

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Doktorské studijní programy v biomedicíně
Katedra fyziologie živočichů



Mgr. Alena Randáková

Mechanismy aktivace muskarinového M_1 receptoru atypickými agonisty

Activation mechanisms of muscarinic M_1 receptor by atypical agonists

Disertační práce

Pracoviště: Fyziologický ústav Akademie věd České republiky v.v.i.

Oddělení neurochemie

Vedoucí práce: **MUDr. Vladimír Doležal, DrSc.**

Praha, 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační 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 dne

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Dr. Vladimíru Doležalovi za jeho trpělivost, ochotu a čas který mi věnoval a Dr. Janu Jakubíkovi za umožnění spolupráce na zajímavém projektu, všestrannou pomoc a podporu. Celému kolektivu oddělení neurochemie děkuji za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	6
ABSTRAKT.....	7
1. LITERÁRNÍ ÚVOD.....	10
1.1 Muskarinové acetylcholinové receptory.....	10
1.2 Přenos signálu muskarinovými receptory.....	12
1.3 Muskarinové receptory v léčbě onemocnění centrálního a periferního nervového systému.....	14
1.4 Struktura muskarinových receptorů.....	17
1.4.1 Zařazení muskarinových receptorů.....	17
1.4.2 Transmembránové uspořádání.....	18
1.4.3 Ortosterické vazebné místo.....	20
1.4.4 Alosterická vazebná místa.....	22
1.4.5 Oblasti muskarinových receptorů odpovídající za spřáhování s G-proteiny.....	23
1.5 Aktivace signálních drah muskarinových receptorů.....	24
1.5.1 Aktivace muskarinových receptorů.....	24
1.5.2 Dynamika aktivace muskarinových receptorů.....	28
1.6 Možnosti selektivního ovlivnění muskarinových receptorů.....	29
1.6.1 Selektivní antagonisté muskarinových receptorů.....	29
1.6.2 Alosterické modulátory muskarinových receptorů.....	31
1.6.2.1 Muskarinové toxiny.....	36
1.6.3 Funkčně selektivní agonisté muskarinových receptorů (atypičtí agonisté).....	37
1.6.3.1 Selektivní alosteričtí agonisté.....	37
1.6.3.2 Selektivní ektopičtí agonisté.....	38
1.6.3.3 Bitopiční agonisté.....	39
1.6.3.4 Selektivita agonistů k určité signální dráze (agonist bias).....	43
2 CÍL PRÁCE.....	44
3 MATERIÁL A METODY.....	45
3.1 Použité chemikálie.....	45

3.2	Mutageneze lidského muskarinového M ₁ receptoru a příprava buněčných linií.....	45
3.3	Buněčné kultury a příprava membrán.....	46
3.4	Stanovení proteinů.....	47
3.5	Vazebné studie.....	47
3.6	Akumulace inositolfosfátů.....	48
3.7	Mikrofluorimetrické stanovení koncentrace nitrobuněčných vápenatých iontů	49
3.8	Analýza dat.....	50
4	VÝSLEDKY.....	53
4.1	Vliv mutací na vazebné vlastnosti M ₁ receptoru.....	53
4.1.1	Stanovení exprese a afinity pro NMS.....	53
4.1.2	Vliv mutací na vazbu agonistů.....	54
4.1.3	Vliv mutací na neodmyvatelnou vazbu xanomelinu.....	56
4.2	Vliv mutací na aktivaci receptoru.....	58
4.2.1	Vliv mutací na akumulaci inositolfosfátů.....	58
4.2.2	Vliv mutací na aktivaci M ₁ receptoru neodmyvatelně navázaným xanomelinem.....	61
4.2.3	Vliv mutací na uvolňování vápenatých iontů z nitrobuněčných zdrojů stimulované agonisty.....	63
4.2.4	Vliv mutací na hladinu nitrobuněčných vápenatých iontů vyvolanou neodmyvatelně navázaným xanomelinem.....	68
5	DISKUZE.....	70
6	ZÁVĚR.....	77
7	LITERATURA.....	78
8	SEZNAM PŘÍLOH.....	92
9	PŘÍLOHY.....	93

SEZNAM ZKRATEK

AC	adenylylcykláza
APP	protein prekurzor amyloidu (amyloid precursor protein)
BQCA	benzylchinolonkarboxylová kyselina (benzylquinoloncarboxylic acid)
CHO	fibroblasty z ovárií zlatého křečka (Chinese hamster ovary)
CNS	centrální nervový systém
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EL	extracelulární klička (extracellular loop)
EC ₅₀	koncentrace vyvolávající polovinu max. odpovědi (effective concentration ₅₀)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
E _{MAX}	maximální odpověď
f _{low}	proporce nízkoafinní vazebné složky
GPCR	receptor spřažený s G-proteiny (G-Protein Coupled Receptor)
IC ₅₀	koncentrace vyvolávající polovinu maximální inhibice (half maximal inhibitory concentration)
IL	intracelulární klička (intracellular loop)
IP _X	inositolfosfáty (mono, di a trifosfáty)
IQR	interkvartilní rozsah
K _D	rovnovážná disociační konstanta
KHB	pufr Krebs-Hepes (Krebs-Hepes Buffer)
K _I	inhibiční konstanta
K _G	parametr relativně kvantifikující afinitu ke G-proteinu
mAChR	muskarinové acetylcholinové receptory
M _{1,2,3,4,5}	jednotlivé podtypy muskarinového receptoru
NDMC	N-desmetylklozapin (N-desmethylozapine)
NMS	N-metylskopolamin
PBS	isotonický fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PDB ID	identifikační označení v proteinové databázi
PIP ₂	fosfatidylinositolbisfosfát
PLC	fosfolipáza C
PNS	periferní nervový systém
QNB	3-chinuklidinyl benzylát (quinuclidinyl benzilate)
S.E.M.	střední chyba průměru (Standard Error of the Mean)
TCA	trichloroctová kyselina (trichloroacetic acid)
TM helix	transmembránový helix
wt	přirozený receptor (wild type)

ABSTRAKT

Atypičtí agonisté muskarinových receptorů jsou látky, které se vážou se srovnatelnou afinitou k jednotlivým podtypům receptoru, ale jsou schopny je do určité míry selektivně aktivovat. Molekulární mechanismus této funkční selektivity atypických agonistů není dosud znám a jeho objasnění by mohlo přispět k cílenému vývoji nových funkčně selektivních agonistů vhodných pro léčebné využití.

Funkční selektivita atypických agonistů muskarinových receptorů by mohla souviset se způsobem, jakým tyto látky aktivují receptor. Specifická konformační změna receptoru vyvolaná po navázání těchto strukturně složitých agonistů by mohla vést k využití aktivačních mechanismů, které jsou paralelní s aktivačním mechanismem klasických ortosterických agonistů a vést k selektivní aktivaci receptoru. Zjišťovali jsme, zda atypičtí muskarinové M_1 selektivní agonisté xanomelin a N-desmetylklozapin využívají při aktivaci M_1 receptoru stejnou kaskádu tzv. aktivačních přepínačů jako klasičtí ortosteričtí neselektivní agonisté karbachol a oxotremorin.

Za tímto účelem jsme provedli bodové mutace M_1 receptoru v oblasti odpovědné za vazbu ortosterického ligandu (D105^{3.32}, D99^{3.26}), v oblasti aktivačního přepínače odpovědného za přenos konformační změny z ortosterického místa do intracelulární části receptoru D71^{2.50} a v oblasti přepínače "ionic lock switch" odpovídající za interakci s G-proteiny (R123^{3.50}, D122^{3.49}). Pomocí funkčních stanovení (akumulace inositolfosfátů a měření změn hladiny intracelulárních vápenatých iontů) jsme sledovali, jak tyto mutace ovlivní přenos signálu na M_1 receptoru prostřednictvím atypických agonistů xanomelinu a N-desmetylklozapinu ve srovnání s klasickými agonisty karbacholem a oxotremorinem. Prostřednictvím vazebných pokusů jsme stanovovali vliv jednotlivých mutací na afinitu těchto agonistů. Dále jsme se zaměřili na vliv jednotlivých mutací na afinitu neodmyvatelné vazby xanomelinu a perzistentní aktivaci receptoru xanomelinem.

Mutace aminokyselin D105^{3.32} i D99^{3.26} snížily afinitu všech testovaných agonistů, což se promítlo i ve funkčních stanoveních jako snížení potence aktivovat receptor. Mutace D105^{3.32} v ortosterickém místě měla výraznější vliv na potenci xanomelinu aktivovat M_1 receptor než tomu bylo pro klasické ortosterické agonisty karbachol a oxotremorin. Mutace v oblasti aktivačního přepínače D71^{2.50} a interakce s G-proteiny R123^{3.50} vedly k úplné ztrátě funkční odpovědi jak klasických tak atypických agonistů.

Naše výsledky ukazují, že klasičtí i atypičtí agonisté aktivují M_1 receptor stejným mechanismem využívajícím aktivační přepínač D71^{2.50} a přepínač "ionic lock switch". Dále poukazují na klíčovou roli D105^{3.32} v ortosterickém vazebném místě pro aktivaci M_1 receptoru atypickými agonisty i pro perzistentní aktivaci receptoru neodmyvatelně navázaným

xanomelinem. Rozdíl mezi jednotlivými agonisty je ve způsobu jakým s D105^{3,32} interagují. Dále naše výsledky ukazují, že interakce s vestibulem ortosterického vazebného místa je důležitá i pro vazbu atypických agonistů.

ABSTRACT

Atypical agonists of muscarinic receptors bind to individual receptor subtypes with comparable affinity but activate them selectively to a certain extent. Molecular mechanism underlying this "functional selectivity" is not known and its elucidation may contribute to development of new atypical functionally selective agonists suitable for therapeutic use.

Functional selectivity of atypical muscarinic agonists may be caused by a distinct molecular mechanism(s) of how these compounds activate the receptor. Agonist-specific conformations induced by structurally complex atypical agonists may lead to utilization of a parallel activation mechanism that is different than the activation mechanism induced by non-selective classical agonists. In order to examine this possibility we investigated whether the M₁ receptor preferring atypical agonists xanomeline and N-desmethylozapine, and the classical orthosteric agonists carbachol and oxotremorine, activate the M₁ receptor through a common cascade of transmission switches.

To this end we mutated key amino acids of the M₁ receptor that are essential for ligand binding to the orthosteric binding site (D105^{3.32}, D99^{3.26}), receptor activation (transmission switch, D71^{2.50}), or interaction with G-protein (ionic lock switch, R123^{3.50} D122^{3.49}). We compared effects of these mutations on binding characteristics and functional responses of atypical and classical agonists. Furthermore we analyzed effects of these mutations on persistent activation of the M₁ receptor by wash-resistantly bound xanomeline.

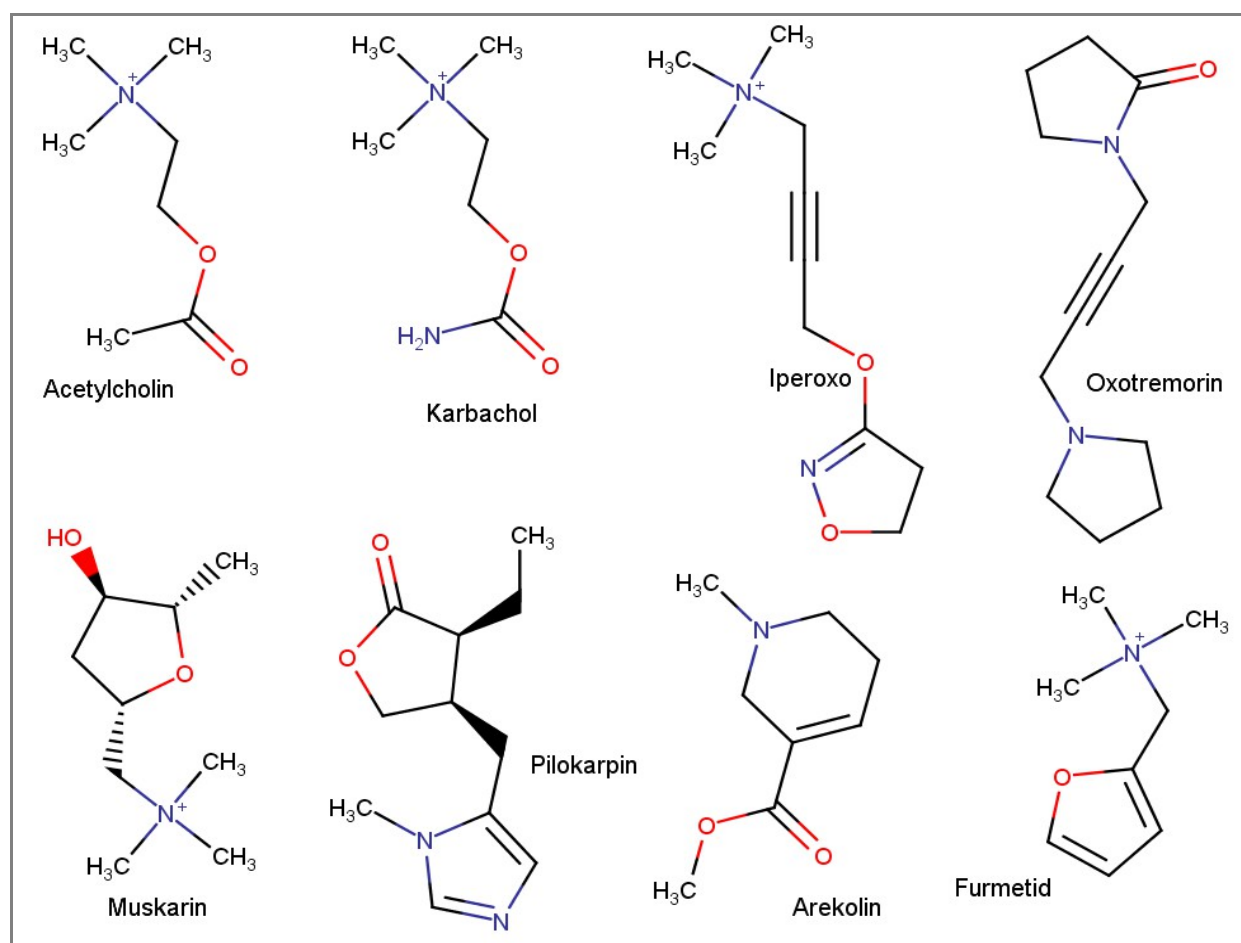
Point mutation of D105^{3.32} and D99^{3.26} decreased affinity of all tested agonists and caused a decrease in potency of receptor activation in functional assays. Mutation of D105^{3.32} in the orthosteric binding site decreased the potency of the atypical agonist xanomeline more than the potency of the classical orthosteric agonists carbachol and oxotremorine. Point mutation of residue D71^{2.50}, involved in receptor activation, or R123^{3.50}, involved in coupling to G-proteins, completely abolished functional responses to both classical and atypical agonists.

Our data show that classical as well as atypical agonists activate the M₁ receptor by the same molecular mechanism that involves the transmission switch D71^{2.50} and the ionic lock switch (R123^{3.50}, D122^{3.49}). These results further point to the key role of D105^{3.32} in the orthosteric binding site in receptor activation by atypical agonists and persistent activation of the M₁ receptor by wash-resistantly bound xanomeline. The principal difference among tested agonists is in the way they interact with D105^{3.32}. In addition, our data demonstrate an important role of the vestibule of the orthosteric binding site for atypical agonists binding.

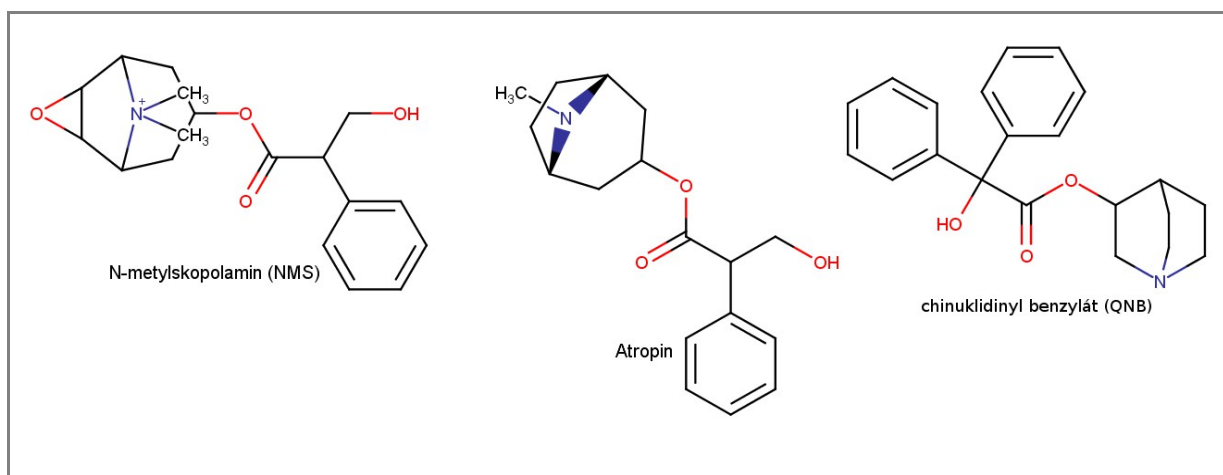
1 LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1 Muskarinové acetylcholinové receptory

Muskarinové receptory (mAChR) jsou membránové proteiny aktivovatelné acetylcholinem, který je jedním z hlavních neuropřenašečů v centrální (CNS) a periferní (PNS) nervové soustavě a působí i mimo ni /Beckmann a Lips, 2013/. Mohou být aktivovány nebo blokovány i některými přírodními látkami. K takovým látkám patří muskarin (alkaloid muchomůrky červené, *Ammanita muscaria*), od něhož je odvozen i název receptorů, nebo pilokarpin (alkaloid získávaný z listů tropických keřů rodu mrštnoplod, *Pilocarpus*). Obě tyto látky působí jako agonisté a receptory aktivují. Mezi látky blokující muskarinové receptory patří antagonisté atropin, skopolamin nebo hyoscin (rostlinné alkaloidy z čeledi lilkovitých, *Solanaceae*) /Eglen, 2012/. Tyto látky a řada jejich derivátů jsou používány pro ovlivnění a studium mAChR. Strukturální vzorce některých z nich jsou uvedeny v obrázku 1A,B na straně 10-11.



Obrázek 1A: Strukturální vzorce vybraných agonistů mAChR.



Obrázek 1B: Strukturální vzorce vybraných antagonistů mAChR.
/PubChem; www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/

Klonováním bylo identifikováno pět podtypů mAChR (M_1 - M_5) /Bonner a spol., 1987; Peralta a spol., 1987/. Jednotlivé podtypy se liší lokalizací (tkáňovou i buněčnou) a farmakologickými a funkčními vlastnostmi /Felder, 2000/. V závislosti na podtypu a lokalizaci zprostředkovávají celou řadu fyziologických dějů /Eglen, 2012/, na něž působí excitačně nebo inhibičně /Felder, 2000/.

Muskarinové receptory se nacházejí na neuronech centrálního i periferního nervového systému a v parasympatiku inervovaných tkáních. Vyskytují se i ve tkáních inervovaných sympatikem (potní žlázy) a ve tkáních, které tvoří klasické synapse jako jsou bílé krvinky, epitelální buňky nebo buňky endotelu /Caulfield, 1993/.

Rozložení jednotlivých podtypů mAChR bylo zmapováno pomocí hybridizace mRNA a podtypově selektivních protilátek (Tabulka 1; str. 12). Jak v mozku tak na periférii se rozložení jednotlivých podtypů často výrazně překrývá /Levey, 1993/.

V CNS se mAChR uplatňují v celé řadě vegetativních, senzorických i motorických funkcí. Dále hrají roli při regulaci stavu bdělosti a spánku, emočních odpovědích, stresových reakcích nebo udržení pozornosti. V mozkové kůře a hipokampu se mAChR podílejí na řízení vyšších kognitivních funkcí jako je učení, paměť, pozornost nebo prostorová orientace /Wess, 1996/. Aktivace parasympatiku prostřednictvím mAChR vede například ke zpomalení srdečního rytmu či zvýšení sekrece exokrinních a endokrinních žláz, nebo kontrakcím hladké svaloviny a zvýšení motility střev /Eglen, 2012/. V rámci auto/parakrinního působení acetylcholinu se mAChR účastní i imunitní odpovědi nebo regulace buněčné proliferace /Wessler a Kirkpatrick, 2008; Kawashima a Fujii, 2008/.

Kvůli nedostatečné selektivitě muskarinových ligandů (Kapitola 1.6; str. 29), nebylo možné přesně určit účast jednotlivých muskarinových podtypů na konkrétních fyziologických pochodech. Až zavedení zvířecích modelů s delecí genů pro jednotlivé muskarinové podtypy

umožnilo detailní studium jejich funkce /Wess, 2003, 2007/. Role jednotlivých podtypů mAChR v konkrétních fyziologických pochodech a patologiích je popsána v kapitole 1.3 (str. 14).

Tabulka 1: Rozložení podtypů muskarinových receptorů ve vybraných částech centrálního (CNS) a periferního (PNS) systému podle /Levey, 1993/.

CNS					PNS			
Mozková kůra	Hipokampus	Striatum	Thalamus	Mozkový kmen a mozeček	Srdce	Slinné žlázy	Ileum	Plíce
M₁-M₅ protein								
M ₁ (34-40 %)	M ₁ (47 %)	M ₄ (29 %)	M ₂ (42-49 %)	M ₂ (70-84 %)	M ₂ (88 %)	M ₃ (42 %)	M ₂ (69 %)	M ₄ (41 %)
M ₂ (19-37 %)	M ₂ (17 %)	M ₁ (29-31 %)	M ₁ (6-16 %)	M ₃ (5-6 %)		M ₁ (36 %)	M ₄ (12 %)	M ₂ (40 %)
M ₄ (15 %)	M ₄ (15 %)	M ₂ (12-29 %)	M ₄ (15 %)	M ₁ (2-5 %)		M ₂ (12 %)	M ₃ (4 %)	
M ₃ (10 %)	M ₃ (10 %)	M ₃ (6 %)	M ₃ (6 %)	M ₄ (1 %)		M ₄ (7 %)	M ₁ (3 %)	
M₁-M₅ mRNA								
M ₁	M ₁	M ₄	M ₂	M ₂	M ₂	M ₃	M ₂	M ₄
M ₂	M ₂	M ₁	M ₁	M ₃		M ₁	M ₃	
M ₄	M ₄	M ₂	M ₄					
M ₃	M ₃	M ₃	M ₃					
	M ₅		M ₅					

Množství mRNA jednotlivých muskarinových podtypů je řazeno sestupně.

1.2 Přenos signálu muskarinovými receptory

Muskarinové receptory patří do skupiny membránových receptorů spřažených s G-proteiny (G-Protein Coupled Receptor; GPCR), které pro přenos signálu do buňky využívají heterotrimerních G-proteinů /Alexander, 2011/. Po navázání agonisty na receptor dojde ke konformační změně v jeho transmembránové oblasti, která je přenesena do intracelulární oblasti receptoru a umožňuje následnou aktivaci G-proteinu /Gudermann a spol., 1995/. G-protein je složen z GTP vázající α -podjednotky a podjednotek β a γ . Po aktivaci receptoru se sníží afinita α -podjednotky pro GDP, ten se z α -podjednotky uvolní a α -podjednotka naváže GTP, čímž se aktivuje a disociuje z komplexu s receptorem a $\beta\gamma$ -dimerem. Volná α -podjednotka i $\beta\gamma$ -dimer pak přímo ovlivňují řadu efektorů.

Fyziologická odpověď vyvolaná aktivací mAChR je dána v první řadě typem G-proteinu se kterým receptor interaguje a následnou stimulací či inhibicí příslušných efektorů (Tabulka 2; str. 14). Muskarinové receptory lze rozdělit do dvou skupin na základě preferenčního spřáhování s jednotlivými typy G-proteinů /Wess, 1996/. Muskarinové podtypy M_{1,3,5} se preferenčně spřahují s G-proteiny G_{q/11} /Caulfield, 1993/ a stimulují tak přímo fosfolipázu C β (PLC β), která katalyzuje hydrolýzu fosfatidylinositolbisfosfátu (PIP₂), při které vznikají druzí poslové

diacylglycerol a inositoltrisfosfát účastníci se dalších fyziologických dějů jako je aktivace protein kinázy C diacylglycerolem nebo uvolnění vápenatých iontů z endoplazmatického retikula stimulované inositoltrisfosfátem /Nathanson, 2008/. Do druhé skupiny patří muskarinové podtypy M_2 a M_4 . Tyto podtypy se preferenčně spřahují s $G_{i/o}$ proteiny. Výsledkem aktivace je inhibice adenylcyklázy (AC), následné snížení tvorby cAMP a utlumení signalizace na něm závislé (např. aktivace protein kinázy A) /Caulfield, 1993/. Funkční odpověď vyvolává i dimer podjednotek $\beta\gamma$, který přímo ovlivňuje některé iontové kanály, například napětově řízené vápníkové kanály v presynaptických zakončeních /Herlitze a spol., 1996/, draslíkové kanály v srdeční tkáni /Caulfield, 1993/, nebo aktivuje PLC β /Zhu a Birnbaumer, 1996/.

Preferenční spřahování muskarinových receptorů s jednotlivými podtypy G-proteinů není absolutní a stejně jako mnoho jiných GPCR mohou mAChR interagovat s více než jedním typem G-proteinu, což poskytuje ohromnou variabilitu funkčních odpovědí na aktivaci receptoru. Muskarinové receptory $M_{1,3,5}$ se v menší míře spřahují také s G_s G-proteiny a stimulují syntézu cAMP prostřednictvím aktivace AC /Burford a Nahorsky, 1995/. U podtypů M_1 a M_3 byla prokázána také interakce s $G_{12/13}$ /Siehler, 2009/ a G_i G-proteiny /Offermanns a spol., 1994/ a u M_2 přímá interakce s G_s a $G_{q/11}$ proteiny /Michal a spol., 2007/. Funkční odpověď mAChR je ovlivněna celou řadou faktorů jako jsou například výše exprese receptorů, tkáňová a buněčná lokalizace /Felder, 2000/, dostupnost jednotlivých G-proteinů, účinnost a koncentrace agonisty nebo desenzitizace /Tuček a spol., 2002/.

Spojení muskarinových receptorů, ať už přímé nebo nepřímé, s celou řadou efektorů /Antony a spol., 2009/ dává prostor pro takzvaný "agonist bias" /Kenakin, 2007/ (Kapitola 1.6.3.4; str. 42), kde ovlivnění určitého efektoru závisí na kombinaci agonista-receptor, tedy konformační změně receptoru vyvolané konkrétním agonistou (specifické konformaci pro daného agonistu, anglicky "agonist-specific conformation") /Ehlert, 2008/.

U muskarinových receptorů byl prokázán i jiný přenos signálu než prostřednictvím G-proteinů, a to přes arestiny a kinázy receptorů spřahovaných s G-proteiny (G-protein receptors kinases) /Reiter a Lefkowitz, 2006/ vedoucí k desenzitizaci receptorů.

Tabulka 2: Klasifikace G-proteinů interagujících s muskarinovými receptory a jejich základní funkce /Wess, 1996/ a /Siehler, 2009/.

G_s (G _s , G _{olf})	aktivuje AC váže se na některé Ca ²⁺ kanály a aktivuje je
G_i (G _i , G _o , G _t , G _{gust} , G _z)	přímo inhibuje AC, v určité míře aktivuje K ⁺ kanály inhibuje Ca ²⁺ kanály. G _t proteiny přímo aktivují fosfodiesterasu
G_q (G _q , G ₁₁ , G ₁₄ , G ₁₅ , G ₁₆)	aktivuje PLC β
G₁₂ (G ₁₂ , G ₁₃)	Aktivuje RhoGTPázové nukleotidové výměňkové faktory

1.3 Muskarinové receptory v léčbě onemocnění centrálního a periferního nervového systému

Muskarinové receptory, v závislosti na lokalizaci a podtypu, zprostředkovávají řadu fyziologických funkcí jak v centrálním (CNS) tak periferním (PNS) nervovém systému /Felder a spol., 2001; Eglén, 2006 a 2012; Langmead a spol., 2008/. Jejich selektivní pozitivní nebo negativní modulace je tedy důležitá pro cílené terapeutické ovlivňování celé řady poruch spojených s poškozenou signalizací přes mAChR.

Různá onemocnění CNS jako jsou například Alzheimerova a Parkinsonova choroba /Perry a spol., 1990/ či schizofrenie /Sellin a spol., 2008/ jsou spojovány s úpadkem kognitivních funkcí zahrnujících procesy učení a paměti. Na řízení těchto funkcí se v první řadě podílejí muskarinové receptory podtypu M₁ /Levey, 1993/, které jsou ve velké míře zastoupené právě v oblasti spojené s kognitivními funkcemi jako je kůra předního mozku a hipokampus. Role muskarinových receptorů podtypu M₁ v kognitivních procesech byla podpořena studii s myšimi modely bez muskarinového M₁ receptoru, kde došlo k výraznému zhoršení procesů konsolidace paměti /Eglén, 2005/. V kůře předního mozku jsou M₁ receptory odpovědné za stimulaci signální dráhy proteinové kinázy aktivované mitogenem (mitogen-activated protein kinase) /Hamilton a Nathanson, 2001/, která je důležitým mediátorem cholinergního vlivu na synaptickou plasticitu a kognici /Rosenblum a spol., 2000/.

V řadě klinických studií bylo prokázáno zlepšení kognitivních funkcí po podávání agonistů muskarinových receptorů /Doggrell a Evans, 2003/ či inhibitorů acetylcholinesterázy (enzymu degradujícího acetylcholin) /Christie a spol., 1981/. Tento přínos byl však doprovázen řadou vedlejších účinků spojených s aktivací ostatních podtypů mAChR. Jednalo se především o

aktivaci M_2 a M_3 receptorů na periférii spojenou se zpomalením srdeční frekvence, nadměrným sliněním, pocením a poruchami trávení /*Bymaster a spol., 2003; Wess a spol., 2007*/. Proto je věnováno velké úsilí hledání agonistů, kteří by selektivně aktivovali M_1 receptory /*Fisher, 2007; Jakubík a spol., 2008*/.

Kromě výše zmíněného pozitivního vlivu posílení muskarinové transmise na zlepšení poznávacích funkcí vede stimulace mAChR podtypu M_1 a M_3 ke zvýšení neamyloidogenního štěpení bílkoviny prekurzor amyloidu (amyloid precursor protein; APP) /*Nitsch a spol., 1992; Buxbaum a spol., 1992*/. Snižuje tak tvorbu β -amyloidu, který je podle v současnosti převládající a obecně uznávané hypotézy /*Hardy a Higgins, 1992; Selkoe, 2001*/ příčinou vzniku a rozvoje Alzheimerovy choroby. Potvrzuje to i klinické pozorování, že podávání muskarinových antagonistů u pacientů s Parkinsonovou nemocí významně zvyšuje množství amyloidních plaků a neurofibrilárních klubíček /*Perry a spol., 2003*/. Zatímco proteolytickým štěpením APP uvnitř β -amyloidové sekvence prostřednictvím α -sekretázy (tzv. neamyloidogenní štěpení) vzniká jako produkt molekula α APPs (rozpuštěný extracelulární N-terminální konec APP) s neuroprotektivními účinky /*Lichtenthaler, 2011*/, výsledkem postupného štěpení β - a γ -sekretázou je neurotoxický a amyloidogenní β -amyloid, který se ukládá v mozku pacientů ve formě plaků. Hlavním nositelem synaptické toxicity však není agregovaný β -amyloid tvořící plaky, ale podstatně menší rozpustné oligomery β -amyloidu /*Selkoe, 2002; Haass a Selkoe, 2007*/.

V oblastech spojovaných s kognitivními funkcemi se ve velké míře nacházejí i muskarinové receptory podtypu M_2 . Tento podtyp je na cholinergních neuronech mozku lokalizován především presynapticky a jeho aktivace inhibuje uvolňování acetylcholinu. Na rozdíl od M_1 a M_3 receptorů však aktivace receptorů M_2 a M_4 nevyvolává neamyloidogenní štěpení APP /*Nitsch a spol., 1992*/. Látky, které by působily jako selektivní agonisté muskarinového M_1 receptoru nebo selektivní antagonisté M_2 receptoru, případně splňující obě kritéria, se jeví jako nadějný terapeutický nástroj při léčbě Alzheimerovy choroby a dalších onemocnění spojených s kognitivními poruchami.

Schizofrenie je onemocnění doprovázené pozitivními příznaky (halucinace, bludy), negativními příznaky (např. citová oploštělost, demotivace) a také kognitivními poruchami. Pozitivní příznaky jsou spojovány s nadměrnou aktivací dopaminergních D_2 receptorů ve striatu a mesolimbických oblastech mozku. Na druhou stranu negativní příznaky jsou spojovány se sníženým dopaminergním přenosem přes dopaminové D_1 receptory v přední korové oblasti /*Karam a spol., 2010*/. Vzhledem k negativním příznakům a kognitivním poruchám je patofyziologie schizofrenie spojována také s muskarinovými receptory (tzv. "cholinergní hypotéza schizofrenie"). Tuto hypotézu podporuje řada zjištění, jako například mechanismus

působení klinicky používaného antipsychotika klozapinu, jehož aktivní metabolit NDMC (N-desmetylklozapin) kromě inhibice dopaminových D₂ receptorů působí jako parciální agonista muskarinových M₁ receptorů /Weiner a spol., 2004; Sur, 2003/. Také bylo pozorováno snížené množství M₁ a M₄ receptorů u schizofrenních pacientů v kůře předního mozku, hipokampu, kaudata (nucleus caudatus) a putamen /Crook a spol., 2001/. Snížení množství M₁ receptorů by mohlo být příčinou kognitivních příznaků schizofrenie. Muskarinové receptory M₄ inhibují uvolňování dopaminu ve striatu a mesolimbických oblastech mozku /Tzavara a spol., 2004/. Jejich snížené množství by tak mohlo souviset s pozitivními příznaky schizofrenie. To podporuje i zjištění, že muskarinová antagonisté vyvolávají stavy obdobné pozitivním příznakům schizofrenie /Mego a spol., 1988/ a muskarinová agonisté jsou tyto příznaky schopné do určité míry potlačovat /Scarr, 2009/. Selektivní agonisté M₁ receptorů, působící zlepšení kognitivních funkcí a zároveň agonisté M₄ receptorů, snižující uvolňování dopaminu by mohli najít uplatnění při léčbě schizofrenie.

Podtyp muskarinového receptoru M₅ je v CNS, spolu s podtypy M₄ a M₂, spojován s dopaminergní signalizací. Podtyp M₅ je jediným podtypem muskarinového receptoru nalezeným na dopaminergních neuronech inervujících striatum a hlavním podtypem na dopaminergních neuronech inervujících nukleus accumbens a další oblasti limbického systému. Tyto oblasti mozku mají klíčovou úlohu v procesu závislosti /Eglen, 2012/. Ve striatu dochází po aktivaci M₅ receptorů, stejně jako po požití návykové látky, k uvolnění dopaminu. Hladina dopaminu je úzce spjatá s příznaky drogové závislosti (odměna, zvyšování tolerance, abstinenční příznaky) /Morales a Pickel, 2012/. Bylo pozorováno, že u myši bez M₅ receptoru se sníží potřeba zvyšovat dávku a abstinenční příznaky u závislosti na morfinu /Basile a spol., 2002/ a kokainu /Lester a spol., 2010/. Selektivní antagonisté M₅ receptorů se tedy jeví jako potenciální terapeutika nejen při léčbě drogové závislosti ale také pozitivních příznaků schizofrenie.

