

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

**G PROTEINY A ADENYLYLCYKLÁZA V MOZKOVÉ KŮŘE
POTKANA BĚHEM ONTOGENEZE**

PharmDr. Jiří Stöhr

Doktorandská dizertační práce

2007

Školitel: doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

Fyziologický ústav AV ČR, Oddělení membránových receptorů

Děkuji svému školiteli **doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc.** za odborné vedení a **RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc.** za pomoc a veškerou podporu, které mi poskytli v průběhu mé činnosti ve Fyziologickém ústavu AV ČR i na Přírodovědecké fakultě UK v Praze.

Dále děkuji všem kolegům z Oddělení membránových receptorů, zvláště pak **RNDr. Vladimíru Rudajevovi, RNDr. Václavu Lisému, CSc., RNDr. Lence Bouřové, PhD., I. Ihnatových, PhD.** a **RNDr. Lucii Hejnové, PhD.** za pomoc při experimentální práci, množství cenných rad a vytvoření přátelského prostředí.

Nakonec bych chtěl poděkovat svým rodičům a všem ostatním, kteří byli jakkoli nápomocni k dokončení této práce.

OBSAH

SEZNAM PUBLIKACÍ	6
Publikační podklad pro přípravu dizertační práce	6
Ostatní publikace	6
Abstrakta z konferencí.....	7
SEZNAM ZKRATEK	8
ÚVOD A CÍL PRÁCE	11
LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
Receptory spřažené s G proteiny (GPCR)	12
Klasifikace GPCR receptorů.....	13
GABA _B receptory	15
Klasifikace GABA _B receptorů	15
Distribuce GABA _B receptorů.....	17
Ontogeneze GABA _B receptorů v mozkové kůře.....	17
Heterotrimerní GTP vazebné proteiny (G proteiny).....	19
Struktura podjednotek G proteinů.....	19
Přenos signálu G proteiny.....	21
Regulátory G proteinové signalizace (RGS).....	21
Klasifikace G proteinů	22
Třída G _s /G _{olf}	23
Třída G _i /G _o	23
Třída G _q /G ₁₁	24
Třída G ₁₂ /G ₁₃	24
G proteiny v mozku	25
Adenylycykláza (AC).....	26
Struktura a izoformy AC.....	26
Regulace AC aktivity.....	28
Regulace G proteiny.....	28
Regulace Ca ²⁺ a kalmodulinem.....	28
Regulace fosforylací.....	28
Další typy regulace.....	29
Distribuce AC v mozku	29
METODY	31
Chemikálie.....	31
Příprava vzorků.....	31
Vazebné studie.....	31
Stanovení vazby [³ H]ouabainu na Na/K-ATPázu.....	31
Stanovení GABA _B receptorů pomocí [³ H]CGP54626A	32

Agonistou stimulovaná vazba [³⁵ S]GTPγS na G proteiny.....	32
Stanovení vazby [³ H]forskolinu na adenylcyklázu	33
Stanovení aktivity adenylcyklázy	33
Stanovení agonistou stimulované vysokoafinní GTPázové aktivity	34
Stanovení peroxidace lipidů	34
Stanovení proteinů.....	35
Analýza dat.....	35
VÝSLEDKY	36
Plazmatické membrány - vazba [³ H]ouabainu.....	36
GABA _B receptory - vazba [³ H]CGP54626A	36
Vysokoafinní GTPázová aktivita.....	36
Vazba [³ H]GTPγS.....	37
Adenylcyklázová aktivita	38
Aktivace adenylcyklázy forskolinem, GTPγS, AlF ₄ ⁻ a Mn ²⁺	38
Vliv dithiotreitolu	38
Vliv Fe ²⁺ a kyseliny askorbové	39
Vliv suraminu	39
Vliv fosforylace	40
Vazba [³ H]forskolinu.....	41
Přímé a kompetitivní vazebné studie	41
Vliv Mg ²⁺ iontů a Gpp(NH)p.....	42
Vliv AlF ₄ ⁻ , isoprenalinu a baclofenu.....	42
Vliv suraminu	43
DISKUZE	44
SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ	54
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
PŘÍLOHA I – OBRÁZKY	73
Obr.1 Vazba [³ H]CGP54626A	73
Obr.2 Vysokoafinní GTPázová aktivita.....	74
Obr.3 Kinetická analýza GTPázové aktivity	75
Obr.4 Vazba [³⁵ S]GTPγS.....	76
Obr.5 Stimulace aktivity AC forskolinem (FSK) a GTPγS	77
Obr.6 Vliv DTT na aktivitu AC stimulovanou forskolinem, Mn ²⁺ a AlF ₄ ⁻	78
Obr.7 Vliv DTT na aktivitu AC stimulovanou FSK o nízké koncentraci.....	79
Obr.8 Vliv DTT na aktivitu AC stimulovanou GTPγS.....	80
Obr.9 Vliv Fe ²⁺ na bazální a forskolinem stimulovanou aktivitu AC.....	81
Obr.10 Vliv Fe ²⁺ /DTT na bazální aktivitu AC	82
Obr.11 Vliv Fe ²⁺ /DTT a kyseliny askorbové na lipidovou peroxidaci.....	83
Obr.12 Vliv kyseliny askorbové na bazální a forskolinem stimulovanou aktivitu AC.....	84

