracích (Obr. 17a). Vysokoafinitní mechanismus se uplatňoval při nízkých koncentracích takrinu a způsoboval asi 20% inhibice. Tento mechanismus byl



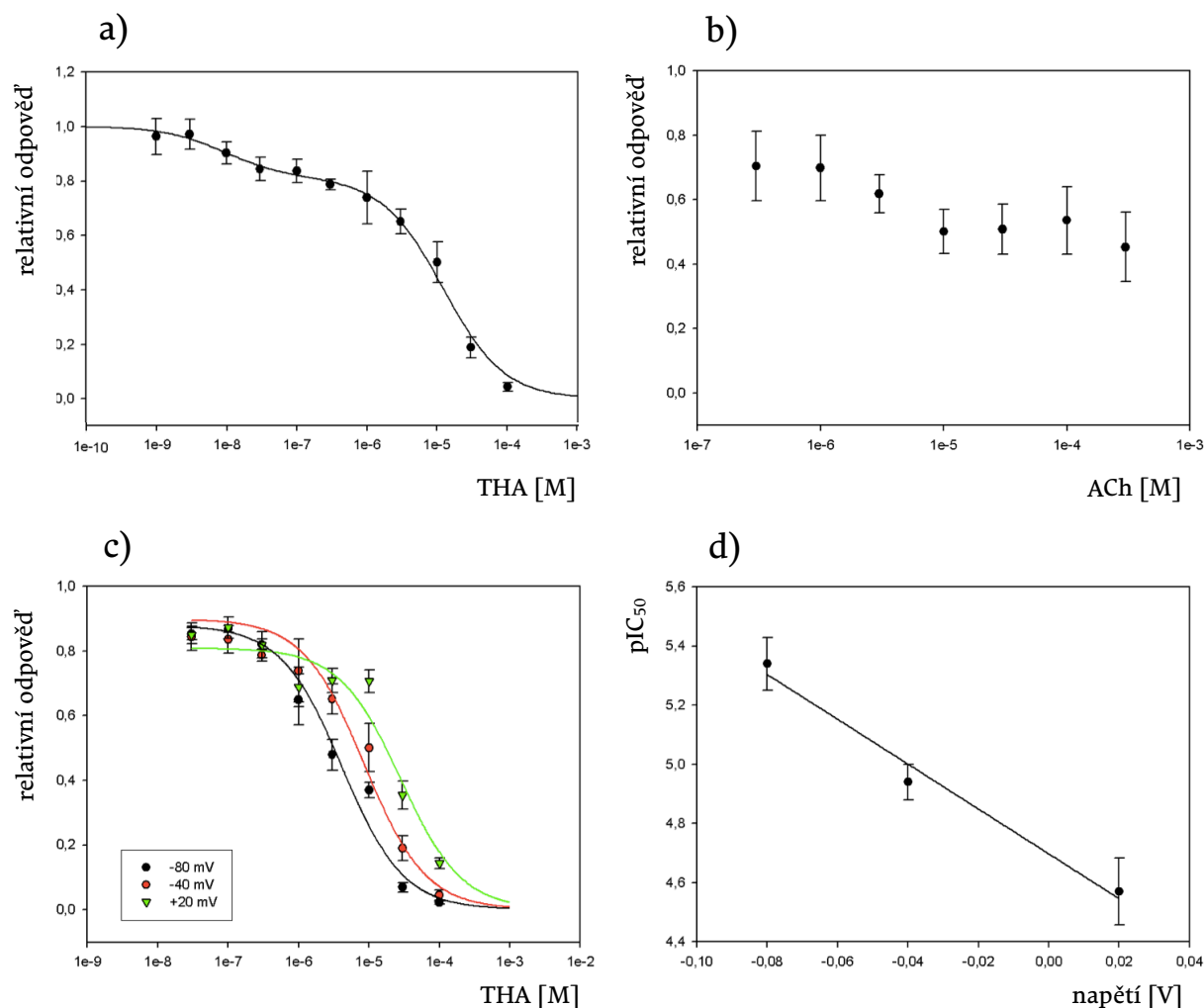
Obr. 16: Ukázka proudových odpovědí na aplikaci takrinu a ACh na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$. Ukázka dvou kontrolních proudových odpovědí na samotnou aplikaci ACh a na aplikaci ACh společně s 10 μM takrinu. Takrin byl vždy nejprve 5 s preaplikován, což zajistilo dostatek času, aby se navázal na receptor. Poté byl takrin aplikován 5 s společně s ACh. Můžeme pozorovat pokles proudové odpovědi při společné aplikaci takrinu a ACh přibližně na 50%. Po ukončení aplikace takrinu, se receptor navrácí do aktivovatelného stavu. Černě je vyznačena doba aplikace ACh a bíle doba aplikace takrinu.

charakterizován inhibiční konstantou takrinu IC_{50} rovnou $0,01 \mu M$ ($pIC_{50} = 8,0 \pm 0,25$). S rostoucí koncentrací takrinu se začal projevovat i nízkoafinitní mechanismus, který způsoboval přibližně 80% inhibice. IC_{50} takrinu bylo pro nízkoafinitní mechanismus rovno $12,6 \mu M$ ($pIC_{50} = 4,9 \pm 0,06$). Pokud jsme spočítali poloviční efektivní blokádu celé křivky, tak byla rovna $10,1 \mu M$. Tuto hodnotu jsme počítali jako vážený průměr vysokoafinitní a nízkoafinitní inhibiční konstanty. Inhibice takrinem byla na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ reverzibilní.

Abychom lépe porozuměli mechanismu inhibice, zaměřili jsme se na to, jak se bude měnit míra inhibice vyvolaná takrinem při různých koncentracích ACh. V tomto měření jsme použili koncentraci takrinu blízkou jeho hodnotě IC_{50} zjištěnou v předchozích experimentech. Pro tento typ receptoru to byla $10 \mu M$ koncentrace takrinu. Koncentraci ACh jsme použili v rozmezí od $0,3 \mu M$ do $300 \mu M$. Pozorovali jsme, že vyšší koncentrace ACh jsou inhibovány o něco více než nižší koncentrace (Obr. 17b).

V dalších experimentech jsme se zaměřili na napěťovou závislost inhibice takrinem. Měřili jsme proudové odpovědi při třech membránových potenciálech: $-80 mV$, $-40 mV$ a $+20 mV$. Koncentrace ACh byla $30 \mu M$. Napěťovou závislost jsme měřili pro nízkoafinitní mechanismus inhibice. Z toho důvodu jsme experimentální body prokládali jednoduchou inhibiční křivkou dle rovnice I, která odpovídala průběhu pro jeden, nízkoafinitní, inhibiční mechanismus. Maximum této křivky proto nesměřovalo k 1, ale bylo volné. Pozorovali jsme, že se změnou napětí docházelo k posunu hodnot IC_{50} : $IC_{50(-80 mV)} = 4,2 \mu M$; $IC_{50(-40 mV)} = 12,1 \mu M$; $IC_{50(+20 mV)} = 28,1 \mu M$ (Obr. 17c).

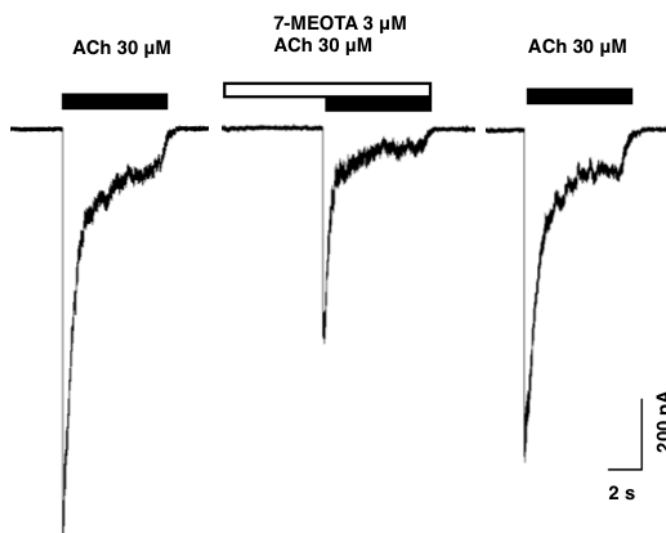
Napěťovou závislost jsme dále analyzovali podle klasického modelu pro blokátory iontového kanálu dle rovnice III. Z důvodu přesnějšího výpočtu chyb jsme tuto funkci linearizovali. Hodnoty pIC_{50} takrinu při různém napětí byly rovny: $pIC_{50(-80 mV)} = 5,34 \pm 0,09$; $pIC_{50(-40 mV)} = 4,94 \pm 0,06$; $pIC_{50(+20 mV)} = 4,57 \pm 0,11$ (Obr. 17d). Pomocí tohoto modelu jsme byli schopni spočítat, jak hluboko do iontového kanálu se takrin dostává. Z míry napěťové závislosti jsme určili, že se takrin váže přibližně do poloviny membránové části iontového kanálu ($\delta = 0,44 \pm 0,06$; δ je relativní elektrická vzdálenost vazebného místa inhibitoru směrem z extracelulární strany). Na tomto typu receptoru jsme nepozorovali žádnou schopnost takrinu potencovat ACh odpovědi.



Obr. 17: Inhibiční účinek takrinu na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$. **a)** Závislost inhibice na koncentraci takrinu při 30 μM ACh. Naměřené body jsou proloženy inhibiční funkcí dle rovnice II. Křivka, kterou jsme body prokládali popisuje zvlášť mechanismus účinku takrinu při jeho nízkých koncentracích ($20\% \pm 2,3\%$ inhibice) a při jeho vysokých koncentracích ($80\% \pm 2,3\%$ inhibice). Při nízkých koncentracích se uplatňoval vysokoafinitní mechanismus a IC_{50} takrinu se rovnalo 0,01 μM ($\text{pIC}_{50} = 8,0 \pm 0,25$). Při vysokých koncentracích se uplatňoval nízkoafinitní mechanismus a IC_{50} takrinu bylo rovno 12,6 μM ($\text{pIC}_{50} = 4,9 \pm 0,06$). Efektivní hodnota IC_{50} byla 10,1 μM . **b)** Závislost inhibice takrinu na koncentraci ACh. Pro tato měření jsme použili 10 μM takrin ($\approx \text{IC}_{50}$). S vyšší koncentrací ACh rostla míra inhibice takrinem. **c)** Napěťová závislost inhibice takrinem. Koncentrace ACh byla 30 μM . Závislost inhibice na koncentraci takrinu byla měřena při membránovém potenciálu -80 mV, -40 mV a +20 mV. Se změnou napětí docházelo ke změně hodnot IC_{50} : $\text{IC}_{50(-80 \text{ mV})} = 4,2 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50(-40 \text{ mV})} = 12,1 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50(+20 \text{ mV})} = 28,1 \mu\text{M}$. Naměřené body byly proloženy dle rovnice I s volným maximem. **d)** Závislost pIC_{50} takrinu na různém napětí. $\text{pIC}_{50(-80 \text{ mV})} = 5,34 \pm 0,09$; $\text{pIC}_{50(-40 \text{ mV})} = 4,94 \pm 0,06$; $\text{pIC}_{50(+20 \text{ mV})} = 4,57 \pm 0,11$. Body byly proloženy rovnicí III. Pomocí této rovnice jsme byli schopni spočítat, že se takrin váže přibližně do poloviny membránové části iontového kanálu ($\delta = 0,44 \pm 0,06$).

4.1.2. 7-MEOTA

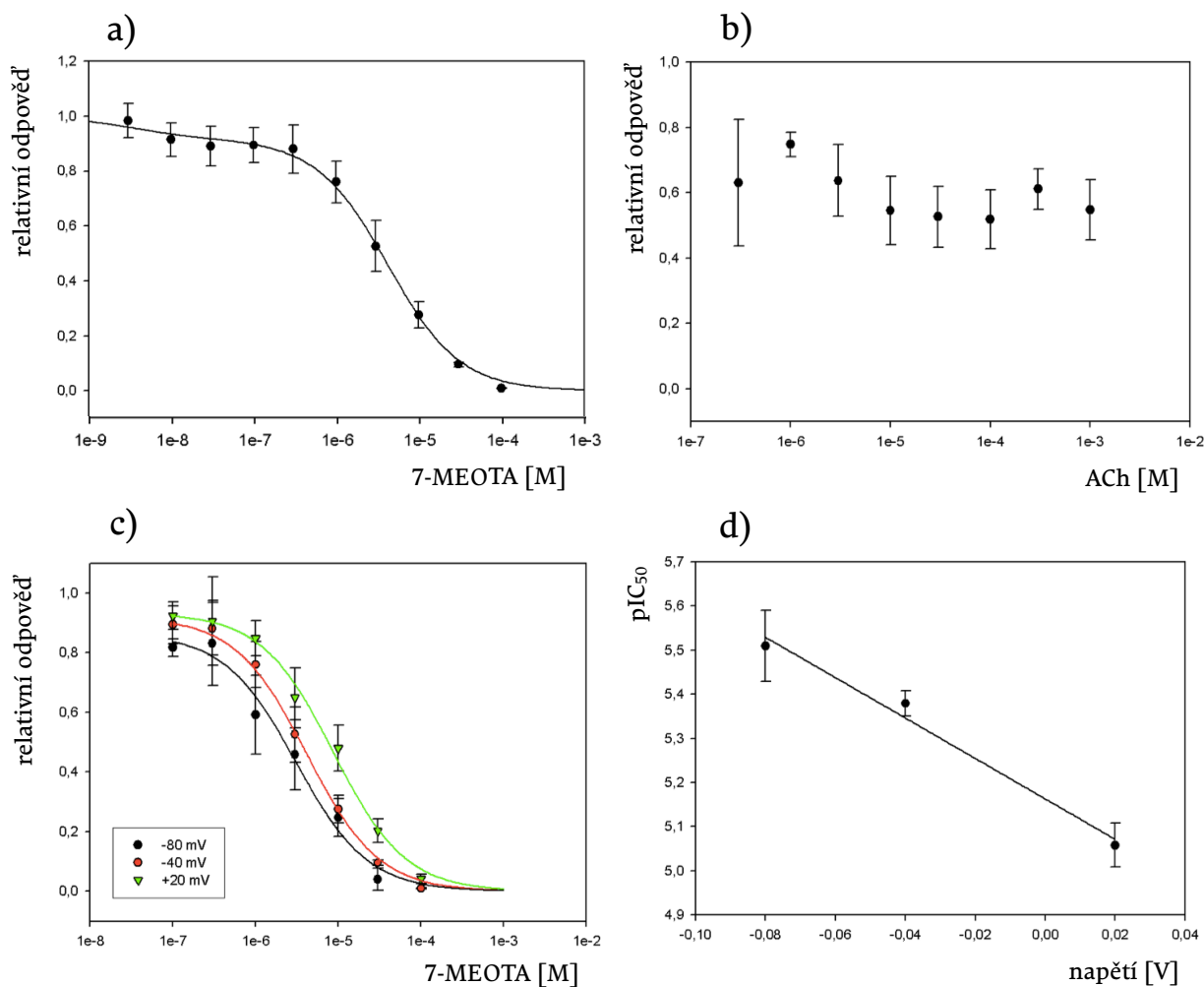
Pro testování účinku 7-MEOTA na receptor $\alpha\beta\gamma\delta$ jsme zvolili podobný postup jako u takrinu. Nejprve jsme testovali zda má 7-MEOTA sama o sobě schopnost aktivovat receptor $\alpha\beta\gamma\delta$. Do koncentrace 100 μM jsme nepozorovali žádné proudové odpovědi vyvolané samostatnou aplikací 7-MEOTA. Následně jsme měřili jak budou různé koncentrace 7-MEOTA ovlivňovat proudové odpovědi při společné aplikaci s ACh. Koncentrace ACh byla 30 μM a koncentrace 7-MEOTA byla v rozmezí od 0,003 μM do 100 μM . Schéma aplikace jsme použili stejné jako u takrinu. Nejprve jsme inhibitor 7-MEOTA preaplikovali samostatně 5 s a následně jsme ho aplikovali 5 s společně s ACh (Obr. 18). Míra inhibice závisela na množství inhibitoru a byla reverzibilní. Získané body jsme proložili inhibiční funkcí dle rovnice II, která popisovala dvojí mechanismus účinku 7-MEOTA. Při nízkých koncentracích se uplatňoval vysokoafinitní mechanismus, který byl zodpovědný za 8% inhibice. IC_{50} 7-MEOTA pro tuto část inhibice bylo rovno 0,003 μM ($\text{pIC}_{50} = 8,5 \pm 0,5$). Při vysokých koncentracích se uplatňoval nízkoafinitní mechanismus, který byl schopný receptor inhibovat úplně a způsoboval zbylých 92% inhibice. Hodnota IC_{50} inhibitoru 7-MEOTA byla pro nízkoafinitní část inhibice rovna 4,0 μM ($\text{pIC}_{50} = 5,4 \pm 0,04$) (Obr. 19a). Efektivní hodnota IC_{50} byla 3,7 μM .