Muskarinové receptory v CNS se účastní i dalších patofyziologických dějů. Signalizace prostřednictvím M₁ receptorů v mozku se podílí na vzniku přinejmenším některých typů epileptických záchvatů. Vyplývá to ze studie na myších s delecí M₁ receptoru u nichž nebylo možné vyvolat epileptický záchvat pomocí částečného muskarinového agonisty pilo-karpinu /Hamilton a spol., 1997/. Aktivace muskarinových receptorů má také analgetické účinky. Předpokládá se zde role zejména podtypu M₂ a v menší míře M₄ /Duttaroy a spol., 2002/. Potvrzují to studie s myšími modely s delecí genů pro M₂ a M₄ receptory, u nichž byly potlačeny analgetické účinky muskarinových agonistů /Wess a spol., 2003/. M₂ receptory se podílejí na termoregulaci a koordinaci pohybů /Gomez a spol., 1999/. Jednonukleotidový polymorfismus M₂ receptoru v mozku u lidí je spojován s úbytkem receptoru a bipolární depresivní poruchou /Cannon a spol., 2011/. Muskarinový podtyp M₃ je exprimován převážně na periférii,

ale v menší míře se nachází i v CNS /Levey, 1993/. Jeho role v CNS není plně objasněna. Je spojován s uvolňováním růstového hormonu /Gautam a spol., 2009/ a tudíž by jeho selektivní modulace mohla najít uplatnění při léčbě poruch růstu.

Cílené ovlivňování muskarinových receptorů má důležitý význam také při léčbě řady poruch na periférii. Podtyp M_3 /Caufield, 1993/ má úlohu při kontrakci hladké svaloviny a to zejména v močovém a gastrointestinálním traktu. Selektivní látky blokující tento podtyp by byly vhodné při léčbě inkontinence a hyperaktivity močového měchýře /Chapple a spol., 2002/. V gastrointestinálním traktu je kromě M_3 důležitá i role podtypu M_2 /Matsui a spol., 2002; Wess, 2007/. Podtyp M_3 dále ovlivňuje činnost žláz s vnější a vnitřní sekrecí. S ohledem na problematiku diabetu druhého typu je velké úsilí věnováno M_3 receptorům na β buňkách slinivky břišní a studiu jejich vlivu na sekreci insulinu /Gautam a spol., 2008/. Muskarinové receptory zprostředkovávají působení acetylcholinu i mimo nervový systém a jejich ovlivňování lze využít k léčbě některých patologických stavů /Kawashima a Fujii, 2008; Beckmann a Lips, 2013/. Muskarinové receptory se nacházejí v epiteliálních buňkách a buňkách endotelu a mnohé studie ukazují, že aktivace podtypů M_1 , M_3 a M_5 vede ke zvýšení buněčné proliferace a progresu rakovinného bujení /Spindel, 2012/. Schopnost agonistů muskarinových receptorů stimulovat buněčný růst byla prokázána také u nádorů prostaty, vaječníků, prsu slinivky břišní, plic, tlustého střeva, konečníku i kožních a mozkových nádorů /Spindel, 2012/. Řada studií poukazuje zejména na hlavní úlohu podtypu M_3 /Beckmann a Lips, 2013/. Selektivní antagonisté muskarinových receptorů by tedy mohly najít uplatnění v léčbě některých druhů rakoviny. Muskarinové receptory se nacházejí i v buňkách imunitního systému a podílí se na imunitní reakci /Wessler a Kirkpatrick, 2008/. V různých typech buněk byl pozorován prozánětlivý vliv agonistů muskarinových receptorů /Beckmann a Lips, 2013/.

1.4 Struktura muskarinových receptorů

1.4.1 Zařazení muskarinových receptorů

Všechny GPCR mají obdobnou strukturu tvořenou sedmi transmembránovými (TM) α -helixy, propojenými extra a intracelulárními smyčkami. Na základě podobnosti s rhodopsinem byly muskarinové receptory zařazeny mezi GPCR rhodopsinového typu /Ovchinnikov, 1982/.

Donedávna nebyla k dispozici krystalová struktura muskarinových receptorů a jejich strukturní vlastnosti a aktivační mechanismus se odvozovaly ze známé 3D krystalové struktury jim blízkého rhodopsinu /Palczewski a spol., 2000; Teller a spol., 2001; Park a spol., 2008/ a počítačových modelů z ní odvozených /Hulme a spol., 2003b; Espinoza-Fonseca a spol., 2008/. Informace o struktuře a funkci muskarinových receptorů přinesla celá řada spektroskopických

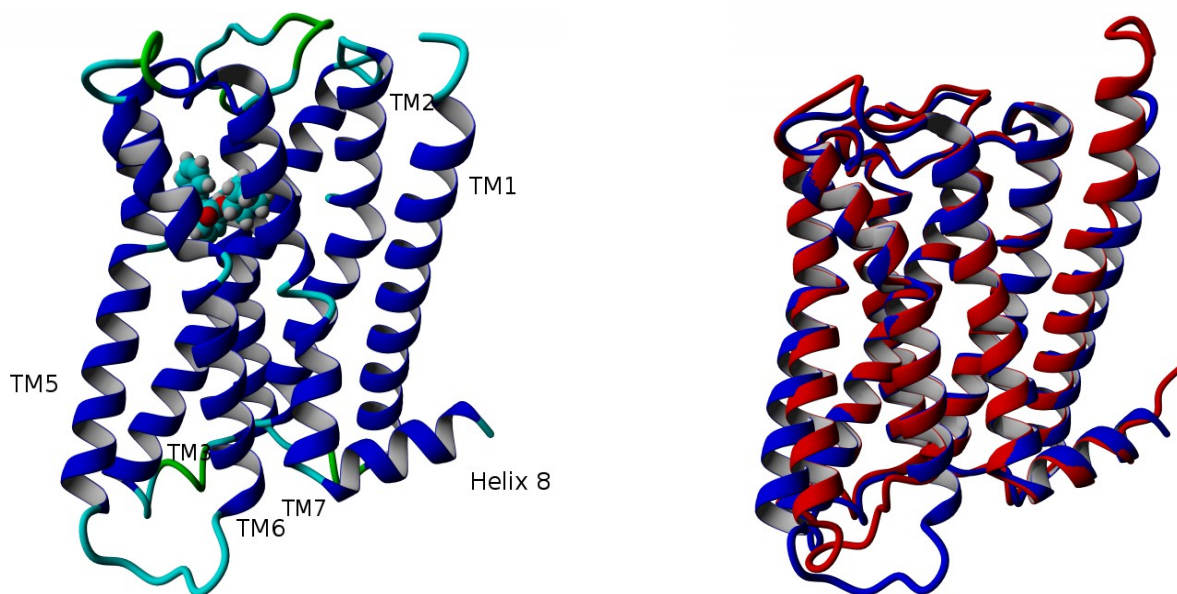
stanovení a díky cílené mutagenезi byla objasněna úloha řady aminokyselin a domén v jejich sekvenci /Wess, 1996; Hulme a spol., 2003a/.

Teprve nedávno byla publikována krystalová struktura M₂ /Haga a spol., 2012/ a M₃ /Kruse a spol., 2012/ receptoru v inaktivním stavu s navázanými antagonisty QNB (3-chinuklidinyl benzylát) u M₂, thiotropiem u M₃ a následně struktura M₂ receptoru v aktivním stavu s agonistou iperoxo /Kruse a spol., 2013/. Určení těchto krystalových struktur výrazně přispělo nejen k objasnění struktury, ale i aktivace mAChR.

1.4.2 Transmembránové uspořádání

Struktura mAChR sestává z extracelulárně umístěného N-konce, intracelulárně umístěného C-konce a 7 transmembránových α -helixů spojených třemi extracelulárními (extracellular loop; EL) a třemi intracelulárními smyčkami (intracellular loop; IL). Transmembránové helixy TM1,2,3,5,6, a 7 jsou uspořádány přibližně do elipsy a "podepřeny" TM4 helixem, který křížuje vnější povrch TM3. Intracelulární C-konec má rovněž helikální uspořádání (Obrázek 2; str. 19 vlevo). C-koncový helix 8 je přichycen k vnitřnímu povrchu plazmatické membrány prostřednictvím palmitoylace na cysteinech. Dostupné krystalové struktury M₂ a M₃ receptorů /Haga a spol., 2012; Kruse a spol., 2012/ ukazují, že jsou si oba receptory strukturně velmi podobné a to i v oblastech, které se liší primární sekvencí, jako jsou extra a intracelulární smyčky (Obrázek 2; str. 19 vpravo).

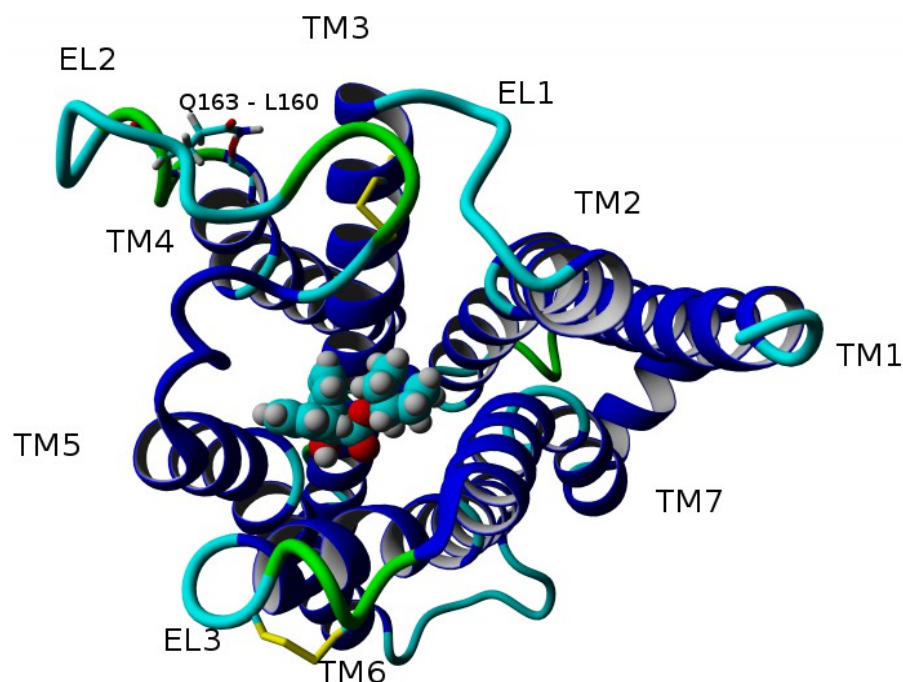
V tomto textu jsou aminokyseliny označeny jednopísmenným kódem a číslovány podle pořadí v sekvenci jednotlivých podtypů muskarinových receptorů a/nebo podle univerzálního číslování pro GPCR /Ballesteros a Weinstein, 1995/, kdy pozice nejvíce konzervované aminokyseliny v TM helixu N (N označuje TM helix 1-7), je označena N.50. Pořadí ostatních aminokyselin se pak odvíjí od N.50. Aminokyseliny ležící v sekvenci receptoru před N.50 se označují N.50-x, aminokyseliny za N.50 se označují N.50+x (x vyjadřuje vzdálenost aminokyseliny od N.50). Například v TM3 M₁ receptoru je nejvíce konzervovanou aminokyselinou R123, která je podle univerzálního číslování Ballesterosové a Weisteina označena 3.50. Aspartát 122 ležící jednu pozici před R123 je označen 3.49. Univerzální číslování GPCR je zavedeno pouze pro TM helixy a nepoužívá se pro označení aminokyselin v intra- a extracelulárních kličkách, jejichž délka a primární struktura se u jednotlivých GPCR výrazně liší.



Obrázek 2: Struktura muskarinových receptorů. Vlevo: M_2 receptor s navázaným antagonistou QNB. Vpravo: srovnání struktury M_2 (modře) a M_3 (červeně) receptorů (PDB ID: 3UON; 4DAJ /www.rcsb.org/).

Extracelulární prostorové uspořádání receptoru je poměrně jednoduché a otevřené s dlouhou extracelulární smyčkou EL2 stabilizovanou konzervovaným disulfidickým můstkem cysteinu C3.25 na N-konci TM3 a cysteinu uprostřed EL2 (C176 u M_2). Z krystalové struktury M_2 receptoru /Haga a spol., 2012/ je dále patrný disulfidický můstek v EL3 mezi C413 a C416 (Obrázek 3; str. 20).

Krystalová struktura M_2 i M_3 receptoru ukazuje výrazné odklonění extracelulární části TM4 směrem ven (Obrázek 3; str. 20) /Haga s spol., 2012; Kruse a spol., 2012/. Odklon TM4 nebyl pozorován u známých krystalových struktur dalších GPCR rhodopsinu /Palczewski a spol., 2000/, β_2 a β_1 adrenergního receptoru /Rasmussen a spol., 2007; Warne a spol., 2008/, A_{2A} adenosinového receptoru /Jaakola a spol., 2008/, CXCR4 chemokinového receptoru /Wu a spol., 2010/, histaminového H_1 receptoru /Shimamura a spol., 2011/ a dopaminového D_3 receptoru /Chien a spol., 2010/. Odkloněná část TM4 je stabilizována vodíkovou vazbou mezi glutaminem 4.56 a leucinem 4.53 (Q163 a L160 pro M_2). Tato vazba je součástí sítě polárních interakcí konzervovaných pro všechny podtypy. Mutace Q4.56 (Q208 u M_3) vedla ke zhoršení vazby ligandu i aktivace receptoru /Scarselli a spol., 2007/.



Obrázek 3: Extracelulární část M_2 receptoru (PDB ID: 3UON /www.rcsb.org/). Žlutě jsou znázorněny disulfidické můstky, červeně vodíková vazba mezi Q163 a L160.

Známé krystalové struktury GPCR mají síť interakcí vodíkových vazeb vedoucích od vazebné kapsy do cytoplazmatického prostoru /Hulme, 2013/. Ve struktuře M_2 , M_3 a s vysokou pravděpodobností i u ostatních podtypů muskarinových receptorů je tato síť součástí dlouhého spojitého vodního kanálu vedoucího z extracelulárního prostoru do hloubky 33 Å od EL2. Součástí kanálu je vazebná kapsa pro ligand. Od cytoplazmatické části je oddělen hydrofobní vrstvou tvořenou třemi aminokyselinami L2.46 v TM2, L4.43 v TM4 a I6.40 v TM6 /Haga a spol., 2012; Kruse a spol., 2012/. Tyto tři aminokyseliny jsou konzervované v rámci všech muskarinových podtypů.

1.4.3 Ortosterické vazebné místo

Pro vazbu ligandu do ortosterického vazebného místa receptoru nejsou podstatné jen interakce v samotné vazebné kapse, ale i interakce v oblasti jejího vstupu (vestibul vazebného místa). Konzervovaný aspartát D3.26 na N-konci TM3 v sousedství konzervovaného disulfidického můstku hraje roli v regulaci přístupu ortosterických ligandů do samotné vazebné kapsy receptoru. Předpokládá se, že zprostředkovává primární kontakt ligandu s receptorem /Jakubík a spol., 2000/. Účast tohoto aspartátu na vazbě ligandu byla potvrzena řadou mutačních studií, kdy jeho záměnou došlo k snížení afinity ortosterických agonistů i

antagonistů /*Fraser a spol., 1989; Goodwin a spol., 2007*/. Krystalová struktura M₂ receptoru v aktivním stavu ukazuje propojení D97^{3.26} s Q163^{4.56} prostřednictvím vodíkových vazeb a v inaktivním stavu propojení s Q163^{4.56} a N169 (EL2). Lze tedy předpokládat, že D3.26 má strukturní roli v přístupu ligandu do vazebného místa receptoru a pravděpodobně prostřednictvím svých interakcí stericky umožní přímý kontakt ligandu s E175 v EL2. To může přispět ke správné orientaci ligandu při vstupu do vazebné kapsy receptoru.

Ortosterické vazebné místo muskarinových receptorů leží ve štěrbině vzniklé kruhovým uspořádáním transmembránových helixů a nachází ve vzdálenosti 10-15 Å od povrchu receptoru. Aminokyseliny TM helixů podílející se na vazbě ortosterických ligandů jsou konzervované mezi všemi muskarinovými podtypy. Krystalové struktury M₂ a M₃ receptorů odhalily jen drobné strukturní odlišnosti ovlivňující ortosterické vazebné místo. Příkladem je F181 v EL2 M₂ receptoru, který je u ostatních podtypů nahrazen leucinem (L225 u M₃). V krystalové struktuře M₃ receptoru vzniká díky absenci aromatického kruhu výklenek ve vazebném místě /*Kruse a spol., 2012, Haga a spol., 2012*/. V krystalové struktuře M₂ receptoru F181 směřuje do vazebné kapsy a interaguje s fenylem muskarinového ortosterického antagonisty QNB.

Bylo potvrzeno, že kladně nabitá amoniová hlava acetylcholinu a dalších muskarinových agonistů a antagonistů vytváří iontovou vazbu s D3.32 v TM3, který je konzervován pro všechny GPCR, které vážou neurotransmitery na bázi biogenních aminů /*Felder, 2000*/. Tento aspartát je klíčový pro vazbu ortosterických ligandů a jeho substitucí dochází k výraznému snížení jejich afinity k receptoru /*Fraser a spol., 1989*/. Krystalové struktury M₂ a M₃ receptoru ukazují interakci mezi antagonisty QNB a thiotropiem /*Haga a spol., 2012; Kruse a spol., 2012*/ a agonistou iperoxo /*Kruse a spol., 2013*/ s N6.52 v TM6 prostřednictvím vodíkové vazby. D3.32 a N6.52 slouží k orientaci ligandu ve vazebné kavitě. V případě M₁ /*Hulme a spol., 2003 a*/ a M₃ /*Blüml a spol., 1994*/ receptoru bylo pozorováno, že mutace N6.52 výrazně ovlivní vazbu QNB, ale u acetylcholinu je pokles afinity minimální.

Ortosterické vazebné místo je dále tvořené aminokyselinami převážně aromatického charakteru. Vytváří aromatickou klec, která dokáže stabilizovat náboj pozitivně nabitě amoniové hlavy muskarinových ligandů. Převaha aromatických zbytků odpovídá kompozičně i vazebnému místu nikotinových receptorů /*Brejc, 2001*/ a acetylcholinesterázy /*Axelsen, 1994*/.

Pomocí rozsáhlých mutačních studií /*Wess, 1996; Hulme, 2003a*/ byla identifikována řada aminokyselin ovlivňujících vazbu ortosterických ligandů acetylcholinu a NMS do vazebného místa receptoru. Z těchto studií však nelze vyvodit, zda příslušné mutace mění vazebnou kavitu přímo, nebo zda je jejich vliv nepřímý a je zprostředkovaný konformační změnou jiné části receptoru. Zdá se, že většina aminokyselin klíčových pro vazbu acetylcholinu se podílí i na vazbě antagonisty NMS (N-metylskopolamin). Antagonisté muskarinových receptorů jsou

obecně poměrně velké molekuly a zasahují i do odlehlejších oblastí vazebné kapsy. Aminokyseliny ortosterického vazebného místa, jejichž náhrada za alanin výrazně snížila afinitu acetylcholinu i NMS jsou D3.32, W4.57, Y7.53, Y6.51, P 4.59, Y 3.33, Y 7.39, L3.29, W6.48 /Hulme, 2003 (a)/.

Na vazbě acetylcholinu, ale ne antagonisty NMS, se rozhodující měrou dále podílejí dva threoniny T5.39 a T5.42 v TM5, jejichž náhrada za alanin vedla k více než desetinásobnému poklesu afinity pro acetylcholin, ale afinitu NMS neovlivnila /Wess, 1996/. Tyto threoniny z TM5 zřejmě hrají roli při uzavření vazebné kavity při aktivaci receptoru /Heitz a spol., 1999/. Uzavření vazebné kavity vede k těsnější interakci s agonistou a tím vyšší afinitě. U antagonistů k uzavření nedochází. Proto mutace threoninů nemá na afinitu antagonistů vliv.

1.4.4 Alosterická vazebná místa

Muskarinové receptory mají nad ortosterickým vazebným místem velký extracelulární vestibul do něhož se vážou alosterické ligandy /Lazareno a spol., 2000 a 2002, Birdsall a spol., 2001/. Pomocí cílené mutagenese byly identifikovány oblasti klíčové pro vazbu řady alosterických modulátorů /Matsui a spol., 1995; Krejčí a Tuček, 2001; Jakubík a spol., 2005; Prilla a spol., 2006/ na extracelulárním konci TM3, v EL2 a rozhraní EL3 a TM7. Tato oblast je u jednotlivých podtypů méně konzervovaná a skýtá možnosti pro jejich selektivní modulaci. Pro vazbu alosterických ligandů se zdá být kritický W7.35, který zřejmě vytváří π - π interakce s Y6.51 /Haga a spol., 2012/, který je součástí aromatické klece kolem ortosterického vazebného místa a při aktivaci receptoru (Kapitola 1.5; str. 24) se podílí na uzavření ortosterické vazebné kavity.

Krystalová struktura M_2 receptoru s agonistou iperoxo a pozitivním alosterickým modulátorem LY2119620 /Kruse a spol., 2013/ ukazuje slabou kontrakci vazebné kavity kolem modulátoru díky pohybu TM6, který strukturně propojuje vestibul, ortosterické místo a intracelulární prostor /Kruse a spol., 2013/, což může vysvětlovat vliv na afinitu a účinnost ortosterických ligandů a i na přímou aktivaci G-proteinů prostřednictvím alosterických ligandů /Jakubík a spol., 1996/. Kontrakce kavity dovoluje rozsáhlejší interakci receptoru s modulátorem, což může vést ke zvýšení afinity agonisty a zpomalení jeho disociace a může přímo stabilizovat otevřenou aktivní konformaci intracelulární části TM6. To může vysvětlovat alosterickou aktivaci nebo pozitivní modulaci aktivace receptoru agonistou /Kruse a spol., 2013/.

Na základě farmakologických stanovení byla definována ještě jiná oblast muskarinových receptorů, do které se vážou alosterické modulátory strukturně odvozené od indolkarbazolu a benzimidazolu (WIN 51, 708 a WIN 62, 577) /Lazareno a spol., 2002; Lanfazema a spol., 2006/. Není zatím známo, kde se tato oblast nachází, ale výsledky molekulárního mode-

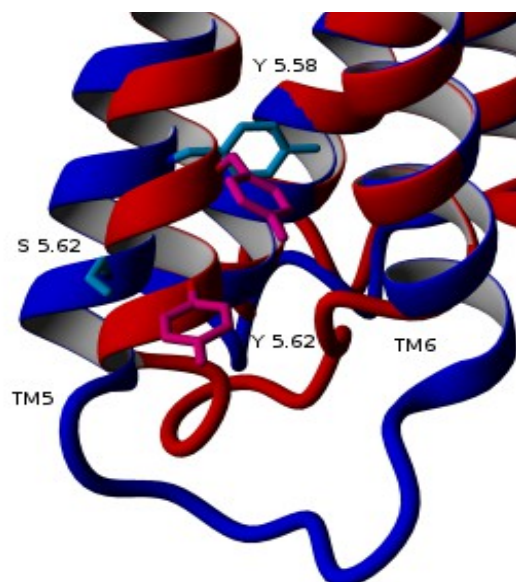
lování /*Espinoza-Fonseca a Trujillo-Ferrara, 2005 a 2006*/ naznačují její intracelulární polohu.

1.4.5 Oblasti muskarinových receptorů odpovídající za spřáhování s G-proteiny

Díky známé krystalové stuktuře rhodopsinu v komplexu s C-koncem α -podjednotky G-proteinu /*Scheerer a spol., 2008*/, bylo možné určit oblasti, kterými GPCR přímo interagují s G-proteiny. Kromě konzervovaného R3.50 odpovídá za interakci receptoru s α -podjednotkou G-proteinu hydrofobní povrch cytoplazmatických konců TM5 a TM6, hydrofóbní kontakty na rozhraní TM3 a IL2 a hydrofóbní aminokyseliny v IL1 /*Scheerer a spol., 2008*/ . Důležitost některých aminokyselin v těchto oblastech receptoru pro vazbu G-proteinu byla potvrzena řadou mutačních studií jak rhodopsinu tak i na dalších GPCR /*O'Dowd a spol., 1988*/ včetně muskarinových receptorů /*Wess, 1996; Burstein a spol., 1998*/.

Znamé krystalové struktury M_2 a M_3 receptoru se výrazněji liší právě v oblasti interakce s G-proteiny /*Kruse a spol., 2012*/, což může vysvětlovat jejich selektivitu k jednotlivým typům G-proteinů. Tyto receptory se liší v pozici cytoplazmatického konce TM5 a IL2 (Obrázek 4; str. 24). Hlavní rozdíl je v poloze konzervovaného Y5.58. V případě struktury M_2 receptoru je natočen směrem k tělu proteinu, u M_3 naopak směřuje ven k lipidové dvojvrstvě.

Pomocí cílené mutagenese byla identifikována série 4 aminokyselin (AALS u M_3 a VTIL u M_2) na cytoplazmatickém konci TM6, kritická pro selektivitu spřáhování s G-proteiny /*Blin a spol., 1995; Liu a spol., 1995*/ . V obou strukturách interagují tyto zbytky přímo s TM5. Ve struktuře β_2 adrenergního receptoru v komplexu s G_s proteinem dvě ze čtyř korespondujících aminokyselin interagují s C-koncem helixu G_{α_s} podjednotky /*Rasmussen a spol., 2011*/ . Tyrosin Y5.62 ve spodní části TM5 (Obrázek 4; str 24) hraje roli v aktivaci $G_{q/11}$ u M_3 receptoru /*Blüml a spol., 1994*/ . Korespondující aminokyselinou u M_2 je S5.62, který je ve srovnání se strukturou M_3 receptoru posunut přibližně o 4 Å směrem ven /*Kruse a spol., 2012*/ . Poloha intracelulárního konce TM5 má zřejmě stěžejní úlohu při specifitě spřáhování muskarinových receptorů s G-proteiny.



Obrázek 4. *Intracelulární oblasti M_2 a M_3 receptorů určující selektivitu spřáhování s G -proteiny. Modře jsou zobrazeny cytoplazmatické konce TM5 a TM6 M_2 receptoru (PDB ID: 3OUN) a červeně M_3 receptoru (PDB ID: 4DAJ)/www.rcsb.org/. Cytoplazmatický konec TM5 M_3 receptoru je výrazně posunut dovnitř oproti TM5 M_2 receptoru a konzervovaný Y5.58 zaujímá polohu směrem ven.*

1.5. Aktivace signálních drah muskarinových receptorů

1.5.1 Aktivace muskarinových receptorů

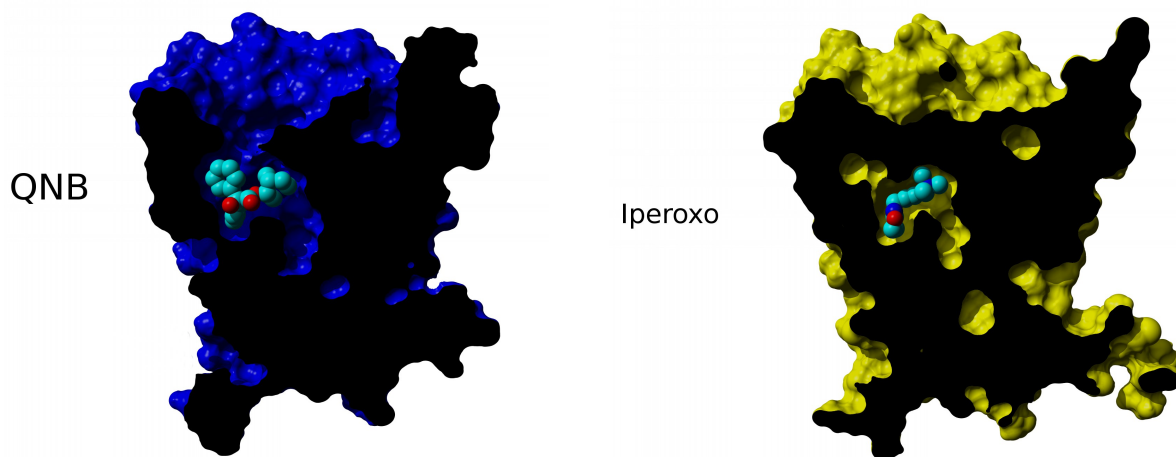
Po navázání agonisty přecházejí muskarinové receptory z inaktivního do aktivovaného stavu. Děje se tak prostřednictvím série molekulárních přepínačů (molecular switches), které jsou konzervované v rámci celé rhodopsinové skupiny receptorů /Trzaskowski a spol., 2012/.

Molekulárním přepínačem rozumíme nekovalentní intramolekulární interakce, které existují v inaktivním stavu receptoru a stabilizují ho. Při přechodu do aktivovaného stavu musí být tyto interakce zrušeny a nahrazeny novými, stabilizující aktivní stav /Hulme a spol., 2003b/.

Aktivace receptoru by mohla být spojena se změnou konformace acetylcholinu. Strukturální analýza vazebné kavity v modelu M_1 receptoru /Hulme a spol., 2003b/ ukazuje, že acetylcholin se váže v synklinální (energeticky bohatší) konformaci a v aktivovaném stavu je v antiklinální konformaci (energeticky chudší). Změna konformace acetylcholinu by mohla být součástí aktivačního procesu /Lu a spol., 2001; Hulme a spol., 2003b/.

Díky krystalovým strukturám M_2 receptoru v inaktivním stavu s navázaným QNB a aktivovaném stavu s navázaným agonistou iperoxo lze srovnat strukturní změny při aktivaci receptoru. Oproti struktuře rhodopsinu /Park a spol., 2008/ a β_2 adrenergního receptoru /Rasmussen a spol., 2007/ muskarinový receptor M_2 podstoupí během přechodu do

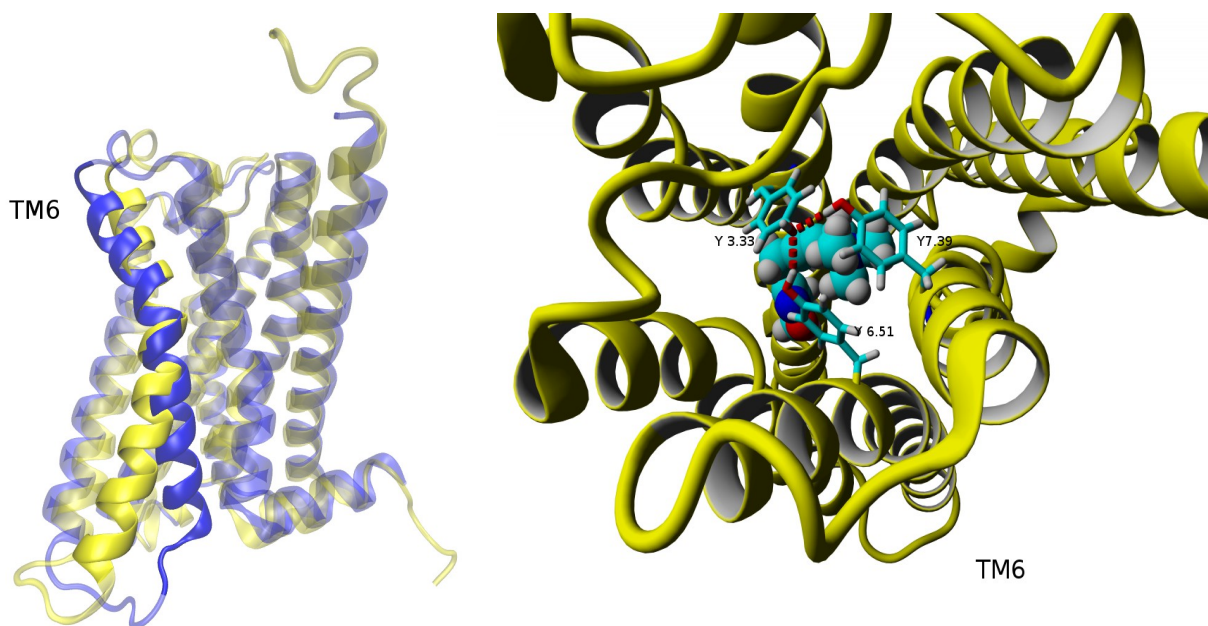
aktivního stavu velké změny v ortosterickém vazebném místě /*Kruse a spol., 2013*/. Ortosterické vazebné místo se zmenší a úplně pohltí agonistu a oddělí ho od solventu (Obrázek 5 vpravo). Antagonista QNB je příliš velká molekula na to, aby byla pohlcena úplně (Obrázek 5 vlevo), což by mohlo vysvětlovat potlačení bazální aktivity receptoru (inverzní agonismus).



Obrázek 5: *Řez ortosterickým vazebným místem M_2 receptoru*

Vlevo: Model inaktivního M_2 receptor s navázaným antagonistou QNB (PDB ID: 3UON). Vpravo: aktivovaný receptor s navázaným agonistou iperoxo (PDB ID: 4MQS) /www.rcsb.org/.

Během aktivace receptoru dojde k posunu horních částí TM helixů 5,6,7 směrem k agonistovi a TM3 podstoupí lehkou rotaci. Největší změnu podstoupí TM6 (Obrázek 6; str. 26 vlevo). Posun horní části této domény směrem dovnitř, umožní N6.52 vytvořit vodíkovou vazbu s agonistou iperoxo a zároveň dovolí vznik vodíkových můstků mezi Y6.51 a Y3.33, který vytváří vodíkovou vazbu s Y7.39 a tak se uzavře náboji stabilizovaná hydrofobní klec (Obrázek 6; str. 26 vpravo) omezující disociaci navázaného ligandu /*Kruse a spol., 2013*/. Dojde tak ke zmenšení kavity kolem agonisty, což může vést ke zrušení interakcí stabilizujících inaktivní stav a vést k přeuspořádání sítě vodíkových vazeb, což je klíčové pro aktivaci receptoru /*Hulme a spol., 2001*/.



Obrázek 6: *Strukturní změny při aktivaci muskarinového M_2 receptoru.*

Vlevo: Posun TM6 při aktivaci M_2 receptoru; modře inaktivní stav (PDB ID: 3UON), žlutě aktivovaný receptor (PDB ID: 4MQS). Vpravo: uzavření vazebné kavity po navázání agonisty prostřednictvím vodíkové vazby mezi Y 3.33 a Y 6.51 a Y 7.39 (PDB ID: 4MQS)/www.rcsb.org/. Červeně jsou označeny vodíkové vazby.