Obr.13 Vliv suraminu na bazální aktivitu AC a stimulovanou Mn^{2+} , AlF_4^- a forskolinem	85
Obr.14 Vliv suraminu na aktivitu AC v cye ⁻ membránách	86
Obr.15 Vliv fosforylace na aktivitu AC	87
Obr.16 Saturační vazebné křivky [³ H]forskolinu	88
Obr.17 Saturační vazebné křivky [³ H]forskolinu v přítomnosti AlF_4^-	89
Obr.18 Kompetice vazby [³ H]forskolinu s neznačeným forskolinem	90
Obr.19 Vliv Mg^{2+} na specifickou vazbu [³ H]forskolinu modulovanou Gpp(NH)p	91
Obr.20 Vliv Gpp(NH)p na specifickou vazbu [³ H]forskolinu	92
Obr.21 Modulace vazby [³ H]forskolinu isoprenalinem, baclofenem, Gpp(NH)p, AlF_4^- a suraminem	93
Obr.22 Vliv suraminu na vazbu [³ H]forskolinu	94
PŘÍLOHA II – TABULKY	95
Tab.1 Kinetické charakteristiky vysokoafinní GTPázy v mozkové kůře potkana	95
Tab.2 Vazba [³ H]forskolinu na membrány mozkové kůry nezralých a dospělých potkanů	96
PŘÍLOHA III – PUBLIKACE	97

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikační podklad pro přípravu dizertační práce

Stöhr, J., Bouřová, L., Hejnová, L., Ihnatovych, I., Novotný, J. and Svoboda, P. (2004). Increased baclofen-stimulated G protein coupling and deactivation in rat brain cortex during development. *Brain Res Dev Brain Res* 151(1-2): 67-73.

Stöhr, J., Novotný, J., Bouřová, L. and Svoboda, P. (2005). Modulation of adenylyl cyclase activity in young and adult rat brain cortex. Identification of suramin as a direct inhibitor of adenylyl cyclase. *J Cell Mol Med* 9(4): 940-952.

Stöhr, J., Novotný, J. and Svoboda, P. (2005). Characterization of [3H]-forskolin binding sites in young and adult rat brain cortex: identification of suramin as a competitive inhibitor of [3H]-forskolin binding. *Can J Physiol Pharmacol* 83(7): 573-581.

Ostatní publikace

Moravcová, Z., Rudajev, V., **Stöhr, J.**, Novotný, J., Černý, J., Parenti, M., Milligan, G. and Svoboda, P. (2004). Long-term agonist stimulation of IP prostanoid receptor depletes the cognate G(s)alpha protein in membrane domains but does not change the receptor level. *Biochim Biophys Acta* 1691(1): 51-65.

Svoboda, P., Teisinger, J., Novotný, J., Bouřová, L., Drmota, T., Hejnová, L., Moravcová, Z., Lisý, V., Rudajev, V., **Stöhr, J.**, Vokurková, A., Švandová, I. and Durchánková, D. (2004). Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimeric G proteins. *Physiol Res* 53 Suppl 1: S141-152.

Kaminský, O., Klenerová, V., **Stöhr, J.**, Šída, P. and Hynie, S. (2001). Differences in the behaviour of Sprague--Dawley and Lewis rats during repeated passive avoidance procedure: effect of amphetamine. *Pharmacol Res* 44(2): 117-122.

Klenerová, V., Šída, P., Englišová, D., **Stöhr, J.**, Nazarov, E., Kaminský, O. and Hynie, S. (1999). Effects of immobilization stress combined with water immersion and chronic amphetamine treatment on the adenylyl cyclase activity in rat neurohypophysis. *Physiol Res* 48(6): 513-517.

Abstrakta z konferencí

Novotný, J., **Stöhr, J.**, Bouřová, L. and Svoboda, P. (2006). Identification of suramin as a direct inhibitor of adenylyl cyclase and a competitive inhibitor of [3H]-forskolin binding. Cell Signaling World 2006 – Signal Transduction Pathways as therapeutic targets, Kirchberg - Luxembourg, LUX, January 25-28, 2006, *Proceedings and Program 153 (Session II: Poster II)*.

Stöhr, J., Bouřová, L., Hejnová, L., Novotný, J., Rudajev, V. and Svoboda, P. (2004a). Vliv RGS1 a RGS16 na baclofenem stimulovanou vysokoafinní GTPázu v mozku mladých a dospělých zvířat. 46. česko-slovenská psychofarmakologická konference, Lázně Jeseník, 7.-11. ledna 2004, *Psychiatrie 8: 56 (Poster 71)*.