Obr. 18: Ukázka proudových odpovědí na aplikaci 7-MEOTA a ACh na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$. Ukázka dvou kontrolních proudových odpovědí na samotnou aplikaci ACh a na aplikaci ACh společně s 3 μM 7-MEOTA. 7-MEOTA byla vždy nejprve 5 s preaplikována. Poté následovala 5 s aplikace inhibitoru 7-MEOTA společně s ACh. Je zde vidět zmenšení proudové odpovědi při aplikaci inhibitoru přibližně o 50%. Pokles druhé kontrolní odpovědi na ACh je způsoben variabilitou proudových odpovědí buněk TE671. Černě je vyznačena doba aplikace ACh a bíle doba aplikace 7-MEOTA.

Stanovili jsme míru inhibice 7-MEOTA při různých koncentracích ACh. Pro tato měření jsme použili 3 μM koncentraci 7-MEOTA, což je koncentrace blízká hodnotě IC_{50} pro 7-MEOTA na tomto typu receptoru. Koncentrace ACh jsme použili v rozmezí od 0,3 μM do 300 μM . Pozorovali jsme změnu míry inhibice s měnící se koncentrací ACh. Přesněji míra inhibice lehce rostla se vzrůstající koncentrací ACh (Obr. 19b).

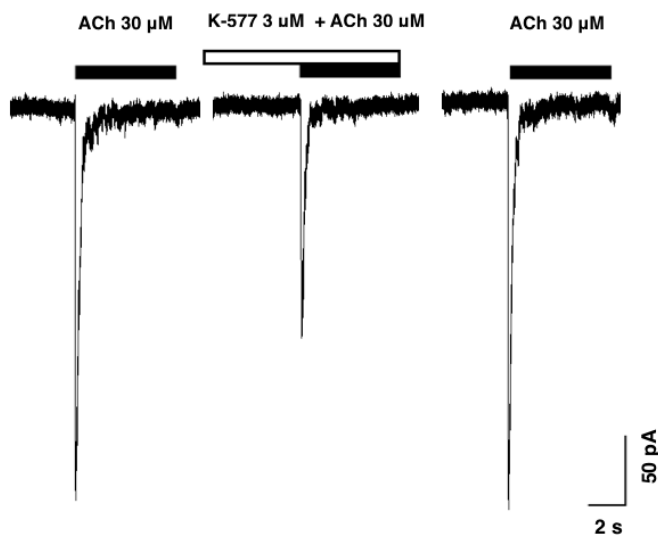
Napětovou závislost 7-MEOTA jsme měřili při membránovém potenciálu -80 mV, -40 mV a +20 mV. Tuto závislost jsme stanovovali pouze pro nízkoafinitní mechanismus inhibice a experimentální body jsme prokládali funkcí dle rovnice I s volným maximem. Při změně membránového potenciálu jsme pozorovali posun inhibiční konstanty IC_{50} : $\text{IC}_{50(-80 \text{ mV})} = 3,1 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50(-40 \text{ mV})} = 4,2 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50(+20 \text{ mV})} = 8,7 \mu\text{M}$ (Obr. 19c). Napětovou závislost jsme analyzovali podle klasického modelu pro blokátory otevřeného kanálu. Hodnoty pIC_{50} jsme vynesli proti membránovému napětí a proložili funkcí dle rovnice III ($\text{pIC}_{50(-80 \text{ mV})} = 5,50 \pm 0,08$; $\text{pIC}_{50(-40 \text{ mV})} = 5,40 \pm 0,03$; $\text{pIC}_{50(+20 \text{ mV})} = 5,06 \pm 0,05$). Pomocí této rovnice jsme určili, že se 7-MEOTA dostává přibližně do první čtvrtiny membránové části iontového kanálu ($\delta = 0,27 \pm 0,03$) (Obr. 19d).



Obř. 19: Inhibiční účinek 7-MEOTA na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$. **a)** Závislost inhibice na koncentraci 7-MEOTA při 30 μM ACh. Jednotlivé body jsou proloženy inhibiční funkcí podle rovnice II. Tato rovnice dobře popisuje experimentální body. Působení 7-MEOTA na tento receptorový podtyp vykazovalo dvojí mechanismus účinku. Vysokoafinitní, který se uplatňoval při nízkých koncentracích 7-MEOTA a popisující $8\% \pm 1,7\%$ inhibice, a nízkoafinitní, který se uplatňoval při vysokých koncentracích 7-MEOTA a popisující $92\% \pm 1,7\%$ inhibice. Vysokoafinitní mechanismus má hodnotu IC_{50} rovnou $0,003 \mu\text{M}$ ($pIC_{50} = 8,5 \pm 0,5$). Pro nízkoafinitní mechanismus je tato hodnota násobně vyšší a je rovna $4,0 \mu\text{M}$ ($pIC_{50} = 5,4 \pm 0,04$). Efektivní hodnota IC_{50} pro celou inhibiční křivku 7-MEOTA je $3,7 \mu\text{M}$. **b)** Změna míry inhibice 7-MEOTA v závislosti na koncentraci ACh. Pro tato měření jsme použili $3 \mu\text{M}$ 7-MEOTA ($\approx IC_{50}$). Pozorovali jsme, že se vzrůstající koncentrací ACh mírně rostla také míra inhibice způsobená inhibitorem 7-MEOTA. **c)** Závislost inhibice 7-MEOTA na napětí. Inhibiční křivku jsme měřili při membránovém napětí -80 mV , -40 mV a $+20 \text{ mV}$. Koncentrace ACh byla $30 \mu\text{M}$. Body jsou proloženy dle rovnice I s volným maximem. Se změnou napětí ke kladnějším hodnotám docházelo ke vzrůstu inhibiční konstanty IC_{50} : $IC_{50(-80 \text{ mV})} = 3,1 \mu\text{M}$, $IC_{50(-40 \text{ mV})} = 4,2 \mu\text{M}$, $IC_{50(+20 \text{ mV})} = 8,7 \mu\text{M}$. **d)** Vynesení hodnot pIC_{50} při různém napětí. $pIC_{50(-80 \text{ mV})} = 5,50 \pm 0,08$; $pIC_{50(-40 \text{ mV})} = 5,40 \pm 0,03$; $pIC_{50(+20 \text{ mV})} = 5,06 \pm 0,05$. Body jsou proloženy dle rovnice III. Pomocí této rovnice jsme spočítali, že 7-MEOTA se dostává přibližně do první čtvrtiny membránové části iontového kanálu ($\delta = 0,27 \pm 0,03$).

4.1.3. K-577

K-577 je dalším derivátem takrinu, u kterého nás zajímalo, jaký bude mít účinek na receptor $\alpha\beta\gamma\delta$. Nejprve jsme zjišťovali, zda má samotná aplikace K-577 agonistický účinek na tento receptorový typ. Až do koncentrace 100 μM jsme ovšem nepozorovali schopnost K-577 aktivovat $\alpha\beta\gamma\delta$ receptor. Následně jsme zjišťovali jaký vliv bude mít tento derivát na proudové odpovědi, pokud bude aplikován společně s ACh. Pro tato měření jsme použili koncentrace K-577 v rozmezí od 0,003 μM do 100 μM a koncentraci ACh 30 μM . Schéma aplikace bylo stejné jako u předchozích dvou látek. Nejprve jsme tedy aplikovali K-577 samostatně po dobu 5 s a následně jsme ho aplikovali dalších 5 s společně s ACh. Výsledkem bylo, že jsme pozorovali různý stupeň inhibice v závislosti na koncentraci inhibitoru. Tato inhibice byla reverzibilní a k navrácení receptoru do aktivovatelného stavu byla dostačující pauza 30 s mezi aplikacemi (Obr. 20). Naměřené body jsme proložili inhibiční funkcí dle rovnice II, která popisovala dvojí mechanismus účinku K-577 na receptor $\alpha\beta\gamma\delta$. První mechanismus byl vysokoafinitní a uplatňoval se při nízkých koncentracích K-577. Tato část inhibiční křivky popisovala 15% rozsahu inhibice a odpovídající hodnota IC_{50} byla rovna 0,08 μM ($\text{pIC}_{50} = 7,1 \pm 0,54$). Druhý mechanismus účinku K-577 byl nízkoafinitní

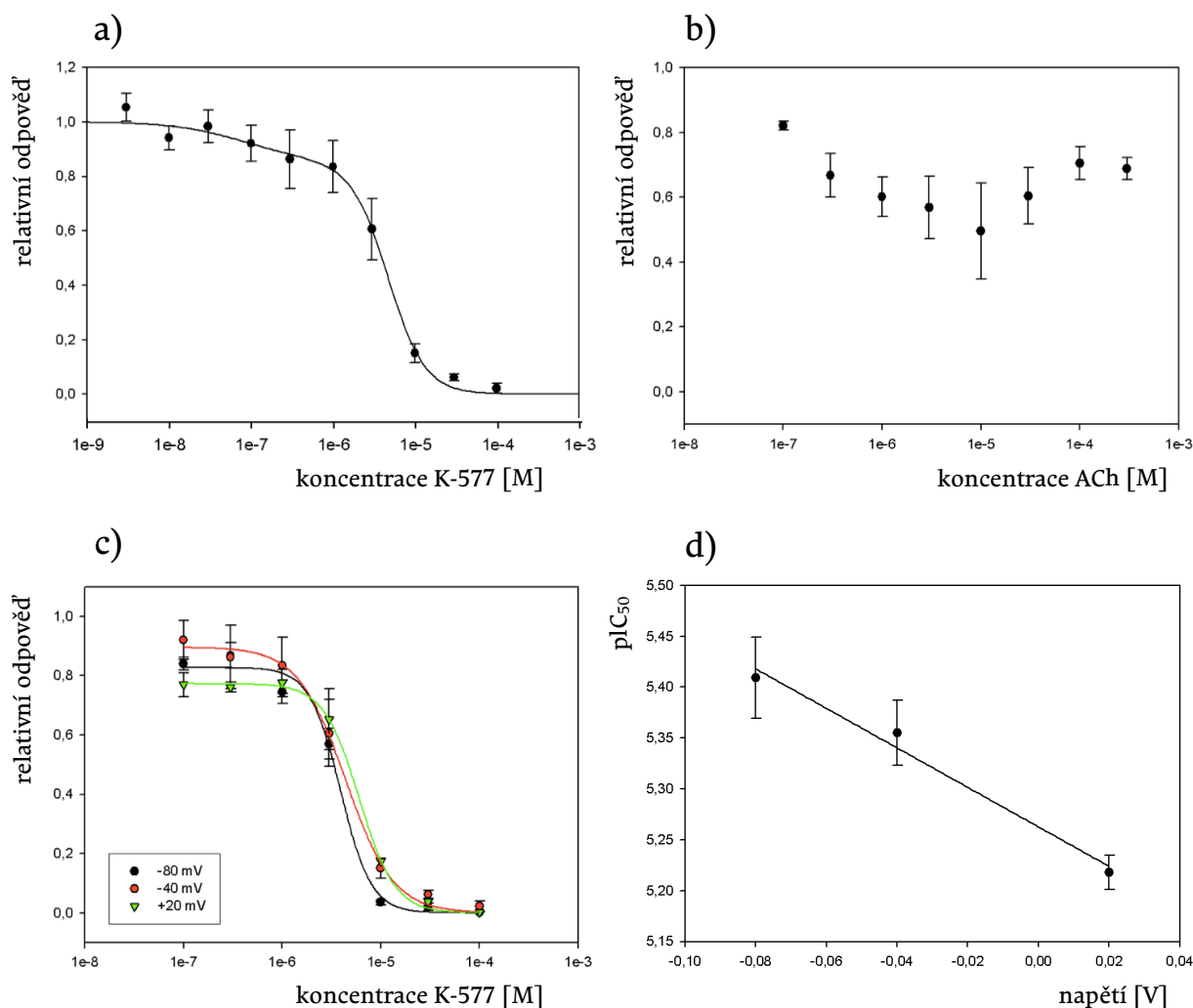


Obr. 20: Ukázka proudových odpovědí na aplikaci K-577 a ACh na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$. Ukázka dvou kontrolních proudových odpovědí na samotnou aplikaci ACh a na aplikaci ACh společně s 3 μM K-577. Inhibitor byl vždy nejprve preaplikován 5 s samostatně. Následně byl aplikován 5 s společně s ACh. Můžeme pozorovat zmenšení proudové odpovědi přibližně o 50%. Po odstranění inhibitoru se receptor navracel do aktivovatelného stavu. Černě je vyznačena doba aplikace ACh a bíle doba aplikace K-577.

a projevoval se při vyšších koncentracích inhibitoru. Popisoval 85% rozsahu inhibice a IC_{50} pro něj bylo rovno $5,0 \mu\text{M}$ ($pIC_{50} = 5,3 \pm 0,06$). Pro celou inhibiční křivku byla hodnota IC_{50} rovna $4,3 \mu\text{M}$ (Obr. 21a).