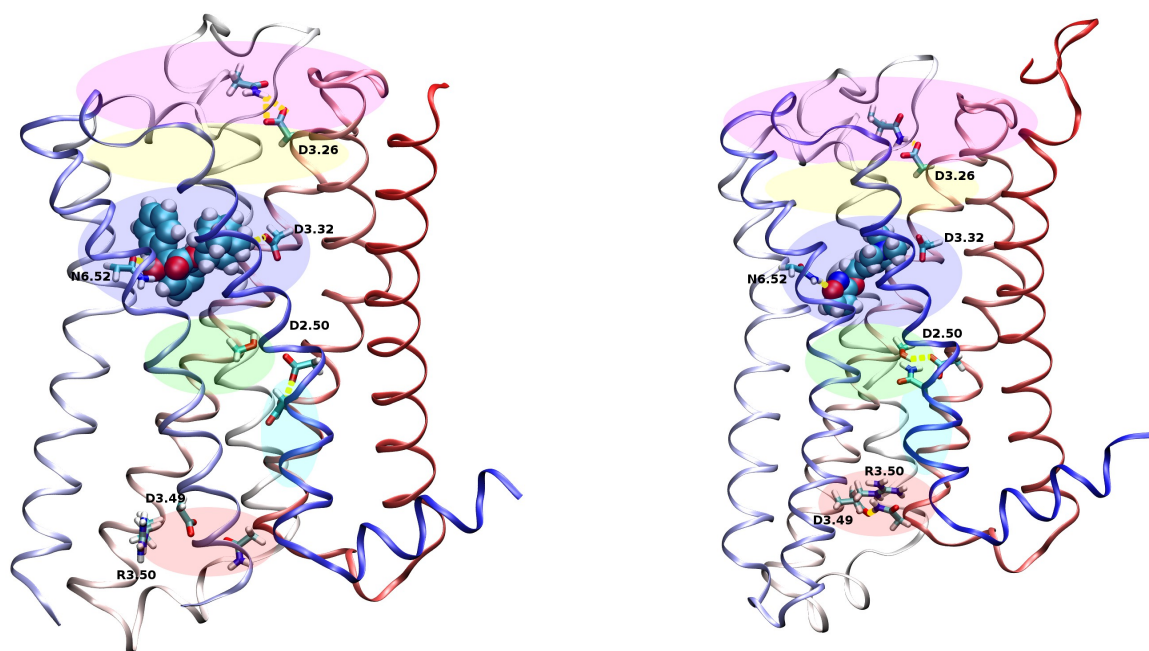
Klíčovým rysem aktivace GPCR je pohyb intracelulárních částí TM5 a zejména TM6 směrem ven, čímž se vytvoří prostor dostatečně velký k zasunutí C-konce alfa podjednotky G-proteinu /Rasmussen a spol., 2011/. U struktury M_2 receptoru dochází v aktivní konformaci k výraznému intracelulárnímu odklonu TM6 a malému posunu TM5. To vede k přeuspořádání vodíkových vazeb v konzervovaném motivu NSXXNPXXY (tyrosine toggle switch) v TM7, motivu WXP (transmission switch) v TM6 a DRY motivu (ionic lock switch) v intracelulární části TM3 (Obrázek 7; str. 27). Vazba agonisty na receptor vede k posunu konzervovaného tryptofanu W(6.48) v motivu WXP a vytvoření vodíkové vazby mezi W(6.48) a N(7.45) v TM7, který je součástí motivu NSXXNPXXY. To vede k posunu TM6 směrem ven.

Konzervovaný D2.50 stabilizuje konformaci muskarinového M_2 receptoru prostřednictvím vodíkových vazeb s N7.49 a S7.46 v motivu NSXXNPXXY. Při aktivaci D2.50 vytvoří další vodíkovou vazbu se S3.39 ve TM3. Mutace tohoto aspartátu D2.50N vedla ke ztrátě schopnosti karcholu aktivovat receptor /Fraser a spol., 1989/. Ze struktury aktivovaného M_2 receptoru /Kruse a spol., 2013/ je patrné také částečné odvinutí TM7 okolo Y7.53 v motivu NSXXNPXXY. Tyrosin Y7.53 je v blízkosti konzervovaného Y5.58. Díky své vzdálenosti nebudou regovat přímo, ale pravděpodobně umožní vytvoření vodního můstku a stabilizaci aktivní konformace.

Konzervovaný DRY motiv v TM3 a kyselé aminokyseliny v TM6 vytvářejí stabilizující síť

nekovalentních intramolekulárních interakcí, které udržují cytoplazmatické konce TM3 a TM6 blízko sebe v inaktivní konformaci. Ve struktuře M_2 receptoru v inaktivním stavu R3.50 a D3.49 DRY motivu tvoří solný můstek /Haga a spol., 2012/. V aktivním stavu M_2 receptoru R3.50 zaujímá prodlouženou konformaci a spolu s D3.49 je stabilizován vodíkovou vazbou s N2.39 v TM2 /Kruse a spol., 2013/. Mutace N2.39 nemá vliv na vazebné vlastnosti receptoru, ale zhoršuje aktivaci receptoru. Je pravděpodobné, že N2.39 buď přímo stabilizuje aktivní konformaci nebo přímo zasahuje do interakce s G-proteinem /Kruse a spol.,2013/. Role D3.49 se zdá být čistě stabilizační /Hulme a spol., 2003b/. Podílí se na stabilizaci inaktivního stavu, protože jeho mutace vedou ke zvýšení bazální aktivity receptoru /Fraser a spol., 1989/.

Díky přeuspořádání interakcí se v aktivním stavu vytvoří centrální jádro, které ukotví postranní řetězec R3.50 paralelně s povrchem membrány a umožní se tak funkční spojení s α -helixem G_{α} podjednotky G-proteinu přes čtvrtý aminokyselinový zbytek od C konce podjednotky Y391 /Hulme, 2013/.



Obrázek 7: *Aktivace muskarinového M_2 receptoru. Model muskarinového M_2 receptoru v inaktivní konformaci s navázaným QNB vlevo (PDB ID: 3UON) a v aktivovaném stavu s navázaným agonistou iperoxo vpravo (PDB ID: 4MQS)/www.rcsb.org/. Žlutě jsou znázorněny vodíkové vazby. Růžová barva označuje alosterickou oblast, žlutá ektopické vazebné místo, modrá ortosterické vazebné místo, zelená (transmission switch), tyrkysová (tyrosine toggle switch) a červená (ionic-lock switch).*

1.5.2 Dynamika aktivace muskarinových receptorů

GPCR jsou často považovány za přepínače mezi dvěma stavy, aktivním a inaktivním. Rozmanitost funkčních odpovědí mnoha GPCR však nelze vysvětlit jednoduchým modelem "zapnuto - vypnuto". Aktivace receptoru odpovídá spíše dynamické adaptabilní struktuře. Řada biochemických a biofyzikálních studií potvrzuje, že GPCR jsou flexibilní dynamické proteiny a že strukturně odlišné ligandy mohou vyvolat a stabilizovat specifické konformace receptoru a aktivovat různé signální dráhy /*Kenakin, 2007; Kobilka a Deupi, 2007*/.

Pomocí jednoduchého přepínačového modelu lze vysvětlit aktivaci rhodopsinu, který nevykazuje žádnou bazální aktivitu a ke změně struktury receptoru a jeho aktivaci dochází skokovou formou. Energie absorpce fotonu je zde využita k vyvolání konformační změny receptoru přes vysokou počáteční energetickou bariéru nutnou pro izomerizaci retinalu /*Trzaskowski a spol., 2012*/.

Mnohá pozorování však nasvědčují tomu, že přenos signálu prostřednictvím řady dalších GPCR, včetně muskarinových receptorů, je komplexnější. Různí agonisté na daném GPCR mají různou účinnost a aktivují různé signální dráhy /*Kenakin, 2003 a 2007*/ . U těchto receptorů mají agonisté zpravidla poměrně nízkou afinitu a rychlou disociaci. Při absenci agonisty nedosahují plně inaktivní konformace, tzn. mají bazální aktivitu, a jejich vnitřní flexibilita dovoluje receptoru zaujímat různé konformační stavy, mezi nimiž jsou nízké energetické bariéry /*Deupi a spol., 2010*/ . Aktivace pravděpodobně probíhá skrze sérii konformačních mezistavů a zahrnuje zrušení nekovalentních interakcí, které stabilizují inaktivní stav receptoru. Navázání strukturálně odlišných agonistů může znamenat zrušení různých kombinací těchto intramolekulárních interakcí, které vedou k různým konformacím receptoru a aktivaci různých signálních drah. Právě dynamický charakter GPCR je esenciální pro jejich signalizační dráhy /*Kenakin, 2003 a 2007*/ . Vazba agonisty nebo parciálního agonisty snižuje energii aktivní konformace ve vztahu k inaktivní konformaci. Energetický profil může dále změnit spřažení s G-proteinem. Naopak inverzní agonista může snížit energii inaktivní konformace ve vztahu k aktivní konformaci /*Kobilka a Deupi, 2007*/ .

Bazální aktivita může odrážet vnitřní flexibilitu receptoru a jeho tendenci existovat ve více než jedné konformaci i v nepřítomnosti ligandu. Receptor s nízkou bazální aktivitou může být v nepřítomnosti agonisty omezen do jedné inaktivní konformace s hlubokým energetickým minimem. Naopak vysoká bazální aktivita může být vysvětlena malými energetickými rozdíly mezi inaktivním a aktivním stavem a nízkou energetickou bariérou, která zvyšuje pravděpodobnost spontánního přechodu do aktivního stavu /*Kobilka a Deupi, 2007*/ .

Energie vazby agonisty přispívá ke změně energetického profilu prostřednictvím změny sítě stabilizujících interakcí k upřednostnění aktivní konformace. Agonista může přímo rušit

existující interakce a tím upřednostnit vznik nových interakcí, nebo může fungovat jako můstek vytvářející nové interakce mezi TM helixy stabilizujícími nový konformační stav /Kobilka a Deupi, 2007/.

Ze zrychlené simulace molekulární dynamiky M₂ receptoru /Miao a spol., 2013/ vyplývá, že při přechodu receptoru z inaktivního do aktivovaného stavu dochází k zesílení sítě stabilizujících interakcí v oblasti vazebného místa a zeslabení v oblasti intracelulárních domén v místě interakce s G-proteinem.

1.6 Možnosti selektivního ovlivnění muskarinových receptorů

Látky selektivně aktivující, blokující nebo modulující jednotlivé podtypy mAChR by mohly sloužit jako vhodné prostředky při léčbě řady onemocnění. Hledání selektivních ortosterických ligandů mAChR je však problematické. Klasické (ortosterické) vazebné místo muskarinových receptorů má u všech podtypů téměř úplně shodnou strukturu /Hulme a spol., 2003b/ a to výrazně omezuje selektivitu ortosterických ligandů. Jedná se o oblast tvořenou transmembránovými oblastmi TM3-7 obsahující vysoce konzervované hydrofilní aminokyseliny. Jsou to zejména aspartát D3.32, který svým záporným nábojem stabilizuje vazbu s kladně nabitou amoninovou hlavu ortosterických ligandů, a asparagin N6.52 /Hulme, 2013/.

V současné době je známa řada podtypově selektivních antagonistů a alosterických modulátorů mAChR, ale existuje jen velmi málo selektivních agonistů. Navíc jejich selektivita je velice slabá.

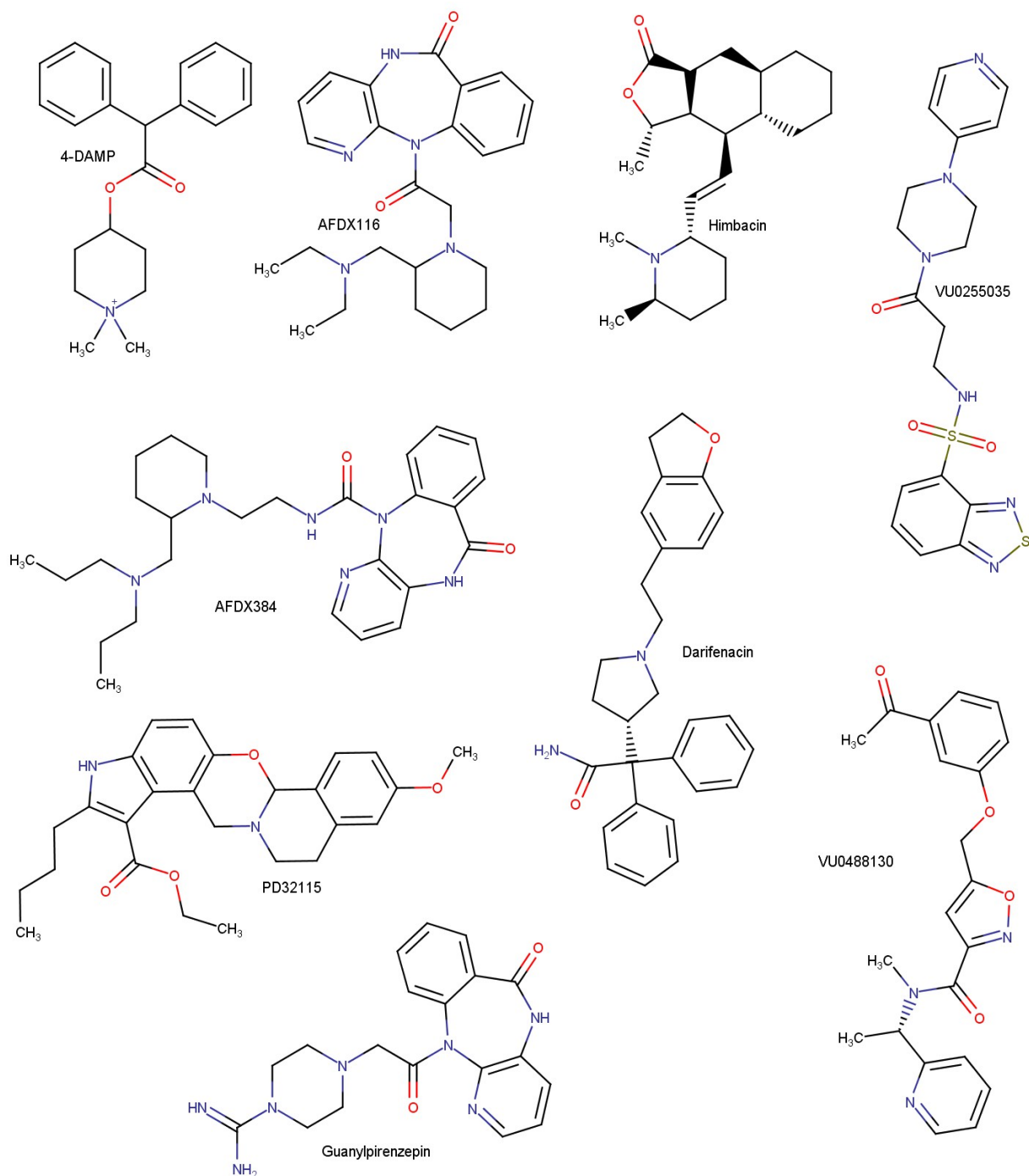
1.6.1 Selektivní antagonisté muskarinových receptorů

Antagonisté muskarinových receptorů jsou obecně větší molekuly než agonisté, což jim zřejmě dovoluje interagovat s postranními řetězci aminokyselin v méně konzervovaných oblastech mimo ortosterické místo. V současné době je známa řada antagonistů mAChR s relativně vyšší afinitou pro jeden nebo dva podtypy muskarinových receptorů (Tabulka 3; str. 30, Obrázek 8; str. 31), z nichž někteří jsou ve fázi klinických testů nebo už nacházejí využití v klinické praxi jako například selektivní antagonisty M₃ receptorů darifenacin (Enablex) při léčbě inkontinence a hyperaktivního močového měchýře /www.FDA.gov/.

Tabulka 3: *Vybraní selektivní a částečně selektivní muskarinová antagonisté. Afinita k jednotlivým podtypům muskarinových receptorů je vyjádřena jako záporný logaritmus inhibiční konstanty K_i*

	<i>Selektivita</i>	M₁	M₂	M₃	M₄	M₅
4-DAMP¹	M ₃ /M ₁	9.2	8.3	9.3	8.9	9.0
AFDX-116¹	M ₂ ,M ₄	6.2	6.7-7.3	6.1	7.0-8.7	5.3-5.6
AFDX-384¹	M ₂ ,M ₄	7.3-7.5	8.0-9.0	7.2-7.8	8.0-8.7	6.3
darifenacin¹	M ₃	8.3	7.3-7.6	9.1	8.1	8.6
guanylpirenzepin¹	M ₁	7.7	5.6	6.5	6.5	6.8
himbacin¹	M ₂ ,M ₄	7.1	7.9-8.4	6.9-7.2	7.9-8.2	5.4-6.5
pirenzepin¹	M ₁	8.3	4.9-6.4	5.6-6.7	5.9-7.6	6.2-6.9
tripitramin¹	M ₂	8.8	9.6	7.1-7.4	7.8-8.2	7.3-7.5
VU0255035¹	M ₁	7.8	6.2	6.1	5.9	5.6
VU0488130²	M ₅	<5	<5	<5	<5	6.5
PD 320115³	M ₄	<5	6,47	6,82	9	<5

Údaje jsou převzaty z: ¹Alexander a spol., 2011; ²Gentry a spol., 2014; ³Böhne a spol., 2002/



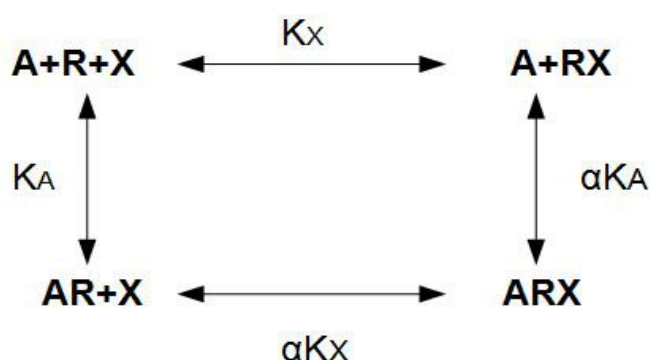
Obrázek 8: Strukturní vzorce vybraných selektivních muskarinových antagonistů.
/PubChem; www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/

1.6.2 Alosterické modulátory muskarinových receptorů

Alosterické modulátory jsou látky schopné po navázání na receptor měnit jeho konformaci a tím jeho afinitu k ortosterickému ligandu. Stejným způsobem mění i vazbu ortosterického ligandu afinitu receptoru pro alosterický modulátor. Dochází-li po navázání jednoho ligandu k poklesu afinity pro druhý ligand, hovoříme o negativní kooperativitě, v opačném případě se jedná o kooperativitu pozitivní. Pokud při současné interakci obou ligandů s receptorem ke

vzájemnému ovlivnění afinit nedojde, jedná se o neutrální kooperativitu /Kenakin, 2004/. O alosterickou interakci se jedná i v případě interakce receptoru s agonistou a G-proteinem. Vazba agonisty zvyšuje afinitu receptoru pro G-protein a naopak vazba G-proteinu na receptor zvyšuje afinitu pro agonistu. Alosterická interakce agonisty a G-proteinu pak vyvolá snížení afinity α -podjednotky G-proteinu pro GDP a jeho výměnu za GTP.

Nejjednodušším modelem alosterické interakce popisujícím reciproční ovlivnění afinit ligandů je model ternárního komplexu (Obrázek 9) /Ehlert, 1988/. Podle tohoto modelu může být alosterická interakce kvantifikována pomocí rovnovážných disociačních konstant pro každý ligand a faktorem kooperativity.



Obrázek 9. Model ternárního komplexu alosterické interakce.

R = receptor; X = ortosterický ligand; A = alosterický ligand; K_X a K_A = rovnovážné disociační konstanty komplexů AR a RX ; α = faktor kooperativity (vzájemná maximální změna afinity A a X k jejich vazebným místům při současném navázání do formy ternárního komplexu AXR).

Faktor kooperativity α udává velikost kooperativity mezi alosterickým a ortosterickým ligandem, který odpovídá násobku, o který se změní afinita jednoho ligandu po navázání druhého. Hodnota $\alpha > 1$ znamená negativní kooperativitu (snížení afinity, zvýšení disociačních konstant K_X a K_A), hodnota $\alpha < 1$ pozitivní kooperativitu (zvýšení afinity, snížení disociačních konstant K_X a K_A), $\alpha = 1$ neutrální kooperativitu.

Důležitým rysem alosterické modulace je změna kinetiky vazby ortosterického ligandu /Christopoulos a spol., 1998; Christopoulos a Kenakin, 2002/. Pro asociaci ligandu je zpravidla limitující difuze, rychlost asociace je tedy konstantní. Působení alosterického ligandu na afinitu ortosterického ligandu se obvykle projeví změnou disociace ortosterického ligandu a to zpomalením v případě pozitivní kooperativity a zrychlením v případě negativní kooperativity. Změny kinetiky vazby ortosterického ligandu se mohou projevit i v přítomnosti alosterického ligandu s neutrální kooperativitou a jsou tak důležitým ukazatelem alosterické interakce. Vliv

pozitivní a negativní kooperativity alosterických modulátorů na asociaci ortosterického ligandu je u mAChR ovlivněn sterickým bráněním, které zpomaluje jak asociaci tak disociaci ortosterických ligandů bez ohledu na kooperativitu /Proška a Tuček, 1994/.

Vazba alosterického modulátoru neovlivňuje jen afinitu receptoru pro ortosterický ligand, ale i funkční odpověď vyvolanou ortosterickým ligandem a její kinetiku, případně i bazální aktivitu receptoru /Jakubík a spol., 2009/. Obvykle se zvýšení afinity pro ortosterického agonistu projevuje jako zvýšení jeho schopnosti (potency) vyvolat aktivaci receptoru (to je snížení koncentrace potřebné k vyvolání poloviny maximální odpovědi) /Lazareno a spol., 1999/. Alosterické modulátory však mohou mít i opačný vliv na funkční odpověď než jaký mají na vazbu ortosterického ligandu /Zahn a spol., 2002; Jakubík a spol., 2009/. Pro účinek alosterických modulátorů na funkční odpověď je model ternárního komplexu nedostačující, protože nebere v úvahu aktivní a inaktivní stav receptoru a alosterickou modulaci signalizace. To proto, že ternární komplex ARX je konformačně odlišný od binárního komplexu RX.

Vliv alosterických modulátorů na vazbu, funkční odpověď receptoru i kinetiku vazby a odpovědi je limitován vzájemnou kooperativitou ligandů. Pro vazbu a její kinetiku je limitní faktor kooperativity α . Modulace funkční odpovědi je komplexní a výsledná kooperativita je dána jak faktorem kooperativity α tak faktorem popisujícím spontánní a indukovanou aktivaci /Jakubík a El-Fakahany, 2015/. Vliv alosterického ligandu je tedy satureovatelný a ovlivňuje vazbu i funkci ortosterického ligandu pouze v určitém koncentračním rozmezí. Nad touto hranicí už zvyšování koncentrace alosterického modulátoru jeho účinek na vazbu a odpověď na stimulaci klasickým ligandem nemění, čímž se snižuje nebezpečí předávkování. Tím se alosterická modulace zásadně liší od kompetice dvou ortosterických ligandů, která je vzhledem ke koncentraci ligandů proporcionální.

Alosterická vazebná místa muskarinových receptorů se nacházejí v extracelulární oblasti receptoru /Lazareno a spol., 2000 a 2002, Birdsall a spol., 2001, Kruse a spol., 2013/, která se mezi podtypy liší. Díky tomu se liší i afinita alosterických ligandů k jednotlivým podtypům mAChR. Například jedny z prvních popsanych alosterických modulátorů alcuronium a galamin /Clark a Mitchelson, 1976; Dunlap a Brown 1983, Stockton a spol., 1983, Nedoma a spol., 1986, Tuček a spol., 1990/ mají nejvyšší afinitu k podtypu M_2 . Afinita klesá v případě alcuronia v pořadí $M_2 > M_4 = M_3 > M_1 > M_5$ /Jakubík a spol., 1995/ a v případě galaminu $M_2 > M_4 > M_1 > M_3 > M_5$ /Ellis a spol., 1991; Gnagey a spol., 1999/. Výrazné podtypové selektivity lze dosáhnout také díky vzájemné kooperativě různých dvojic ortosterický - alosterický ligand /Jakubík a spol., 1995 a 1997/.

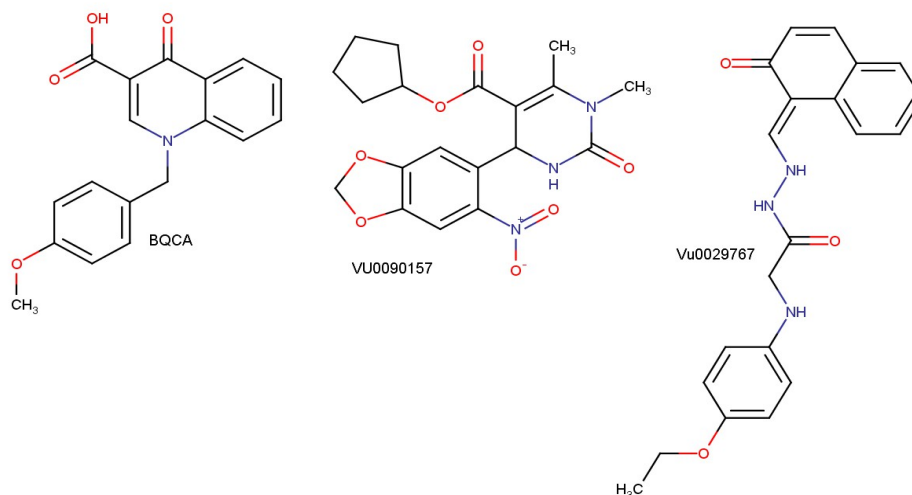
Faktor kooperativity závisí na komplexu receptor - ortosterický ligand - alosterický ligand /Kenakin, 2004/. Pozitivní kooperativita dvojice ortosterický - alosterický ligand na

jednom podtypu receptoru může být kombinována s negativní nebo neutrální kooperativitou na jiném podtypu /Ma a spol., 2009/. Určitý alosterický modulátor může mít pozitivní kooperativitu s jedním a negativní nebo neutrální kooperativitu s druhým ligandem na stejném podtypu. Například alosterický modulátor LY2033298 má na M₂ receptoru pozitivní kooperativitu s oxotremorinem-M a negativní s xanomelinem /Valant a spol., 2012/, pozitivně moduluje vazbu acetylcholinu na M₄, ale neovlivňuje vazbu NMS a QNB /Leach a spol., 2010/. Alosterické modulátory ovlivňují afinitu ortosterických ligandů v různé míře, od několikanásobného posunu po stonásobky. Alosterický modulátor N-chlorometyl brucin zvyšuje afinitu acetylcholinu k M₃ receptoru 3x /Lazareno a Birdsall, 1995/, zatímco BQCA (benzylchinolonkarboxylová kyselina) u M₁ 100x /Canals a spol., 2012/.

Z pohledu alosterických interakcí patří muskarinové receptory mezi nejlépe prostudovanou skupinu receptorů spřažených s G-proteiny /Tuček a spol., 1990; Proška a Tuček, 1994; Jakubík a spol., 1995 a 1997; Lazareno a Birdsall, 1995; Christopoulos a spol., 1998; Lazareno a spol., 2000, 2002 a 2004/. Jako alosterické modulátory muskarinových receptorů působí řada chemicky velice různorodých látek, jako například některé steroidní látky, alkaloidy nebo peptidy /Jakubík a El-Fakahany, 2010/.

Prvním popsaným alosterickým modulátorem s pozitivní kooperativitou s přirozeným agonistou acetylcholinem byl brucin, který slabě zvyšoval jeho afinitu k M₁, M₃ a M₄ receptoru /Jakubík a spol., 1997; Lazareno a spol., 1998/ a posiloval aktivaci M₁ a M₄ receptorů /Birdsall a spol., 1999/. "Absolutní" funkční podtypová selektivita byla poprvé popsána u thiochromu. Na M₄ receptorech působí thiochrom jako selektivní pozitivní alosterický modulátor acetylcholinu. Zvyšuje jeho afinitu i potenci. Na ostatních podtypech mAChR thiochrom vykazuje neutrální kooperativitu a neovlivňuje vazbu acetylcholinu ani jeho funkční odpověď /Lazareno a spol., 2004/.

Objev BQCA /Ma spol., 2009/ podpořil úsilí o vývoj M₁ selektivních pozitivních alosterických modulátorů jako možných prostředků pro léčbu Alzheimerovy choroby. BQCA zvyšuje jak afinitu acetylcholinu k M₁ receptoru, tak i jeho potenci aktivovat receptor. Navíc pozitivně reguluje neamyloidogenní štěpení APP in vitro a zvyšuje prokrvení v korové oblasti mozku /Ma a spol., 2009/. V současnosti je známa celá řada nových strukturně různorodých M₁ selektivních alosterických modulátorů acetylcholinu jako například VU0090157 a VU0029767 /Marlo a spol., 2009/ (Obrázek 10; str. 35). Známa je i řada pozitivních modulátorů acetylcholinu selektivních pro další podtypy muskarinových receptorů jako M₅ selektivní VU0238429 /Bridges a spol., 2009/, M₄ selektivní VU0010010 a jeho deriváty /Shirey a spol., 2008/ a LY2033298 /Chan a spol., 2008/.



Obrázek 10: *Strukturní vzorce pozitivních alosterických modulátorů acetylcholinu /PubChem; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>*

Látky, které by působily jako selektivní pozitivní nebo negativní alosterické modulátory přirozeného muskarinového agonisty acetylcholinu, by mohly najít uplatnění při léčbě řady onemocnění spojených s cholinergním přenosem jako je například Alzheimerova choroba. Výhodou alosterické modulace je účinek modulátoru pouze v místě a čase uvolnění acetylcholinu a zároveň snížení nebezpečí předávkování, protože maximální účinek je určen faktorem kooperativity a další zvyšování koncentrace modulátoru již nevede ke zvýšení účinku. Nevýhodou alosterických modulátorů je jejich poměrně nízká afinita a také složitost alosterické interakce z pohledu ovlivnění funkčních odpovědí receptoru, která komplikuje cílený vývoj látek s požadovanými funkčními vlastnostmi. Je tedy nutné stanovovat nejenom jejich vazebné vlastnosti ale i funkční účinky.

Také se zjistilo */Jakubík a spol., 1996, 1998/*, že alosterické modulátory jako alkuronium, galamin nebo strychnin jsou schopny aktivovat receptor i bez přítomnosti ortosterického agonisty. Tato aktivace dosahuje mnohem nižší účinnosti (efficacy) oproti aktivaci vyvolané ortosterickými agonisty. K aktivaci muskarinových receptorů může tedy docházet nejen z jejich klasického, ale i alosterického vazebného místa. V současnosti je známa řada látek působících jako alosteričtí agonisté s vysokou potencí a účinností aktivovat receptor */Lebois a spol., 2010 a 2011/*.

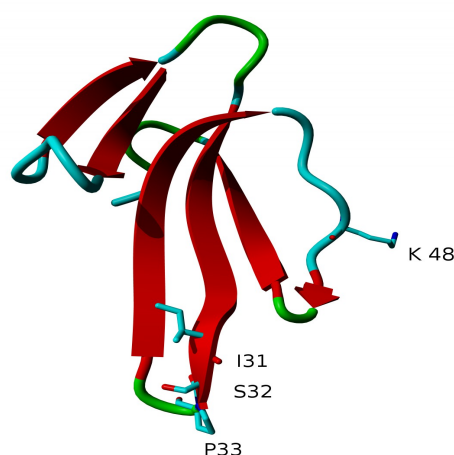
Účinek alosterického modulátoru na funkční odpověď receptoru závisí i na biologickém systému. Například na poměru množství receptorů ke G-proteinům, který ovlivňuje bazální aktivitu receptoru. Systém s vysokým poměrem receptor/G-protein má nízkou bazální aktivitu a velkou receptorovou rezervu. Agonisté mají vysokou účinnost a potenci aktivovat receptor. Naopak systém s nízkým poměrem receptor/G-protein má vysokou bazální aktivitu a žádnou

receptorovou rezervu, agonisté mají nízkou účinnost a potenci /*Jakubík a El-Fakahany, 2015*/. Například pozitivní alosterický modulátor acetylcholinu BQCA (Obrázek 10; str. 35) se selektivitou pro M₁ receptor se v systému s vysokou receptorovou rezervou chová jako alosterický agonista a aktivuje receptor i v nepřítomnosti acetylcholinu /*Canals a spol., 2012*/.

1.6.2.1 Muskarinové toxiny

Muskarinové toxiny jsou proteiny vázající se na alosterická místa muskarinových receptorů a ve vazbě k jednotlivým podtypům dosahují vysoké selektivity. Asi desítka těchto toxinů byla purifikována a identifikována z jedu afrických hadů rodu *Dendroaspis* (Mamba). Vážou se k preferenčnímu podtypu s vysokou afinitou v řádu pM - nM /*Karlsson a spol., 2000*/. Sestávají z 63-66 aminokyselin a čtyř disulfidických můstků formujících čtyři smyčky (Obrázek 11). Sekvenční identita jednotlivých toxinů je okolo 50 %. Navzdory podobnosti jejich primární a terciární struktury vykazují muskarinové toxiny funkční rozdíly a různé profily interakce s muskarinovými receptory. Z hlediska funkčních vlastností, se muskarinové toxiny mohou chovat jako kompetitivní antagonisté, alosterické modulátory i jako agonisté /*Servent a Fruchard-Gaillard, 2009*/.

Na základě jejich velikosti se usuzuje, že se vážou do extracelulární oblasti receptoru, která není konzervovaná. Srovnáním sekvencí muskarinových toxinů s odlišnou selektivitou k jednotlivým podtypům receptorů, byla identifikována klíčová oblast pro jejich vazebnou selektivitu. Jedná se o aminokyseliny v poloze 31-33 a v poloze 48 /*Karlsson a spol., 2000*/.



Obrázek 11: *Struktura MT7 (PDB ID: 2vlw)/www.rcsb.org/. Struktura beta-listů (červeně) a smyček s vyznačenými aminokyselinami I31, S32, P33 a K48, odpovídající za vazebnou selektivitu.*

Mezi vysoce selektivní toxiny patří muskarinový toxin MT7, nazývaný také (M_1 -toxin). Je vysoce selektivní pro podtyp M_1 , kde jeho afinita o více než pět řádu převyšuje afinitu k ostatním podtypům /Max a spol., 1993a,b; Mourier a spol., 2003; Olanas a spol., 2004; Fruchart-Gaillard a spol., 2006/. Dále toxin MT3 (neboli M_4 -toxin), který se váže k M_4 receptoru s více než o dva řády vyšší afinitou než k ostatním podtypům /Jolkkonen a spol., 1994; Liang a spol., 1996; Jerusalinsky a spol., 1998/. A M_2 -toxin, který se váže pouze na M_2 receptor /Carsi a spol., 1999/. Ostatní muskarinové toxiny jsou již méně selektivní.

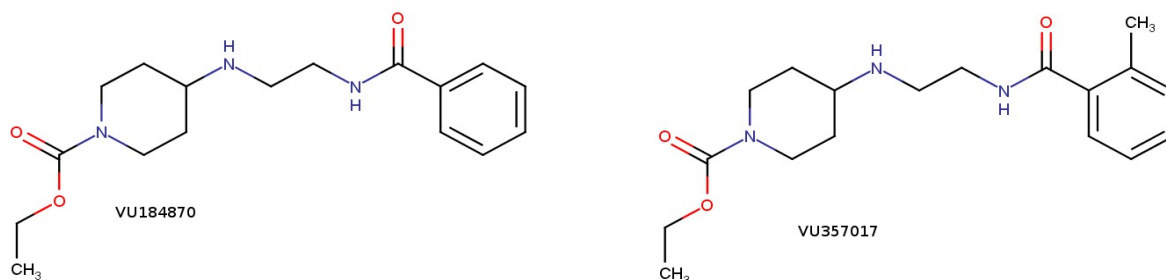
1.6.3 Funkčně selektivní agonisté muskarinových receptorů (atypičtí agonisté)

I přes vysokou homologii ortosterického vazebného místa muskarinových receptorů pro klasické agonisty byly popsány látky, které se sice vážou se srovnatelnou afinitou ke všem podtypům muskarinových receptorů, ale jsou schopny je do určité míry selektivně aktivovat (funkčně selektivní ligandy) /Eglen, 2012; Kruse a spol., 2014/. Tito tzv. atypičtí agonisté aktivují muskarinové receptory jinak než klasicky z ortosterického místa.

Muskarinové receptory mohou být aktivovány kromě z ortosterického vazebného místa také z alosterických míst /Jakubík a spol., 1996; Lebois a spol., 2010/ a tzv. ektopických míst (míst přilehlých k ortosterickému místu) /Langmead a spol., 2008/.

1.6.3.1 Selektivní alosteričtí agonisté

Látky, které aktivují receptor z alosterického vazebného místa jsou označovány jako alosteričtí agonisté. Příkladem mohou být látky VU0184670 a VU0357017 (Obrázek 12) a jejich deriváty /Lebois a spol., 2010/ selektivně aktivující M_1 receptor. Pomocí molekulárního modelování a cílené mutagenese bylo odhaleno vazebné místo pro tyto látky lokalizované na třetí extracelulární kličce. Tyto látky aktivují M_1 receptory s vysokou potencí (EC_{50} 150-500 nM) a účinností srovnatelnou s klasickými ortosterickými agonisty. Jejich alosterické působení je potvrzeno tím, že jejich aktivace je blokována atropinem nekompetitivním způsobem a že nevytěšňují NMS z ortosterického vazebného místa.

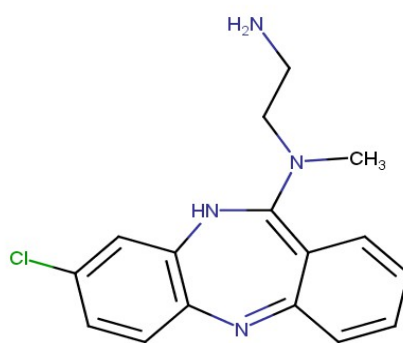


Obrázek 12: Strukturní vzorce alosterických M_1 selektivních agonistů VU0184670 a VU0357017. /PubChem; www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/

1.6.3.2 Selektivní ektopičtí agonisté

Ektopické ligandy aktivují receptor prostřednictvím interakcí s nekonzervovanými aminokyselinami v těsném okolí ortosterického vazebného místa. Oproti alosterickým ligandům interagují s ortosterickými ligandy kompetitivním způsobem /*Jakubík a spol., 2014a*/.

Příkladem ligandu vázajícího se do ektopického místa je N-desmetylklozapin (NDMC; Obrázek 13). NDMC je aktivní metabolit klozapinu, atypického antipsychotika využívaného pro léčbu schizofrenie /*Lameh a spol., 2007*/ . Váže se s nanomolární afinitou ke všem muskarinovým podtypům /*Sur a spol., 2003; Gregory a spol., 2010*/, ale je funkčně selektivním parciálním agonistou na lidských rekombinantních /*Sur a spol., 2003; Davies a spol., 2005*/ a krysích přirozených M₁ receptorech /*Thomas a spol., 2010*/ . V případě M₁ receptorů z lidské mozkové kůry však působí jako antagonist a /*Thomas a spol., 2010*/ . Protichůdné působení na M₁ receptor v závislosti na biologickém systému bylo popsáno i u klozapinu /*Olianas a spol., 1999; Li a spol., 2005*/ .



N-desmetylklozapin

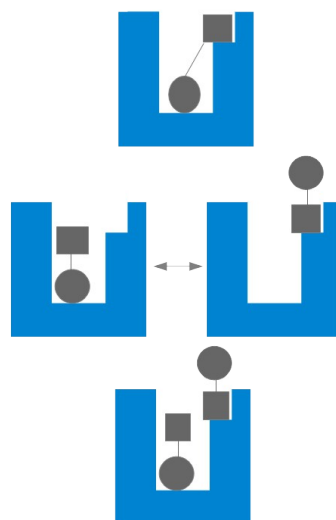
Obrázek 13: *Strukturní vzorec NDMC*
/PubChem; www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/

Řada mutačních studií /*Sur a spol., 2003; Spalding a spol., 2006; Lebon a spol., 2009; Jacobson a spol., 2010*/ naznačuje, že NDMC interaguje s M₁ receptorem a aktivuje ho z ektopického místa (ektopický agonista), které ne zcela překrývá ortosterické vazebné místo. Přesto bylo prokázáno, že D3.32 v ortosterickém vazebném místě je klíčový pro aktivaci M₁ receptoru NDMC, stejně jako je tomu u acetylcholinu /*Lebon a spol., 2009*/ . Původně byl NDMC považován za alosterického agonistu na základě pozorování, že mutace v ortosterickém vazebném místě Y381A, která výrazně snížila potenci acetylcholinu aktivovat M₁ receptor, zvýšila potenci aktivace receptoru a dokonce zvýšila účinnost (efficacy) NDMC na úroveň plného agonisty /*Sur a spol., 2003*/ . Kinetické disociační studie však neprokázaly alosterické působení NDMC na ortosterického antagonistu NMS /*Spalding a spol., 2006*/ . Farmakologická

analýza prokázala kompetici mezi NDMC a ortosterickými ligandy, agonistou karbacholem a antagonistou atropinem /Spalding a spol., 2006/. NDMC je svou velikostí i strukturou blízký selektivnímu antagonistovi M₁ receptoru pirenzepinu, za jehož selektivní působení zřejmě odpovídají interakce v těsném okolí ortosterického vazebného místa.

1.6.3.3 Bitopiční agonisté muskarinových receptorů

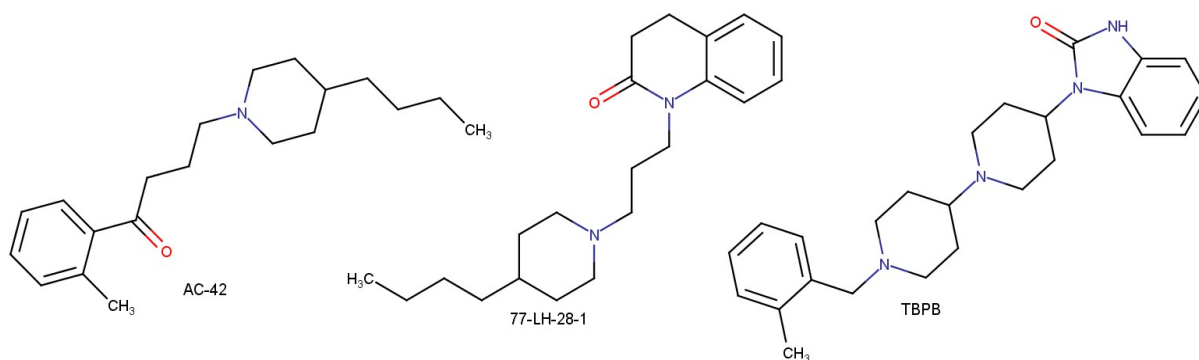
Zvláštním typem muskarinových ligandů skýtajícím potenciál pro selektivní aktivaci jsou tzv. bitopiční agonisté. Jedná se o molekuly schopné se současně vázat jak do ortosterické (případně ektopické) tak alosterické části receptoru. Bitopické látky mají jak alosterické (změna vazebné kinetiky ortosterických ligandů) tak i ortosterické (kompetice s ortosterickými ligandy) vlastnosti /Jakubík a spol., 2002, 2014b/. Způsob vazby těchto látek na receptor může mít různé varianty (Obrázek 14) /Lane a spol., 2013/. Pokud je bitopický ligand dostatečně veliký, může se jeho jedna (bivalentní) molekula vázat současně do ortosterického i alosterického místa (Obrázek 14 nahoře). Menší bitopický ligand se může vázat buď do ortosterického nebo alosterického místa a přecházet mezi nimi (Obrázek 14 uprostřed, tzv. "flip-flop" mechanismus) /Schwarz a spol., 2007/. Třetí možností je, že se dvě molekuly téhož ligandu váží současně na ortosterické i alosterické místo (Obrázek 14 dole). Protože se vzájemně ovlivňují, označujeme tento typ vazby bitopického ligandu jako kooperativní.



Obrázek 14: Možné interakce bitopických ligandů s receptorem. Nahoře: bivalentní; uprostře "flip-flop"; dole kooperativní.

Výhodou bitopických ligandů je kombinace charakteristických vlastností ortosterických (vysoká potence a účinnost) a alosterických ligandů (podtypová selektivita). Cílený návrh bitopických ligandů by využitím příslušných ortosterických a alosterických složek mohl být cestou k vývoji účinných selektivních agonistů /*Mohr a spol., 2010; Antony a spol., 2009; Disingrini a spol., 2006*/ nebo antagonistů /*Steinfeld a spol., 2007; Boulos a spol., 2013*/. Důležitou roli zde má i můstek (linker) spojující oba farmakofory, který může mít sám o sobě vliv na schopnost ligandu aktivovat receptor nebo způsobit nevhodnou orientaci bitopické molekuly /*Valant a spol., 2012*/.

Bitopický mechanismus vazby a aktivace receptoru zřejmě využívají i někteří funkčně selektivní agonisté, kteří byli původně klasifikováni jako alosteričtí agonisté. Dosud nebyla publikována krystalová struktura muskarinových receptorů s navázaným žádným z těchto ligandů, která by tento způsob vazby potvrdila. Jedná se například o M₁ funkčně selektivní agonisty AC-42, jeho účinnější analog 77-LH-28-1 nebo TBPB (Obrázek 15) /*Spalding a spol., 2002; Langmead a spol., 2008; Jacobson a spol., 2010*/. Na základě struktury, molekulárního modelování, mutačních a podrobných farmakologických stanovení se jejich bitopický charakter jeví pravděpodobný /*Avlani a spol., 2010; Keov a spol., 2014*/.



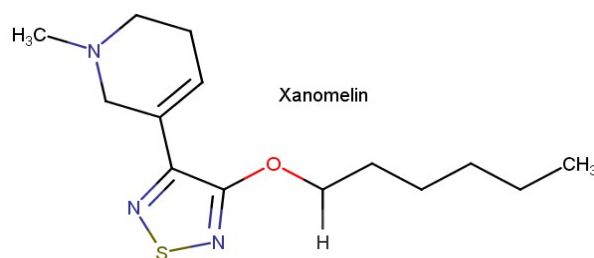
Obrázek 15: *Strukturní vzorce AC-42; 77-LH-28-1; TBPB*
/PubChem; www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/

Byla provedena řada mutačních studií zkoumajících vazbu a aktivaci receptoru těmito agonisty ve srovnání s acetylcholinem nebo jinými ortosterickými agonisty /*Spalding a spol., 2002, 2006; Lebon a spol., 2009; Gregory a spol., 2010, Keov a spol., 2014*/. Vazba a aktivace AC-42, 77-LH-28-1, a TBPB je ovlivněna jak mutacemi v oblasti ortosterického vazebného místa, tak i v odlehlejších oblastech. Tyto látky využívají k aktivaci receptoru D3.32 v ortosterickém místě, který je klíčový pro vazbu a aktivaci receptoru ortosterickými ligandy /*Gregory a spol., 2010, Keov a spol., 2014*/. Přesto se zdá, že se nevážou přímo do

ortosterického místa, ale místa k němu přilehlého /Spalding a spol., 2006; Lebon spol., 2009/. Mutace v ortosterickém místě Y3.33, Y6.51 a N6.52, klíčové pro aktivaci ortosterickými agonisty, ovlivnily aktivaci receptoru prostřednictvím AC-42 jen velmi málo /Spalding a spol., 2002/, přičemž mutace W101A^{3,38} ležící jeden helikální závit nad D3.32 vedla na rozdíl od karbacholu a acetylcholinu ke zvýšení aktivace receptoru agonistou AC-42. Mutace W99^{3,28}A výrazně zvýšila afinitu AC-42 a 77-LH-28-1, ale snížila afinitu acetylcholinu k M₁ receptoru /Lebon a spol., 2009/. Aktivaci receptoru agonisty AC-42 a 77-LH-28-1 ovlivnily i mutace v odlehlejších oblastech /Spalding a spol., 2002 a 2006; Lebon a spol., 2009/. Bylo zjištěno že mutace M₁ receptoru v N-koncové sekvenci a TM1, EL3, extracelulární části TM7, nebo Y82^{2,61} v extracelulární části TM2 narušují aktivaci vyvolanou AC-42. Účinnost agonistů AC-42, 77-LH-28-1 a TBPB je také ovlivněna mutací Phe 77^{2,56} na extracelulárním konci TM2 receptoru /Avlani a spol., 2010; Jacobson a spol., 2010/. Zdá se, že část molekuly 77-LH-28-1 se váže do alosterického místa stejného jako modulátor C₇/3-phth /Avlani a spol., 2010/.

Interakce TBPB s extracelulárními oblastmi TM 2,3,7 spojenými s vazbou alosterického modulátoru galaminu /Matsui a spol., 1995/ byly potvrzeny pomocí molekulárního modelování a mutační analýzy /Keov a spol., 2014/. Vazbu TBPB a AC-42 do stejného místa přilehlého k ortosterickému místu potvrzují i další modelační a mutační studie /Jacobson a spol., 2010/, podle nichž se toto místo liší od místa vazby ektopického agonisty NDMC.

Mezi funkčně selektivní bitopické ligandy muskarinových receptorů vázající se do ortosterického a alosterického místa receptoru patří xanomelin (Obrázek 16) /Jakubík a spol., 2002/. Xanomelin je jedním z mála funkčně selektivních muskarinových agonistů /Shannon a spol., 1994 a 2000; Šantrůčková a spol., 2014/. Váže se se srovnatelnou afinitou ke všem podtypům muskarinových receptorů /Jakubík a spol., 2006/, ale preferenčně aktivuje M₁ /Shannon a spol., 1994/ a M₄ /Shannon a spol., 2000/ receptory s účinností srovnatelnou s plnými ortosterickými agonisty. Díky svému unikátnímu způsobu interakce s receptorem patří mezi bitopické agonisty muskarinových receptorů /Jakubík a spol., 2002/.



Obrázek 16: Strukturní vzorec xanomelinu
/PubChem; www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/

Xanomelin se váže na receptor dvěma způsoby. Reverzibilní vazbou do ortosterického vazebního místa a neodmyvatelnou vazbou do zatím nespecifikovaného alosterického místa /Christopoulos a spol., 1998; Jakubík a spol., 2002 a 2006/. Neodmyvatelná vazba má poločas odmytí přibližně 30 hodin /Jakubík a spol., 2002/ a závisí na délce O-alkylového řetězce, který musí být O-butyl nebo delší /Jakubík a spol., 2004/. Na purifikované rozpustné receptory se váže xanomelin jen prostřednictvím reverzibilní vazby, ale na receptory rekonstituované do liposomů se opět váže oběma způsoby /Jakubík a spol., 2004/. Zdá se, že neodmyvatelná vazba xanomelinu je zprostředkována interakcí O-alkylového řetězce s membránovými lipidy. Xanomelin aktivuje receptory jak prostřednictvím reverzibilní, tak neodmyvatelné vazby a aktivace oběma způsoby je blokována přítomností ortosterického antagonisty /Jakubík a spol., 2002/. Na M₅ receptoru funguje neodmyvatelně navázaný xanomelin jako antagonist /Grant a El-Fakahany, 2005/.

Neodmyvatelně navázaný xanomelin má jak kompetitivní tak alosterické vlastnosti /Christopoulos a spol., 1998; Jakubík a spol., 2002/, což odpovídá bitopickému charakteru jeho vazby na receptor. Chování neodmyvatelného xanomelinu může být vysvětleno mechanismem podobným "flip-flop" vazbě bitopických agonistů /Schwarz a spol., 2007/. Přičemž v alosterickém místě je vázán trvale a interakce s ortosterickým místem je reverzibilní. Samotná přítomnost neodmyvatelné vazby xanomelinu nemůže vysvětlit jeho funkční selektivitu pro podtypy M₁ a M₄, neboť ta se vyskytuje se srovnatelnou afinitou u všech podtypů /Jakubík a spol., 2006/. Některé výsledky naznačují, že funkční selektivitu xanomelinu by mohla vysvětlovat různá kinetika vzniku neodmyvatelné vazby. Na M₁ receptoru vzniká neodmyvatelná vazba prakticky okamžitě zatímco na M₂ receptoru je k jejímu vzniku nutná delší expozice xanomelinu /Jakubík a spol., 2006; Machová a spol., 2007/. Také bylo zjištěno, že neodmyvatelně navázaný xanomelin selektivně brání ortosterickému agonistovi karbacholu vyvolat další zvýšení hladiny nitrobenzických vápenatých iontů prostřednictvím M₁ a M₄ receptorů /Šantrůčková a spol., 2014/.

Xanomelin byl díky své schopnosti selektivně stimulovat aktivaci M₁ a M₄ receptorů zkoumán jako možná účinná látka při léčbě Alzheimerovy choroby a schizofrenie. V klinických studiích skutečně zlepšoval kognitivní schopnosti a potlačoval halucinace a bludy u pacientů s Alzheimerovou chorobou /Bodick a spol., 1997/ a schizofrenií /Shekhar a spol., 2008/. Pro nepříjemné vedlejší účinky, jako jsou poruchy srdečního rytmu, trávení nebo nadměrné slinění a pocení /Bymaster a spol., 2003/ v důsledku aktivace periferních M₂ a M₃ receptorů byl z klinických studií vyřazen. Přesto zůstává xanomelin díky své funkční selektivitě v popředí zájmů farmakologického výzkumu a objasnění mechanismu jeho působení by mohlo přispět k vývoji nových látek s požadovanými funkčními vlastnostmi bez vedlejších účinků. V současné době

jsou syntetizovány a zkoumány nové látky strukturně odvozené od xanomelinu /*Si a spol., 2010; Wang a spol., 2011; Boulos a spol., 2013; Bonifazi a spol., 2014*/.

1.6.3.4 Selektivita agonistů k určité signální dráze neboli “agonist bias”

Funkční selektivitu muskarinových agonistů lze chápat nejen jako selektivní aktivaci jednotlivých podtypů muskarinových receptorů, ale i jako selektivní aktivaci určité signální dráhy (efektoru). Muskarinové receptory jsou stejně jako ostatní GPCR dynamické struktury a mohou zaujmout po navázání strukturně odlišných agonistů různé konformace stabilizující mnohočetné aktivní stavy. To se pak projeví rozdílnou aktivací jednotlivých funkčních drah a následně efektorů, ke kterým tyto dráhy vedou /*Kobilka a Deupi, 2007*/.

Schopnost různých agonistů, ortosterických nebo alosterických, vyvolat různé konformace receptoru vedoucí k selektivní modulaci jednotlivých efektorů se označuje jako “agonist bias” /*Kenakin a Christopoulos, 2013*/.

K selektivnímu ovlivnění určitého efektoru může dojít i působením alosterických modulátorů. Například pozitivní alosterické modulátory acetylcholinu VU0090157 a VU0029767 zvyšují afinitu pro acetylcholin a potencují aktivaci PLC, ale pouze VU0090157 posiluje také aktivaci fosfolipázy D /*Marlo a spol., 2009*/.

Velký potenciál pro “agonist bias” mají bitopické ligandy /*Antony a spol., 2009*/.

Díky kombinaci dvou farmakoforů mohou vyvolat unikátní konformace receptoru odlišné od konformací vyvolaných samotnými ortosterickými či alosterickými agonisty. Schopnost ligandů selektivně modulovat určité signální dráhy ukazuje na nutnost pečlivé analýzy následků aktivace receptoru, ale také otevírá prostor pro navrhování a vývoj látek s terapeuticky užitečnějším profilem, selektivitou “bias” k požadované signální dráze, a tím k omezení vedlejších účinků /*Urban a spol., 2007; Violin a Lefkowitz, 2007; Kenakin, 2011*/.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo zjistit, zda atypičtí muskarinová M_1 selektivní agonisté xanomelin a N-desmetylklozapin využívají při aktivaci M_1 receptoru stejnou sérii tzv. aktivačních přepínačů jako klasičtí ortosteričtí neselektivní agonisté karbachol a oxotremorin, nebo aktivují receptor nějakým paralelním aktivačním mechanismem.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité chemikálie

Radioligandy byly zakoupeny u firmy ARC (USA), ostatní použité chemikálie, pokud není uvedeno jinak u firmy Sigma-Aldrich (ČR).

3.2 Mutagenese lidského muskarinového M₁ receptoru a příprava buněčných linií

Za účelem studia aktivačního mechanismu muskarinového M₁ receptoru byla provedena jeho cílená mutagenese v oblastech odpovídajících za vazbu ligandu mutace D105N, D105E a D99N, aktivaci receptoru D71N a jeho interakci s G-proteinem D122N a R123N. Následně byly připraveny buněčné linie z fibroblastů ovárií zlatého křečka (Chinese Hamster Ovary; CHO) stabilně exprimující přirozené (wild type; wt) i mutované M₁ receptory. Mutované aminokyseliny v sekvenci lidského muskarinového M₁ receptoru jsou znázorněny na obrázku 17 (str. 46).

Jako expresní vektor byl použit plazmid pcDNA3.1 (Invitrogen, USA) nesoucí sekvenci pro lidskou variantu muskarinového M₁ receptoru (hmAChR M₁) získaný od Missouri S&T Resource Center (Rolla, MO, USA). V plazmidu byly pomocí navržených mutačních primerů (syntetizovaných v Generi Biotech, ČR) a soupravy Quick Change II Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) a PCR reakce v Thermo-cycleru (Bio-Rad, ČR) provedeny příslušné mutace. Superkompetentní bakterie E. Coli (kmen XL1-Blue, Stratagene, USA) byly transformovány plasmidem kódujícím přirozený nebo mutovaný M₁ receptor dle protokolu výše uvedené soupravy metodou teplotního šoku (45 s, 42°C). Bakteriální suspenze byla nanášena na Petriho misky s LB agarom a ampicilinem (100 µg/ml) a ponechána přes noc v inkubátoru (37°C). Narostlé kolonie byly zaočkovány do LB média s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml a za stálého třepání (200 rpm) při 37°C byly kultivovány přes noc. Z takto připravených bakteriálních kultur byla pomocí soupravy GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid maxiprep Kit izolována plazmidová DNA. Koncentrace získané DNA byla změřena na přístroji Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA) a přítomnost mutace byla zkontrolována sekvenací na přístroji ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (MBÚ, AV ČR v.v.i.).

Jako expresní systém byly využity buňky CHO, které přirozeně neexprimují muskarinové receptory (CHO-K1). CHO-K1 buňky byly transfekovány plasmidem kódujícím přirozený nebo mutovaný lidský M₁ receptor prostřednictvím Lipofectaminu 2000 (Invitrogen, USA) a pro selekci klonů exprimujících receptor bylo využito rezistence na antibiotikum Geneticin obsažené v expresním plazmidu.

CHO-K1 buňky byly pěstovány v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Life

Technologies, USA). Po dosažení 75 % konfluencie byly opláchnuty fosfátovým izotonickým roztokem (Phosphate Buffered Saline; PBS, 150 mM NaCl s 10 mM fosfátovým pufrům, pH 7,4) a poté inkubovány 6 hodin v médiu Opti-MEM (Life Technologies, USA) v přítomnosti Lipofectaminu o koncentraci 5 µl/ml a plasmidové DNA o koncentraci 1 µg/ml. Po 48 hodinách byly transfekované CHO buňky rozsazeny 1:1000 a pěstovány v přítomnosti geneticinu (G418; Life Technologies, USA) o koncentraci 1000 ng/ml). Po 3 až 4 týdnech selekce v médiu s geneticinem byly připraveny nové stabilní linie CHO buněk exprimující přirozený nebo mutovaný M₁ receptor.

10	20	30	40	50	60
MNTSAPPAVS	PNITVLAPGK	GPWQVAFIGI	TTGLLSLATV	TGNLLVL ISF	KVNTTELKTVN
70	80	90	100	110	120
NYFLLSLACA	DLIIGTFSMN	LYTTYLLMGH	WALGTLAC DL	WLALDYVASN	ASVMNLLLIS
130	140	150	160	170	180
FDR YFSVTRP	LSYRAKRTPR	RAALMIGLAW	LVSFVLWAPA	ILFWQ YLVGE	RTVLAGQCYI
190	200	210	220	230	240
QFLSQP IITF	GTAMAAFYLP	VTVMCTLYWR	IYRETENRAR	ELAALQGSET	PGKGGGSSSS
250	260	270	280	290	300
SERSQPGAEG	SPETPPGRCC	RCCRAPRLQ	AYSWKEEEEE	DEGSMESLTS	SEGEEPGSEV
310	320	330	340	350	360
VIKMPVDPE	AQAPTKQPPR	SSPNTVKRPT	KKGRDRAGKG	QKPRGKEQLA	KRKTFSLVKE
370	380	390	400	410	420
KKAART LSAI	LLAFILTWTP	YNIMVL VSTF	CKDCVPETLW	ELGYWLCYVN	STINPMCYAL
430	440	450	460		
CNKA FRDTER	LLLLCRWDKR	RWRKIPKRP	SVHRTPSRQC		

Obrázek 17: *Sekvence lidského muskarinového M₁ receptoru s vyznačenými mutovanými aminokyselinami. Modře jsou vyznačeny mutované aminokyseliny, podtržené části označují transmembránové segmenty (TM1 – TM7). Pořadí aminokyselin je seřazeno od N-konce k C-konci. Zdroj sekvence /www.uniprot.org/*

3.3 Buněčné kultury a příprava membrán

Nové stabilní linie CHO buněk exprimující přirozený a mutované lidské muskarinové receptory M₁ byly pěstovány při teplotě 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO₂ v médiu pro tkáňovou kulturu DMEM doplněném o geneticin v koncentraci 50 ng/ml a 10 % fetální telecí sérum /*Jakubík a spol., 1995/* v Petriho miskách (75 cm²). Před sklizením byly buňky pro zvýšení exprese muskarinových receptorů vystaveny po 24 hodin působení butyrátu sodného o koncentraci 5 mM /*Dion a spol., 1997/*.

Konfluentní buňky byly sklizeny po pěti dnech růstu v kultuře. Nejprve byly opláchnuty dvakrát 5 ml PBS a následně, po přidání 4 ml PBS, sklizeny pomocí škrabky. Následovala centrifugace 3 min při 300 g a po odsátí supernatantu byl buněčný pelet zamražen v -20°C.

Zamražené CHO buňky sklizené z dvaceti Petriho misek byly resuspendovány v 10 ml

homogenizačního média (100 mM NaCl, 20 mM Na-HEPES, 10 mM EDTA, pH = 7,4) a na ledu homogenizovány homogenizátorem Polytron (Ultra-Turrax; Janke&Kunkel GmbH&Co. KG, IKA-labortechnik, Německo) při 22000 otáčkách/min dvakrát po dobu 30 sekund s přestávkou 30 sekund. Hrubé fragmenty byly odstraněny nízkootáčkovou centrifugací při 1000 g a 4°C po dobu 5 minut. Supernatant byl rozdělen do mikrozkušavek po 1 ml a centrifugován 30 min při 30000 g a 4°C. Po odsátí supernatantu byl sediment (membrány) resuspendován v 1 ml reakčního media (100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Na-HEPES, pH 7,4), nechán 30 minut ve 4°C a pak opětovně centrifugován 30 minut při 30000 g a 4°C. Získané membrány byly po odstranění supernatantu zamraženy v -80°C.

3.4 Stanovení proteinů

Množství proteinů v membránách bylo stanovováno spektrofotometricky při 690 nm Lowryho metodou /Lowry a spol., 1951/ v Petersonově modifikaci /Peterson, 1977/. Absorbance byla měřena na čtečce destiček (Wallac Victor™, Finsko).

3.5 Vazebné studie

Pomocí saturačních vazebných pokusů lze stanovit jak maximální počet vazebných míst (množství receptorů), tak afinitu receptoru k radioligandu. Afinitu receptoru k ligandu lze stanovit i nepřímo, prostřednictvím vytěšňovacích (kompetičních) pokusů, kdy sledovaný ligand soutěží o vazebné místo s radioligandem se známou afinitou.

V saturačních pokusech byla stanovena exprese přirozených a mutantních M₁ receptorů a jejich afinita k radioligandům ³H-N-metylskopolaminu (³H-NMS, specifická radioaktivita: 80 Ci/mmol) nebo 3-chinuklidinyl benzylátu (³H-QNB, specifická radioaktivita: 50,5 Ci/mmol). V kompetičních pokusech byla stanovena afinita k neznačeným agonistům karcholu, oxotremorinu, N-desmetylklozapinu (NDMC; N-desmethyloclozapine) a xanomelinu (Tocris, USA).

Všechny vazebné studie byly prováděny v 96-jamkových destičkách v kvadruplikátech. Membrány CHO buněk (10-30 µg proteinu na vzorek) byly inkubovány 3 hodiny při 30°C v reakčním médiu doplněném o příslušnou koncentraci daného ligandu. V saturačních pokusech byla koncentrace ³H-NMS v rozmezí 62,5-2000 pM a ³H-QNB 12,5-400 pM. U mutace v ortosterickém vazebném místě D105N byl použit 1,25-40 nM ³H-QNB. V kompetičních pokusech byl použit 1 nM ³H-NMS a vzrůstající koncentrace neznačených agonistů (koncentrace jsou uvedeny ve výsledcích a obrázcích). Celkový reakční objem pro vazebné studie byl 400 µl. Nespecifická vazba byla stanovena v přítomnosti 10 µM atropinu. V případě saturace ³H-QNB

na mutantu D105N byla jeho koncentrace zvýšena na 40 μM .

Inkubace byla ukončena rychlou filtrací radioaktivně označených membrán (Brandel Cell Harvester, Brandel, USA) za použití filtrů ze skleněných vláken (Whatmann GF/B, Whatman, UK), které byly v případě použití ^3H -NMS před filtrací namočený na 3 minuty do polyetyleniminu o koncentraci 5 g/l. Filtry byly usušeny v mikrovlnné troubě (3 min, 800W) a poté zataveny do scintilačního vosku Meltilex (Perkin Elmer, USA) zahříváním při 105°C po dobu 60 s. Radioaktivita zachycená na filtru byla měřena pomocí scintilačního počítače Wallac Microbeta 1450 (Wallac, Finsko). Přesná koncentrace radioligandu byla vypočtena ze známé specifické radioaktivity radioligandu a radioaktivity v médiu, stanovené kapalným scintilačním měřením v scintilačním roztoku Rotiszint (Carl Roth, Německo).

Vazba neodmyvatelně navázaného xanomelinu byla stanovena v kompetičních pokusech s 1 nM ^3H -NMS. Membrány byly resuspendovány v reakčním médiu v koncentraci 1 mg proteinu na ml. Suspenze byla rozdělena do mikrozkušavek po 100 μl a inkubována 20 minut při 37°C v přítomnosti 100 nM až 1 mM xanomelinu. Po inkubaci byly membrány za použití centrifugace (30 minut; 30000 g) 3-krát promyty 1 ml reakčního média, poté znovu resuspendovány v 1 ml reakčního média a inkubovány 1 h při 37°C. Po hodině následovalo opětovné trojnásobné promytí.

3.6 Akumulace inositolfosátů

Funkční odpověď na stimulaci M_1 receptorů byla stanovována jako agonistou vyvolaná akumulace inositolfosátů (IP_x) /Michal a spol., 2009/. Buňky CHO exprimující přirozený nebo mutovaný M_1 receptor byly nasazeny do 24-jamkových destiček. Konfluentní buňky byly inkubovány přes noc při 37°C v přítomnosti 100 nM ^3H -myo-inositolu (specifická radioaktivita: 20 Ci/mmol) v DMEM, aby došlo k označení fosfatidylinositol bisfosfátu (PIP_2) v buněčné membráně. Následně byly buňky opláchnuty 2-krát 400 μl Krebs-HEPES pufru (KHB; 138 mM NaCl; 4 mM KCl; 1,3 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 1,2 mM NaH_2PO_4 ; 20 mM Hepes, 10 mM glukóza, pH 7,4) a preinkubovány 15 minut při 37°C ve 400 μl KHB obsahujícím 10 mM LiCl. Poté byli přidáni agonisté v příslušných koncentracích do konečného objemu 500 μl . Po aktivaci M_1 receptoru agonistou dojde prostřednictvím $\text{PLC}\beta$ ke štěpení membránového PIP_2 a akumulaci inositolfosátů (tri-, di-, a monofosfátů). Přítomnost Li^+ iontů brání katabolismu IP_x . Po 20-ti minutové inkubaci bylo médium rychle odstraněno odsátím a reakce byla zastavena přidáním 200 μl 20 % trichloroctové kyseliny (trichloroacetic acid; TCA). Po 1 hodině ve 4°C byl odebrán alikvot TCA extraktu, obsahující IP_x , na stanovení radioaktivity. Sražené buňky, které zůstávají přilepené v jamkách, byly opláchnuty TCA a rozpuštěny ve 200 μl 1 M NaOH pro stanovení inkorporace radioaktivity, která zbývá v membránách. Míra akumulace IP_x byla stanovována

jako poměr rozpustných IPx ku celkové inkorporované radioaktivitě (součet radioaktivity v TCA extraktu a v NaOH lyzátu). Radioaktivita v TCA extraktu a NaOH lyzátu ze sražených buněk byla měřena kapalnou scintilací v scintilačním roztoku Rotiszint pomocí scintilačního počítače Wallac Microbeta 1450.

Pro stanovení aktivace muskarinových receptorů neodmyvatelně navázaným xanomelinem byl použit upravený postup pro měření akumulace IPx. Konfluentní CHO buňky exprimující přirozený nebo mutovaný M₁ receptor byly sklizeny jemnou trypsinizací a resuspendovány v KHB (2 Petriho misky/ml). Suspenze byla rozdělena do mikrozkrumavek po 100 μl a v přítomnosti v příslušných koncentracích (100 nM – 100 μM) xanomelinu inkubována 20 minut při 37°C. Následně byly buňky za použití centrifugace (3 minuty, 250 g) 3-krát promyty v 1 ml KHB, resuspendovány v 1 ml KHB a inkubovány 1 h při 37°C. Po 1 hodině následovalo opětovné trojnásobné promytí. Buněčné pelety byly resuspendovány v 100 μl KHB s přidáním ³H-myo-inositolem o koncentraci 500 nM a inkubovány 1 h při 37°C. Po inkubaci byla suspenze buněk centrifugována a médium odsáto. Buňky byly opláchnuty 1 ml KHB. Pelety byly rozděleny do triplikátu o výsledném objemu 800 μl KHB obsahujícím 10 mM LiCl a opět inkubovány 1 h při 37°C. Inkubace byla zastavena přidáním 500 μl stop roztoku (*chloroform:metanol:HCl v poměru 2:1:0,1*) a přenesením na led na 20 minut. Akumulace IPx byla stanovena po rozdělení této směsi na iontoměničových kolonách (Dowex AG1X8-200). Alikvot extraktu (650 μl) byl nanesen na iontoměničovou kolonu. Následovalo promytí 10 ml deionizované vody, 20 ml roztoku A (60 mM mravenčnan amonný, 5 mM borát sodný) a eluce zachycených IPx 4 ml roztoku B (1 M mravenčnan amonný, 0,1 M kyselina mravenčí). Množství nahromaděných ³H-IPx bylo stanoveno pomocí kapalně scintilace na scintilačním počítači (Packard Tricarb, oddělení radiomerie FgÚ AVČR v.v.i.).