Následně jsme měřili vliv koncentrace ACh na stupeň inhibice K-577. Při měření jsme použili $3 \mu\text{M}$ koncentraci K-577. Koncentraci ACh jsme použili v rozmezí od $0,3 \mu\text{M}$ do $300 \mu\text{M}$. Se změnou koncentrace agonisty jsme pozorovali změnu míry inhibice K-577. Inhibice byla největší při koncentraci ACh $10 \mu\text{M}$. Směrem k vyšším a nižším koncentracím ACh míra inhibice postupně klesala. Koncentrace při které dochází k této změně odpovídá přibližně hodnotě EC_{50} pro tento typ receptoru ($EC_{50} = 7 \mu\text{M}$) (Obr. 21b).

K-577 měla proti takrinu a 7-MEOTA slabou napěťovou závislost. Změna hodnot IC_{50} byla malá ($IC_{50(-80 \text{ mV})} = 3,8 \mu\text{M}$; $IC_{50(-40 \text{ mV})} = 4,4 \mu\text{M}$; $IC_{50(+20 \text{ mV})} = 6,1 \mu\text{M}$). Hillův koeficient zde nebyl rovný 1, ale lišil se v závislosti na změně napětí ($H_{-80 \text{ mV}} = 2,8$; $H_{-40 \text{ mV}} = 1,8$; $H_{+20 \text{ mV}} = 2,4$) (Obr. 21c). Přestože K-577 vykazovala jen slabou napěťovou závislost, v porovnání s dvěma předchozími látkami, inhibici jsme analyzovali podle obdobného modelu pro blokátory otevřeného kanálu. Hodnoty pIC_{50} naměřené při různém napětí ($pIC_{50(-80 \text{ mV})} = 5,41 \pm 0,04$; $pIC_{50(-40 \text{ mV})} = 5,36 \pm 0,03$, $pIC_{50(+20 \text{ mV})} = 5,22 \pm 0,02$) jsme vynesli do grafu a proložili funkcí dle rovnice III, pomocí které jsme určili, že se inhibitor K-577 dostává pouze do vrchní části iontového kanálu ($\delta = 0,12 \pm 0,02$) (Obr. 21d).



Obr. 21: Inhibiční účinek K-577 na receptor $\alpha\beta\gamma\delta$. **a)** Závislost inhibice na koncentraci K-577 při $30 \mu\text{M}$ ACh. Jednotlivé body jsou proloženy inhibiční funkcí podle rovnice II. Při nízkých koncentracích se projevovat pouze vysokoafinitní mechanismus inhibice, který byl schopný inhibovat odpovědi svalového receptoru o $15\% \pm 6,3\%$. Vysokoafinitní inhibice K-577 byla charakterizována konstantou IC_{50} rovnou $0,08 \mu\text{M}$ ($pIC_{50} = 7,1 \pm 0,54$). S rostoucí koncentrací K-577 se začínal uplatňovat také nízkoafinitní mechanismus inhibice. Ten byl zodpovědný za zbylých $85\% \pm 6,3\%$ inhibice. Hodnota IC_{50} K-577 je v tomto případě rovna $5,0 \mu\text{M}$ ($pIC_{50} = 5,3 \pm 0,06$). Efektivní hodnota IC_{50} je rovna $4,3 \mu\text{M}$. **b)** Změna míry inhibice K-577 v závislosti na změně koncentrace ACh. Pro tato měření jsme použili $3 \mu\text{M}$ K-577 ($\approx IC_{50}$). Zde jsme nepozorovali jednotnou změnu míry inhibice s klesající nebo rostoucí koncentrací ACh. Nejvýraznější byla inhibice při $10 \mu\text{M}$ ACh. Od této koncentrace směrem k vyšším koncentracím, ale také k nižším, docházelo k poklesu míry inhibice. **c)** Napěťová závislost inhibice K-577. Inhibiční křivku jsme měřili při třech membránových potenciálech: -80 mV , -40 mV a $+20 \text{ mV}$. Koncentrace ACh byla $30 \mu\text{M}$. Body jsou proloženy inhibiční křivkou s volným Hillovým koeficientem a volným maximem dle rovnice I. V tomto případě jsme pozorovali slabou závislost na napětí a hodnoty IC_{50} byly: $IC_{50(-80 \text{ mV})} = 3,8 \mu\text{M}$; $IC_{50(-40 \text{ mV})} = 4,4 \mu\text{M}$; $IC_{50(+20 \text{ mV})} = 6,1 \mu\text{M}$. **d)** Vynesení hodnot pIC_{50} při různém napětí ($pIC_{50(-80 \text{ mV})} = 5,41 \pm 0,04$; $pIC_{50(-40 \text{ mV})} = 5,36 \pm 0,03$; $pIC_{50(+20 \text{ mV})} = 5,22 \pm 0,02$). Body jsou proloženy funkcí dle rovnice III. Podle této rovnice jsme spočítali, že se K-577 dostává pouze do vrchní části iontového kanálu ($\delta = 0,12 \pm 0,02$).

4.1.4. Porovnání míry inhibice takrinu, 7-MEOTA a K-577

Takrin a jeho deriváty mají různou účinnost inhibice na různých strukturách. Nejvíce účinným inhibitorem je K-577, který silně inhibuje AChE i nikotinové receptory $\alpha\beta\gamma\delta$ a $\alpha4\beta2$. Takrin stále velmi účinně inhibuje AChE, ale nikotinové receptory inhibuje již méně. 7-MEOTA je proti těmto látkám slabým inhibitorem AChE a neuronálního receptoru $\alpha4\beta2$, ale svalový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$ inhibuje z těchto tří látek nejúčinněji (Tab. 1). Porovnání inhibičních konstant naměřených na svalovém receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ (Tab. 2).

Tab. 1: Hodnoty IC_{50} takrinu, 7-MEOTA a K-577 pro AChE, receptor $\alpha\beta\gamma\delta$ a receptor $\alpha4\beta2$ (Soukup a kol. 2013; Krusek a kol. 2013) (Hodnoty IC_{50} pro AChE látku K-577 nám byly poskytnuty Dr. Soukupem z Centra biomedicínského výzkumu Univerzity nemocnice v Hradci Králové).

Látka	IC_{50} AChE (μM)	IC_{50} nAChR $\alpha\beta\gamma\delta$ (μM)	IC_{50} nAChR $\alpha4\beta2$ (μM)
THA	$0,5 \pm 0,1$	10,1	8 ± 3
7-MEOTA	$15,0 \pm 2,4$	3,7	15 ± 3
K-577	0,1	4,3	4 ± 2

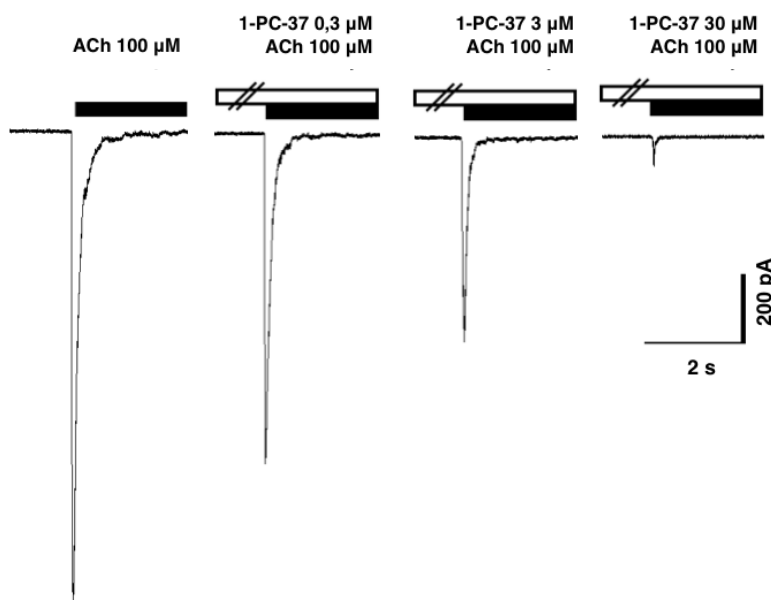
Tab. 2: Hodnoty IC_{50} a pIC_{50} takrinu, 7-MEOTA a K-577 pro vysokoafinitní a nízkoafinitní mechanismus inhibice nAChR $\alpha\beta\gamma\delta$.

Látka	IC_{50} vysokoafinitní	pIC_{50} vysokoafinitní	IC_{50} nízkoafinitní	pIC_{50} nízkoafinitní	IC_{50} efektivní
THA	0,01 μM	$8,0 \pm 0,25$	12,6 μM	$4,9 \pm 0,06$	10,1 μM
7-MEOTA	0,003 μM	$8,5 \pm 0,5$	4,0 μM	$5,4 \pm 0,04$	3,7 μM
K-577	0,08 μM	$7,1 \pm 0,54$	5,0 μM	$5,3 \pm 0,06$	4,3 μM

4.2 Účinek látek PC na nAChR

4.2.1. Účinek látek PC na svalový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$

Naším cílem bylo prostudovat vliv inhibitorů AChE odvozených od 7-MEOTA na nikotinový receptor. Jako model jsme zvolili lidské embryonální svalové receptory $\alpha\beta\gamma\delta$ endogenně exprimované v linii buněk TE671. Testovali jsme celkem sedm látek, které byly označeny jako: 1-PC-6, 1-PC-13, 1-PC-32, 1-PC-37, 1-PC-41, 1-PC-48 a 1-PC-49. Nejprve jsme testovali, zda samostatná aplikace těchto látek vyvolá proudové odpovědi. Až do koncentrace 100 μM jsme nepozorovali žádný agonistický účinek těchto látek na receptor $\alpha\beta\gamma\delta$. Dále nás zajímalo jaký vliv budou mít látky PC na proudové odpovědi, vyvolané agonistou ACh. Postupně jsme aplikovali různé koncentrace studovaných látek společně se stálou koncentrací agonisty. Jako srovnávacího agonistu jsme zvolili 100 μM ACh ($\text{EC}_{50}=7 \mu\text{M}$). Testované látky jsme v daných koncentracích vždy nejprve preaplikovali 5 s na povrch buněk a následně jsme je dalších 5 s aplikovali společně s 100 μM ACh. Výsledkem bylo, že jsme pozorovali různou míru inhibice proudových odpovědí. Tato inhibice byla



Obr. 22: Ukázka inhibice proudových odpovědí při aplikaci látky 1-PC-37 na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$. Ukázka míry inhibice ACh odpovědí při aplikaci 1-PC-37 ve vybraných koncentracích 0,3 μM , 3 μM a 30 μM . Všechny testované látky PC byly vždy nejprve samostatně preaplikovány 5 s na povrch buněk. Ihned poté následovala jejich 5 s aplikace společně se 100 μM ACh. Černě je vyznačena doba aplikace ACh a bíle doba aplikace látky PC.

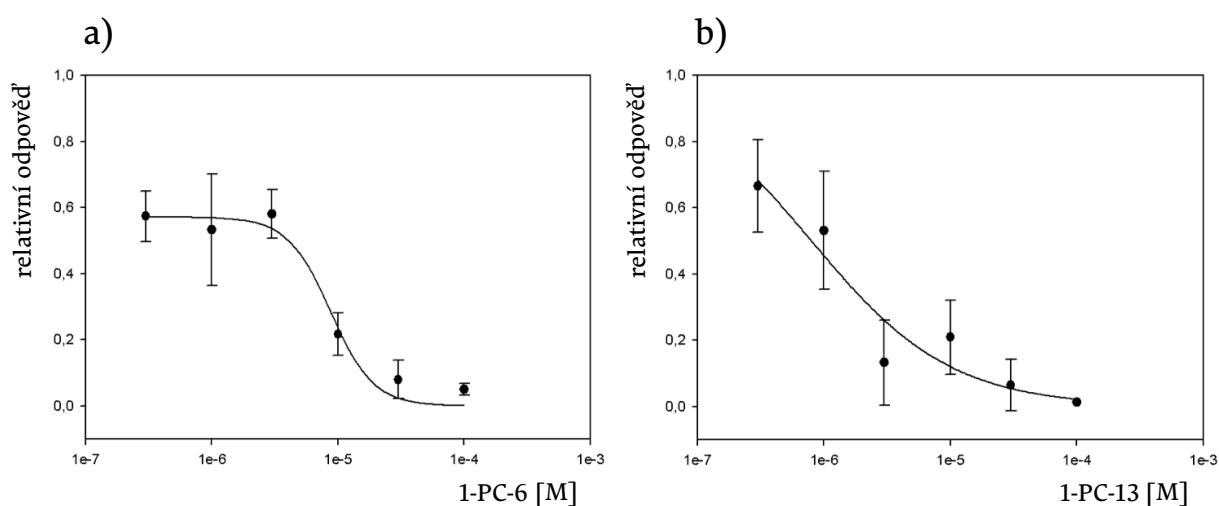
koncentračně závislá a reverzibilní (Obr. 22). K návratu inhibovaných receptorů do aktivovatelného stavu stačilo méně než 30 s. Relativní míru inhibice jsme stanovovali jako poměr amplitudy inhibované odpovědi a aritmetického průměru 2 nejbližších kontrolních odpovědí na aplikaci samotného ACh.

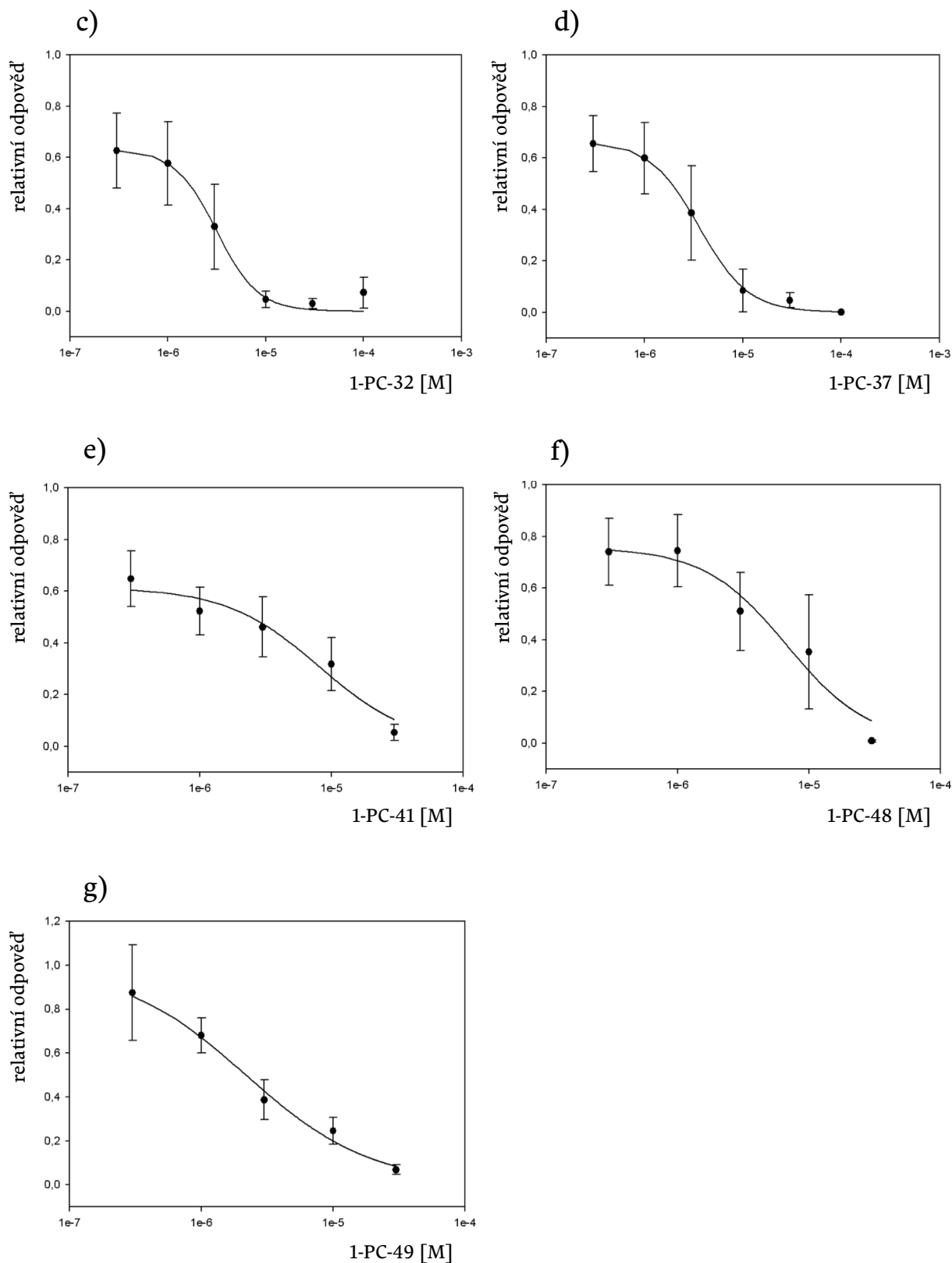
Závislost inhibice na koncentracích jednotlivých látek PC jsme popsali inhibiční funkcí dle rovnice 1 s volným Hillovým koeficientem a volným maximem. Pro testované látky PC jsme určili poloviční efektivní blokádu: 1-PC-6 $IC_{50} = 8,7 \mu M$; 1-PC-13 $IC_{50} = 0,8 \mu M$; 1-PC-32 $IC_{50} = 3,1 \mu M$; 1-PC-37 $IC_{50} = 3,6 \mu M$; 1-PC-41 $IC_{50} = 8,1 \mu M$; 1-PC-48 $IC_{50} = 6,8 \mu M$; 1-PC-49 $IC_{50} = 1,7 \mu M$ (Tab. 3). Všechny studované látky přímo a účinně inhibovaly svalový nikotinový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$ koncentračně závislým způsobem (Obr. 23).

Tab. 3: Tabulka s hodnotami IC_{50} pro jednotlivé látky PC měřeny na svalovém receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$.

Receptor $\alpha\beta\gamma\delta$

Látka	IC_{50} (μM)	H
1-PC-6	$8,7 \pm 1,6$	$2,5 \pm 1,4$
1-PC-13	$0,8 \pm 1,9$	$0,8 \pm 0,5$
1-PC-32	$3,1 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,6$
1-PC-37	$3,6 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,2$
1-PC-41	$8,1 \pm 3,2$	$1,2 \pm 0,5$
1-PC-48	$6,8 \pm 2,6$	$1,4 \pm 0,6$
1-PC-49	$1,7 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,2$





Obr. 23: Inhibiční křivky jednotlivých látek PC měřené při 100 μ M ACh na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$. a) Inhibiční křivka látky 1-PC-6. b) Inhibiční křivka látky 1-PC-13. c) Inhibiční křivka látky 1-PC-32. d) Inhibiční křivka látky 1-PC-37. e) Inhibiční křivka látky 1-PC-41. f) Inhibiční křivka látky 1-PC-48. g) Inhibiční křivka látky 1-PC-49. Všechny testované látky reverzibilně inhibovaly svalový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$ koncentračně závislým způsobem. Inhibiční křivky jsou proloženy funkcí dle rovnice I s volným Hillovým koeficientem a volným maximem.

5.1.5. Porovnání účinku na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ a receptoru $\alpha4\beta2$

Dva mechanismy účinku takrinu, 7-MEOTA a K-577, které jsme pozorovali na svalovém receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$, bychom mohli porovnat s dvojitým účinkem, který jsme u těchto látek pozorovali na neuronálním receptoru $\alpha4\beta2$. Je pravděpodobné, že schopnost inhibice prostřednictvím blokády otevřeného kanálu se bude uplatňovat nejenom na svalovém receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ (Prince a kol. 2002), ale také na neuronálním receptoru $\alpha4\beta2$. Podstatná část inhibice způsobená takrinem a jeho deriváty na svalovém receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ a neuronálním receptoru $\alpha4\beta2$ by tedy mohla být způsobena obdobným mechanismem.

Při nízké koncentraci takrinu a jeho derivátů na svalovém receptoru předpokládáme alosterický účinek těchto látek. Obdobný účinek předpokládáme také na neuronálním receptoru $\alpha4\beta2$. Na tomto podtypu jsme pozorovali, že při nízké koncentraci ACh, mají tyto látky schopnost potencovat ACh odpovědi. Potenciace neuronálního receptoru $\alpha4\beta2$ takrinem byla pozorována již dříve (Zwart a kol. 2000). Domníváme se, že i na neuronálním receptoru, je to dáno vazbou těchto látek na ligand vázající doménu mimo vazebné místo agonisty. Je tedy možné, že na obou těchto receptorech se mohou tyto látky vázat na podobné místo na ligand vázající doméně. Na receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ to vede k inhibici, ale na receptoru $\alpha4\beta2$ to způsobuje potenciaci.

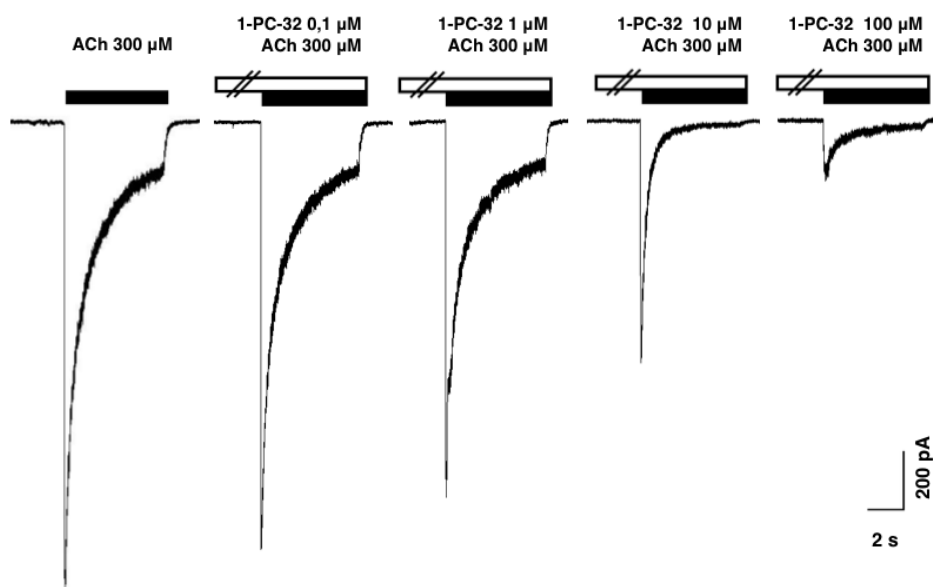
Tento rozdíl je možné vysvětlit rozdílnou pravděpodobností otevírání kanálu (Mathie a kol. 1991; Lingle a kol. 1992). Svalový receptor má mnohem vyšší pravděpodobnost otevírání kanálu obsazeného dvěma molekulami agonisty a proto zde není velký prostor pro zvýšení jeho aktivity. Je tedy obtížné si na něm představit alosterický potenciační mechanismus. Naproti tomu u neuronálního receptoru, kde je pravděpodobnost otevření nižší, existuje prostor pro výraznější pozitivní modulaci. Je tedy možné, že na obou těchto receptorech působí takrin, 7-MEOTA a K-577 na homologických místech, ale na neuronálním receptoru je možnost pro zvýšení aktivity a na svalovém receptoru vede jakákoliv modulace spíše ke snížení jeho aktivity.

4.2.2. Účinek látek PC na neuronální receptor $\alpha 4\beta 2$

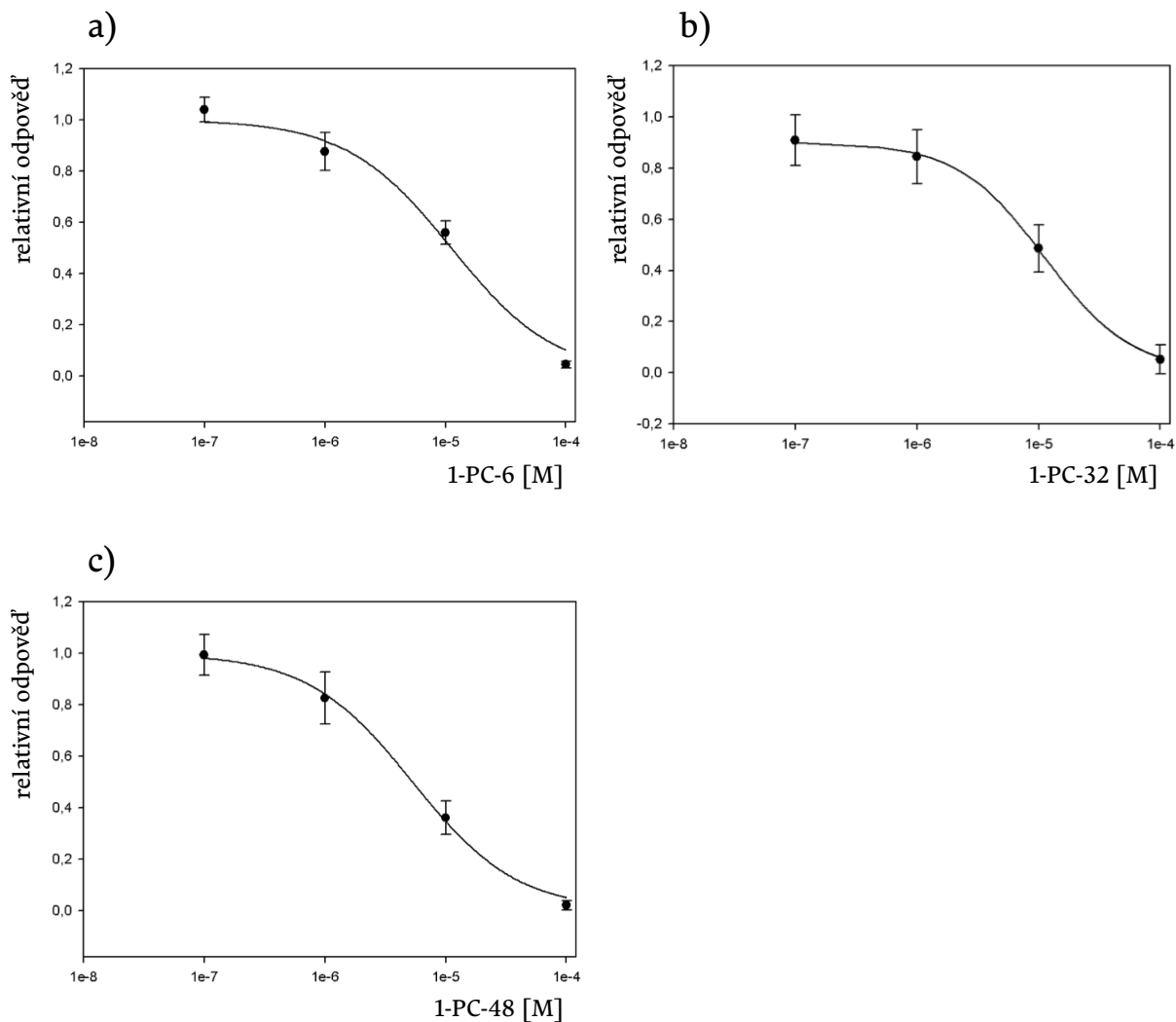
Pro vybrané PC látky jsme prostudovali interakci s neuronálním nikotinovým receptorem. Jako model jsme zvolili krysí neuronální receptory $\alpha 4\beta 2$ přechodně exprimované v linii COS buněk (předpokládáme stechiometrii receptoru $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, která má nižší afinitu k ACh). Tomuto dalšímu testování byly podrobeny látky označené jako: 1-PC-6, 1-PC-32 a 1-PC-48. Nejprve jsme testovali zda samotná aplikace těchto látek na povrch buněk vyvolá nějaké proudové odpovědi a zjistili jsme, že až do 100 μM koncentrace žádné odpovědi nevyvolávají.