3.7 Mikrofluorimetrické stanovení koncentrace nitrobuněčných vápenatých iontů

Aktivaci muskarinových receptorů podtypu M₁, lze sledovat také prostřednictvím stanovení koncentrace nitrobuněčných vápenatých iontů, jejichž uvolnění z endoplazmatického retikula je dalším krokem signalizační kaskády M₁ receptorů a díky zesílení signálu je tato metoda velice citlivá. Pro stanovení koncentrace vápenatých iontů byla využita fluorescenční sonda FURA 2 (Life Technologies, USA). Koncentrace nitrobuněčného vápníku je úměrná poměru intenzit fluorescence detekované při 510 nm, naměřené po excitaci 340 nm (excitační maximum FURA 2 s navázanými ionty vápníku) a 380 nm (excitační maximum volné FURA 2) /Gryniewicz a spol., 1985/.

CHO buňky exprimující mutované nebo přirozené M₁ receptory byly nasazeny na mikroskopická sklíčka o průměru 24 mm umístěných v Petriho miskách o průměru 35 mm. Po

dosažení 80 % konfluence byly 2-krát opláchnuty v KHB a inkubovány v přítomnosti 5 μM FURA 2-AM (ve formě acetoxymetylésteru, který je elektricky neutrální a prostupuje buněčnou membránou) rozpuštěné v KHB s 1 mM Pluronic F127 (surfaktant usnadňující vstup sondy do buněk) při 37°C po dobu 1 h. Po inkubaci byly buňky opláchnuty 2-krát v KHB a na mikroskopickém sklíčku přemístěny do promývací komůrky, která je součástí fluorescenčního mikroskopu (Olympus IX-90, Japonsko) a průběžně promývány (rychlostí 0,5 ml/min) KHB s 1 mM probenecidem, který brání úniku volné sondy z buněk. Obraz byl snímán pomocí CCD kamery propojené s počítačem vybaveným programem Metafluor 7.0 (Visitron System GmbH, Německo) s frekvencí 2 x 2 snímky/s (excitace 340/380). Obraz byl ukládán a vyhodnocen po skončení měření. Pro vyhodnocení byly vybrány pouze buňky odpovídající na první kontrolní stimulaci (karbacholem nebo oxotremorinem). Buňky s příliš slabou, pomalou nebo jinak abnormální odpovědí byly vyloučeny. Odlehle hodnoty maxima signálu, času do dosažení maxima a času poklesu, byly určeny ze stanovení tzv. interkvartilního rozsahu (IQR), který říká, jak je rozlehlá ta polovina všech výsledků, která se nachází okolo středu hodnot (data < Q1-1,5*IQR a data > Q3+1,5*IQR byla vyloučena). Signál vybraných buněk byl po odečtení pozadí zprůměrován a normalizován na klidový poměr emisí rovný 1. Pokusy měly dvojí uspořádání. V prvním případě byla měřena změna koncentrace vápenatých iontů v závislosti na koncentraci přidaného agonisty. CHO buňky exprimující wt nebo mutovaný M₁ receptor a pro kontrolu buňky bez receptoru (netransfekované CHO-K1) byly vystaveny po dobu 10 sekund působení vzrůstající koncentrace testovaných agonistů (karbachol, oxotremorin, NDMC, xanomelin). Jednotlivé stimulační byly odděleny 6-ti minutovým promýváním KHB. V druhém uspořádání byl sledován vliv prodlouženého působení xanomelinu. Nejprve byla provedena 10-ti sekundová kontrolní stimulace 10 μM oxotremorinem, následovaná 6-ti minutovým promýváním KHB. Poté byly buňky vystaveny 40-ti sekundovému působení 10 μM xanomelinu. Koncentrace vápenatých iontů pak byla měřena ještě následujících 6 minut při promývání KHB.

3.8 Analýza dat

Data byla zpracována v programu Microsoft Office Excel, prokládání křivek a statistické zpracování dat bylo provedeno za použití programů a GraphPad Prism5 (GraphPad software, Inc., San Diego, USA) a Grace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace>). Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm střední chyba průměru (Standard Error of Mean; S.E.M.). Statistická významnost byla vypočtena analýzou rozptylu (ANOVA) a Dunnettovým post-testem nebo párovým t-testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly s hladinou významnosti $P < 0.05$.

V saturačních vazebných pokusech byla stanovována závislost vazby radioligandu na jeho koncentraci vyjádřená Langmuirovou isoterrou,

$$y = B_{MAX} * x / (x + K_D) \quad (\text{rovnice 1})$$

kde y je vazba radioligandu při jeho koncentraci x ; B_{MAX} je maximální vazebná kapacita; K_D je rovnovážná disociační konstanta, odpovídající koncentraci radioligandu, při níž je obsazeno 50 % vazebných míst a vyjadřuje afinitu receptoru k radioligandu.

V kompetičních pokusech byla sledována závislost poklesu vazby (vytěsnění z vazebného místa) radioligandu o konstantní koncentraci na zvyšující se koncentraci neznačeného agonisty. Závislost velikosti vazby radioligandu na koncentraci agonisty byla proložena vytěšňovací křivkou s jedním (rovnice 2) případně dvěma (rovnice 3) vazebnými místy.

$$y = 100 - (100 * x / (x + IC_{50})) \quad (\text{rovnice 2})$$

$$y = 100 - ((100 - f_{low}) * x / (x + IC_{50high})) - f_{low} * x / (x + IC_{50low}) \quad (\text{rovnice 3})$$

y vyjadřuje vazbu radioligandu při koncentraci agonisty x , vyjádřenou jako procento vazby v nepřítomnosti agonisty; f_{low} je podíl nízkoafinních vazebných míst vyjádřený v procentech, IC_{50low} je koncentrace agonisty vytěšňující 50 % radioligandu z nízkoafinního vazebného místa, IC_{50high} je koncentrace agonisty vytěšňující 50 % radioligandu z vysokoafinního vazebného místa.

Ze stanovené hodnoty IC_{50} pro studovaného agonistu, byla pomocí K_D kompetujícího radioligandu vypočítána inhibiční konstanta K_I (vyjadřující afinitu receptoru pro studovaného agonistu) podle rovnice:

$$K_I = IC_{50} / (1 + [D] / K_D) \quad (\text{rovnice 4})$$

kde $[D]$ je koncentrace radioligandu a K_D jeho rovnovážná disociační konstanta.

Ve funkčních stanoveních byla sledována biologická odpověď vyvolaná v závislosti na koncentraci agonisty. Závislost velikosti funkční odpovědi na koncentraci agonisty byla proložena logistickou funkcí s proměnlivým sklonem dle rovnice 5:

$$y = 1 + (E_{MAX} - 1) * x^{nH} / (x^{nH} + EC_{50}^{nH}) \quad (\text{rovnice 5})$$

kde y je funkční odpověď receptoru při koncentraci agonisty x normalizovaná na klidový stav, E_{MAX} maximální odpověď, vyjadřující účinnost (efficacy) agonisty vyvolat biologický účinek, EC_{50} je koncentrace agonisty vyvolávající polovinu maximální odpovědi a vyjadřuje potenci látky vyvolat biologickou odpověď (potency); nH je Hillův koeficient (vyjadřující míru kooperativity děje).

Aby bylo možné porovnat účinnost (efficacy) aktivace receptorů u buněčných linií s rozdílnou

expresí receptorů, byl vypočítán parametr K_G . Parametr K_G relativně kvantifikuje afinitu G-proteinu ke komplexu receptor-agonista a byl vypočten podle rovnice 6, /Lu a Hulme, 1999/

$$K_G = (E_{MAX\ FR} / (1 - E_{MAX\ FR})) / B_{MAX} \quad (\text{rovnice 6})$$

kde $E_{MAX\ FR}$ je hodnota maximální odpovědi (viz. rovnice 5), vyjádřená jako podíl E_{MAX} pro karchol $(E_{MAX\ agonisty} - 1) / (E_{MAX\ karcholu} - 1)$ pro CHO buňky exprimující wt M_1 receptor s vysokou expresí a nejvyšší E_{MAX} ; B_{MAX} je maximální vazebná kapacita, podle rovnice (1).

4 VÝSLEDKY

4.1 Vliv mutací na vazebné vlastnosti M₁ receptoru

4.1.1 Stanovení exprese a afinity pro ³H-NMS

Pro charakterizaci vazebných vlastností přirozeného muskarinového receptoru M₁ a mutantů (D71N, D99N, D105N, D105E, D122N a R123N) exprimovaných v plasmatické membráně CHO buněk bylo využito saturačních vazebných pokusů s radioaktivně značeným muskarinovým antagonistou ³H-NMS, který je neselektivní (má srovnatelnou afinitu pro všech 5 podtypů muskarinových receptorů) a váže se se stejnou afinitou na receptor v aktivním i inaktivním stavu (konformaci). Ze saturace specifické vazby ³H-NMS na membrány CHO buněk byl stanoven počet receptorů (vazebných míst pro ³H-NMS) a afinita k ³H-NMS (Tabulka 4; str 54).

Mutace D71N (v oblasti aktivačního přepínače receptoru) a D99N (ve vestibulu ortosterického vazebného místa) vedly pouze ke slabému poklesu afinity M₁ receptoru k ³H-NMS a substituce asparaginem v oblasti interakce s G-proteinem D122N a R123N afinitu receptoru k ³H-NMS neovlivnila vůbec. Nejvýraznější vliv na afinitu receptoru pro ³H-NMS měly mutace aspartátu v pozici 105 (D105N a D105E), který se nachází v ortosterickém vazebném místě. Mutace D105E vedla k čtyřnásobnému poklesu afinity receptoru k ³H-NMS, mutace D105N k úplné ztrátě afinity. Exprese jednotlivých forem muskarinových receptorů se pohybovala v rozmezí 3.3 ± 0.2 (R123N) až 15.8 ± 0.8 (D105E) pmol vazebných míst na mg membránových proteinů (Tabulka 4; str. 54).

Z důvodu ztráty afinity receptoru pro ³H-NMS u mutantu D105N byla exprese receptoru stanovena podle specifické vazby radioaktivně značeného antagonisty ³H-QNB, která byla na rozdíl od vazby ³H-NMS měřitelná. Nespecifická vazba byla stanovena v přítomnosti 40 μM atropinu. Exprese mutantu D105N byla $5,8 \pm 0,2$ pmol vazebných míst na mg membránových proteinů a pK_D pro ³H-QNB $7,68 \pm 0,03$, což znamená pokles afinity zhruba 200x vůči wt M₁, kde je pK_D= $10,01 \pm 0,14$. Hodnoty jsou průměry ± S.E.M. ze 3 nezávislých pokusů v triplikátech.

Tabulka 4: *Parametry vazby $^3\text{H-NMS}$ na wt a mutované M_1 receptory exprimované v membránách CHO buněk. Afinita k $^3\text{H-NMS}$ je vyjádřena jako záporný dekadický logaritmus rovnovážné disociační konstanty (pK_D), vypočtené podle rovnice 1 (str. 51). Expresce receptorů (B_{MAX}) je vyjádřena v pmol/mg membránových proteinů. Výsledky jsou uvedeny jako průměry \pm S.E.M. ze 4-8 nezávislých pokusů v kvadruplicatech.*

	wt	D71N	D99N	D105N	D105E	D122N	R123
pK_D $^3\text{H-NMS}$	9.76 \pm 0.03	9.29 \pm 0.02*	9.41 \pm 0.02*	b.v.	9.15 \pm 0.05*	9.65 \pm 0.05	9.9 \pm 0.1
B_{MAX}	7.6 \pm 0.6	6.9 \pm 0.5	10.6 \pm 0.5	5.8 \pm 0.2 ^a	15.8 \pm 0.8	4.1 \pm 0.3	3.3 \pm 0.2

b.v., (bez vazby na receptor); *, rozdíl od wt, $P < 0,05$, ANOVA a Dunnettův test; ^a, podle vazby $^3\text{H-QNB}$

4.1.2 Vliv mutací na vazbu agonistů

Afinity jednotlivých agonistů (karcholu, oxotremorinu, xanomelinu, NDMC) k wt nebo mutovaným M_1 receptorům byly stanoveny nepřímo prostřednictvím kompetičních (vytěšňovacích) pokusů s 1nM $^3\text{H-NMS}$. Na rozdíl od antagonisty $^3\text{H-NMS}$ se někteří agonisté vážou do ortosterického vazebného místa receptoru s různou afinitou, podle konformace, ve které se receptor nachází. Na vazebné vytěšňovací křivce lze pak nalézt dvě vazebná místa, vysokoafinní a nízkoafinní (dvoumístná vazebná křivka).

V kontrolních pokusech na wt M_1 měla vytěšňovací vazebná křivka pro klasické agonisty karchol a oxotremorin, stejně jako pro atypického agonistu xanomelin, nízkoafinní i vysokoafinní složku. Oproti tomu atypický agonista NDMC měl jen jednu vazebnou složku (Obrázek 18; str. 55).

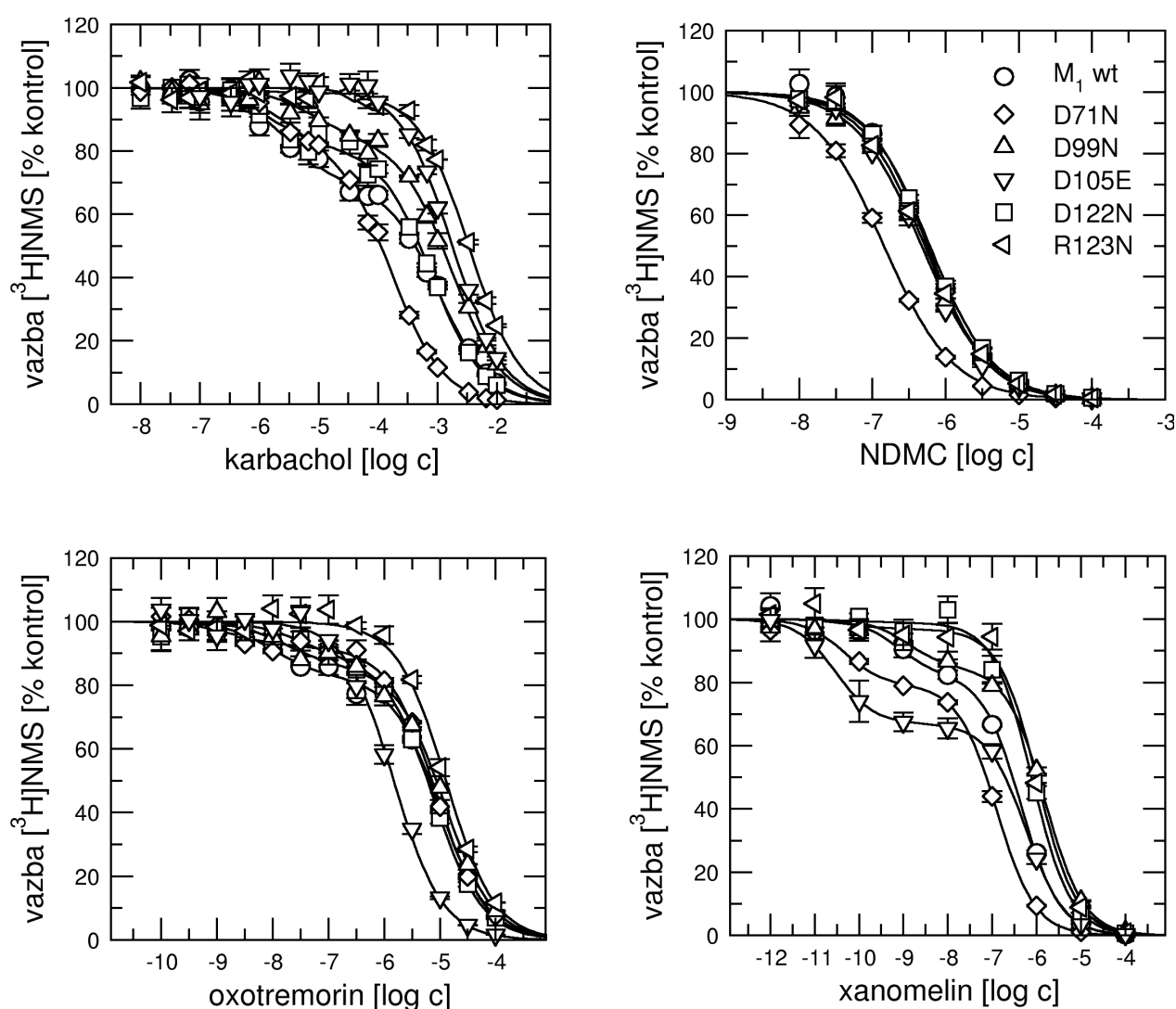
Mutace R123N v oblasti receptoru odpovědné za interakci s α -podjednotkou G-proteinu způsobila, že mutantní receptor oproti wt vázal agonisty (karchol, oxotremorin a xanomelin) jen s nízkou afinitou, vazebná křivka měla tedy jen jednu vazebnou složku. Navíc mutace R123N snížila afinitu nízkoafinní vazby pro tyto agonisty. Afinitu NDMC mutace R123N neovlivnila (Tabulka 5; str. 56).

Mutace asparátu v pozici 122 (D122N), stabilizující inaktivní konformaci receptoru, zvýšila proporcii nízkoafinních míst pro karchol. Xanomelin se vázal pouze s nízkou afinitou. Mutace D122N měla dále za následek zvýšení afinity vysokoafinních míst pro karchol a snížení afinity nízkoafinních míst pro oxotremorin a xanomelin. Vazbu NDMC tato mutace neovlivnila (Tabulka 5; str. 56).

Mutace v ortosterickém vazebném místě D105E měla za následek zrušení vysokoafinní vazby karcholu a oxotremorinu. Zvýšila afinitu vysokoafinního místa a snížila afinitu nízkoafinního místa pro xanomelin. Dále snížila afinitu nízkoafinního místa pro karchol a NDMC (Tabulka 5; str. 56).

Mutace ve vestibulu ortosterického vazebného místa D99N snížila afinitu nízko i vysokoafinního místa pro karbachol, oxotremorin a xanomelin a snížila i afinitu pro NDMC. Dále pak tato mutace způsobila zvýšení proporce nízkoafinních míst pro karbachol (Tabulka 5; str. 56).

Mutace v oblasti zodpovědné za aktivaci receptoru D71N vedla ke zvýšení afinity nízkoafinních míst pro karbachol, snížení afinity nízkoafinních míst pro oxotremorin, přičemž nízkoafinní vazbu xanomelinu neovlivnila. U karbacholu a oxotremorinu vedla mutace D71N ke zvýšení proporce nízkoafinních míst. Dále vedla ke zvýšení afinity vysokoafinních míst pro oxotremorin a xanomelin. Mutace D71N neměla vliv na afinitu pro NDMC (Obrázek 18). Parametry proložení vazebnými křivkami jsou shrnuty v tabulce 5 (str. 56).



Obrázek 18: *Vliv mutací na vazbu agonistů k M_1 receptoru. Vazba 1nM ^3H -NMS na wt a mutantní M_1 receptory (osa y, procenta kontrolní vazby v nepřítomnosti agonisty) v závislosti na zvyšující se koncentraci agonisty (osa x, $\log c$) karbacholu /vlevo nahoře/, NDMC /vpravo nahoře/, oxotremorinu /vlevo dole/, xanomelinu /vpravo dole/. Body jsou průměr \pm SEM. Parametry proložení naměřených hodnot a počty pokusů jsou uvedeny v tabulce 5 (str. 56).*

Tabulka 5: *Afinity muskarinových agonistů. Afinity agonistů karbacholu, NDMC, oxotremorinu a xanomelinu jsou vyjádřeny jako záporný dekadický logaritmus inhibiční konstanty K_I (pK_I), vypočtené z hodnoty IC_{50} podle rovnice 4 (str. 51) a rovnovážné disociační konstanty K_D pro kompetující ligand 3H -NMS (rovnice 1, str. 51). K_{Ilow} a K_{Ihigh} jsou vyjádření inhibiční konstanty pro nízko a vysokoafinní komponenty vazebné křivky, f_{low} je poměrná část nízkoafinní složky vazebné křivky vyjádřená v procentech a vypočtená z rovnice 3 (str. 51). Parametry jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. ze 4 až 8 nezávislých pokusů v kvadruplicatech.*

	karbachol			NDMC	oxotremorin			xanomelin		
	$pK_{I\ high}$	$pK_{I\ low}$	f_{low}	$pK_{I\ low}$	$pK_{I\ high}$	$pK_{I\ low}$	f_{low}	$pK_{I\ high}$	$pK_{I\ low}$	f_{low}
wt	6.45 \pm 0.09	3.80 \pm 0.04	70 \pm 2	7.10 \pm 0.02	8.96 \pm 0.02	6.04 \pm 0.03	83 \pm 3 a	10.12 \pm 0.09	7.19 \pm 0.04	82 \pm 3 a
D71N	6.49 \pm 0.02	4.28 \pm 0.04 *	85 \pm 3 *	7.30 \pm 0.1	9.70 \pm 0.2 *	5.50 \pm 0.02 *	91 \pm 2 *	10.59 \pm 0.02 *	7.32 \pm 0.04	78 \pm 3
D99N	5.70 \pm 0.2 *	3.31 \pm 0.06 *	85 \pm 1 *	6.86 \pm 0.04 *	8.56 \pm 0.01 *	5.51 \pm 0.08 *	86 \pm 4	9.20 \pm 0.20 *	6.4 \pm 0.1 *	85 \pm 4
D105E	N	2.96 \pm 0.03 *	100 *	6.59 \pm 0.04 *	N	6.01 \pm 0.07	100*	11.36 \pm 0.05 *	6.50 \pm 0.06 *	70 \pm 4 a
D122N	6.75 \pm 0.01 *	3.83 \pm 0.04	82 \pm 1 *	6.94 \pm 0.09	8.83 \pm 0.01	5.83 \pm 0.04 *	89 \pm 2	N	6.85 \pm 0.03 *	100 *
R123N	N	3.40 \pm 0.1 *	100 *	7.17 \pm 0.02	N	5.80 \pm 0.03 *	100 *	N	6.95 \pm 0.01 *	100 *

N, (nepočítáno); *, liší se od wt; a, f_{low} odlišné od f_{low} pro karbachol, $P < 0,05$, ANOVA a Dunnettův test. Kvůli ztrátě afinity pro kompetitor 3H -NMS, nebyla u mutantu D105N stanovena afinita testovaných agonistů.

4.1.3 Vliv mutací na neodmyvatelnou vazbu xanomelinu

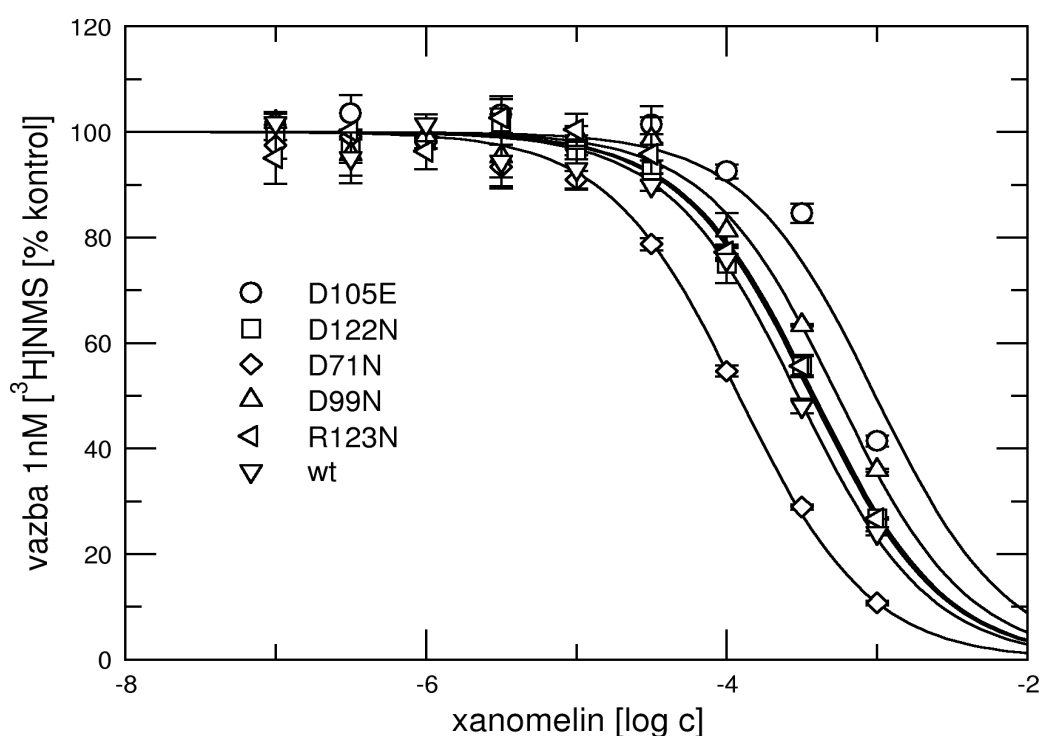
Pro určení afinity neodmyvatelné vazby xanomelinu na wt a mutované M_1 receptory bylo nutné membrány CHO buněk nejprve inkubovat v přítomnosti různých koncentrací xanomelinu, poté membrány hodinu promývat (Kapitola 3.5; str. 47), aby došlo k disociaci xanomelinu z ortosterického vazebného místa a zůstal tak navázán k receptoru pouze neodmyvatelnou vazbou. Poločas disociace neodmyvatelné vazby je 30 hodin /Jakubík a spol., 2002/. Na takto připravených membránách s neodmyvatelně navázaným xanomelinem byl následně proveden vytěšňovací pokus s 1 nM 3H -NMS (Obrázek 19; str. 57).

Afinita neodmyvatelné vazby xanomelinu stanovená na membránách CHO buněk exprimujících wt M_1 receptor byla 260 μ M. Mutace D71N, D122N a R123N afinitu neodmyvatelné vazby xanomelinu k M_1 receptoru neovlivnily. Oproti tomu u mutantu D99N došlo k trojnásobnému poklesu a mutantu D105E k více než desetinásobnému poklesu afinity pro neodmyvatelný xanomelin (Tabulka 6, str. 57).

Tabulka 6: *Afinita neodmyvatelné vazby xanomelinu.* Afinita neodmyvatelné vazby xanomelinu k membránám z CHO buněk exprimujících wt a mutované M_1 receptory je vyjádřena jako záporný dekadický logaritmus inhibiční konstanty K_i (pK_i) vypočtené z hodnoty IC_{50} podle rovnice 4 (str. 51) a rovnovážné disociační konstanty K_D pro kompetující ligand 3H -NMS (rovnice 1; str. 51). Parametry jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. ze 3 nezávislých pokusů v kvadruplikátech.

	wt	D71N	D99N	D105E	D122N	R123N
pK_i	4.34 \pm 0.06	4.37 \pm 0.08	3.81 \pm 0.05*	3.20 \pm 0.10*	4.17 \pm 0.06	4.39 \pm 0.06

*odlišné od wt, $P < 0,05$, ANOVA a Dunnettův test. Kvůli ztrátě afinity pro kompetitor 3H -NMS, nebyla u mutanta D105N stanovena afinita neodmyvatelného xanomelinu.



Obrázek 19: *Vliv mutací na neodmyvatelnou vazbu xanomelinu.* Vazba 1 nM 3H -NMS na wt a mutované M_1 receptory (osa y, procenta kontrolní vazby v nepřítomnosti agonisty) v závislosti na koncentraci xanomelinu (osa x, log c). Body jsou průměr \pm S.E.M. ze 3 nezávislých pokusů v kvadruplikátech. Parametry proložení naměřených hodnot jsou uvedeny v tabulce 6.

4.2 Vliv mutací na aktivaci receptoru

4.2.1 Vliv mutací na akumulaci inositolfosfátů

Vliv jednotlivých mutací na aktivaci muskarinového M_1 receptoru prostřednictvím klasických a atypických agonistů byl stanovován jako agonistou stimulovaná akumulace IPx v CHO buňkách exprimujících wt a mutované M_1 receptory. Stanovovanými parametry bylo maximum akumulovaných IPx (E_{MAX}), vyjadřující účinnost (efficacy) agonisty vyvolat biologický účinek a koncentrace agonisty vyvolávající polovinu maximální odpovědi EC_{50} , vyjadřující potenci agonisty aktivovat receptor (potency).

Na rozdíl od schopnosti agonistů aktivovat receptor (EC_{50}) byla hodnota účinnosti (E_{MAX}) závislá na výši exprese receptorů (Tabulka 7).

Tabulka 7: *Parametry karbacholem stimulované akumulace IPx na dvou liniích CHO buněk s různou expresí receptorů wt M_1 (a, b). Expese receptorů je vyjádřena v pmol vazebných míst pro NMS/mg membránových proteinů a vypočtena podle rovnice 1, maximální stimulace E_{MAX} jako násobek bazální akumulace v nepřítomnosti karbacholu, potence karbacholu jako záporný dekadický logaritmus EC_{50} vypočtené podle rovnice 5 (str. 51). Data jsou průměry \pm S.E.M. ze 3 nezávislých pokusů v triplikátech.*

Linie CHO	expese	E_{MAX}	pEC_{50}
wt M_1 a	2,47 \pm 0,57*	2,00 \pm 0,34*	5,95 \pm 0,10
wt M_1 b	8,90 \pm 1,02*	4,10 \pm 0,42*	5,63 \pm 0,12

* odlišné od druhého, párový t-test, $P < 0,05$

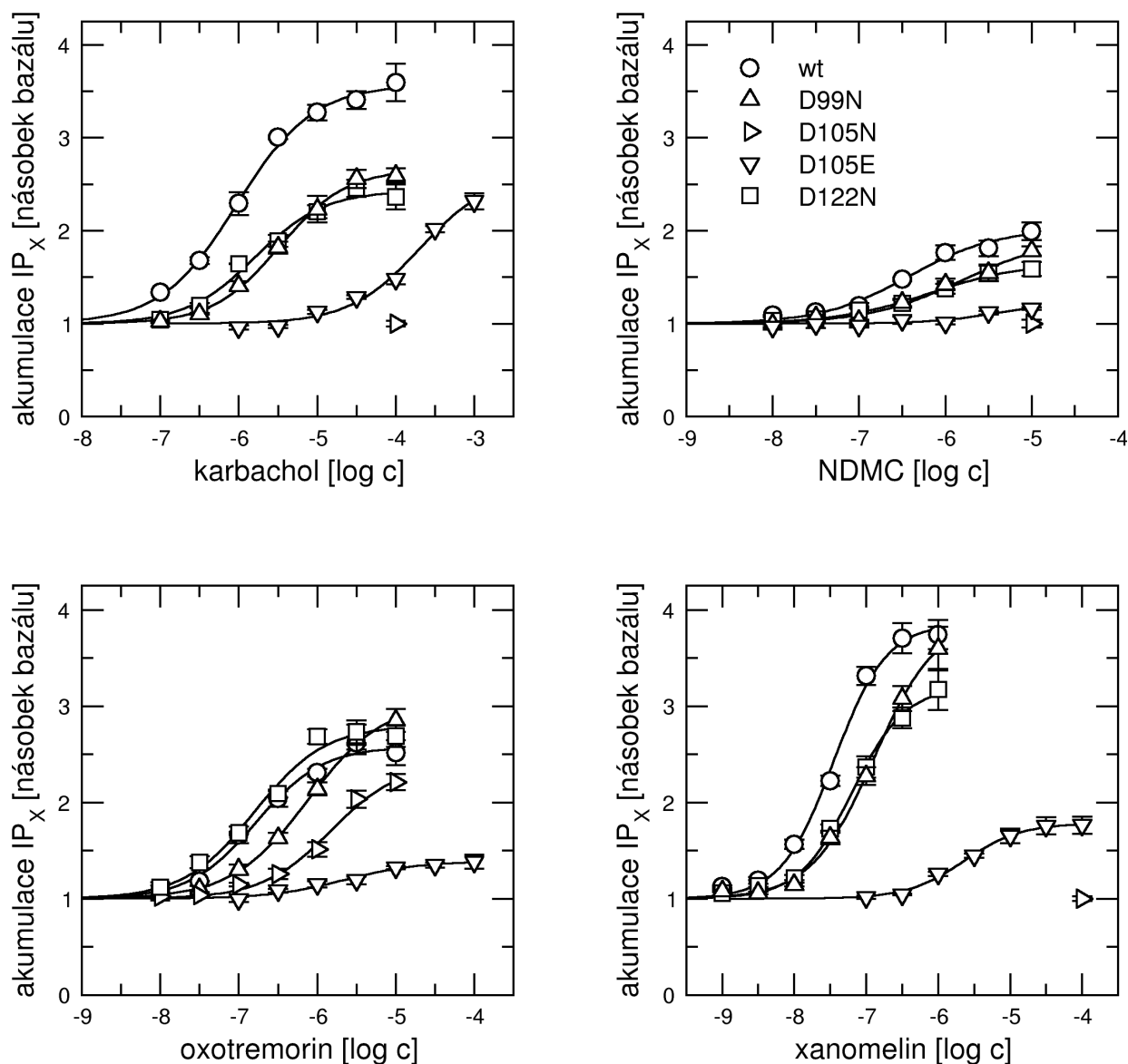
Aby bylo možné porovnat hodnoty maximální odpovědi E_{MAX} vyvolané jednotlivými agonisty pro buněčné linie s odlišnou expresí receptorů byl použit parametr K_G , vyjadřující afinitu G-proteinu ke komplexu agonista-receptor. Hodnota K_G byla vypočítána podle rovnice 6 (str. 52) /Lu a Hulme, 1999/ a pro normalizační výpočet byly použity parametry buněčné linie CHO s vysokou expresí M_1 receptorů a hodnotou E_{MAX} pro karbachol vyšší než ve všech provedených pokusech (Tabulka 8; str. 59). Schopnost agonistů aktivovat wt M_1 receptor (EC_{50}) klesala v pořadí xanomelin > oxotremorin \cong NDMC > karbachol (Tabulka 8; str. 59). Nejvyšší účinnost aktivace receptoru (podle K_G) byla pro wt M_1 naměřena u xanomelinu a to dvakrát vyšší než u plného agonisty karbacholu. Parciální agonisté NDMC a oxotremorin dosáhli 22 % a 45 % účinnosti karbacholu. Žádný z testovaných agonistů nevyvolal odpověď u mutantů D71N a R123N. V případě mutantu D105N byla akumulace inositolfosfátů stimulována pouze oxotremorinem a to se srovnatelnou účinností, ale s desetkrát nižší EC_{50} než u wt M_1 receptoru. Na druhou stranu všichni testovaní agonisté stimulovali akumulaci inositolfosfátů u mutantu

D105E. Oproti wt byla u mutanta D105E snížena EC_{50} všech agonistů kromě NDMC. I když u mutanta D105N byl oxotremorin jediným agonistou schopným jej aktivovat, u mutana D105E došlo k největšímu snížení účinnosti právě u oxotremorinu. Zatímco se účinnost aktivace mutanta D105E snížila dvakrát pro NDMC a xanomelin a pětikrát pro karchol, snížení pro oxotremorin bylo dokonce patnáctinásobné. Mutace D99N vedla k trojnásobnému snížení potence zkoumaných agonistů aktivovat mutovaný M_1 receptor a s výjimkou oxotremorinu snižovala i jejich účinnost. Mutace D122N neovlivňovala aktivaci agonisty s výjimkou zvýšení účinnosti pro oxotremorin (Tabulka 8).