Při měření jednotlivých inhibičních křivek jsme používali jako srovnávacího agonistu ACh v koncentraci 300 μM ($\text{EC}_{50}=159 \mu\text{M}$). Testované látky jsme ve zvolené koncentraci vždy nejprve preaplikovali 5 s samostatně a poté je aplikovali 5 s společně s ACh (Obr. 24). Protože receptor $\alpha 4\beta 2$ se vrací z desenzitizovaného stavu pomaleji, než svalový receptor, museli jsme mezi jednotlivými aplikacemi dodržovat interval 60 s. Během této doby byla buňka omývána roztokem ECS a stačila přejít zpět do aktivovatelného stavu.

Všechny testované látky inhibovaly receptor $\alpha 4\beta 2$ koncentračně závislým způsobem a tato inhibice byla reverzibilní. Naměřené body jsme proložili inhibiční křivkou dle rovnice 1 a stanovili hodnoty IC_{50} pro každou z těchto látek: 1-PC-6 $\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{M}$; 1-PC-32 $\text{IC}_{50} = 8 \mu\text{M}$; 1-PC-48 $\text{IC}_{50} = 5,3 \mu\text{M}$ (Tab. 4.; Obr. 25).



Obr. 24: Ukázka inhibice proudových odpovědí při aplikaci látky 1-PC-32 na receptoru $\alpha 4\beta 2$. Ukázka míry inhibice ACh odpovědí při aplikaci 1-PC-32 v koncentracích 0,1 μM , 1 μM , 10 μM a 100 μM . Látky PC byly vždy nejprve samostatně preaplikovány 5 s. Poté následovala jejich společná 5 s aplikace s 300 μM ACh. Černě je vyznačena doba aplikace ACh a bíle doba aplikace látky PC.



Obr. 25: Inhibiční křivky látek PC měřené při 300 μM ACh na receptorech $\alpha 4\beta 2$. Naměřené body jsou proloženy jednoduchou inhibiční funkcí dle rovnice 1. Inhibiční křivky všech látek směřovaly k 1 s výjimkou látky 1-PC-32, která v nejnižší naší měřené koncentraci stále inhibovala receptor $\alpha 4\beta 2$ o 8% a nesměřovala k 1, ale k 0,92. a) Inhibiční křivka látky 1-PC-6 ($\text{IC}_{50}= 11 \mu\text{M}$). b) Inhibiční křivka látky 1-PC-32 ($\text{IC}_{50}= 8 \mu\text{M}$). c) Inhibiční křivka látky 1-PC-48 ($\text{IC}_{50}=5,3 \mu\text{M}$).

Tab. 4: Tabulka s hodnotami IC_{50} pro jednotlivé látky PC měřené na neuronálním receptoru $\alpha 4\beta 2$.

nAChR $\alpha 4\beta 2$

Látka	IC_{50} (μM)
1-PC-6	$11,2 \pm 2,1$
1-PC-32	$10,6 \pm 1,4$
1-PC-48	$5,3 \pm 0,4$

5. Diskuse

Takrin byl první látkou schválenou k terapii AD. Brzy po jeho schválení byl však stažen z trhu vzhledem k jeho silným nežádoucím účinkům. Takrin byl ale dál používán jako vzorový inhibitor AChE. Na jeho základě bylo vytvořeno mnoho derivátů. Cílem bylo vytvořit takovou látku, která by měla pozitivní účinky takrinu, ale byly by u ní odstraněny nežádoucí vedlejší účinky, kvůli kterým bylo použití takrinu (Cognexu®) v terapii problematické a z toho důvodu velice řídké.

Velice nadějným derivátem takrinu byla 7-MEOTA. Tato látka byla poprvé syntetizována na Vojenské lékařské Akademii J.E. Purkyně v Hradci Králové (Patočka 1986) a měla mnoho předpokladů nahradit takrin v terapii AD. Z finančních důvodů ovšem tato látka nepostoupila do dalších testování. Postupně se poté začalo upouštět od výzkumu inhibitorů cholinesteráz jako perspektivní léčby AD. Po několika letech výzkumu AD, který se soustředil na jiné hypotézy a léčby AD, se ovšem nepodařilo nalézt jinou a lepší léčbu, než kterou poskytovaly inhibitory acetylcholinesteráz. Z toho důvodu začal v poslední době návrat k těmto inhibitorům a začaly být syntetizovány nové látky schopné inhibovat cholinesterázu (Bolognesi a kol. 2010; Camps a kol. 2010; Kozurkova a kol. 2011; Fernandez-Bachiller a kol. 2012; El-Malah a kol. 2013; Romero a kol. 2013). Obnoveného testování se dočkala také 7-MEOTA (Soukup a kol. 2013). Tato látka byla následně použita pro syntézu dalších inhibitorů AChE, které by mohly mít ještě lepší farmakologické vlastnosti. Nových a nadějných inhibitorů AChE je nyní syntetizováno velké množství. Na základě přítomnosti různých chemických skupin, náboje či velikosti, lze sice částečně předpovídat schopnost interakce těchto látek s různými buněčnými strukturami a jejich možný účinek, ale nakonec je stejně potřeba tyto látky jednotlivě otestovat.

5.1. Takrin, 7-MEOTA a K-577

V první části této diplomové práce jsme se zaměřili na studium účinku inhibitorů cholinesteráz takrinu, 7-MEOTA a K-577 na lidský embryonální svalový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$. Tyto látky jsme již dříve testovali na neuronálním nikotinovém receptoru $\alpha4\beta2$, u kterého jsme zjistili jejich přímou interakci s tímto receptorovým podtypem. Na receptoru $\alpha4\beta2$ jsme pozorovali zajímavý efekt, kdy při nízké koncentraci ACh byla pozorována potenciace ACh odpovědi. Je tedy pravděpodobné, že tyto látky mohou působit jako pozitivní alosterické modulátory (Krusek a kol. 2013).

Zajímalo nás tedy, jaký účinek budou mít tyto látky na svalový nikotinový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$.

5.1.1. Takrin

Koncentrační závislost účinku takrinu na receptor $\alpha\beta\gamma\delta$ nebylo možné uspokojivě popsat jednoduchou inhibiční křivkou, která by popisovala jeden mechanismus účinku, pokud by se takrin vázal pouze na jedno vazebné místo na receptoru. Proto jsme zvolili k popisu křivky model, který charakterizoval zvláště účinek takrinu při jeho nízkých koncentracích a zvláště při jeho vysokých koncentracích. Při nízkých koncentracích takrinu se uplatňoval vysokoafinitní mechanismus, při kterém bylo IC_{50} rovno $0,01 \mu M$. Tento mechanismus je pravděpodobně nezávislý na napětí a je dán vazbou takrinu na ligand vázající doménu. Nemůžeme ale vyloučit působení ze strany membrány. Tento vysokoafinitní mechanismus způsobuje 20% inhibice. Díky silné afinitě takrinu k vazebnému místu, dochází pravděpodobně již při jeho nízkých koncentracích k obsazení všech volných receptorů. Vysokoafinitní mechanismus, ale není sám o sobě schopný plně inhibovat receptory a dochází tak pouze ke snížení amplitud ACh odpovědí. To by nasvědčovalo tomu, že receptory plně obsazené na vysokoafinitním místě, mají sníženou pravděpodobnost otevření vyvolanou alosterickým mechanismem, ale inhibitor je není schopen zcela vyřadit z činnosti.

Druhý, nízkoafinitní mechanismus, který se začíná ve větší míře uplatňovat až se vzrůstající koncentrací takrinu, je zodpovědný za přibližně 80% jeho inhibičního účinku a je schopen receptory inhibovat zcela. Jedná se o inhibici při které má takrin IC_{50} rovno $12,6 \mu M$. Tento mechanismus je závislý na membránovém napětí a je pravděpodobně způsoben vazbou pozitivně nabitého takrinu do iontového kanálu. Takrin tedy nejspíše působí jako blokátor otevřeného kanálu. Že takrin působí na svalovém receptoru jako blokátor otevřeného kanálu bylo pozorováno již v dřívějších studiích (Canti a kol. 1998; Prince a kol. 2002). Dále jsme pozorovali, že s rostoucí koncentrací ACh dochází ke zvýšení míry inhibice takrinem. To vylučuje možnost kompetitivní inhibice a ukazuje to na to, že takrin se spíše váže mimo vazebné místo pro ACh. Což by odpovídalo tomu, že nízkoafinitní inhibice je způsobena vazbou takrinu do otevřeného iontového kanálu.

5.1.2. 7-MEOTA

Účinky 7-MEOTA na nikotinové receptory doposud nebyly systematicky studovány. Z dřívějšího měření na neuronálním receptoru $\alpha 4\beta 2$ jsme však očekávali, že přímý účinek této látky na další nikotinové receptory by mohl být účinku takrinu podobný. Na svalovém receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ jsme skutečně pozorovali, že 7-MEOTA měla podobný průběh účinku jako takrin. Přestože je 7-MEOTA z těchto tří látek nejméně účinným inhibítorem AChE a receptoru $\alpha 4\beta 2$, receptor $\alpha\beta\gamma\delta$ inhibuje nejúčinněji ($IC_{50} = 3,7 \mu M$). 7-MEOTA stejně jako takrin působí na svalový receptor dvěma mechanismy. Za 8% inhibičního účinku je zodpovědný vysokoafinitní mechanismus uplatňující se při nízké koncentraci 7-MEOTA. Inhibiční konstanta IC_{50} je pro tento mechanismus rovna $0,003 \mu M$. Podobně jako u takrinu, předpokládáme, že je to způsobeno vazbou inhibitoru 7-MEOTA na ligand vázající doménu. Pravděpodobně se také neváže do vazebného místa pro ACh, neboť s rostoucí koncentrací agonisty nedochází k poklesu míry inhibice. Naopak jsme pozorovali mírné zvýšení míry inhibice s rostoucí koncentrací ACh. Za většinu inhibičního účinku, tedy zbylých 92%, je nejspíše zodpovědná blokáda otevřeného kanálu, čemuž nasvědčuje napěťová závislost této části inhibice. Jedná se o nízkoafinitní mechanismus, který se začíná projevovat s rostoucí koncentrací 7-MEOTA. IC_{50} nízkoafinitního mechanismu je více jak tisíckrát vyšší než IC_{50} vysokoafinitního mechanismu a je rovno $4 \mu M$.

5.1.3. K-577

K-577 je nově syntetizovaná látka, kterou jsme dostali k dispozici k prozkoumání a proto o jejích přímých účincích nejsou doposud žádné informace. Přestože jsme u K-577 pozorovali podobný inhibiční efekt jako u takrinu a 7-MEOTA, v určitých aspektech se inhibice lišila. Míra inhibice K-577 ($IC_{50} = 4,3 \mu M$) a 7-MEOTA ($IC_{50} = 3,7 \mu M$) je podobná a i u této látky jsme pozorovali dvojí mechanismus účinku. Vysokoafinitní projevující se při nízké koncentraci tohoto derivátu ($IC_{50} = 0,08 \mu M$) a nízkoafinitní projevující se při jeho vzrůstající koncentraci ($IC_{50} = 4,3 \mu M$). Ovšem nízkoafinitní mechanismus látky K-577 je na napětí závislý pouze nepatrně a Hillův koeficient naměřených inhibičních křivek se při různém napětí lišil. Vysvětlení toho proč se Hillův koeficient lišil však nemáme. Důvodem, proč nemá K-577 výraznější napěťovou závislost nízkoafinitního děje, může být větší velikost této molekuly. K-577 se nemůže, přestože nese kladný náboj, vázat hlouběji do iontového kanálu. To by vysvětlovalo slabou napěťovou závislost látky K-577 a nevyvracelo by to možnost, že

působí jako blokátor otevřeného kanálu. Různou míru inhibice K-577 v závislosti na koncentraci ACh by bylo možno vysvětlit, podobně jako u takrinu alosterickou inhibicí způsobující snížení aktivity kanálu a afinity k agonistovi.

5.1.4. Inhibiční účinek takrinu, 7-MEOTA, K-577

Naše výsledky potvrdily, že takrin, 7-MEOTA a K-577 přímo interagují se svalovým receptorem $\alpha\beta\gamma\delta$. Mechanismus účinku těchto látek je na první pohled velmi podobný. K-577 se ale v určitých aspektech liší. Hlavním rozdílem je, že inhibice K-577 nevykazuje výraznou napěťovou závislost. Jelikož mají všechny tyto tři látky velmi podobnou strukturu, zjišťovali jsme, čím by mohl být dán tento rozdíl. Takrin, 7-MEOTA i K-577 jsou při fyziologickém pH protonovány a nesou kladný náboj. Což je důležitý požadavek k tomu, aby tyto látky byly schopny blokovat kationtové iontové kanály. Rozdíl je ovšem ve velikosti jejich struktur.

Takrin je z těchto látek nejmenší a tvoří základní strukturu pro 7-MEOTA a K-577. 7-MEOTA navíc obsahuje methoxy skupinu připojenou na 7. uhlíku a K-577 má ještě navíc připojen uhlíkový řetězec na 9. uhlíku. To dělá K-577 největší z těchto tří látek. Velikost struktury pochopitelně ovlivňuje, jak hluboko do iontového kanálu se tyto látky dostávají. Velikost těchto látek jsme zjistili pomocí volně dostupného programu vyvinutého firmou ChemAxon (chemicalize.org). Tento program nám umožnil vytvořit prostorový model molekuly a vypočítat minimální projekční plochu testovaných látek. Minimální projekční plocha pro jednotlivé látky byla 30,6 Å² pro takrin, 33,9 Å² pro 7-MEOTA a 50,7 Å² pro K-577. Velikost této projekční plochy dobře koreluje s tím, jak hluboko do iontového kanálu se jednotlivé látky dostávají.

Takrin, který má nejmenší minimální projekční plochu (30,6 Å²), se z extracelulární strany dostává do iontového kanálu nejhlouběji. Podle modelu pro napěťové závislosti blokády otevřeného kanálu jsme spočítali, že se takrin váže přibližně do poloviny membránové části iontového kanálu ($\delta_{\text{THA}} = 0,44$). 7-MEOTA má o něco větší minimální projekční plochu (33,9 Å²) a již se dostává pouze do čtvrtiny membránové části iontového kanálu ($\delta_{7\text{-MEOTA}} = 0,27$). K-577 s největší minimální projekční plochou (50,7 Å²) je schopný proniknout pouze do horní části iontového kanálu ($\delta_{\text{K-577}} = 0,12$). Rozdílnou velikostí těchto látek se tedy dá vysvětlit jejich odlišná napěťová závislost. Čím je látka menší, tím hlouběji se může dostávat do iontového kanálu a tím výraznější je její napěťová závislost (Tab. 5; Obr. 26).