Tabulka 8: *Parametry agonisty stimulované akumulace inositolfosfátů. Koncentrace vyvolávající polovinu maximálního účinku (EC_{50}) pro jednotlivé agonisty vyjádřená jako záporný dekadický logaritmus (pEC_{50}) a maximální stimulace (E_{MAX}) vyjádřená jako násobek klidové akumulace IP_x jsou spočítány podle rovnice 5 (str. 51). Účinnost aktivace receptoru (K_G) byla vypočítána podle rovnice 6. Pro výpočet byly použity hodnoty E_{MAX} a B_{MAX} pro buněčnou linii s vysokou expresí receptorů a nejvyšší hodnotou E_{MAX} (wt M_1 : $B_{MAX} = 11.3 \pm 0.5$; karchol $pEC_{50} = 5.90 \pm 0.05$; $E_{MAX} = 5.2 \pm 0.3$). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm S.E.M. ze 3 až 8 nezávislých pokusů v kvadruplicatech.*

		wt	D71N	D99N	D105N	D105E	D122N	R123N
karchol	pEC_{50}	6.02±0.04		5.53±0.08*		3.7±0.1*	5.82±0.03	
	E_{max}	3.5±0.2	b.o.	2.6±0.2*	b.o.	2.63±0.03*	2.5±0.2*	b.o.
	K_G	0.19±0.01		0.058±0.004*		0.040±0.01*	0.14±0.01	
NDMC	pEC_{50}	6.5±0.2		6.0±0.1*		5.9±0.2	6.33±0.08	
	E_{max}	2.0±0.3 ^a	b.o.	1.8±0.2	b.o.	1.14±0.02*	1.63±0.07*	b.o.
	K_G	0.041±0.006 ^a		0.022±0.002*		0.0022±0.0001*	0.043±0.002	
oxotremorin	pEC_{50}	6.81±0.08 ^a		6.22±0.05*	5.8±0.1*	5.73±0.08*	6.94±0.07	
	E_{max}	2.65±0.03 ^a	b.o.	2.98±0.09*	2.4±0.3*	1.35±0.05*	2.7±0.1	b.o.
	K_G	0.085±0.001 ^a		0.084±0.003	0.086±0.009	0.0058±0.0002*	0.166±0.006*	
xanomelin	pEC_{50}	7.39±0.09 ^a		6.92±0.08*		5.6±0.1*	7.11±0.09	
	E_{max}	4.1±0.2 ^a	b.o.	3.9±0.2	b.o.	1.8±0.1*	3.3±0.1*	b.o.
	K_G	0.37±0.02 ^a		0.21±0.01*		0.015±0.001*	0.30±0.01	

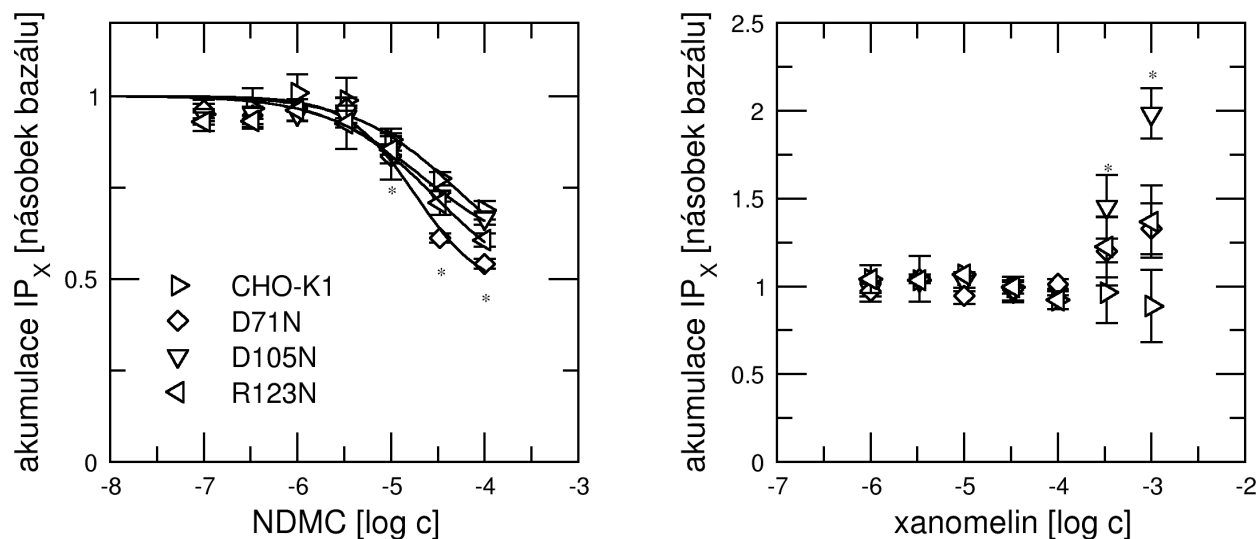
b.o., (bez odpovědi); *, lišící se od wt; a, odlišné od stimulace karcholem; $P < 0,05$, ANOVA a Dunnettův test.



Obrázek 20: *Vliv mutací M₁ receptoru na agonisty stimulovanou akumulaci IP_x. Akumulace inositolfosfátů v CHO buňkách exprimujících wt a mutantní muskarinové M₁ receptory (osa y, násobek akumulace IP_x v nepřítomnosti agonisty) v závislosti na koncentraci agonisty (osa x, log c) karbacholu /vlevo nahoře/, NDMC /vpravo nahoře/, oxotremorinu /vlevo dole/, xanomelinu /vpravo dole/. Označení mutantů je uvedeno v obrázku vpravo nahoře. Body jsou průměr ± S.E.M. Parametry proložení naměřených hodnot a počty pokusů jsou uvedeny v tabulce 8 (str. 59).*

Vyšší koncentrace NDMC (>30 μ M) vyvolávaly pokles hladiny IP_x u CHO buněk exprimujících wt a mutované M₁ receptory, u kterých nižší koncentrace NDMC (\leq 10 μ M) akumulaci IP_x stimulovaly. U mutantů D71N, D105N a R123R, kde k žádné stimulaci akumulace IP_x NDMC ani při nízkých koncentracích (\leq 10 μ M) nedocházelo byl dokonce pozorován i pokles klidové hladiny IP_x (Obrázek. 21; str. 61 vlevo). Proto byl pokus proveden též na CHO-K1 buňkách, které muskarinové receptory neexprimují. Při vyšších koncentracích

NDMC byl pozorován stejný pokles jako u mutantů D71N, D105N a R123R (Obrázek 21 vlevo). Na druhou stranu při vysokých koncentracích xanomelinu ($\geq 300 \mu\text{M}$) docházelo u mutantů D71N, D105N a R123R ke stimulaci akumulace IP_x , přičemž na CHO-K1 ani 1 mM xanomelin stimulaci nevyvolal (Obrázek 21 vpravo).

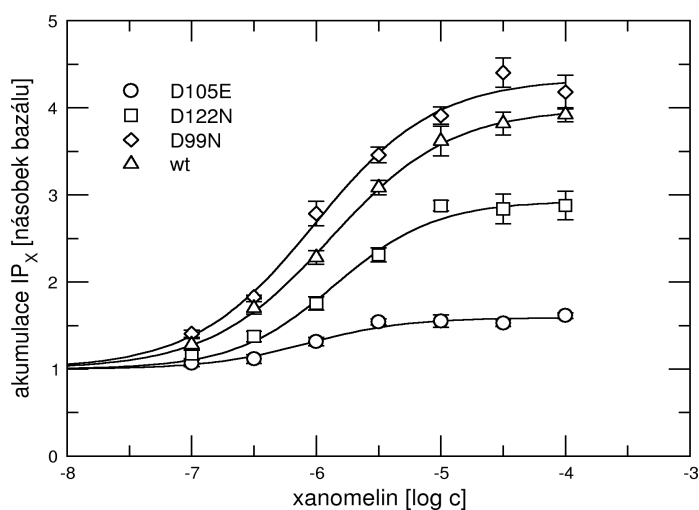


Obrázek 21: *Akumulace inositolfosfátů v CHO buňkách při vysokých koncentracích agonistů. Akumulace inositolfosfátů (osa y, násobek bazální hodnoty v nepřítomnosti agonisty) v CHO-K1 buňkách neexprimujících muskarinové receptory nebo exprimujících mutované receptory D71N, D105N nebo R123N v závislosti na koncentraci (osa x, log c) NDMC /levý panel/ nebo xanomelinu /pravý panel/. Body jsou průměr \pm S.E.M. ze 3 nezávislých pokusů v triplicátěch. *, odlišný od klidové hodnoty $P < 0,05$ podle párového t-testu.*

4.2.2 Vliv mutací na aktivaci M_1 receptoru neodmyvatelně navázaným xanomelinem

I po odmytí xanomelinu z ortosterického vazebního místa lze pozorovat přetrvávající aktivaci muskarinového M_1 receptoru /Christopoulos a spol., 1998/. Vliv mutací M_1 receptoru na tuto přetrvávající aktivaci byl sledován opět podle stimulace akumulace inositolfosfátů. Jelikož bylo potřeba umožnit vznik neodmyvatelné vazby inkubací s xanomelinem před inkorporací radioaktivně značeného myo-inositolu do plazmatické membrány CHO buněk a poté odmytí xanomelinu z ortosterického vazebního místa, bylo nutné pracovat s buňkami v suspenzi a akumulované IP_x dělit na iontoměničových kolonách (Kapitola 3.6; str. 48). Výsledky vlivu mutací na K_G a EC_{50} neodmyvatelně navázaného xanomelinu stimulovat akumulaci IP_x jsou shrnuty v tabulce 9 a v obrázku 22 (str. 62). U kontrolních wt M_1 receptorů stimuloval neodmyvatelný xanomelin akumulaci IP_x s hodnotou EC_{50} $1 \mu\text{M}$, což je téměř o jeden a půl řádu vyšší koncentrace než je nutná pro stimulaci IP_x xanomelinem prostřednictvím ortosterického vazebního místa (odmyvatelné vazby). Mutace D71N, D105N, R123N úplně potlačily akumulaci IP_x stimulovanou neodmyvatelně navázaným xanomelinem. Mutace D99N, D105E a

D122N potenci neodmyvatelně navázaného xanomelinu aktivovat M_1 receptor neovlivnilo. U mutantů D99N a D122N se nezměnila ani účinnost aktivace (podle K_G), zatímco mutace D105E snížila účinnost aktivace receptoru neodmyvatelnou vazbou na dvacetinu.



Obrázek 22: Vliv mutací M_1 receptoru na akumulaci IP_X stimulovanou neodmyvatelně navázaným xanomelinem. Akumulace inositolfosfátů (osa y, násobek bazální hodnoty u kontrolních CHO buněk bez navázaného xanomelinu) v závislosti na koncentraci neodmyvatelně navázaného xanomelinu (osa x, log c xanomelinu během preinkubace). Body jsou průměr \pm S.E.M. z 3 nezávislých pokusů v triplikátech

Tabulka 9: Parametry stimulace akumulace inositolfosfátů neodmyvatelně navázaným xanomelinem. EC_{50} vyjádřená jako záporný dekadický logaritmus (pEC_{50}) a E_{MAX} jako násobek klidové akumulace IP_X (bez neodmyvatelně navázaného xanomelinu) jsou spočítány podle rovnice 5 (str. 51) Účinnost aktivace receptorů (K_G) byla vypočítána podle rovnice 6 (str. 52). Pro výpočet byly použity hodnoty E_{MAX} a B_{MAX} pro buněčnou linii s vysokou expresí receptorů a nejvyšší hodnotou E_{MAX} ($B_{MAX} = 11.3 \pm 0.5$; $pEC_{50} = 6.2 \pm 0.1$; $E_{MAX} = 5.5 \pm 0.2$). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm S.E.M. ze 3 nezávislých pokusů v triplikátech.

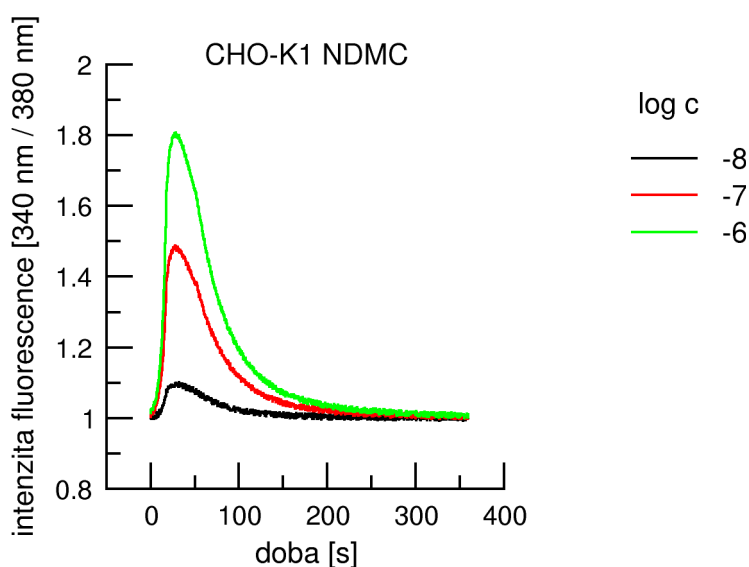
	pEC_{50}	E_{MAX}	K_G
wt	6.0 \pm 0.1	3.8 \pm 0.3	0.22 \pm 0.02
D71N	b.o.		
D99N	6.1 \pm 0.1	4.3 \pm 0.3	0.26 \pm 0.02
D105E	6.0 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	0.01 \pm 0.00*
D105N	b.o.		
D122N	5.9 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1	0.18 \pm 0.01
R123N	b.o.		

b.o. (bez odpovědi); * rozdíl od wt, $P < 0.05$; ANOVA a Dunnettův test.

4.2.3 Vliv mutací na uvolňování vápenatých iontů z nitrobuněčných zdrojů stimulované agonisty.

Při vysokých koncentracích xanomelinu ($\geq 300 \mu\text{M}$) bylo pozorováno zvýšení akumulace inositolfosfátů u mutací D71N, D105N a R123N (Obrázek 21; str. 61), u kterých s výjimkou oxotremorinu u mutace D105N (Obrázek 20; str. 60) k žádné stimulaci nedocházelo. Aby došlo k vyloučení nesespecifických fyzikálně-chemických vlivů vysoké koncentrace xanomelinu na akumulaci inositolfosfátů, byla pro stanovení aktivace M_1 receptorů použita citlivější metoda, mikrofluorimetrické stanovení koncentrace nitrobuněčných vápenatých iontů. Uvolnění vápenatých iontů především z endoplazmatického retikula je dalším krokem v signální kaskádě M_1 receptorů. Díky zesílení signálu je stanovení vápenatých iontů velice citlivé.

Pomocí fluorescenční sondy FURA-2 byla sledována změna hladiny nitrobuněčných vápenatých iontů v CHO buňkách vyvolaná jednotlivými agonisty. V CHO-K1 buňkách (neexprimujících muskarinové receptory) vyvolala již 10 nM koncentrace NDMC zvýšení hladiny nitrobuněčných vápenatých iontů (Obrázek 23). Tudíž metoda měření koncentrace nitrobuněčných vápenatých iontů není vhodná pro stanovení vlivu mutací M_1 receptoru na jeho aktivaci NDMC.



Obrázek 23: *Časový průběh změn hladiny nitrobuněčných vápenatých iontů při vystavení CHO-K1 buněk NDMC. CHO-K1 buňky byly vystaveny po dobu 10 s působení NDMC (použité koncentrace NDMC jsou vyznačeny v legendě obrázku a jsou vyjádřeny jako dekadický logaritmus koncentrace, log c). Časový průběh (osa x, doba v sekundách) hladiny vápenatých iontů (osa y) je vyjádřen jako poměr intenzit fluorescence po excitaci 340 nm a 380 nm, normalizovaný na klidový poměr fluorescence. Signál je průměr z 8-12 buněk z reprezentativního pokusu, potvrzeného 2 dalšími nezávislými pokusy.*

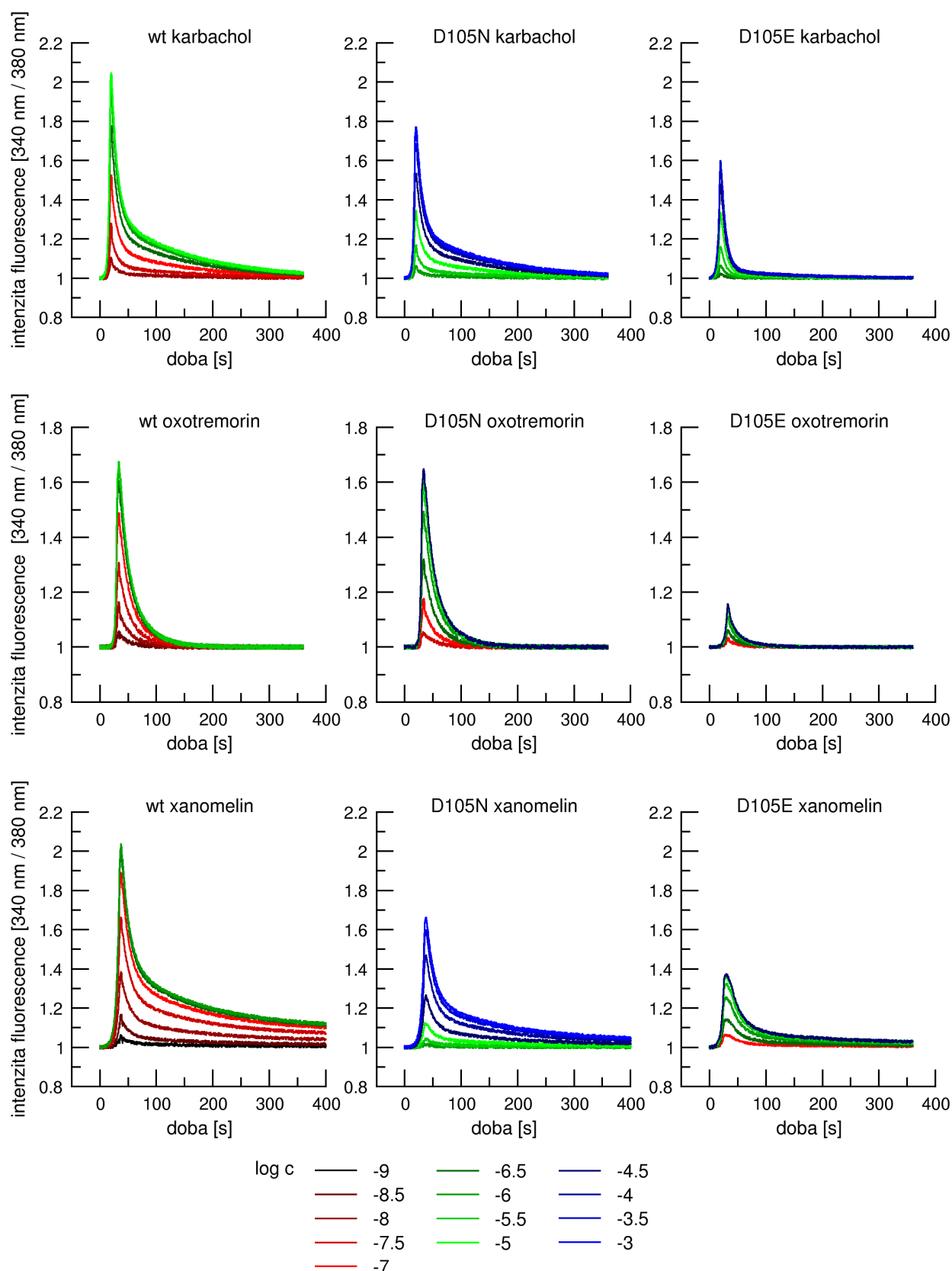
U mutantů D71N a R123N nevyvolal xanomelin žádnou odpověď v podobě změny hladiny nitrobuněčných vápenatých iontů. Pozornost byla tedy zaměřena na hlubší prozkoumání mutace D105N a D105E. U CHO buněk exprimujících muskarinový wt nebo mutantní D105N nebo D105E receptor byla sledována časová závislost změn hladiny Ca^{2+} po vystavení buněk na 10 s agonistům karchocholu, oxotremorinu a xanomelinu v různých koncentracích. U CHO buněk exprimujících wt M_1 receptor vyvolali všichni tito agonisté přechodné zvýšení hladiny Ca^{2+} s rychlým vzestupem následovaným pomalým poklesem (Obrázek 24; str. 64 vlevo). Čas do dosažení maximální koncentrace Ca^{2+} se pohyboval od $6,3 \pm 0,3$ s pro karchochol do $13,1 \pm 0,5$ s pro xanomelin (hodnoty jsou průměr \pm S.E.M. ze tří nezávislých pokusů). Čas, po který docházelo k poklesu koncentrace Ca^{2+} na klidovou úroveň se pohyboval od 143 ± 6 s po stimulaci oxotremorinem do více než 360 s po vystavení xanomelinu. Pro dosažení stejné odpovědi jako pro wt M_1 receptor bylo u mutantu D105N nutné vyšších koncentrací agonistů (Obrázek 24; str. 64 uprostřed).

U mutantů D105N a D105E byl ve srovnání s wt pozorován pomalejší nárůst koncentrace Ca^{2+} po stimulaci karchocholem a xanomelinem a rychlejší pokles hladiny Ca^{2+} po stimulaci oxotremorinem a xanomelinem. U mutantu D105E byl rychlejší pokles hladiny Ca^{2+} pozorován i po stimulaci karchocholem. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 10.

Tabulka 10: *Vliv mutací D105N a D105E na parametry časového průběhu změn hladiny nitrobuněčných vápenatých iontů po stimulaci CHO buněk agonisty. Doba nárůstu vyjadřuje čas v sekundách od počátku stimulace do dosažení maximální hladiny vápenatých iontů. Doba poklesu vyjadřuje čas v sekundách od dosažení maximálního účinku do poklesu na klidovou úroveň. Hodnoty jsou průměr \pm S.E.M. ze 3 nezávislých pokusů.*

	karchochol		oxotremorin		xanomelin	
	Doba nárůstu	Doba poklesu	Doba nárůstu	Doba poklesu	Doba nárůstu	Doba poklesu
wt	$6,3 \pm 0,3$	280 ± 14	$10,5 \pm 0,4$	143 ± 6	$13,1 \pm 0,5$	>360
D105N	$9,1 \pm 0,3^*$	250 ± 12	$12,0 \pm 1,0$	$127 \pm 6^*$	$16,0 \pm 1,0^*$	$320 \pm 15^*$
D105E	$7,8 \pm 0,3^*$	$110 \pm 9^*$	$11,0 \pm 1,0$	$119 \pm 6^*$	$23,0 \pm 2,0^*$	$250 \pm 10^*$

*, $P < 0,05$; statisticky významný rozdíl od wt podle ANOVA a Dunnettova testu

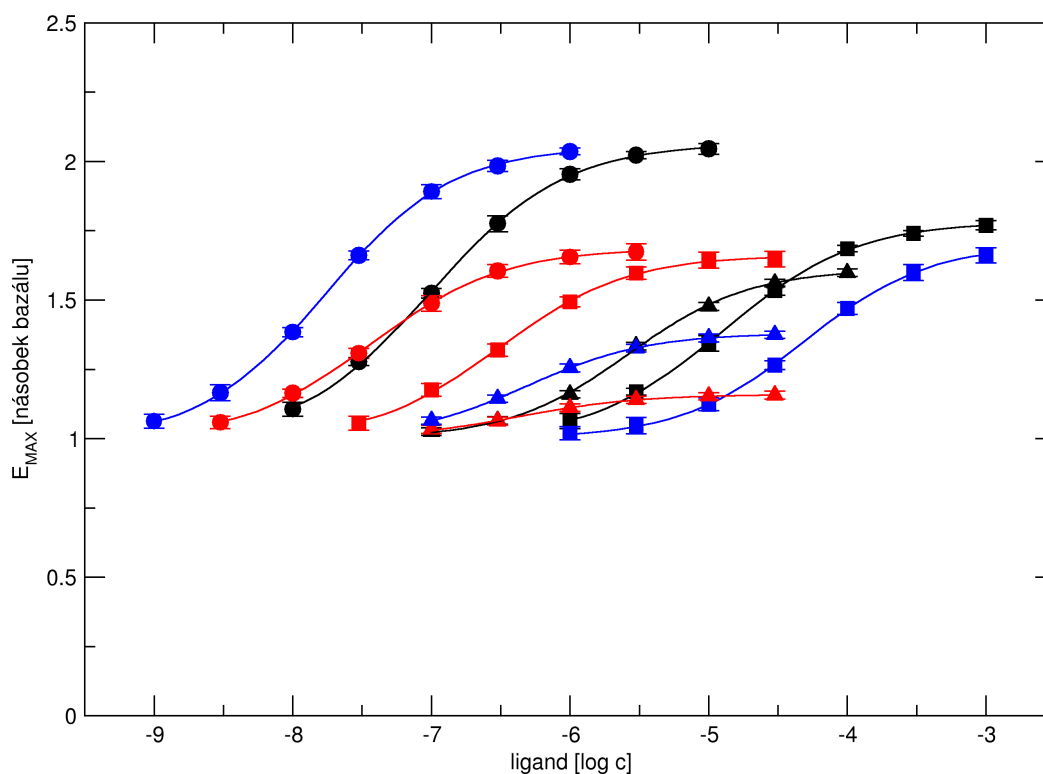


Obrázek 24: Časový průběh změny hladiny nitrobuňkových vápenatých iontů po stimulaci agonistou. Časový průběh změn hladiny nitrobuňkových vápenatých iontů v CHO buňkách exprimujících wt M_1 a mutované D105N a D105E receptory po 10-ti sekundovém vystavení buněk karbacholu (nahore), oxotremorinu (uprostřed) a xanomelinu (dole). Koncentrace vyjádřené jako dekadický logaritmus ($\log c$) jsou uvedeny v obrázku. Časový průběh (osa x, doba v sekundách) hladiny vápenatých iontů (osa y) je vyjádřen jako poměr intenzit fluorescence

po excitaci 340 nm a 380 nm, normalizovaný na klidový poměr fluorescence. Signál je průměr z 8-12 buněk z reprezentativního pokusu, potvrzeného 2 dalšími nezávislými pokusy.

V obrázku 25 (str. 67) je vynesena závislost maximální změny koncentrace Ca^{2+} (E_{MAX}) z obrázku 24 (str. 65) na koncentraci agonisty. Parametry proložení jsou uvedeny v tabulce 11 (str. 67). Na rozdíl od akumulace inositolfosfátů velikost exprese wt M_1 neovlivňovala E_{MAX} karbacholem stimulované změny koncentrace nitrobuněčných vápenatých iontů. Účinnost aktivace je tedy vyjadřována jako E_{MAX} a není přepočítána pomocí K_G .

Mutace D105E měla obecně menší vliv na potenci agonistů vyvolat zvýšení hladiny nitrobuněčných vápenatých iontů než mutace D105N, ale měla výraznější vliv na velikost maximální vyvolané odpovědi E_{MAX} . V případě wt muskarinového M_1 receptoru byl agonistou s největší potenci vyvolat nárůst hladiny nitrobuněčných vápenatých iontů xanomelin ($pEC_{50} = 7,76 \pm 0,04$) následovaný oxotremorinem ($pEC_{50} = 7,43 \pm 0,04$) a karbacholem ($pEC_{50} = 6,99 \pm 0,03$). Data vyjadřují průměr \pm S.E.M. za 3 nezávislých pokusů. U všech testovaných agonistů způsobila mutace D105N pokles jejich potence. Nejdramatičtější vliv měla na potenci xanomelinu, kde vedla k jejímu poklesu téměř 3000-krát ($pEC_{50} = 4,3 \pm 0,04$). U karbacholu způsobila přibližně stonásobný pokles potence ($pEC_{50} = 4,89 \pm 0,04$) a nejmírnější vliv měla u oxotremorinu, kde způsobila menší než 10-ti násobný pokles potence ($pEC_{50} = 6,50 \pm 0,03$). Dále měla za následek mírné snížení E_{MAX} vyvolané karbacholem a xanomelinem (Tabulka 11; str. 67), přičemž E_{MAX} pro oxotremorin se nezměnila. Naopak výrazný vliv na E_{MAX} pro jednotlivé agonisty měla mutace D105E. Vedla k poklesu hodnoty pro všechny agonisty a to na $58 \pm 3 \%$ pro karbachol, $36 \pm 2 \%$ pro xanomelin a $24 \pm 1 \%$ pro oxotremorin (průměr \pm S.E.M. ze 3 pokusů). Mutace D105E měla srovnatelný vliv na potenci oxotremorinu s mutací D105N. Vliv na potenci karbacholu a xanomelinu měla mutace D105E ve srovnání s D105N výrazně nižší, vedla k méně než 30-ti násobnému poklesu pro oba agonisty.



Obrázek 25: *Závislost maximální hladiny E_{MAX} nitrobuněčných vápenatých iontů na koncentraci agonistů u wt M_1 , D105N a D105E. Osa y, E_{MAX} vyjádřená jako násobek klidové hladiny koncentrace nitrobuněčných Ca^{2+}) u CHO buněk exprimujících M_{1wt} receptor /kroužky/, mutantní receptor D105N /čtverečky/ a D105E /trojúhelníčky/ v závislosti na zvyšující se koncentraci agonistů (osa x, log c) karchacholu /černě/, oxotremorinu /červeně/ a xanomelinu /modře/. Parametry proložení jsou shrnuty v tabulce 11. Body jsou průměr \pm S.E.M. ze 3 nezávislých pokusů.*

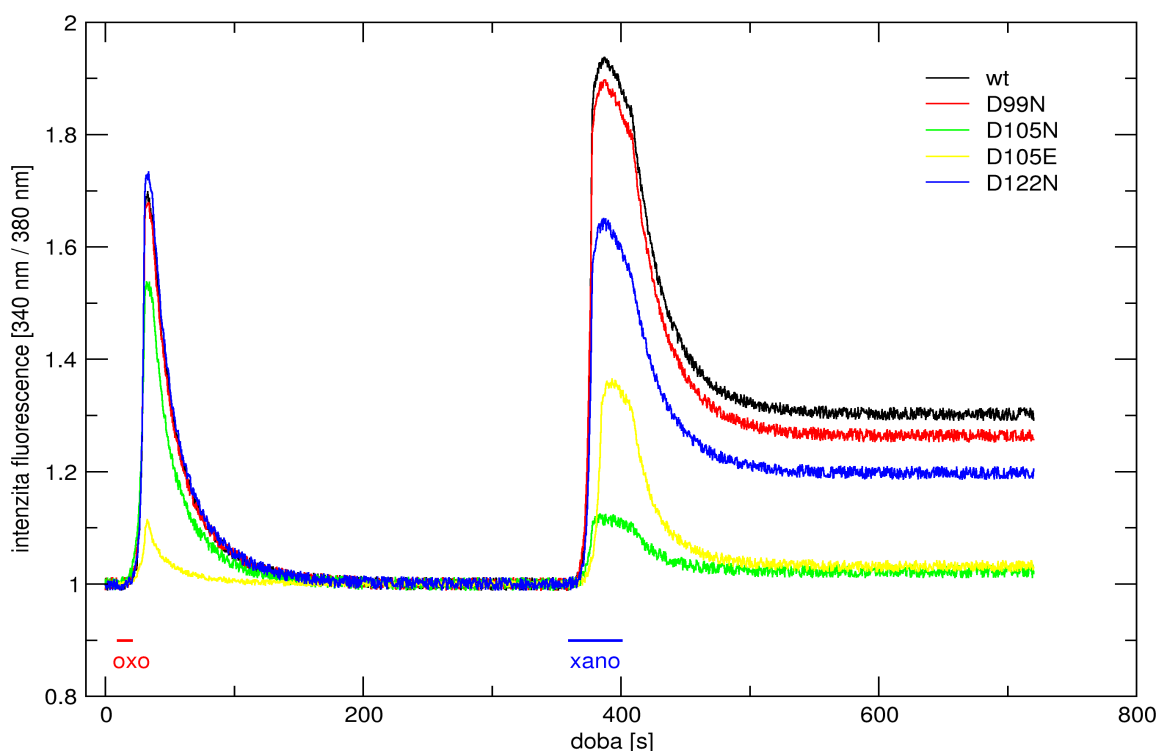
Tabulka 11: *Vliv mutací D105N a D105E na parametry koncentrační závislosti změny maximální hladiny nitrobuněčných vápenatých iontů na stimulaci agonisty. Koncentrace agonisty vyvolávající polovinu maximálního účinku je vyjádřena jako záporný dekadický logaritmus (pEC_{50}). Maximální stimulace (E_{MAX}) je vyjádřena jako násobek klidové hladiny vápenatých iontů. Parametry jsou průměr \pm S.E.M. ze 3 nezávislých pokusů.*

	karchachol		oxotremorin		xanomelin	
	pEC_{50}	E_{MAX}	pEC_{50}	E_{MAX}	pEC_{50}	E_{MAX}
wt	$6,99 \pm 0,03$	$2,05 \pm 0,02$	$7,43 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,01$	$7,76 \pm 0,04$	$2,05 \pm 0,02$
D105N	$4,89 \pm 0,04^*$	$1,77 \pm 0,02^*$	$6,50 \pm 0,03^*$	$1,66 \pm 0,01$	$4,33 \pm 0,04^*$	$1,69 \pm 0,02^*$
D105E	$5,58 \pm 0,03^*$	$1,61 \pm 0,01^*$	$6,37 \pm 0,03^*$	$1,16 \pm 0,00^*$	$6,31 \pm 0,04^*$	$1,38 \pm 0,01^*$

* rozdíl od wt, $P < 0,05$ ANOVA a Dunnettův test

4.2.4 Vliv mutací na hladinu nitrobuněčných vápenatých iontů vyvolanou neodmyvatelně navázaným xanomelinem.

K bližšímu prozkoumání vlivu mutací muskarinového M_1 receptoru na jeho přetrvávající aktivaci vyvolanou neodmyvatelnou vazbou xanomelinu byly CHO buňky exprimující wt M_1 nebo mutované D99N, D105N, D105E nebo D122N receptory vystaveny 40-ti sekundovému působení xanomelinu a byla sledována odpověď v podobě změn hladiny vápenatých iontů. Nejprve byla provedena 10-ti sekundová kontrolní stimulace buněk 10 μ M oxotremorinem, který vyvolával odpověď u všech mutovaných receptorů. Následovalo 6-ti minutové promývání a poté 40-ti sekundová stimulace 10 μ M xanomelinem a opět 6-ti minutové promývání v KHB. Kontrolní stimulace oxotremorinem u CHO buněk exprimujících mutanty D99N a D122N vyvolala odpověď srovnatelnou s wt M_1 . Naopak mutace D105N, obdobně jako D105E, vedla ke snížení maximální odpovědi. U CHO buněk exprimujících wt M_1 receptor vedlo prodloužené působení xanomelinu po přechodném zvýšení hladiny nitrobuněčného vápníku (E_{MAX} $1,93 \pm 0,02$ násobek klidové hladiny; průměr \pm S.E.M. za 3 nezávislých pokusů) k přetrvávajícímu zvýšení na $1,31 \pm 0,02$ násobku klidové hladiny neodmyvatelně navázaným xanomelinem (Obrázek 26).



Obrázek 26: Časový průběh změn koncentrace nitrobuněčných vápenatých iontů po prodlouženém vystavení buněk xanomelinu. Časový průběh (osa x, doba v sekundách) hladiny nitrobuněčných vápenatých iontů (osa y, vyjádřené jako poměr intenzit fluorescence po excitaci při 340 a 380 nm) v CHO buňkách exprimující wt M_1 (černě) nebo mutantní D99N (červeně),

D105N (zeleně), D105E (žlutě) a D122N (modře) receptory. Po počáteční 10-ti sekundové kontrolní stimulaci 10 μ M oxotremorinem (oxo) byly buňky promývány KHB bez agonisty. V sedmé minutě byly buňky na 40 sekund vystaveny 10 μ M xanomelinu (xano) a pak promývány KHB bez agonisty do konce měření. Signál je průměr z 8-12 buněk z reprezentativního pokusu, potvrzeného 2 dalšími nezávislými pokusy.

Všechny testované mutace (D99N, D105N, D105E, D122N) snižovaly jak hodnotu E_{MAX} přechodného zvýšení hladiny vápenatých iontů tak klidovou hladinu po promývání podle párového t-testu ($P < 0,05$). Nejslabší vliv měla mutace D99N, kde přechodné zvýšení po 40-ti sekundové stimulaci xanomelinem dosahovalo hodnoty $E_{MAX} = 1,88 \pm 0,02$ násobku klidové hladiny před stimulací xanomelinem a klidová hladina po druhém promývání $1,26 \pm 0,02$ násobku. Nejsilnější vliv měla mutace D105N, kde E_{MAX} pro přechodné zvýšení hladiny vápenatých iontů dosahovala pouze $1,12 \pm 0,02$ násobek klidové hladiny před stimulací xanomelinem a klidová hladina po druhém promývání $1,03 \pm 0,02$ násobku. Hodnoty klidových hladin po druhém promývání byly i u mutantů D105N a D105E statisticky významně vyšší než klidová hodnota hladiny vápenatých iontů před stimulací podle jednovýběrového t-testu ($P < 0,05$).

5 DISKUZE

V posledních letech byly popsány látky (atypičtí agonisté muskarinových receptorů), které se vážou se srovnatelnou afinitou k jednotlivým muskarinovým podtypům, ale jsou schopné je do určité míry selektivně aktivovat /Eglen, 2012; Kruse a spol., 2014/. Molekulární mechanismus funkční selektivity těchto atypických agonistů však není dosud znám. Objasnění tohoto mechanismu by mohlo přispět k cílenému vývoji nových funkčně selektivních agonistů vhodných pro léčebné využití.

Mechanismus funkční selektivity atypických agonistů muskarinových receptorů by mohl souviset se způsobem, jakým tyto látky aktivují receptor. Pro aktivaci receptoru je nezbytné zmenšení vazebné kavity dané přiblížením horní části TM6 směrem dovnitř a intracelulární odklon této domény pro interakci s G-proteinem /Rasmussen a spol., 2011/. V případě aktivace receptoru klasickými agonisty se tak děje prostřednictvím interakce agonisty s D3.32 v TM3 a N6.52 v TM6 (číslování aminokyselin dle Ballesterosové a Weinsteina /Ballesteros a Weinstein, 1995/), která způsobí uzavření vazebné kavity a vzniklá konformační změna je pak přenesena do intracelulární části receptoru prostřednictvím přeuspořádání intramolekulárních interakcí v sérii molekulárních přepínačů "transmission switch", "tyrosine-toggle switch" a "ionic-lock switch", které jsou společné pro všechny aminergní GPCR /Trzaskowski a spol., 2012/.

Předpokládá se, že každý agonista v závislosti na své struktuře vyvolává po interakci s GPCR specifickou konformační změnu (agonist-specific conformation) receptoru /Ehlert, 2008/. Atypičtí agonisté jsou obecně poměrně velké a složité molekuly, tudíž specifická konformační změna receptoru vyvolaná po jejich navázání by mohla vést k využití paralelních aktivačních mechanismů (přepínačů) a souviset s jejich funkční selektivitou /Jakubík a spol., 2011; Navarro-Polanco a spol., 2011/. Některé studie ukazují na existenci řady aktivačních přepínačů v muskarinových receptorech, z nichž některé jsou selektivně využívány alosterickými agonisty, zatímco jiné jsou společné pro všechny agonisty /Nawaratne a spol., 2008 a 2010; Abdul-Ridha a spol., 2014/.

V této disertační práci jsme se zabývali molekulární podstatou aktivace muskarinového M₁ receptoru atypickými M₁ selektivními agonisty xanomelinem a NDMC. Xanomelin je považován za bitopického agonistu interagujícího jak s ortosterickým tak i blíže neurčeným alosterickým místem na receptoru. Rozdílná kinetika aktivace jednotlivých podtypů receptoru xanomelinem naznačuje možnost odlišných mechanismů aktivace u jednotlivých podtypů receptoru /Jakubík a spol., 2006/. NDMC je považován za ektopického agonistu interagujícího s receptorem v místě, které se ne zcela překrývá s ortosterickým místem. Aktivační mechanismus NDMC se odlišuje od aktivačního mechanismu klasických ortosterických agonistů jak dokazuje studie Sur a spol.,

/2003/, ve které mutace tyrozinu Y6.51 (Y381A v sekvenci M₁ receptoru) v ortosterickém místě, který se podílí na uzavření vazebné kavity při aktivaci klasickými agonisty, snižuje potenci klasického agonisty acetylcholinu, ale zlepšuje potenci i účinnost aktivace NDMC.

Za účelem prozkoumání aktivačního mechanismu těchto atypických agonisů jsme provedli bodové mutace v oblasti M₁ receptoru odpovědné za vazbu ortosterického ligandu (D105^{3.32}, D99^{3.26}), aktivaci receptoru (D71^{2.50}, stabilizující tyrosine toggle switch) a interakci s G-proteiny (R123^{3.50}, D122^{3.49}, v konzervovaném DRY motivu, který je součástí "ionic lock switch") a sledovali, jak tyto mutace ovlivní přenos signálu na M₁ receptoru prostřednictvím atypických agonistů xanomelinu a NDMC ve srovnání s klasickými neselektivními ortosterickými agonisty karbacholem a oxotremorinem.

Muskarinové receptory se stejně jako řada dalších GPCR nacházejí vzhledem k vazbě agonistů ve dvou stavech: nízkoafinní stav, kdy receptor je volný, odpřažený od G-proteinu, nebo spřažený s G-proteinem vázícím GDP a vysokoafinní stav, kdy je receptor spřažen s G-proteinem bez GDP /*Jakubík a spol., 2011*/. Na rozdíl od ostatních agonistů, kteří se vážali na wt M₁ receptor jak nízkoafinní tak vysokoafinní vazbou, kompetiční křivka NDMC vykazovala jen jednu vazebnou složku, podobně jako je tomu u antagonistů (Obrázek 18; str. 55). Navíc na rozdíl od ostatních agonistů měl NDMC stejnou afinitu jak k inaktivnímu (D71N), tak odpřaženému (R123N) receptoru (Tabulka 5; str. 56). NDMC tedy interaguje s receptorem jiným způsobem než ostatní studovaní agonisté. To podporuje hypotézu o specifických konformacích receptoru vyvolaných konkrétním agonistou stejně jako zjištění, že jednotlivé mutace způsobovaly změny afinit a poměru nízko a vysokoafinních složek specificky pro každého testovaného agonistu.

Aspartát D3.32 (D105 v sekvenci muskarinového M₁ receptoru) je konzervován v rámci všech aminergních GPCR a tedy i muskarinových podtypů. Nachází se uprostřed TM3 v ortosterickém vazebném místě a je klíčovou aminokyselinou pro vazbu klasických muskarinových agonistů a antagonistů. Prostřednictvím svého záporného náboje interaguje s pozitivně nabitou kvartérní amoniovou skupinou acetylcholinu a většiny muskarinových ligandů /*Spalding a spol., 1994*/.

Mutace tohoto aspartátu na asparagin D105N, která neutralizuje záporný náboj, měla za následek úplnou ztrátu vazby kladně nabitého antagonisty ³H-NMS a více než stonásobný pokles afinity nepolárního antagonisty ³H-QNB (Tabulka 4; str. 54). Afinita testovaných agonistů nebyla tedy případě mutanta D105N stanovována. Mutace D105E, která mění geometrii vazebného místa, vedla ke čtyřnásobnému poklesu afinity pro NMS a měla negativní dopad i na vazbu všech testovaných agonistů (snížením afinity nebo zvýšením proporce nízkoafinních míst u oxotremorinu). Obě mutace aspartátu D105 (D105N, D105E) výrazně ovlivnily funkční

odpověď M_1 receptoru na stimulaci všemi testovanými agonisty. Překvapivé je, že mutace D105N přímo v ortosterickém místě snížila potenci (zvýšily EC_{50}) aktivace receptoru atypickým agonistou xanomelinem více než u klasických ortosterických agonistů karcholu a oxotremorinu (Obrázek 25, Tabulka 11; str. 67). Potence xanomelinu byla ovlivněna nejvíce, oxotremorinu nejméně. U xanomelinu došlo u mutantů D105 i k nejvýraznějšímu ovlivnění kinetiky aktivace, u oxotremorinu nejméně (Tabulka 10; str. 64).

Míra ovlivnění afinity, potence i kinetiky aktivace studovaných agonistů mutacemi D105 je dána způsobem jejich interakce s ortosterickým vazebným místem. Simulace molekulární dynamiky vazby studovaných agonistů k receptoru /Randáková a spol., 2015/ na homologním modelu M_1 receptoru /Jakubík a spol., 2013/ ukazuje, že ionizovatelný dusík xanomelinu a NDMC a kvartérní amoniová skupina karcholu se vážou silnou iontovou vazbou na D105. U xanomelinu a NDMC navíc tvoří ionizovatelný dusík vodíkové a vodné můstky s D105. Oxotremorin však interaguje s D105 jen slabě, a to prostřednictvím vodných můstků. Změna vazebné energie zrušením záporného náboje aspartátu mutací D105N je tedy mnohem vyšší u xanomelinu, NDMC a karcholu než u oxotremorinu, což se odráží ve velikosti změny potence.

V případě oxotremorinu nedošlo u mutantu D105E ke změně afinity (Tabulka 5; str. 56), ale došlo ke snížení jeho potence (Tabulka 8; str. 59). Afinita zřejmě nebyla ovlivněna díky flexibilitě vazby oxotremorinu k D105 prostřednictvím vodných můstků. Nicméně konformační změna receptoru, na níž se D105 podílí, je stěžejní pro aktivaci a tudíž u oxotremorinu došlo ke snížení potence aktivovat receptor. Mutací D105E došlo na rozdíl od D105N jen ke změně geometrie ortosterického vazebného místa, tudíž i ovlivnění potence agonistů aktivovat receptor bylo menší než u D105N. Mutací D105E byla však výrazně snížena účinnost aktivace receptoru všemi testovanými agonisty (Tabulka 8; str. 59). Vazbou agonisty dojde k propojení TM3 (D105^{3.32}) a TM6 (N6.52) a sevření vazebné kavity. Díky prodloužení postranního řetězce mutací D105E pravděpodobně dochází při interakci s agonisty k menšímu sevření vazebné kavity a tím také následnému menšímu otevření intracelulární části receptoru nutné pro interakci s G-proteinem. To by mohlo vysvětlovat snížení účinnosti aktivace receptoru. U karcholu je snížení účinnosti aktivace receptoru mutací D105E ovlivněno nejméně, což by mohlo souviset s jeho malou velikostí.

Pro sledování účinku mutací D105 na aktivaci M_1 receptoru NDMC nebylo možné kvůli interferenci odpovědi prostřednictvím jiných typů receptorů exprimovaných v CHO buňkách (Obrázek 23; str. 63) použít citlivější metodu, kterou je měření změn hladiny vápenatých iontů. NDMC je promiskuitní ligand interagující s různými GPCR. Fibroblasty exprimují např. i serotoninové 5-HT_{2A} receptory, pro které je NDMC inverzním agonistou /Lameh a spol., 2007/, což vysvětluje i pokles akumulace IP_x na CHO buňkách bez muskarinových receptorů (Obrázek

21; str. 61 vlevo).

Mutace D105N však potlačila aktivaci a D105E snížila účinnost aktivace receptoru NDMC sledovanou prostřednictvím akumulace IP_X . Z toho vyplývá, že D105 je klíčový i pro aktivaci M_1 receptoru NDMC, což potvrzuje i Lebon a spol., /2009/, navzdory některým studiím, které ukazují, že NDMC aktivuje receptor z ektopického místa, které se ne zcela překrývá s klasickým ortosterickým místem pro acetylcholin /Sur a spol., 2003; Nawaratne a spol., 2008/.

Naše výsledky ukazují, že atypičtí agonisté NDMC a xanomelin využívají D105 pro aktivaci receptoru, což je v souladu i se studiemi Lebon spol., /2008/ a Keov a spol.,/2014/. Rozdíl je ve způsobu jakým s D105 interagují.

Xanomelin se hydrofóbní částí své molekuly váže na receptor neodmyvatelně, což vede k perzistentní aktivaci receptoru /Jakubík a spol., 2004/. Naše výsledky ukazují, že i v této aktivaci hraje klíčovou roli D105. Mutace D105E způsobila pokles afinity neodmyvatelné vazby xanomelinu (Tabulka 6; str. 57), který se odrazil i při aktivaci receptoru poklesem účinnosti (K_G) neodmyvatelného xanomelinu stimulovat akumulaci IP_X (Tabulka 9; str. 62). Na časovém průběhu změn koncentrace nitrobuněčných vápenatých iontů po prodlouženém vystavení buněk xanomelinu (Obrázek 26; str. 68) můžeme vidět jak účinek odmyvatelného xanomelinu (přechodné zvýšení hladiny vápenatých iontů), tak jeho přetrvávající aktivaci projevující se zvýšenou hladinou vápníku (plateau). Poměr mezi hladinou vápenatých iontů při přechodném zvýšení a při přetrvávající aktivaci u mutantů D105E a D105N je obdobný jako u wt receptoru. Interakce xanomelinu s D105 v ortosterickém vazebném místě je tedy nutná pro vznik neodmyvatelné vazby xanomelinu a perzistentní aktivaci receptoru. Tyto nálezy jsou v souladu s pozorováními, že zablokování ortosterického vazebného místa antagonistou NMS zamezí aktivaci receptoru prostřednictvím neodmyvatelné vazby xanomelinu pouze přechodně /Šantrůčková a spol., 2014/.

Aspartát D3.26 (D99 v sekvenci muskarinového M_1 receptoru) v oblasti vstupu do ortosterického vazebného místa na N-konci TM3 hraje roli při vazbě ortosterických ligandů. Mutace tohoto aspartátu vedou ke snížení afinity a urychlení kinetiky vazby muskarinových ligandů /Fraser a spol.,1989; Goodwin a spol., 2007/. Podle tzv. tandemového modelu vazby ligandu /Jakubík a spol., 2000/, potvrzeného simulací molekulární dynamiky /Kruse a spol., 2012/, je vazba ligandu do ortosterického místa muskarinového receptoru dynamický proces, při kterém dochází k translokaci ligandu mezi dvěma vazebnými doménami, z vestibulu vazebného místa do ortosterického místa. Aspartát D3.26 není konzervován v rámci GPCR. Adrenergní receptory mají v pozici 3.26 glutamát, jehož záměnou za alanin nedošlo k ovlivnění afinit agonistů ani antagonistů adrenergních receptorů /Strader a spol., 1987/. Naše výsledky ukazují, že mutace aspartátu D99^{3.26}N vede ke snížení afinity antagonisty NMS a klasických agonistů, což

korespondujeme s výsledky *Fraser a spol., /1989/* a *Goodwin a spol., /2007/*, a také snižuje afinitu atypických agonistů xanomelinu a NDMC (Tabulka 5; str. 56). Pokles afinit klasických a atypických agonistů je srovnatelný, přestože by se dalo předpokládat, že u ektopického agonisty NDMC, interagujícího pravděpodobně v oblasti nad ortosterickým místem blíže jeho vestibulu, bude afinita ovlivněna více. Pokles afinit agonistů se přenesl i do poklesu potencií všech agonistů aktivovat receptor.

Mutace D99N měla za následek i pokles afinity vazby (Tabulka 6; str. 57) a účinnosti (Obrázek 26. str. 68) neodmyvatelného xanomelinu aktivovat receptor (pokles účinnosti neodmyvatelného xanomelinu byl zřetelný jen při citlivějším mikrofluorimetrickém stanovení aktivace receptoru). Odpovídá to pozorování, že mutace D99N snižuje afinitu vazby xanomelinu do ortosterického místa, která je zřejmě nutná pro vznik neodmyvatelné vazby xanomelinu. Poměr mezi hladinou vápenatých iontů při přechodném zvýšení a při přetrvávající aktivaci u mutace D99N stejně jako u mutací aspartátu 105 je obdobný jako u wt receptoru (Obrázek 26; str. 68). Z toho můžeme usuzovat, že pro vznik neodmyvatelné vazby xanomelinu a perzistentní aktivaci receptoru je nutná nejen interakce xanomelinu s ortosterickým místem D105, ale podstanou roli hraje i vestibul vazebného místa.

Můžeme tedy říci, že jak aspartát D105 v ortosterickém vazebném místě tak aspartát D99 ve vestibulu vazebného místa ovlivňují vazbu klasických agonistů i atypických agonistů xanomelinu a NDMC.

Aspartát D2.50 uprostřed TM2 (D71 v sekvenci muskarinového M₁ receptoru) funguje jako tzv. molekulární přepínač, jehož prostřednictvím (přeuspořádáním jeho interakcí) je přenesena konformační změna receptoru vyvolaná vazbou ligandu do jeho intracelulární části */Hulme, 2012, Miao a spol., 2013/*. Konkrétně D2.50 interaguje s N7.49 v konzervovaném motivu NPXXY (tyrosine toggle switch */Hulme a spol., 2013/*). Aktivační mechanismus využívající D2.50 je společný pro řadu dalších GPCR */Trzaskowski a spol., 2012/*. Mutace tohoto aspartátu na asparagin vedla ke ztrátě funkční odpovědi muskarinových */Fraser a spol., 1989/* a dalších například serotoninových, adrenergických, kanabinooidních GPCR */GPCR database; www.gpcr.org/Tm/*. U řady GPCR byly popsány ale i další molekulární přepínače podílející se na jejich aktivaci */Chen a spol., 2002; Nachtergaele a spol., 2006; Singh a spol., 2011; Scott a spol., 2013/*. Některé studie ukazují na existenci molekulárních přepínačů selektivně využívaných alosterickými agonisty/modulátory muskarinových receptorů */Nawaratne a spol., 2010/*. Na základě krystalové struktury β_2 adrenergního receptoru v aktivním stavu s navázaným ireverzibilním agonistou byl prokázán aktivační přepínač obsahující I3.40, P5.50, a F6.44, který je paralelní k přepínači využívající D2.50 */Rosenbaum a spol., 2011/*. Naše výsledky však nepodporují možnost aktivace M₁ receptoru atypickými agonisty prostřednictvím paralelního

aktivačního přepínače, protože mutace D71N vedla k úplnému potlačení aktivace receptoru všemi testovanými agonisty a zcela potlačila i perzistentní aktivaci vyvolanou neodmyvatelnou vazbou xanomelinu. Atypičtí agonisté xanomelin i NDMC tedy využívají stejný aktivační přepínač zahrnující D71 jako klasičtí ortosteričtí agonisté.

Společný aktivační mechanismus klasických a atypických agonistů podporuje i studie Markovic a spol., /2012/, která využitím přenosu fluorescenční energie (Förster resonance energy transfer; FRET) ukazuje, že atypičtí agonisté AC-42 a 77-LH-28-1 vyvolávají obdobnou konformační změnu, která vede ke stejné změně vzdálenosti mezi IL3 a C-koncem myšího M₁ receptoru jako klasiční agonisté metacholin a oxotremorin-M.

Arginin R3.50 na cytoplazmatickém konci TM3 (R123 v sekvenci M₁ receptoru) je konzervovaný v rámci všech GPCR. Je součástí konzervovaného DRY (aspartát-arginin-tyrosin) motivu, který je součástí "ionic lock switch". Arginin 3.50 přímo interaguje s α -podjednotkou G-proteinů /Scheerer a spol., 2008/. Mutace tohoto argininu vedla ve většině případů k úplné ztrátě schopnosti agonistů aktivovat receptor /GPCR databáze: www.gpcr.org/7tm/mutant/. Bylo však ukázáno, že v případě chemokinového receptoru CXCR spřáhujícího se s G_i G-proteiny je přítomnost celého DRY motivu pro aktivaci postradatelná /Roland a spol., 2003/. Také bylo ukázáno, že mutace R3.50 u chemoatraktantového receptoru GPR33 na histidin nevedla ke změně funkční odpovědi receptoru /Römpler a spol., 2006/, což naznačuje jiný aktivační mechanismus G-proteinů u těchto receptorů.

Naše měření ukazují, že mutace R123N vede k úplné ztrátě schopnosti M₁ receptoru stimulovat akumulaci inositolfosfátů i uvolňování nitro-buněčných vápenatých iontů nejen karbacholem, což souhlasí se studií Fraserové a spol. /1989/, ale i oxotremorinem a atypickými agonisty NDMC a xanomelinem, včetně jeho neodmyvatelné vazby.

Mutace R123N zabránila interakci s G-proteinem a tím způsobila ztrátu vysokoafinní vazby testovaných agonistů na receptor a vedla, s výjimkou NDMC, ke snížení afinity jejich nízkoafinní vazby (Tabulka 5; str 56). To ukazuje, že na rozdíl od inaktivního receptoru (D71N), kde došlo, s výjimkou NDMC, ke zvýšení afinity pro agonisty, se v případě odpřaženého receptoru (R123N) jedná o jiný stav receptoru /Jakubík a spol., 2011/.

Aspartát 3.49 (D122 v sekvenci muskarinového M₁ receptoru) je součástí konzervovaného DRY motivu molekulárního přepínače "ionic lock switch" a stabilizuje receptor v inaktivní konformaci /Okada a spol., 2004/. Mutace tohoto aspartátu D122N vede k destabilizaci inaktivní konformace a zvýšení konstitutivní aktivity muskarinových receptorů /Jakubík a spol., 2011/. Zvýšení konstitutivní aktivity bylo pozorováno i u adrenergických /Scheer a spol., 1996/, serotoninových 5-HT₂ receptorů /Wang a spol., 1993/ nebo μ -opioidních receptorů /Li a spol., 2001/.

Výsledky kompetičních pokusů ukazují, že mutace D122N vedla ke zvýšení proporce nízkoafinních vazebných míst (Tabulka 5, str. 56), což je zřejmě následkem zvýšení konstitutivní aktivity, díky níž je v systému k dispozici více nespřažených receptorů. Mutace D122N neměla vliv na potenci klasických ani atypických agonistů aktivovat M_1 receptor (Tabulka 8; str. 59), ale vedla ke zvýšení účinnosti aktivace receptoru parciálním agonistou oxotremorinem, zatímco účinnost aktivace plnými agonisty karbacholem ani xanomelinem neovlivnila (Tabulka 8; str. 59). Vycházíme-li z představy, že vazbou plného agonisty dojde k limitní konformační změně receptoru vyvolávající maximální účinnost aktivace /*Kobilka a Deupi, 2007*/, destabilizací inaktivní konformace mutací D122N tak u plných agonistů k zvýšení účinnosti nedochází, protože dokáží vyvolat limitní aktivní konformaci i u receptorů stabilizovaných v inaktivní konformaci. Na rozdíl od plných agonistů není konformační změna receptoru vyvolaná parciálním agonistou limitní. Vyvolá jen částečnou aktivaci a destabilizací inaktivní konformace dojde k usnadnění aktivace parciálním agonistou a tím ke zvýšení jeho účinnosti. V případě NDMC, který je rovněž parciálním agonistou M_1 receptoru, však mutací D122N ke zvýšení účinnosti aktivace nedošlo. Molekula NDMC zřejmě díky své velikosti a struktuře omezuje uzavření vazebné kavity receptoru a tudíž i jeho aktivaci. Destabilizace inaktivní konformace mutací D122N tak aktivaci receptoru NDMC neusnadní a tím pádem ani nezvýší účinnost aktivace.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit, zda atypičtí M_1 selektivní agonisté xanomelin a N-desmetylklozapin aktivují receptor prostřednictvím stejného aktivačního mechanismu jako klasičtí ortosteričtí agonisté, nebo díky své výrazné strukturní odlišnosti vyvolají konformační změnu vedoucí k využití nějakého paralelního aktivačního mechanismu.

Hypotézu o využití paralelních aktivačních mechanismů atypických agonistů, která by mohla vést k jejich funkční selektivitě, naše výsledky nepotvrzují. Zjistili jsme, že jednotlivé mutace různým způsobem ovlivňují vazebné vlastnosti konkrétních agonisů. To podporuje hypotézu o specifických konformacích ("agonist-specific conformation") vyvolaných konkrétními agonisty. Ale funkční stanovení ukázala, že M_1 selektivní bitopický agonista xanomelin i ektopický agonista N-desmetylklozapin aktivují M_1 receptor stejným mechanismem využívajícím D71^{2.50} v TM2 a přepínač "ionic lock switch", který se nachází mezi intracelulárními konci TM3 a TM6, stejně jako klasičtí ortosteričtí agonisté karbachol a oxotrememorin. Naše výsledky dále ukazují na klíčovou roli D105^{3.32} v ortosterickém vazebném místě pro aktivaci M_1 receptoru atypickými agonisty. Rozdíl mezi jednotlivými agonisty je ve způsobu jakým s D105^{3.32} interagují. Také jsme ukázali, že D105^{3.32} v ortosterickém místě je stěžejní i pro persistentní aktivaci receptoru prostřednictvím neodmyvatelně navázaného xanomelinu. Dále naše výsledky ukazují, že interakce s vestibulem vazebného místa je důležitá i pro vazbu atypických agonistů.

7 LITERATURA

Abdul-Ridha A, López L, Keov P, Thal DM, Mistry SN, Sexton PM, Lane JR, Canals M and Christopoulos A (2014) Molecular determinants of allosteric modulation at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* **289**: 6067-6079.

Alexander SPH, Mathie A and Peters JA (2011) Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol* **164 Suppl 1**: S1-324.

Antony J, Kellershohn K, Mohr-Andrä M, Kebig A, Prilla S, Muth M, Heller E, Disingrini T, Dallanoce C, Bertoni S, Schrobang J, Tränkle C, Kostenis E, Christopoulos A, Höltje H, Barocelli E, De Amici M, Holzgrabe U and Mohr K (2009) Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. *FASEB J* **23**: 442-450.

Avlani VA, Langmead CJ, Guida E, Wood MD, Tehan BG, Herdon HJ, Watson JM, Sexton PM and Christopoulos A (2010) Orthosteric and allosteric modes of interaction of novel selective agonists of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* **78**: 94-104.

Axelsen PH, Harel M, Silman I and Sussman JL (1994) Structure and dynamics of the active site gorge of acetylcholinesterase: synergistic use of molecular dynamics simulation and X-ray crystallography. *Protein Sci* **3**: 188-197.

Ballesteros J, Weinstein H (1995) Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure function relations in g protein-coupled receptors. In: Sealfon S, Conn P, editors. *Methods in neurosciences*. Academic Press. pp. 366-428.

Basile AS, Fedorova I, Zapata A, Liu X, Shippenberg T, Duttaroy A, Yamada M and Wess J (2002) Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11452-11457.

Beckmann J and Lips KS (2013) The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology* **92**: 286-302.

Birdsall NJ, Farries T, Gharagozloo P, Kobayashi S, Lazareno S and Sugimoto M (1999) Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogs and acetylcholine at muscarinic receptors: functional studies. *Mol Pharmacol* **55**: 778-786.

Birdsall NJ, Lazareno S, Popham A and Saldanha J (2001) Multiple allosteric sites on muscarinic receptors. *Life Sci* **68**: 2517-2524.

Blin N, Yun J and Wess J (1995) Mapping of single amino acid residues required for selective activation of Gq/11 by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* **270**: 17741-17748.

Blüml K, Mutschler E and Wess J (1994) Functional role in ligand binding and receptor activation of an asparagine residue present in the sixth transmembrane domain of all muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* **269**: 18870-18876.

Bodick NC, Offen WW, Levey AI, Cutler NR, Gauthier SG, Satlin A, Shannon HE, Tollefson GD, Rasmussen K, Bymaster FP, Hurley DJ, Potter WZ and Paul SM (1997) Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease. *Arch Neurol* **54**: 465-473.

Böhme TM, Augelli-Szafran CE, Hallak H, Pugsley T, Serpa K and Schwarz RD (2002) Synthesis and pharmacology of benzoxazines as highly selective antagonists at M(4) muscarinic receptors. *J Med Chem* **45**: 3094-3102.

Bonifazi A, Yano H, Del Bello F, Farande A, Quaglia W, Petrelli R, Matucci R, Nesi M, Vistoli G, Ferré S and Piergentili A (2014) Synthesis and biological evaluation of a novel series of heterobivalent muscarinic ligands based on xanomeline and 1-[3-(4-butylpiperidin-1-yl)propyl]-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-one (77-LH-28-1). *J Med Chem* **57**: 9065-9077.

- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC and Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **237**: 527-532.
- Boulos J, Jakubik J, Randakova A, Avila C (2013) Synthesis of *N*-Substituted Piperidine Salts as Potential Muscarinic Ligands for Alzheimer's Applications. *J Heterocyclic chem* **6**: 1363-1367.
- Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB and Sixma TK (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**: 269-276.
- Bridges TM, Marlo JE, Niswender CM, Jones CK, Jadhav SB, Gentry PR, Plumley HC, Weaver CD, Conn PJ and Lindsley CW (2009) Discovery of the first highly M5-preferring muscarinic acetylcholine receptor ligand, an M5 positive allosteric modulator derived from a series of 5-trifluoromethoxy *N*-benzyl isatins. *J Med Chem* **52**: 3445-3448.
- Burford NT, Tobin AB and Nahorski SR (1995) Differential coupling of m1, m2 and m3 muscarinic receptor subtypes to inositol 1,4,5-trisphosphate and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate accumulation in Chinese hamster ovary cells. *J Pharmacol Exp Ther* **274**: 134-142.
- Burstein ES, Spalding TA and Brann MR (1998) Structure/function relationships of a G-protein coupling pocket formed by the third intracellular loop of the m5 muscarinic receptor. *Biochemistry* **37**: 4052-4058.
- Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE and Greengard P (1992) Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10075-10078.
- Bymaster FP, Carter PA, Yamada M, Gomeza J, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, McKinzie DL and Felder CC (2003) Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *Eur J Neurosci* **17**: 1403-1410.
- Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC and Wess J (2003) Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochem Res* **28**: 437-442.
- Canals M, Lane JR, Wen A, Scammells PJ, Sexton PM and Christopoulos A (2012) A Monod-Wyman-Changeux mechanism can explain G protein-coupled receptor (GPCR) allosteric modulation. *J Biol Chem* **287**: 650-659.
- Cannon DM, Klaver JK, Gandhi SK, Solorio G, Peck SA, Erickson K, Akula N, Savitz J, Eckelman WC, Furey ML, Sahakian BJ, McMahon FJ and Drevets WC (2011) Genetic variation in cholinergic muscarinic-2 receptor gene modulates M2 receptor binding in vivo and accounts for reduced binding in bipolar disorder. *Mol Psychiatry* **16**: 407-418.
- Carsi JM, Valentine HH and Potter LT (1999) m2-toxin: A selective ligand for M2 muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **56**: 933-937.
- Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors: characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* **58**: 319-379.
- Chan WY, McKinzie DL, Bose S, Mitchell SN, Witkin JM, Thompson RC, Christopoulos A, Lazareno S, Birdsall NJM, Bymaster FP and Felder CC (2008) Allosteric modulation of the muscarinic M4 receptor as an approach to treating schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10978-10983.
- Chapple CR, Yamanishi T and Chess-Williams R (2002) Muscarinic receptor subtypes and management of the overactive bladder. *Urology* **60**: 82-8; discussion 88-9.
- Chen S, Lin F, Xu M and Graham RM (2002) Phe(303) in TMVI of the alpha(1B)-adrenergic

- receptor is a key residue coupling TM helical movements to G-protein activation. *Biochemistry* **41**: 588-596.
- Chien EYT, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, Shi L, Newman AH, Javitch JA, Cherezov V and Stevens RC (2010) Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* **330**: 1091-1095.
- Christie JE, Shering A, Ferguson J and Glen AI (1981) Physostigmine and arecoline: effects of intravenous infusions in Alzheimer presenile dementia. *Br J Psychiatry* **138**: 46-50.
- Christopoulos A, Lanzafame A and Mitchelson F (1998) Allosteric interactions at muscarinic cholinceptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **25**: 185-194.
- Christopoulos A and Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* **54**: 323-374.
- Clark AL and Mitchelson F (1976) The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* **58**: 323-331.
- Crook JM, Tomaskovic-Crook E, Copolov DL and Dean B (2001) Low muscarinic receptor binding in prefrontal cortex from subjects with schizophrenia: a study of Brodmann's areas 8, 9, 10, and 46 and the effects of neuroleptic drug treatment. *Am J Psychiatry* **158**: 918-925.
- Davies MA, Compton-Toth BA, Hufeisen SJ, Meltzer HY and Roth BL (2005) The highly efficacious actions of N-desmethylclozapine at muscarinic receptors are unique and not a common property of either typical or atypical antipsychotic drugs: is M1 agonism a pre-requisite for mimicking clozapine's actions?. *Psychopharmacology (Berl)* **178**: 451-460.
- Deupi X and Kobilka BK (2010) Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. *Physiology (Bethesda)* **25**: 293-303.
- Dion LD, Goldsmith KT, Tang DC, Engler JA, Yoshida M and Garver RIJ (1997) Amplification of recombinant adenoviral transgene products occurs by inhibition of histone deacetylase. *Virology* **231**: 201-209.
- Disingrini T, Muth M, Dallanoce C, Barocelli E, Bertoni S, Kellershohn K, Mohr K, De Amici M and Holzgrabe U (2006) Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* **49**: 366-372.
- Doggrell SA and Evans S (2003) Treatment of dementia with neurotransmission modulation. *Expert Opin Investig Drugs* **12**: 1633-1654.
- Dunlap J and Brown JH (1983) Heterogeneity of binding sites on cardiac muscarinic receptors induced by the neuromuscular blocking agents gallamine and pancuronium. *Mol Pharmacol* **24**: 15-22.
- Duttaroy A, Gomeza J, Gan J, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, Smith PL, Felder CC, Levey AI and Wess J (2002) Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* **62**: 1084-1093.
- Eglen RM (2005) Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem* **43**: 105-136.
- Eglen RM (2006) Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol* **26**: 219-233.
- Eglen RM (2012) Overview of muscarinic receptor subtypes. *Handb Exp Pharmacol* : 3-28.
- Ehlert FJ (1988) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* **33**: 187-194.
- Ehlert FJ (2008) On the analysis of ligand-directed signaling at G protein-coupled receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **377**: 549-577.