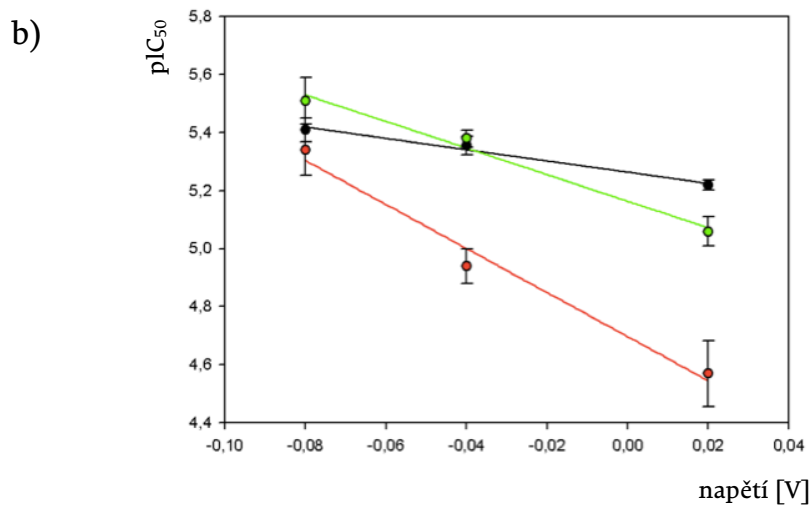
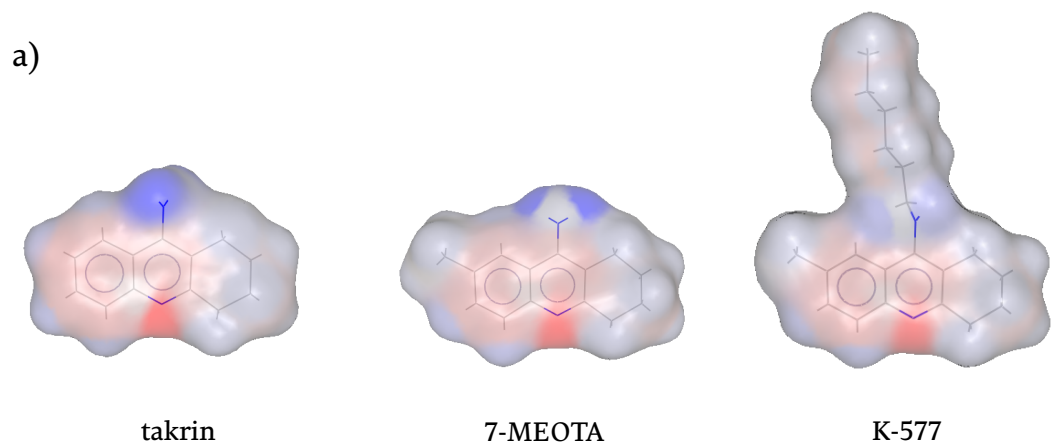
Předpokládáme že nízkoafinitní mechanismus inhibice, který je zodpovědný za většinu inhibičního účinku takrinu, 7-MEOTA a K-577, je způsoben blokádou otevřeného kanálu. Nasvědčuje tomu pozorovaná napěťová závislost a nekompeti-

tivnost této inhibice. Působení takrinu jako blokátoru otevřeného kanálu bylo na svalovém nikotinovém receptoru pozorováno již dříve (Canti a kol. 1998; Prince a kol. 2002). Co se týče účinku 7-MEOTA a K-577, tak zde žádné srovnání nemáme, neboť účinek těchto látek na nAChR nebyl doposud systematicky prostudován.

Na mechanismus vysokoafinitní části inhibice můžeme usuzovat jen nepřímou. Víme, že má kapacitu inhibovat receptory z 10-20% a není výrazně napětově závislá, ale mírně závisí na koncentraci agonisty. Charakter této závislosti vylučuje kompetitivní působení těchto látek na místě pro agonistu. Některé práce však naznačují kompetitivní působení takrinu na nikotinové receptory (Zwart a kol. 2000). Tato práce předpokládá, že účinek takrinu je kombinací kompetitivní inhibice a kompetitivní potenciace a dochází zde tedy k vlivu na aktivitu receptorů se smíšeným obsazením na místech pro agonisty. Tento mechanismus inhibice tedy můžeme u svalového receptoru vyloučit. Proto můžeme předpokládat, že inhibice je alosterické povahy a že receptory obsazené inhibitorem na jiném, dosud neznámém místě, mají o 10-20% sníženou aktivitu. Vzhledem k tomu, že změny v aktivitě receptoru jsou přímo nebo nepřímou alosterickým mechanismem spojené i se změnami zdánlivé afinity vazby agonisty na jeho vazebné místo (Colquhoun 1998), může tento mechanismus částečně objasnit i mírnou závislost inhibice na koncentraci agonisty. Stejná relativní změna zdánlivé afinity se bude v různých částech aktivační křivky projevovat různou měrou ve změně stupně obsazení agonistou a aktivaci receptoru. Protože v okolí hodnoty EC_{50} agonisty je aktivační křivka nejvíce strmá, můžeme pozorovat výraznější relativní inhibici v této oblasti. Nemůžeme ale vyloučit ani jiné mechanismy vzniku závislosti stupně inhibice na koncentraci agonisty.

Tab. 5: Pro blokádu otevřeného kanálu je důležitý náboj molekuly a její velikost. V následující tabulce jsou vypsány jednotlivé parametry pro takrin, 7-MEOTA a K-577. Náboj molekuly a minimální projekční plocha jsme spočítali pomocí programu chemicalize.org a hloubku vazby jsme určili pomocí modelu pro blokátory otevřeného kanálu dle rovnice III.

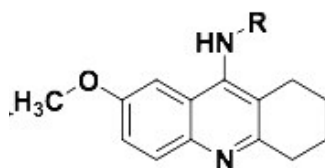
	THA	7-MEOTA	K-577
náboj při fyziologickém pH	+	+	+
minimální projekční plocha	30,6 Å ²	33,9 Å ²	50,7 Å ²
hloubka vazby do iontového kanálu	0,44	0,27	0,12



Obr. 26: Porovnání velikosti struktury takrinu, 7-MEOTA a K-577 s napěťovou závislostí a hloubkou vazby do iontového kanálu. a) Znázornění prostorového modelu molekuly takrinu, 7-MEOTA a K-577. Můžeme vidět, že velikost těchto látek se zvětšuje společně se skupinami, které jsou ke struktuře takrinu přidány na 7. a 9. uhlíku. S velikostí jednotlivých látek souvisí vypočítaná minimální projekční plocha, která je pro takrin - 30,6 Å², pro 7-MEOTA - 33,9 Å² a pro K-577 - 50,7 Å². b) Vynesení hodnot pIC₅₀ takrinu, 7-MEOTA a K-577 v závislosti na změně mem-bránového napětí. Předpokládáme že, velikost těchto látek souvisí s mírou jejich napěťové závislosti. Směrnice přímků linearizovaného modelu blokátoru otevřeného kanálu (dle rovnice III), určuje míru napěťové závislosti. Na tomto grafu můžeme pozorovat nejenom rozdílnou míru inhibice, ale především rozdíl ve směrnicích jednotlivých křivek. Účinek takrinu (znázorněn červeně) je tedy více napěťově závislý než účinek 7-MEOTA (znázorněn zeleně), který je závislý na napětí více než účinek K-577 (znázorněn černě). Podle míry napěťové závislosti lze spočítat, jak hluboko do iontového kanálu se jednotlivé látky dostávají ($\delta_{\text{THA}} = 0,44$; $\delta_{7\text{-MEOTA}} = 0,27$; $\delta_{\text{K-577}} = 0,12$).

5.2. Látky PC

V druhé části této diplomové práce jsme se ve spolupráci s Centrem biomedicínského výzkumu Univerzity v Hradci Králové zabývali studiem nově syntetizovaných látek odvozených od 7-MEOTA, které byly vytvořeny jako potenciální nové inhibitory AChE. Byla syntetizována série látek, které se lišily substitucí na aromatickém jádře (Obr. 26).



Obr. 26: Obecná struktura látek PC. Tyto látky jsou odvozené od 7-MEOTA a liší se substitucí na aromatickém jádře.

Testovali jsme látky vykazující různou mírou inhibice AChE. Větší skupinu látek jsme testovali na svalovém receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ a vybrané z nich také na neuronálním receptoru $\alpha 4\beta 2$. Celkem jsme testovali 7 látek označených jako 1-PC-6, 1-PC-13, 1-PC-32, 1-PC-37, 1-PC-41, 1-PC-48, 1-PC-49. Nejprve jsme studovali jejich účinek na svalovém receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$. Zjistili jsme, že tyto látky přímo interagují s tímto typem nikotinových receptorů a mají na něj inhibiční účinek. Nejúčinnějším inhibitorem byla látka 1-PC-13, která měla $IC_{50}=0,8 \mu M$, a naopak nejméně účinným inhibitorem byla látka 1-PC-6 s $IC_{50}= 8,7 \mu M$. Látky PC se nelišily pouze v inhibičních konstantách, ale také v Hillově koeficientu (pro to však nemáme žádné vysvětlení). Podle tvaru většiny inhibičních křivek je možné usuzovat, že by se i u těchto látek mohly vyskytovat dva inhibiční mechanismy. Jelikož jsme však tuto závislost stanovovali pouze do koncentrace $0,3 \mu M$ pro jednotlivé inhibitory a tato koncentrace u většiny látek PC stále inhibovala receptor $\alpha\beta\gamma\delta$ o 20-30%, můžeme inhibici při nižších koncentracích extrapolovat pouze nepřímo podle tvaru naměřené inhibiční křivky. Podobně je tomu u napěťové závislosti inhibice. Vzhledem k tomu, že tyto látky mají k aromatickému jádru připojeny poměrně velké substituenty (větší než měla látka K-577), předpokládáme, že pokud by blokovaly otevřený kanál, tak by jejich napěťová závislost byla velice mírná či žádná. Závislost inhibice látek PC na koncentraci ACh jsme měřili jen v pár pokusech u látek 1-PC-6, 1-PC-13, 1-PC-32 a 1-PC-47 (data nejsou ukázána). Zde jsme pozorovali pokles míry inhibice se snižující se koncentrací ACh.

Což nasvědčuje nekompetitivnímu charakteru této inhibice. Přesný mechanismus inhibičního účinku látek PC na svalovém receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ však můžeme usuzovat jen nepřímo.

Vybrané látky PC jsme testovali i na neuronálním receptoru $\alpha 4\beta 2$, který patří mezi nejvíce zastoupené nAChR v CNS. I na tomto receptoru jsme pozorovali inhibiční účinek vybraných derivátů. Látky 1-PC-6 a 1-PC-32 inhibovaly $\alpha 4\beta 2$ receptor méně účinně než receptor $\alpha\beta\gamma\delta$. Látka 1-PC-48 tento receptorový typ naopak inhibovala účinněji. Přestože tyto deriváty inhibovaly svalový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$ nejspíše přes dva inhibičními mechanismy, na neuronálním receptoru $\alpha 4\beta 2$ působily pravděpodobně pouze prostřednictvím jednoho mechanismu, který je schopný se vzrůstající koncentrací těchto látek receptor plně inhibovat.

Hodnoty IC_{50} pro jednotlivé struktury jsou vypsány v tabulce níže (Tab. 6). Můžeme pozorovat, že schopnost jednotlivých látek PC inhibovat AChE a nikotinové receptory spolu nekoreluje. Podle míry inhibice jedné struktury tedy nelze předpovědět, jak bude daná látka inhibovat strukturu další. Například látka 1-PC-49 inhibovala AChE nejméně účinně, ale receptor $\alpha\beta\gamma\delta$ inhibovala nejúčinněji. A naopak látka 1-PC-48, která inhibovala AChE nejúčinněji, patřila ke slabším inhibitorům $\alpha\beta\gamma\delta$ a středním inhibitorům $\alpha 4\beta 2$.

Na žádném testovaném nikotinovém receptoru jsme nezaznamenali schopnost látek PC aktivovat tyto receptory nebo potencovat ACh odpovědi. Zdá se tedy, že tyto látky mají pouze inhibiční účinek. Mezi jednotlivými podjednotkami nAChR je však jistá variabilita a je tedy možné, že na jiném typu receptoru by tyto látky mohly mít odlišné farmakologické vlastnosti.

Jelikož byly tyto látky syntetizovány jako nové inhibitory AChE, které by případně mohly najít uplatnění v terapii AD, jejich inhibiční účinek na nikotinové receptory je výraznou nevýhodou. Předpokládalo se, že pokud by inhibitory AChE současně působily na nAChR jako pozitivní alosterické modulátory, mohl by to být nový směr v posilování cholinergní transmise při terapii (Maelicke a kol. 2000). Tyto látky by například při nízkých koncentracích přirozeně se vyskytujícího agonisty ACh, byly schopny prodlužovat otevření kanálu či byly schopny zvyšovat afinitu receptoru k ACh. Inhibiční účinek derivátu 7-MEOTA na nAChR je tedy nevýhodou, neboť by tak mohlo docházet k zeslabování efektu, který mají jako inhibitory AChE. Přestože by tedy jejich působením docházelo ke zvyšování doby výskytu ACh v synaptické štěrbině, současná inhibice nAChR by mohla tento účinek činit méně efektivní či dokonce cholinergní transmissi zeslabovat.

Tab. 6: Hodnoty IC_{50} pro jednotlivé látky PC na AChE, receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ a receptoru $\alpha4\beta2$. Hodnoty IC_{50} pro AChE nám byly poskytnuty Dr. Soukupem z Centra biomedicínského výzkumu Univerzitní nemocnice v Hradci Králové.