- Ellis J, Huyler J and Brann MR (1991) Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes.. *Biochem Pharmacol* **42**: 1927-1932.
- Espinoza-Fonseca LM and Trujillo-Ferrara JG (2005) Identification of multiple allosteric sites on the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett* **579**: 6726-6732.
- Espinoza-Fonseca LM and Trujillo-Ferrara JG (2006) The existence of a second allosteric site on the M1 muscarinic acetylcholine receptor and its implications for drug design. *Bioorg Med Chem Lett* **16**: 1217-1220.
- Espinoza-Fonseca LM, Pedretti A and Vistoli G (2008) Structure and dynamics of the full-length M1 muscarinic acetylcholine receptor studied by molecular dynamics simulations. *Arch Biochem Biophys* **469**: 142-150.
- Felder CC, Bymaster FP, Ward J and DeLapp N (2000) Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem* **43**: 4333-4353.
- Felder CC, Porter AC, Skillman TL, Zhang L, Bymaster FP, Nathanson NM, Hamilton SE, Gomeza J, Wess J and McKinzie DL (2001) Elucidating the role of muscarinic receptors in psychosis. *Life Sci* **68**: 2605-2613.
- Fisher A (2007) M1 muscarinic agonists target major hallmarks of Alzheimer's disease--an update. *Curr Alzheimer Res* **4**: 577-580.
- Fraser CM, Wang CD, Robinson DA, Gocayne JD and Venter JC (1989) Site-directed mutagenesis of m1 muscarinic acetylcholine receptors: conserved aspartic acids play important roles in receptor function. *Mol Pharmacol* **36**: 840-847.
- Fruchart-Gaillard C, Mourier G, Marquer C, Ménez A and Servent D (2006) Identification of various allosteric interaction sites on M1 muscarinic receptor using 125I-Met35-oxidized muscarinic toxin 7. *Mol Pharmacol* **69**: 1641-1651.
- Gnagey AL, Seidenberg M and Ellis J (1999) Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors.. *Mol Pharmacol* **56**: 1245-1253.
- Gautam D, Jeon J, Li JH, Han S, Hamdan FF, Cui Y, Lu H, Deng C, Gavrilova O and Wess J (2008) Metabolic roles of the M3 muscarinic acetylcholine receptor studied with M3 receptor mutant mice: a review. *J Recept Signal Transduct Res* **28**: 93-108.
- Gautam D, Jeon J, Starost MF, Han S, Hamdan FF, Cui Y, Parlow AF, Gavrilova O, Szalayova I, Mezey E and Wess J (2009) Neuronal M3 muscarinic acetylcholine receptors are essential for somatotroph proliferation and normal somatic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 6398-6403.
- Gentry PR, Kokubo M, Bridges TM, Cho HP, Smith E, Chase P, Hodder PS, Utley TJ, Rajapakse A, Byers F, Niswender CM, Morrison RD, Daniels JS, Wood MR, Conn PJ and Lindsley CW (2014) Discovery, synthesis and characterization of a highly muscarinic acetylcholine receptor (mAChR)-selective M5-orthosteric antagonist, VU0488130 (ML381): a novel molecular probe. *ChemMedChem* **9**: 1677-1682.
- Gomeza J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H and Wess J (1999) Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1692-1697.
- Goodwin JA, Hulme EC, Langmead CJ and Tehan BG (2007) Roof and floor of the muscarinic binding pocket: variations in the binding modes of orthosteric ligands. *Mol Pharmacol* **72**: 1484-1496.
- Grant MKO and El-Fakahany EE (2005) Persistent binding and functional antagonism by xanomeline at the muscarinic M5 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 313-319.

- Gregory KJ, Hall NE, Tobin AB, Sexton PM and Christopoulos A (2010) Identification of orthosteric and allosteric site mutations in M2 muscarinic acetylcholine receptors that contribute to ligand-selective signaling bias. *J Biol Chem* **285**: 7459-7474.
- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440-3450.
- Gudermann T, Nürnberg B and Schultz G (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med (Berl)* **73**: 51-63.
- Haass C and Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 101-112.
- Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T and Kobayashi T (2012) Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* **482**: 547-551.
- Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL and Nathanson NM (1997) Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13311-13316.
- Hamilton SE and Nathanson NM (2001) The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* **276**: 15850-15853.
- Hardy JA and Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184-185.
- Heitz F, Holzwarth JA, Gies JP, Pruss RM, Trumpp-Kallmeyer S, Hibert MF and Guenet C (1999) Site-directed mutagenesis of the putative human muscarinic M2 receptor binding site. *Eur J Pharmacol* **380**: 183-195.
- Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T and Catterall WA (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**: 258-262.
- Hulme EC, Lu ZL, Bee M, Curtis CA and Saldanha J (2001) The conformational switch in muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci* **68**: 2495-2500.
- Hulme EC, Lu ZL and Bee MS (2003) Scanning mutagenesis studies of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Receptors Channels* **9**: 215-228. (a)
- Hulme EC, Lu ZL, Saldanha JW and Bee MS (2003) Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* **31**: 29-34. (b)
- Hulme EC (2013) GPCR activation: a mutagenic spotlight on crystal structures. *Trends Pharmacol Sci* **34**: 67-84.
- Jaakola V, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EYT, Lane JR, Ijzerman AP and Stevens RC (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**: 1211-1217.
- Jacobson MA, Kreatsoulas C, Pascarella DM, O'Brien JA and Sur C (2010) The M1 muscarinic receptor allosteric agonists AC-42 and 1-[1'-(2-methylbenzyl)-1,4'-bipiperidin-4-yl]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one bind to a unique site distinct from the acetylcholine orthosteric site. *Mol Pharmacol* **78**: 648-657.
- Jakubík J, Bačáková L, el-Fakahany EE and Tuček S (1995) Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M1-M5 muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **274**: 1077-1083.
- Jakubík J, Bačáková L, Lisá V, el-Fakahany EE and Tuček S (1996) Activation of muscarinic

- acetylcholine receptors via their allosteric binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8705-8709.
- Jakubík J, Bačáková L, El-Fakahany EE and Tuček S (1997) Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors.. *Mol Pharmacol* **52**: 172-179.
- Jakubík J, Haga T and Tuček S (1998) Effects of an agonist, allosteric modulator, and antagonist on guanosine-gamma-[35S]thiotriphosphate binding to liposomes with varying muscarinic receptor/Go protein stoichiometry. *Mol Pharmacol* **54**: 899-906.
- Jakubík J, El-Fakahany EE and Tuček S (2000) Evidence for a tandem two-site model of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors.. *J Biol Chem* **275**: 18836-18844.
- Jakubík J, Tuček S and El-Fakahany EE (2002) Allosteric modulation by persistent binding of xanomeline of the interaction of competitive ligands with the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 1033-1041.
- Jakubík J, Tuček S and El-Fakahany EE (2004) Role of receptor protein and membrane lipids in xanomeline wash-resistant binding to muscarinic M1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **308**: 105-110.
- Jakubík J, Krejčí A and Doležal V (2005) Asparagine, valine, and threonine in the third extracellular loop of muscarinic receptor have essential roles in the positive cooperativity of strychnine-like allosteric modulators.. *J Pharmacol Exp Ther* **313**: 688-696.
- Jakubík J, El-Fakahany EE and Doležal V (2006) Differences in kinetics of xanomeline binding and selectivity of activation of G proteins at M(1) and M(2) muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **70**: 656-666.
- Jakubík J, Michal P, Machová E and Doležal V (2008) Importance and prospects for design of selective muscarinic agonists. *Physiol Res* **57**: S39-47.
- Jakubík J, Randáková A, El-Fakahany EE and Doležal V (2009) Divergence of allosteric effects of rapacuronium on binding and function of muscarinic receptors. *BMC Pharmacol* **9**: 15.
- Jakubík J and El-Fakahany EE (2010) Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmaceuticals* **9**: 2838-2860.
- Jakubík J, Janíčková H, El-Fakahany EE and Doležal V (2011) Negative cooperativity in binding of muscarinic receptor agonists and GDP as a measure of agonist efficacy. *Br J Pharmacol* **162**: 1029-1044.
- Jakubík J, Randáková A, Doležal V (2013) On homology modeling of the M2 muscarinic acetylcholine receptor subtype. *J Comput Aided Mol Des* **27**(6): 525-38.
- Jakubík J, Šantrůčková E, Randáková A, Janíčková H, Zimčík P, Rudajev V, Michal P, El-Fakahany EE and Doležal V (2014) Outline of therapeutic interventions with muscarinic receptor-mediated transmission. *Physiol Res* **63 Suppl 1**: S177-89. (a)
- Jakubík J, Zimčík P, Randáková A, Fuksová K, El-Fakahany EE, Doležal V (2014) Molecular mechanisms of methoctramine binding and selectivity at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **86**(2): 180-92. (b)
- Jakubík J, El-Fakahany EE (2015) Allosteric modulation of muscarinic receptors. In: Mysliveček J, Jakubík J, editors. *Muscarinic receptor: from structure to animal models*. Humana Press. pp. 95-130.
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Alonso M, Verde ER, Cerveňanský C and Harvey A (1998) Muscarinic toxin selective for m4 receptors impairs memory in the rat. *Neuroreport* **9**: 1407-1411.

- Jolkkonen M, van Giersbergen PL, Hellman U, Wernstedt C and Karlsson E (1994) A toxin from the green mamba *Dendroaspis angusticeps*: amino acid sequence and selectivity for muscarinic m4 receptors. *FEBS Lett* **352**: 91-94.
- Karam CS, Ballon JS, Bivens NM, Freyberg Z, Girgis RR, Lizardi-Ortiz JE, Markx S, Lieberman JA and Javitch JA (2010) Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci* **31**: 381-390.
- Karlsson E, Jolkkonen M, Mulugeta E, Onali P and Adem A (2000) Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* **82**: 793-806.
- Kawashima K and Fujii T (2008) Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci* **106**: 167-173.
- Kenakin T (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* **24**: 346-354.
- Kenakin T (2004) G-protein coupled receptors as allosteric machines. *Receptors Channels* **10**: 51-60.
- Kenakin T (2007) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship?. *Mol Pharmacol* **72**: 1393-1401.
- Kenakin T (2011) Functional selectivity and biased receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther* **336**: 296-302.
- Kenakin T and Christopoulos A (2013) Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 205-216.
- Keov P, López L, Devine SM, Valant C, Lane JR, Scammells PJ, Sexton PM and Christopoulos A (2014) Molecular mechanisms of bitopic ligand engagement with the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* **289**: 23817-23837.
- Kobilka BK and Deupi X (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**: 397-406.
- Krejčí A and Tuček S (2001) Changes of cooperativity between N-methylscopolamine and allosteric modulators alcuronium and gallamine induced by mutations of external loops of muscarinic M(3) receptors.. *Mol Pharmacol* **60**: 761-767.
- Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J and Kobilka BK (2012) Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **482**: 552-556.
- Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, Hübner H, Pardon E, Valant C, Sexton PM, Christopoulos A, Felder CC, Gmeiner P, Steyaert J, Weis WI, Garcia KC, Wess J and Kobilka BK (2013) Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **504**: 101-106.
- Kruse AC, Kobilka BK, Gautam D, Sexton PM, Christopoulos A and Wess J (2014) Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **13**: 549-560.
- Lameh J, Burstein ES, Taylor E, Weiner DM, Vanover KE and Bonhaus DW (2007) Pharmacology of N-desmethylozapine. *Pharmacol Ther* **115**: 223-231.
- Lane JR, Sexton PM and Christopoulos A (2013) Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **34**: 59-66.
- Langmead CJ, Watson J and Reavill C (2008) Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* **117**: 232-243.

- Lanzafame AA, Sexton PM and Christopoulos A (2006) Interaction studies of multiple binding sites on m4 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **70**: 736-746.
- Lazareno S and Birdsall NJ (1995) Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **48**: 362-378.
- Lazareno S, Gharagozloo P, Kuonen D, Popham A and Birdsall NJ (1998) Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies.. *Mol Pharmacol* **53**: 573-589.
- Lazareno S, Birdsall B, Fukazawa T, Gharagozloo P, Hashimoto T, Kuwano H, Popham A, Sugimoto M and Birdsall NJ (1999) Allosteric effects of four stereoisomers of a fused indole ring system with 3H-N-methylscopolamine and acetylcholine at M1-M4 muscarinic receptors. *Life Sci* **64**: 519-526.
- Lazareno S, Popham A and Birdsall NJ (2000) Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with N-[methyl-(3)H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site. *Mol Pharmacol* **58**: 194-207.
- Lazareno S, Popham A and Birdsall NJM (2002) Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors.. *Mol Pharmacol* **62**: 1492-1505.
- Lazareno S, Doležal V, Popham A and Birdsall NJM (2004) Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M4 receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity.. *Mol Pharmacol* **65**: 257-266.
- Leach K, Loiacono RE, Felder CC, McKinzie DL, Mogg A, Shaw DB, Sexton PM and Christopoulos A (2010) Molecular mechanisms of action and in vivo validation of an M4 muscarinic acetylcholine receptor allosteric modulator with potential antipsychotic properties. *Neuropsychopharmacology* **35**: 855-869.
- Lebois EP, Bridges TM, Lewis LM, Dawson ES, Kane AS, Xiang Z, Jadhav SB, Yin H, Kennedy JP, Meiler J, Niswender CM, Jones CK, Conn PJ, Weaver CD and Lindsley CW (2010) Discovery and characterization of novel subtype-selective allosteric agonists for the investigation of M(1) receptor function in the central nervous system. *ACS Chem Neurosci* **1**: 104-121.
- Lebois EP, Digby GJ, Sheffler DJ, Melancon BJ, Tarr JC, Cho HP, Miller NR, Morrison R, Bridges TM, Xiang Z, Daniels JS, Wood MR, Conn PJ and Lindsley CW (2011) Development of a highly selective, orally bioavailable and CNS penetrant M1 agonist derived from the MLPCN probe ML071. *Bioorg Med Chem Lett* **21**: 6451-6455.
- Lebon G, Langmead CJ, Tehan BG and Hulme EC (2009) Mutagenic mapping suggests a novel binding mode for selective agonists of M1 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **75**: 331-341.
- Lester DB, Miller AD and Blaha CD (2010) Muscarinic receptor blockade in the ventral tegmental area attenuates cocaine enhancement of laterodorsal tegmentum stimulation-evoked accumbens dopamine efflux in the mouse. *Synapse* **64**: 216-223.
- Levey AI (1993) Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci* **52**: 441-448.
- Li J, Huang P, Chen C, de Riel JK, Weinstein H and Liu-Chen LY (2001) Constitutive activation of the mu opioid receptor by mutation of D3.49(164), but not D3.32(147): D3.49(164) is critical for stabilization of the inactive form of the receptor and for its expression. *Biochemistry* **40**: 12039-12050.
- Li Z, Huang M, Ichikawa J, Dai J and Meltzer HY (2005) N-desmethylozapine, a major metabolite of clozapine, increases cortical acetylcholine and dopamine release in vivo via

- stimulation of M1 muscarinic receptors. *Neuropsychopharmacology* **30**: 1986-1995.
- Liang JS, Carsi-Gabrenas J, Krajewski JL, McCafferty JM, Purkerson SL, Santiago MP, Strauss WL, Valentine HH and Potter LT (1996) Anti-muscarinic toxins from *Dendroaspis angusticeps*. *Toxicon* **34**: 1257-1267.
- Lichtenthaler SF (2011) α -secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem* **116**: 10-21.
- Liu J, Conklin BR, Blin N, Yun J and Wess J (1995) Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11642-11646.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Lu ZL and Hulme EC (1999) The functional topography of transmembrane domain 3 of the M1 muscarinic acetylcholine receptor, revealed by scanning mutagenesis. *J Biol Chem* **274**: 7309-7315.
- Lu ZL, Saldanha JW and Hulme EC (2001) Transmembrane domains 4 and 7 of the M(1) muscarinic acetylcholine receptor are critical for ligand binding and the receptor activation switch.. *J Biol Chem* **276**: 34098-34104.
- Ma L, Seager MA, Wittmann M, Jacobson M, Bickel D, Burno M, Jones K, Graufelds VK, Xu G, Pearson M, McCampbell A, Gaspar R, Shughrue P, Danziger A, Regan C, Flick R, Pascarella D, Garson S, Doran S, Kreatsoulas C, Veng L, Lindsley CW, Shipe W, Kuduk S, Sur C, Kinney G, Seabrook GR and Ray WJ (2009) Selective activation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 15950-15955.
- Machová E, Jakubík J, El-Fakahany EE and Doležal V (2007) Wash-resistantly bound xanomeline inhibits acetylcholine release by persistent activation of presynaptic M(2) and M(4) muscarinic receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **322**: 316-323.
- Markovic D, Holdich J, Al-Sabah S, Mistry R, Krasel C, Mahaut-Smith MP and Challiss RAJ (2012) FRET-based detection of M1 muscarinic acetylcholine receptor activation by orthosteric and allosteric agonists. *PLoS One* **7**: e29946.
- Marlo JE, Niswender CM, Days EL, Bridges TM, Xiang Y, Rodriguez AL, Shirey JK, Brady AE, Nalywajko T, Luo Q, Austin CA, Williams MB, Kim K, Williams R, Orton D, Brown HA, Lindsley CW, Weaver CD and Conn PJ (2009) Discovery and characterization of novel allosteric potentiators of M1 muscarinic receptors reveals multiple modes of activity. *Mol Pharmacol* **75**: 577-588.
- Matsui H, Lazareno S and Birdsall NJ (1995) Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis.. *Mol Pharmacol* **47**: 88-98.
- Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T and Taketo MM (2002) Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci* **22**: 10627-10632.
- Max SI, Liang JS and Potter LT (1993) Stable allosteric binding of m1-toxin to m1 muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **44**: 1171-1175 (a).
- Max SI, Liang JS and Potter LT (1993) Purification and properties of m1-toxin, a specific antagonist of m1 muscarinic receptors. *J Neurosci* **13**: 4293-4300 (b).
- Mego DM, Omori JM and Hanley JF (1988) Transdermal scopolamine as a cause of transient psychosis in two elderly patients. *South Med J* **81**: 394-395.
- Miao Y, Nichols SE, Gasper PM, Metzger VT and McCammon JA (2013) Activation and dynamic network of the M2 muscarinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 10982-10987.

- Michal P, El-Fakahany EE and Dolezal V (2007) Muscarinic M2 receptors directly activate Gq/11 and Gs G-proteins. *J Pharmacol Exp Ther* **320**: 607-614.
- Michal P, Rudajev V, El-Fakahany EE and Dolezal V (2009) Membrane cholesterol content influences binding properties of muscarinic M2 receptors and differentially impacts activation of second messenger pathways. *Eur J Pharmacol* **606**: 50-60.
- Mohr K, Tränkle C, Kostenis E, Barocelli E, De Amici M and Holzgrabe U (2010) Rational design of dualsteric GPCR ligands: quests and promise. *Br J Pharmacol* **159**: 997-1008.
- Morales M and Pickel VM (2012) Insights to drug addiction derived from ultrastructural views of the mesocorticolimbic system. *Ann N Y Acad Sci* **1248**: 71-88.
- Mourier G, Dutertre S, Fruchart-Gaillard C, Ménez A and Servent D (2003) Chemical synthesis of MT1 and MT7 muscarinic toxins: critical role of Arg-34 in their interaction with M1 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* **63**: 26-35.
- Nachtergaeel I, Gaspard N, Langlet C, Robberecht P and Langer I (2006) Asn229 in the third helix of VPAC1 receptor is essential for receptor activation but not for receptor phosphorylation and internalization: comparison with Asn216 in VPAC2 receptor. *Cell Signal* **18**: 2121-2130.
- Nathanson NM (2008) Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Ther* **119**: 33-43.
- Navarro-Polanco RA, Moreno Galindo EG, Ferrer-Villada T, Arias M, Rigby JR, Sánchez-Chapula JA and Tristani-Firouzi M (2011) Conformational changes in the M2 muscarinic receptor induced by membrane voltage and agonist binding. *J Physiol* **589**: 1741-1753.
- Nawaratne V, Leach K, Suratman N, Loiacono RE, Felder CC, Armbruster BN, Roth BL, Sexton PM and Christopoulos A (2008) New insights into the function of M4 muscarinic acetylcholine receptors gained using a novel allosteric modulator and a DREADD (designer receptor exclusively activated by a designer drug). *Mol Pharmacol* **74**: 1119-1131.
- Nawaratne V, Leach K, Felder CC, Sexton PM and Christopoulos A (2010) Structural determinants of allosteric agonism and modulation at the M4 muscarinic acetylcholine receptor: identification of ligand-specific and global activation mechanisms. *J Biol Chem* **285**: 19012-19021.
- Nedoma J, Tucek S, Danilov AF and Shelkovnikov SA (1986) Stabilization of antagonist binding to cardiac muscarinic acetylcholine receptors by gallamine and other neuromuscular blocking drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **236**: 219-223.
- Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ and Growdon JH (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**: 304-307.
- O'Dowd BF, Hnatowich M, Regan JW, Leader WM, Caron MG and Lefkowitz RJ (1988) Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human beta 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling. *J Biol Chem* **263**: 15985-15992.
- Offermanns S, Wieland T, Homann D, Sandmann J, Bombien E, Spicher K, Schultz G and Jakobs KH (1994) Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11. *Mol Pharmacol* **45**: 890-898.
- Okada T, Sugihara M, Bondar A, Elstner M, Entel P and Buss V (2004) The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J Mol Biol* **342**: 571-583.
- Olianas MC, Maullu C and Onali P (1999) Mixed agonist-antagonist properties of clozapine at different human cloned muscarinic receptor subtypes expressed in Chinese hamster ovary cells. *Neuropsychopharmacology* **20**: 263-270.

- Olianas MC, Adem A, Karlsson E and Onali P (2004) Action of the muscarinic toxin MT7 on agonist-bound muscarinic M1 receptors. *Eur J Pharmacol* **487**: 65-72.
- Ovchinnikov YuA (1982) Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. *FEBS Lett* **148**: 179-191.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739-745.
- Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe H and Ernst OP (2008) Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* **454**: 183-187.
- Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J and Capon DJ (1987) Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J* **6**: 3923-3929.
- Perry EK, Smith CJ, Court JA and Perry RH (1990) Cholinergic nicotinic and muscarinic receptors in dementia of Alzheimer, Parkinson and Lewy body types. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **2**: 149-158.
- Perry EK, Kilford L, Lees AJ, Burn DJ and Perry RH (2003) Increased Alzheimer pathology in Parkinson's disease related to antimuscarinic drugs. *Ann Neurol* **54**: 235-238.
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**: 346-356.
- Prilla S, Schrobang J, Ellis J, Hölte H and Mohr K (2006) Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophan M242Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. *Mol Pharmacol* **70**: 181-193.
- Proška J and Tuček S (1994) Mechanisms of steric and cooperative actions of alcuronium on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **45**: 709-717.
- Randáková A, Dolejší E, Rudajev V, Zimčík P, Doležal V, El-Fakahany EE and Jakubík J (2015) Classical and atypical agonists activate M1 muscarinic acetylcholine receptors through common mechanisms. *Pharmacol Res* **97**: 27-39.
- Rasmussen SGF, Choi H, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VRP, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GFX, Weis WI and Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**: 383-387.
- Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah STA, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK and Kobilka BK (2011) Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**: 549-555.
- Reiter E and Lefkowitz RJ (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* **17**: 159-165.
- Roland J, Murphy BJ, Ahr B, Robert-Hebmann V, Delauzun V, Nye KE, Devaux C and Biard-Piechaczyk M (2003) Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* **101**: 399-406.
- Römpler H, Yu H, Arnold A, Orth A and Schöneberg T (2006) Functional consequences of naturally occurring DRY motif variants in the mammalian chemoattractant receptor GPR33. *Genomics* **87**: 724-732.
- Rosenbaum DM, Zhang C, Lyons JA, Holl R, Aragao D, Arlow DH, Rasmussen SGF, Choi H, DeVree BT, Sunahara RK, Chae PS, Gellman SH, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Caffrey M,

- Gmeiner P and Kobilka BK (2011) Structure and function of an irreversible agonist- $\beta(2)$ adrenoceptor complex. *Nature* **469**: 236-240.
- Rosenblum K, Futter M, Jones M, Hulme EC and Bliss TV (2000) ERKI/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. *J Neurosci* **20**: 977-985.
- Santrůčková E, Doležal V, El-Fakahany EE and Jakubík J (2014) Long-Term Activation upon Brief Exposure to Xanomeline Is Unique to M1 and M4 Subtypes of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *PLoS One* **9**: e88910.
- Scarr E and Dean B (2009) Role of the cholinergic system in the pathology and treatment of schizophrenia. *Expert Rev Neurother* **9**: 73-86.
- Scarselli M, Li B, Kim S and Wess J (2007) Multiple residues in the second extracellular loop are critical for M3 muscarinic acetylcholine receptor activation. *J Biol Chem* **282**: 7385-7396.
- Scheer A, Fanelli F, Costa T, De Benedetti PG and Cotecchia S (1996) Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J* **15**: 3566-3578.
- Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe H, Hofmann KP and Ernst OP (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**: 497-502.
- Schwartz TW and Holst B (2007) Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act?. *Trends Pharmacol Sci* **28**: 366-373.
- Scott CE, Abrol R, Ahn KH, Kendall DA and Goddard WA3 (2013) Molecular basis for dramatic changes in cannabinoid CB1 G protein-coupled receptor activation upon single and double point mutations. *Protein Sci* **22**: 101-113.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**: 741-766.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**: 789-791.
- Sellin AK, Shad M and Tamminga C (2008) Muscarinic agonists for the treatment of cognition in schizophrenia. *CNS Spectr* **13**: 985-996.
- Servent D and Fruchart-Gaillard C (2009) Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem* **109**: 1193-1202.
- Shannon HE, Bymaster FP, Calligaro DO, Greenwood B, Mitch CH, Sawyer BD, Ward JS, Wong DT, Olesen PH, Sheardown MJ and et al. (1994) Xanomeline: a novel muscarinic receptor agonist with functional selectivity for M1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **269**: 271-281.
- Shannon HE, Rasmussen K, Bymaster FP, Hart JC, Peters SC, Swedberg MD, Jeppesen L, Sheardown MJ, Sauerberg P and Fink-Jensen A (2000) Xanomeline, an M(1)/M(4) preferring muscarinic cholinergic receptor agonist, produces antipsychotic-like activity in rats and mice. *Schizophr Res* **42**: 249-259.
- Shekhar A, Potter WZ, Lightfoot J, Lienemann J, Dubé S, Mallinckrodt C, Bymaster FP, McKinzie DL and Felder CC (2008) Selective muscarinic receptor agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia. *Am J Psychiatry* **165**: 1033-1039.
- Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, Liu W, Han GW, Kobayashi T, Stevens RC and Iwata S (2011) Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* **475**: 65-70.
- Shirey JK, Xiang Z, Orton D, Brady AE, Johnson KA, Williams R, Ayala JE, Rodriguez AL, Wess J, Weaver D, Niswender CM and Conn PJ (2008) An allosteric potentiator of M4 mAChR modulates hippocampal synaptic transmission. *Nat Chem Biol* **4**: 42-50.
- Si W, Zhang X, Niu Y, Yu H, Lei X, Chen H and Cao X (2010) A novel derivative of xanomeline

- improves fear cognition in aged mice. *Neurosci Lett* **473**: 115-119.
- Siehler S (2009) Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol* **158**: 41-49.
- Singh N, Pydi SP, Upadhyaya J and Chelikani P (2011) Structural basis of activation of bitter taste receptor T2R1 and comparison with Class A G-protein-coupled receptors (GPCRs). *J Biol Chem* **286**: 36032-36041.
- Spalding TA, Birdsall NJ, Curtis CA and Hulme EC (1994) Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors.. *J Biol Chem* **269**: 4092-4097.
- Spalding TA, Trotter C, Skjaerbaek N, Messier TL, Currier EA, Burstein ES, Li D, Hacksell U and Brann MR (2002) Discovery of an ectopic activation site on the M(1) muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* **61**: 1297-1302.
- Spalding TA, Ma J, Ott TR, Friberg M, Bajpai A, Bradley SR, Davis RE, Brann MR and Burstein ES (2006) Structural requirements of transmembrane domain 3 for activation by the M1 muscarinic receptor agonists AC-42, AC-260584, clozapine, and N-desmethylozapine: evidence for three distinct modes of receptor activation.. *Mol Pharmacol* **70**: 1974-1983.
- Spindel ER (2012) Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cancer. *Handb Exp Pharmacol* : 451-468.
- Steinfeld T, Mammen M, Smith JAM, Wilson RD and Jasper JR (2007) A novel multivalent ligand that bridges the allosteric and orthosteric binding sites of the M2 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* **72**: 291-302.
- Stockton JM, Birdsall NJ, Burgen AS and Hulme EC (1983) Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine.. *Mol Pharmacol* **23**: 551-557.
- Strader CD, Sigal IS, Register RB, Candelore MR, Rands E and Dixon RA (1987) Identification of residues required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 4384-4388.
- Sur C, Mallorga PJ, Wittmann M, Jacobson MA, Pascarella D, Williams JB, Brandish PE, Pettibone DJ, Scolnick EM and Conn PJ (2003) N-desmethylozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13674-13679.
- Teller DC, Okada T, Behnke CA, Palczewski K and Stenkamp RE (2001) Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry* **40**: 7761-7772.
- Thomas DR, Dada A, Jones GA, Deisz RA, Gigout S, Langmead CJ, Werry TD, Hendry N, Hagan JJ, Davies CH and Watson JM (2010) N-desmethylozapine (NDMC) is an antagonist at the human native muscarinic M(1) receptor. *Neuropharmacology* **58**: 1206-1214.
- Trzaskowski B, Latek D, Yuan S, Ghoshdastider U, Debinski A and Filipek S (2012) Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Curr Med Chem* **19**: 1090-1109.
- Tucek S, Musilková J, Nedoma J, Proška J, Shelkownikov S and Vorlíček J (1990) Positive cooperativity in the binding of alcuronium and N-methylscopolamine to muscarinic acetylcholine receptors.. *Mol Pharmacol* **38**: 674-680.
- Tucek S, Michal P and Vlachová V (2002) Modelling the consequences of receptor-G-protein promiscuity. *Trends Pharmacol Sci* **23**: 171-176.
- Tzavara ET, Bymaster FP, Davis RJ, Wade MR, Perry KW, Wess J, McKinzie DL, Felder C and Nomikos GG (2004) M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related CNS

pathologies. *FASEB J* **18**: 1410-1412.

Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M and Mailman RB (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **320**: 1-13.

Valant C, Felder CC, Sexton PM and Christopoulos A (2012) Probe dependence in the allosteric modulation of a G protein-coupled receptor: implications for detection and validation of allosteric ligand effects. *Mol Pharmacol* **81**: 41-52.

Violin JD and Lefkowitz RJ (2007) Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**: 416-422.

Wang CD, Gallaher TK and Shih JC (1993) Site-directed mutagenesis of the serotonin 5-hydroxytryptamine₂ receptor: identification of amino acids necessary for ligand binding and receptor activation. *Mol Pharmacol* **43**: 931-940.

Wang D, Yang L, Su J, Niu Y, Lei X, Xiong J, Cao X, Hu Y, Mei B and Hu J (2011) Attenuation of neurodegenerative phenotypes in Alzheimer-like presenilin 1/presenilin 2 conditional double knockout mice by EUK1001, a promising derivative of xanomeline. *Biochem Biophys Res Commun* **410**: 229-234.

Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AGW, Tate CG and Schertler GFX (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**: 486-491.

Weiner DM, Meltzer HY, Veinbergs I, Donohue EM, Spalding TA, Smith TT, Mohell N, Harvey SC, Lamah J, Nash N, Vanover KE, Olsson R, Jayathilake K, Lee M, Levey AI, Hacksell U, Burstein ES, Davis RE and Brann MR (2004) The role of M1 muscarinic receptor agonism of N-desmethylclozapine in the unique clinical effects of clozapine. *Psychopharmacology (Berl)* **177**: 207-216.

Wess J (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* **10**: 69-99.

Wess J, Duttaroy A, Zhang W, Gomeza J, Cui Y, Miyakawa T, Bymaster FP, McKinzie L, Felder CC, Lamping KG, Faraci FM, Deng C and Yamada M (2003) M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to study the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Receptors Channels* **9**: 279-290.

Wess J, Eglen RM and Gautam D (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 721-733.

Wessler I and Kirkpatrick CJ (2008) Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* **154**: 1558-1571.

Wu B, Chien EYT, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V and Stevens RC (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **330**: 1066-1071.

Zahn K, Eckstein N, Tränkle C, Sadée W and Mohr K (2002) Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpine from an agonist into an antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 720-728.

Zhu X and Birnbaumer L (1996) G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by Gs- and Gi-coupled receptors: Lack of receptor selectivity of G α (16) and evidence for a synergic interaction between G β gamma and the alpha subunit of a receptor activated G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2827-2831.

8 SEZNAM PŘÍLOH

Randáková A, Dolejší E, Rudajev V, Zimčík P, Doležal V, El-Fakahany EE, Jakubík J (2015) Classical and atypical agonists activate M1 muscarinic acetylcholine receptors through common mechanisms. *Pharmacol Res* **97**: 27-39. (IF = 4,408)

Jakubík J, Zimčík P, Randáková A, Fuksová K, El-Fakahany EE, Doležal V (2014) Molecular mechanisms of methoctramine binding and selectivity at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **86**(2): 180-92. (IF = 4,128)

Jakubík J, Šantrůčková E, Randáková A, Janíčková H, Zimčík P, Rudajev V, Michal P, El-Fakahany EE, Doležal V (2014) Outline of therapeutic interventions with muscarinic receptor-mediated transmission. *Physiol Res* S177-89. Review. (IF = 1,293)

Boulos J, Jakubík J, Randakova Alena, Avila C (2013) Synthesis of *N*-Substituted Piperidine Salts as Potential Muscarinic Ligands for Alzheimer's Applications. *J Heterocyclic chem* **6**: 1363-1367. (IF = 0,873)

Jakubík J, Randáková A, Doležal V(2013) On homology modeling of the M₂ muscarinic acetylcholine receptor subtype. *J Comput Aided Mol Des* **27**(6): 525-38. (IF = 2,782)

Jakubík J, Janíčková H, Randáková A, El-Fakahany EE, Doležal V(2011) Subtype differences in pre-coupling of muscarinic acetylcholine receptors. *PLoS One* **6**(11): e27732. (IF = 4,092)

Jakubík J, Randáková A, El-Fakahany EE, Dolezal V(2009) Divergence of allosteric effects of rapacuronium on binding and function of muscarinic receptors. *BMC Pharmacol* **28**: 9-15. (IF = 1,842)

9 PŘÍLOHY