Látka	IC_{50} AChE	IC_{50} nAChR $\alpha\beta\gamma\delta$	IC_{50} nAChR $\alpha4\beta2$
1-PC-6	$5,3 \pm 1,0$	$8,7 \pm 1,6$	$11,2 \pm 2,1$
1-PC-13	x	$0,8 \pm 1,9$	-
1-PC-32	$1,6 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,5$	$10,6 \pm 1,4$
1-PC-37	$2,0 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,3$	-
1-PC41	$1,8 \pm 0,3$	$8,1 \pm 3,2$	-
1-PC-48	$1,0 \pm 0,2$	$6,8 \pm 2,6$	$5,3 \pm 0,4$
1-PC-49	$11,9 \pm 2,3$	$1,7 \pm 0,9$	-

6. Závěr

V této diplomové práci jsme se zabývali účinkem takrinu a jeho derivátů na nikotinové acetylcholinové receptory svalového a neuronálního typu. Naše výsledky lze stručně shrnout do následujících bodů:

- Takrin, 7-MEOTA a K-577 koncentračně závislým způsobem inhibují svalový nikotinový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$. Tato inhibice je reverzibilní a napětově závislá. U všech těchto látek jsme pozorovali dvojí mechanismus inhibice. Vysokoafinitní, která se projevovala při nízké koncentraci inhibitorů a nízkoafinitní, projevující se s jejich rostoucí koncentrací. Vysokoafinitní mechanismus je nejspíše alosterické povahy a snižuje aktivitu receptoru o 10-20%. Nízkoafinitní mechanismus je schopný úplné inhibice receptoru a dochází k němu prostřednictvím blokády otevřeného kanálu.
- Podařilo se nám lépe objasnit mechanismus účinku takrinu, 7-MEOTA a K-577 na svalovém embryonálním nikotinovém acetylcholinovém receptoru. Přestože jsme na tomto receptoru nepozorovali schopnost takrinu a jeho derivátů potencovat acetylcholinové odpovědi, jako jsme to u těchto látek pozorovali na neuronálním receptoru $\alpha4\beta2$, je možné se domnívat, že mechanismy uplatňující se na svalovém receptoru $\alpha\beta\gamma\delta$ by mohly být velmi podobné těm, které se projevují na neuronálním receptoru $\alpha4\beta2$, a to přestože ve výsledku vedou k odlišnému účinku.
- Nově syntetizované deriváty 7-MEOTA (látky PC) inhibovaly různě účinně svalový receptor $\alpha\beta\gamma\delta$. Tato inhibice byla reverzibilní a koncentračně závislá. Je možné předpokládat, že i na tomto receptorovém podtypu by se mohly uplatňovat dva mechanismy účinku. Vybrané látky PC jsme testovali také na neuronálním receptoru $\alpha4\beta2$. Na tomto receptoru jsme pozorovali jeden inhibiční mechanismus. U testovaných látek PC jsme nepozorovali žádný potenciační účinek na neuronální ani na svalový receptor.

Přímý inhibiční účinek všech studovaných látek na nikotinové receptory by byl spíše nevýhodou v jejich případném užití v terapii Alzheimerovy choroby.

7. Použitá literatura

- Aidley, D.J., Stanfield, P.R. (1996) *Ion Channels: Molecules In Action*. Cambridge, U.K., Cambridge University Press, pp. 307.
- Albuquerque, E.X., Alkondon, M., Pereira, E.F., Castro, N.G., Schrattenholz, A., Barbosa, C.T., Bonfante-Cabarcas, R., Aracava, Y., Eisenberg, H.M., Maelicke, A. (1997) Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J Pharmacol Exp Ther* **280**: 1117-1136.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Alkondon, M., Rogers, S.W. (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **89**: 73-120.
- Alkondon, M., Albuquerque, E.X. (2006) Subtype-specific inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by choline: a regulatory pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **318**: 268-275.
- Alkondon, M., Braga, M.F., Pereira, E.F., Maelicke, A., Albuquerque, E.X. (2000) $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and modulation of gabaergic synaptic transmission in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* **393**: 59-67.
- Alkondon, M., Pereira, E.F., Albuquerque, E.X. (1998) α -bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res* **810**: 257-263.
- Alkondon, M., Pereira, E.F., Cortes, W.S., Maelicke, A., Albuquerque, E.X. (1997) Choline is a selective agonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci* **9**: 2734-2742.
- Anand, R., Conroy, W.G., Schoepfer, R., Whiting, P., Lindstrom, J. (1991) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J Biol Chem* **266**: 11192-11198.
- Andersen, N., Corradi, J., Sine, S.M., Bouzat, C. (2013) Stoichiometry for activation of neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 20819-20824.
- Arias, H.R., Bhumireddy, P., Bouzat, C. (2006) Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 1254-1276.
- Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S., Quirion, R. (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol* **68**: 209-245.

- Azam, L., McIntosh, J.M. (2009) Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacol Sin* **30**: 771-783.
- Badio, B., Daly, J.W. (1994) Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. *Mol Pharmacol* **45**: 563-569.
- Olivera, B.M. (2002) Conus venom peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 25-47
- Barik, J., Dajas-Bailador, F., Wonnacott, S. (2005) Cellular responses to nicotinic receptor activation are decreased after prolonged exposure to galantamine in human neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* **145**: 1084-1092.
- Beeson, D., Amar, M., Bermudez, I., Vincent, A., Newsom-Davis, J. (1996) Stable functional expression of the adult subtype of human muscle acetylcholine receptor following transfection of the human rhabdomyosarcoma cell line TE671 with cDNA encoding the epsilon subunit. *Neurosci Lett* **207**: 57-60.
- Beranek, R., Vyskocil, F. (1967) The action of tubocurarine and atropine on the normal and denervated rat diaphragm. *J Physiol* **188**: 53-66.
- Bertrand, D., Bertrand, S., Ballivet, M. (1992) Pharmacological properties of the homomeric alpha 7 receptor. *Neurosci Lett* **146**: 87-90.
- Bertrand, D., Bertrand, S., Ballivet, M. (1992) Pharmacological properties of the homomeric alpha 7 receptor. *Neurosci Lett* **146**: 87-90.
- Birks, J. (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD005593.
- Bolognesi, M.L., Bartolini, M., Mancini, F., Chiriano, G., Ceccarini, L., Rosini, M., Milelli, A., Tumiatti, V., Andrisano, V., Melchiorre, C. (2010) Bis(7)-tacrine derivatives as multitarget-directed ligands: Focus on anticholinesterase and anti-amyloid activities. *ChemMedChem* **5**: 1215-1220.
- Boulter, J., Evans, K., Goldman, D., Martin, G., Treco, D., Heinemann, S., Patrick, J. (1986) Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *Nature* **319**: 368-374.
- Brejč, K., van Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A.B., Sixma, T.K. (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**: 269-276.
- Broide, R.S., Leslie, F.M. (1999) The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol* **20**: 1-16.
- Burns, A., Iliffe, S. (2009) Alzheimer's disease. *BMJ* **338**: b158.

- Camps, P., Formosa, X., Galdeano, C., Gomez, T., Munoz-Torrero, D., Ramirez, L., Viayna, E., Gomez, E., Isambert, N., Lavilla, R., Badia, A., Clos, M.V., Bartolini, M., Mancini, F., Andrisano, V., Bidon-Chanal, A., Huertas, O., Dafni, T., Luque, F.J. (2010) Tacrine-based dual binding site acetylcholinesterase inhibitors as potential disease-modifying anti-Alzheimer drug candidates. *Chem Biol Interact* **187**: 411-415.
- Canti, C., Bodas, E., Marsal, J., Solsona, C. (1998) Tacrine and physostigmine block nicotinic receptors in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. *Eur J Pharmacol* **363**: 197-202.
- Celie, P.H., van Rossum-Fikkert, S.E., van Dijk, W.J., Brejc, K., Smit, A.B., Sixma, T.K. (2004) Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* **41**: 907-914.
- Chavez-Noriega, L.E., Crona, J.H., Washburn, M.S., Urrutia, A., Elliott, K.J., Johnson, E.C. (1997) Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h alpha 2 beta 2, h alpha 2 beta 4, h alpha 3 beta 2, h alpha 3 beta 4, h alpha 4 beta 2, h alpha 4 beta 4 and h alpha 7 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **280**: 346-356.
- Chen, Y., Wu, L., Fang, Y., He, Z., Peng, B., Shen, Y., Xu, Q. (2009) A novel mutation of the nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNA4 in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* **83**: 152-156.
- Colquhoun, D. (1998) Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol* **125**: 924-947.
- Colquhoun, D., Sakmann, B. (1985) Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J Physiol* **369**: 501-557.
- Cooper, E., Couturier, S., Ballivet, M. (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* **350**: 235-238.
- Corringer, P.J., Bertrand, S., Galzi, J.L., Devillers-Thiery, A., Changeux, J.P., Bertrand, D. (1999) Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **22**: 831-843.
- Crismon, M.L. (1994) Tacrine: first drug approved for Alzheimer's disease. *Ann Pharmacother* **28**: 744-751.
- Daly, J.W. (2005) Nicotinic agonists, antagonists, and modulators from natural sources. *Cell Mol Neurobiol* **25**: 513-552.

- Dani, J.A., Bertrand, D. (2007) Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 699-729.
- Darreh-Shori, T., Modiri, N., Blennow, K., Baza, S., Kamil, C., Ahmed, H., Andreasen, N., Nordberg, A. (2011) The apolipoprotein E epsilon4 allele plays pathological roles in AD through high protein expression and interaction with butyrylcholinesterase. *Neurobiol Aging* **32**: 1236-1248.
- Davis, K.L., Mohs, R.C., Marin, D., Purohit, D.P., Perl, D.P., Lantz, M., Austin, G., Haroutunian, V. (1999) Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *JAMA* **281**: 1401-1406.
- Davis, K.L., Yamamura, H.I. (1978) Cholinergic underactivity in human memory disorders. *Life Sci* **23**: 1729-1733.
- DeKosky, S.T., Ikonomic, M.D., Styren, S.D., Beckett, L., Wisniewski, S., Bennett, D.A., Cochran, E.J., Kordower, J.H., Mufson, E.J. (2002) Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* **51**: 145-155.
- Descarries, L., Gisiger, V., Steriade, M. (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* **53**: 603-625.
- Dittert, I., Benedikt, J., Vyklicky, L., Zimmermann, K., Reeh, P.W., Vlachova, V. (2006) Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods* **151**: 178-185.
- Dittert, I., Vlachova, V., Knotkova, H., Vitaskova, Z., Vyklicky, L., Kress, M., Reeh, P.W. (1998) A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *J Neurosci Methods* **82**: 195-201.
- Drukarch, B., Kits, K.S., Van der Meer, E.G., Lodder, J.C., Stoof, J.C. (1987) 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA), an alleged drug for the treatment of Alzheimer's disease, inhibits acetylcholinesterase activity and slow outward K⁺ current. *Eur J Pharmacol* **141**: 153-157.
- El-Malah, A., Gedawy, E.M., Kassab, A.E., Salam, R.M. (2013) Novel Tacrine Analogs as Potential Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease. *Arch Pharm (Weinheim)*
- Elenes, S., Auerbach, A. (2002) Desensitization of diliganded mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor channels. *J Physiol* **541**: 367-383.
- Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E., Heinemann, S. (1994) Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* **79**: 705-715.

- Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinemann, S.F., Boulter, J. (2001) $\alpha 10$: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3501-3506.
- Engel, A.G. (2008) Congenital myasthenic syndromes. *Handb Clin Neurol* **91**: 285-331.
- Eustace, A., Coen, R., Walsh, C., Cunningham, C.J., Walsh, J.B., Coakley, D., Lawlor, B.A. (2002) A longitudinal evaluation of behavioural and psychological symptoms of probable Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* **17**: 968-973.
- Farlow, M., Gracon, S.I., Hershey, L.A., Lewis, K.W., Sadowsky, C.H., Dolan-Ureno, J. (1992) A controlled trial of tacrine in Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *JAMA* **268**: 2523-2529.
- Fenster, C.P., Rains, M.F., Noerager, B., Quick, M.W., Lester, R.A. (1997) Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J Neurosci* **17**: 5747-5759.
- Fernandez-Bachiller, M.I., Perez, C., Monjas, L., Rademann, J., Rodriguez-Franco, M.I. (2012) New tacrine-4-oxo-4H-chromene hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and beta-amyloid-reducing properties. *J Med Chem* **55**: 1303-1317.
- Flynn, D.D., Mash, D.C. (1989) Multiple in vitro interactions with and differential in vivo regulation of muscarinic receptor subtypes by tetrahydroaminoacridine. *J Pharmacol Exp Ther* **250**: 573-581.
- Frazier, C.J., Buhler, A.V., Weiner, J.L., Dunwiddie, T.V. (1998) Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J Neurosci* **18**: 8228-8235.
- Galzi, J.L., Devillers-Thiery, A., Hussy, N., Bertrand, S., Changeux, J.P., Bertrand, D. (1992) Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* **359**: 500-505.
- Ge, S., Dani, J.A. (2005) Nicotinic acetylcholine receptors at glutamate synapses facilitate long-term depression or potentiation. *J Neurosci* **25**: 6084-6091.
- Geula, C., Darvesh, S. (2004) Butyrylcholinesterase, cholinergic neurotransmission and the pathology of Alzheimer's disease. *Drugs Today (Barc)* **40**: 711-721.
- Geula, C., Wu, C.K., Saroff, D., Lorenzo, A., Yuan, M., Yankner, B.A. (1998) Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* **4**: 827-831.
- Giniatullin, R., Nistri, A., Yakel, J.L. (2005) Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci* **28**: 371-378.

- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-182.
- Gotti, C., Zoli, M., Clementi, F. (2006) Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* **27**: 482-491.
- Green, C.R., Mohs, R.C., Schmeidler, J., Aryan, M., Davis, K.L. (1993) Functional decline in Alzheimer's disease: a longitudinal study. *J Am Geriatr Soc* **41**: 654-661.
- Grutter, T., Le Novere, N., Changeux, J.P. (2004) Rational understanding of nicotinic receptors drug binding. *Curr Top Med Chem* **4**: 645-650.
- Gura, T. (2008) Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places. *Nat Med* **14**: 894.
- Halevi, S., Yassin, L., Eshel, M., Sala, F., Sala, S., Criado, M., Treinin, M. (2003) Conservation within the RIC-3 gene family. Effectors of mammalian nicotinic acetylcholine receptor expression. *J Biol Chem* **278**: 34411-34417.
- Hall, Z.W., Sanes, J.R. (1993) Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* **72 Suppl**: 99-121.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**: 85-100.
- Harpsoe, K., Ahring, P.K., Christensen, J.K., Jensen, M.L., Peters, D., Balle, T. (2011) Unraveling the high- and low-sensitivity agonist responses of nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* **31**: 10759-10766.
- Hernandez, S.C., Vicini, S., Xiao, Y., Davila-Garcia, M.I., Yasuda, R.P., Wolfe, B.B., Kellar, K.J. (2004) The nicotinic receptor in the rat pineal gland is an alpha3beta4 subtype. *Mol Pharmacol* **66**: 978-987.
- Hille, B. (1992) Ionic Channels of Excitable Membranes. *Inc Sunderland, MA* 607.
- Ji, D., Lape, R., Dani, J.A. (2001) Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* **31**: 131-141.
- Karlin, A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* **3**: 102-114.
- Karlin, A., Cox, R.N., Dipaola, M., Holtzman, E., Kao, P.N., Lobel, P., Wang, L., Yodh, N. (1986) Functional domains of the nicotinic acetylcholine receptor. *Ann NY Acad Sci* **463**: 53-69.

- Kawaja, M.D., Flumerfelt, B.A., Hryciyshyn, A.W. (1990) A comparison of the subnuclear and ultrastructural distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat interpeduncular nucleus. *Brain Res Bull* **24**: 517-523.
- Kendziorra, K., Wolf, H., Meyer, P.M., Barthel, H., Hesse, S., Becker, G.A., Luthardt, J., Schildan, A., Patt, M., Sorger, D., Seese, A., Gertz, H.J., Sabri, O. (2011) Decreased cerebral alpha4beta2* nicotinic acetylcholine receptor availability in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease assessed with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **38**: 515-525.
- Knapp, M.J., Knopman, D.S., Solomon, P.R., Pendlebury, W.W., Davis, C.S., Gracon, S.I. (1994) A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *JAMA* **271**: 985-991.
- Kozurkova, M., Hamulakova, S., Gazova, Z., Paulikova, H., Kristian, P. (2011) Neuroactive Multifunctional Tacrine Congeners with Cholinesterase, Anti-Amyloid Aggregation and Neuroprotective Properties. *Pharmaceuticals* **4**: 382-418.
- Krusek, J., Dittert, I., Hendrych, T., Hnik, P., Horak, M., Petrovic, M., Sedlacek, M., Susankova, K., Svobodova, L., Tousova, K., Ujec, E., Vlachova, V., Vyklicky, L., Vyskocil, F., Vyklicky, L.J. (2004) Activation and modulation of ligand-gated ion channels. *Physiol Res* **53 Suppl 1**: S103-S113.
- Krusek, J., Sepsova, V., Skrenkova, K., Soukup, O., Zdarova Karasova, J., Vyskocil, F. (2013) The inhibition and potentiation of neuronal nicotinic receptors by tacrine, 7-MEOTA and K-577. *The 11th International Conference On Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Florence*
- Lester, H.A., Dibas, M.I., Dahan, D.S., Leite, J.F., Dougherty, D.A. (2004) Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* **27**: 329-336.
- Lindstrom, J.M., Seybold, M.E., Lennon, V.A., Whittingham, S., Duane, D.D. (1976) Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology* **26**: 1054-1059.
- Lingle, C.J., Maconochie, D., Steinbach, J.H. (1992) Activation of skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *J Membr Biol* **126**: 195-217.
- Loring, R.H., Schulz, D.W., Zigmond, R.E. (1989) Characterization of neuronal nicotinic receptors using neuronal bungarotoxin. *Prog Brain Res* **79**: 109-116.
- Luther, M.A., Schoepfer, R., Whiting, P., Casey, B., Blatt, Y., Montal, M.S., Montal, M., Lindstrom, J. (1989) A muscle acetylcholine receptor is expressed in the human cerebellar medulloblastoma cell line TE671. *J Neurosci* **9**: 1082-1096.

- Macklin, K.D., Maus, A.D., Pereira, E.F., Albuquerque, E.X., Conti-Fine, B.M. (1998) Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **287**: 435-439.
- Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E.X., Zerlin, M. (2001) Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* **49**: 279-288.
- Maelicke, A., Schrattenholz, A., Samochocki, M., Radina, M., Albuquerque, E.X. (2000) Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* **113**: 199-206.
- Maelicke, A., Albuquerque, E.X. (1996) New approach to drug therapy in Alzheimer's dementia Alfred Maelicke and Edson X. Albuquerque. *Drug Discovery Today* **1**: 53-59.
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., Kivipelto, M. (2010) Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* **9**: 702-716.
- Mansvelder, H.D., McGehee, D.S. (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* **27**: 349-357.
- Marini, C., Guerrini, R. (2007) The role of the nicotinic acetylcholine receptors in sleep-related epilepsy. *Biochem Pharmacol* **74**: 1308-1314.
- Mathie, A., Cull-Candy, S.G., Colquhoun, D. (1991) Conductance and kinetic properties of single nicotinic acetylcholine receptor channels in rat sympathetic neurones. *J Physiol* **439**: 717-750.
- Maus, A.D., Pereira, E.F., Karachunski, P.I., Horton, R.M., Navaneetham, D., Macklin, K., Cortes, W.S., Albuquerque, E.X., Conti-Fine, B.M. (1998) Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **54**: 779-788.
- Minger, S.L., Esiri, M.M., McDonald, B., Keene, J., Carter, J., Hope, T., Francis, P.T. (2000) Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbance in patients with dementia. *Neurology* **55**: 1460-1467.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M., Unwin, N. (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* **288**: 765-786.
- Moroni, M., Vijayan, R., Carbone, A., Zwart, R., Biggin, P.C., Bermudez, I. (2008) Non-agonist-binding subunit interfaces confer distinct functional signatures to the alternate stoichiometries of the alpha4beta2 nicotinic receptor: an alpha4-alpha4 interface is required for Zn²⁺ potentiation. *J Neurosci* **28**: 6884-6894.

- Moroni, M., Zwart, R., Sher, E., Cassels, B.K., Bermudez, I. (2006) alpha4beta2 nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Mol Pharmacol* **70**: 755-768.
- Neher, E., Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**: 799-802.
- Nelson, M.E., Kuryatov, A., Choi, C.H., Zhou, Y., Lindstrom, J. (2003) Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **63**: 332-341.
- Newhouse, P.A., Potter, A., Corwin, J., Lenox, R. (1994) Age-related effects of the nicotinic antagonist mecamylamine on cognition and behavior. *Neuropsychopharmacology* **10**: 93-107.
- Nitta, A., Katono, Y., Itoh, A., Hasegawa, T., Nabeshima, T. (1994) Nicotine reverses scopolamine-induced impairment of performance in passive avoidance task in rats through its action on the dopaminergic neuronal system. *Pharmacol Biochem Behav* **49**: 807-812.
- Nordberg, A., Lundqvist, H., Hartvig, P., Lilja, A., Langstrom, B. (1995) Kinetic analysis of regional (S)(-)-11C-nicotine binding in normal and Alzheimer brains--in vivo assessment using positron emission tomography. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **9**: 21-27.
- Nordberg, A., Winblad, B. (1986) Reduced number of [3H]nicotine and [3H]acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains. *Neurosci Lett* **72**: 115-119.
- Olsen, R.W., Yang, J., King, R.G., Dilber, A., Stauber, G.B., Ransom, R.W. (1986) Barbiturate and benzodiazepine modulation of GABA receptor binding and function. *Life Sci* **39**: 1969-1976.
- Osterrieder, W. (1987) 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) is a potent blocker of cardiac potassium channels. *Br J Pharmacol* **92**: 521-525.
- Papke, R.L., Bencherif, M., Lippiello, P. (1996) An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neurosci Lett* **213**: 201-204.
- Papke, R.L., Meyer, E., Nutter, T., Uteshev, V.V. (2000) alpha7 receptor-selective agonists and modes of alpha7 receptor activation. *Eur J Pharmacol* **393**: 179-195.
- Paterson, D., Nordberg, A. (2000) Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* **61**: 75-111.

- Patocka, J. (1986) Anticholinesterase activity of 9-amino-7-methoxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroacridine and some derivatives and analogues. *Sbornik Ved Prac VLVDU Hradec Kralove* **102**: 123-140.
- Patocka, J., Bielavsky, J. (1991) Biotransformation of the anticholinesterase agent, 9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridine. *Cesk Farm* **40**: 130-132.
- Patocka, J., Bielavsky, J., Fusek, J. (1994) Advances in synthesis of tacrine derivatives as potential drugs for treatment of Alzheimers disease. *Homeostasis in health and disease* **35**: 299-301.
- Patocka, J., Jun, D., Kuca, K. (2008) Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimers disease. *Current drug metabolism* **9**: 332-335.
- Perry, D.C., Davila-Garcia, M.I., Stockmeier, C.A., Kellar, K.J. (1999) Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J Pharmacol Exp Ther* **289**: 1545-1552.
- Perry, E.K., Morris, C.M., Court, J.A., Cheng, A., Fairbairn, A.F., McKeith, I.G., Irving, D., Brown, A., Perry, R.H. (1995) Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. *Neuroscience* **64**: 385-395.
- Perry, E.K., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P.H., Perry, R.H. (1978) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J* **2**: 1457-1459.
- Picciotto, M.R., Caldarone, B.J., Brunzell, D.H., Zachariou, V., Stevens, T.R., King, S.L. (2001) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacol Ther* **92**: 89-108.
- Picciotto, M.R., Zoli, M. (2002) Nicotinic receptors in aging and dementia. *J Neurobiol* **53**: 641-655.
- Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., Cotman, C.W. (1991) In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* **563**: 311-314.
- Potter, A., Corwin, J., Lang, J., Piasecki, M., Lenox, R., Newhouse, P.A. (1999) Acute effects of the selective cholinergic channel activator (nicotinic agonist) ABT-418 in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* **142**: 334-342.
- Prince, R.J., Pennington, R.A., Sine, S.M. (2002) Mechanism of tacrine block at adult human muscle nicotinic acetylcholine receptors. *J Gen Physiol* **120**: 369-393.

- Quik, M., Philie, J., Choremis, J. (1997) Modulation of alpha7 nicotinic receptor-mediated calcium influx by nicotinic agonists. *Mol Pharmacol* **51**: 499-506.
- Raftery, M.A., Hunkapiller, M.W., Strader, C.D., Hood, L.E. (1980) Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* **208**: 1454-1456.
- Rogawski, M.A. (1987) Tetrahydroaminoacridine blocks voltage-dependent ion channels in hippocampal neurons. *Eur J Pharmacol* **142**: 169-172.
- Romano, C., Goldstein, A. (1980) Stereospecific nicotine receptors on rat brain membranes. *Science* **210**: 647-650.
- Romero, A., Cacabelos, R., Oset-Gasque, M.J., Samadi, A., Marco-Contelles, J. (2013) Novel tacrine-related drugs as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett* **23**: 1916-1922.
- Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., et al. (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**: 1467-1472.
- Schrattenholz, A., Pereira, E.F., Roth, U., Weber, K.H., Albuquerque, E.X., Maelicke, A. (1996) Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Mol Pharmacol* **49**: 1-6.
- Sine, S.M., Engel, A.G. (2006) Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* **440**: 448-455.
- Sine, S.M., Steinbach, J.H. (1984) Agonists block currents through acetylcholine receptor channels. *Biophys J* **46**: 277-283.
- Smit, A.B., Syed, N.I., Schaap, D., van Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K.S., Lodder, H., van der Schors, R.C., van Elk, R., Sorgedrager, B., Brejc, K., Sixma, T.K., Geraerts, W.P. (2001) A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* **411**: 261-268.
- Soukup, O., Jun, D., Zdarova-Karasova, J., Patocka, J., Musilek, K., Korabecny, J., Krusek, J., Kaniakova, M., Sepsova, V., Mandikova, J., Trejtnar, F., Pohanka, M., Drtinova, L., Pavlik, M., Tobin, G., Kuca, K. (2013) A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Curr Alzheimer Res* **10**: 893-906.
- Svensson, A.L., Nordberg, A. (1996) Tacrine interacts with an allosteric activator site on alpha 4 beta 2 nAChRs in M10 cells. *Neuroreport* **7**: 2201-2205.
- Svobodova, L., Krusek, J., Hendrych, T., Vyskocil, F. (2006) Physostigmine modulation of acetylcholine currents in COS cells transfected with mouse muscle nicotinic receptor. *Neurosci Lett* **401**: 20-24.

- Terry, A.V.J., Buccafusco, J.J. (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 821-827.
- Toledano-Gasca, A. (1988) Hypotheses concerning the aetiology of Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* **21 Suppl 1**: 17-25.
- Trinh, N.H., Hoblyn, J., Mohanty, S., Yaffe, K. (2003) Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis. *JAMA* **289**: 210-216.
- Turner, J.R., Kellar, K.J. (2005) Nicotinic cholinergic receptors in the rat cerebellum: multiple heteromeric subtypes. *J Neurosci* **25**: 9258-9265.
- Umbriaco, D., Watkins, K.C., Descarries, L., Cozzari, C., Hartman, B.K. (1994) Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: an electron microscopic study in serial sections. *J Comp Neurol* **348**: 351-373.
- Unwin, N. (1993) Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol* **229**: 1101-1124.
- Unwin, N. (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J Mol Biol* **346**: 967-989.
- Vijayaraghavan, S., Karami, A., Aeinehband, S., Behbahani, H., Grandien, A., Nilsson, B., Ekdahl, K.N., Lindblom, R.P., Piehl, F., Darreh-Shori, T. (2013) Regulated Extracellular Choline Acetyltransferase Activity- The Plausible Missing Link of the Distant Action of Acetylcholine in the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *PLoS One* **8**: e65936.
- Wang, N., Orr-Urtreger, A., Korczyn, A.D. (2002) The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in autonomic ganglia: lessons from knockout mice. *Prog Neurobiol* **68**: 341-360.
- Watanabe, T., Yamagata, N., Takasaki, K., Sano, K., Hayakawa, K., Katsurabayashi, S., Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M. (2009) Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* **1249**: 222-228.
- Watkins, P.B., Zimmerman, H.J., Knapp, M.J., Gracon, S.I., Lewis, K.W. (1994) Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA* **271**: 992-998.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T., Delon, M.R. (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **215**: 1237-1239.

- Wilson, A.L., Langley, L.K., Monley, J., Bauer, T., Rottunda, S., McFalls, E., Kovera, C., McCarten, J.R. (1995) Nicotine patches in Alzheimer's disease: pilot study on learning, memory, and safety. *Pharmacol Biochem Behav* **51**: 509-514.
- Woodhull, A.M. (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J Gen Physiol* **61**: 687-708.
- Woolf, A., Burkhart, K., Caraccio, T., Litovitz, T. (1996) Self-poisoning among adults using multiple transdermal nicotine patches. *J Toxicol Clin Toxicol* **34**: 691-698.
- Zeiger, E., Erexson, G., Mortelmans, K., Thilagar, A. (1997) Genetic toxicity studies of 1,2,3,4-tetrahydro-9-acridinamine (tacrine). *Mutat Res* **393**: 189-197.
- Zwart, R., van Kleef, R.G., Gotti, C., Smulders, C.J., Vijverberg, H.P. (2000) Competitive potentiation of acetylcholine effects on neuronal nicotinic receptors by acetylcholinesterase-inhibiting drugs. *J Neurochem* **75**: 2492-2500.
- Zwart, R., Vijverberg, H.P. (1998) Four pharmacologically distinct subtypes of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* **54**: 1124-1131.