Stöhr, J., Bouřová, L., Hejnová, L., Novotný, J. and Svoboda, P. (2004b). Agonist-stimulated high-affinity GTPase in young and adult rat brain cortex. 80. fyziologické dny, Praha, 3.-5. února 2004, *Physiol Res 53: 36P (Poster 48)*.

Rudajev, V., **Stöhr, J.**, Moravcová, Z., Novotný, J. and Svoboda, P. (2004). IP prostanoid receptor is not present in detergent-insensitive membrane domains. 80. fyziologické dny, Praha, 3.-5. února 2004, *Physiol Res 53: 33P (Přednáška)*.

Stöhr, J., Bouřová, L., Rudajev, V., Novotný, J. and Svoboda, P. (2004c). Modulation of adenylyl cyclase activity and [3H]forskolin binding in young and adult rat brain cortex. BioScience2004 - from molecules to organisms, SECC Glasgow, GB, July 18-22, 2004, *Abstract Book 83a (Poster B321)*.

Novotný, J., Bouřová, L., **Stöhr, J.**, Rudajev, V., Chalupová, A., Lisý, V. and Svoboda, P. (2003). Different activity of adenylyl cyclase and agonist-stimulated GTPase in low-density membrane fragments and bulk-plasma membranes from rat brain cortex. 8th Int. Dahlem Symposium on "Cellular Signal Recognition and Transduction", June 18-21, 2003

Novotný, J., Bouřová, L., **Stöhr, J.**, Rudajev, V., Lisý, V. and Svoboda, P. (2003) Adenylyl cyclase and GTPase activity in rat brain cortex: difference between light-density membrane fragments and bulk-membrane phase. Special FEBS 2003 Meeting on Signal Transduction, Brussels, July 3-8, 2003

SEZNAM ZKRATEK

7TM receptor	sedmitransmembránový receptor
AC	adenylylcykláza
ACn	adenylylcykláza typ n, kde n je 1 až 9
aj.	a jiné
AK	aminokyselina
App(NH)p	adenosin-5'-(β , γ -imido)trifosfát
Asp71	asparagin číslo 71
ATP	adenosin trifosfát
BCF	baclofen
B_{max}	maximální vazebná kapacita
BSA	hovězí sérový albumin
CaM	Ca^{2+} /kalmodulin
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
C-konec	COOH konec proteinu
CNS	centrální nervový systém
CREB protein	protein vázající element cAMP odezvy "cAMP response element binding protein"
DTT	dithiotreitol
EC50	50% efektivní koncentrace
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FSK	forskolin
G protein	trimerní GTP-vazebný protein
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GABA _A receptor	receptor kyseliny γ -aminomáselné typu A
GABA _B receptor	receptor kyseliny γ -aminomáselné typu B
GABA _{B1}	GABA _B receptor podtyp 1
GABA _{B1a}	GABA _B receptor podtyp 1 sestříhová varianta a
GABA _{B1b}	GABA _B receptor podtyp 1 sestříhová varianta b
GABA _{B2}	GABA _B receptor podtyp 2
GABA _C receptor	receptor kyseliny γ -aminomáselné typu C

GAP	GTPázu aktivující protein
GIT	gastrointestinální trakt
GDP	guanosin-5'-difosfát
GPCR	receptory spřažené s G proteiny
Gpp(NH)p	guanosin-5'-(β,γ -imido)trifosfát
GTP	guanosin-5'-trifosfát
GTP γ S	guanosin-5'-[γ -thio]trifosfát
G α	α podjednotka G proteinu
G β	β podjednotka G proteinu
G γ	γ podjednotka G proteinu
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonová kyselina)
K _D	rovnovážná disociační konstanta
kys.	kyselina
kys. askorb.	kyselina askorbová
LPT	dlouhodobá potenciace
MAP-kináza	kináza mitogenaktivujícího proteinu
MDA	malondialdehyd
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
např.	například
N-konec	NH ₂ konec proteinu
obr.	obrázek
PAM	protein asociovaný s Myc
PD	postnatální den
PD 12	12. postnatální den; nezralí potkani 12 dní staří
PD 90	90. postnatální den; dospělí potkani 90 dní staří
PEI	polyethylenimin
PGE ₁	prostaglandin E ₁
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC- β	fosfolipáza C- β
PMA	forbol myristát acetát
PTK	protein tyrosinová kináza
PTX	pertussistoxin

PV	pervanadát
RGS	regulátor G proteinové signalizace
sAC	rozpustná izoforma adenylylcyklázy
SEM	standardní chyba průměru
STME pufr	pufr o složení 250mM sacharóza, 20mM Tris HCl, 3mM MgCl ₂ , 1mM EDTA; pH 7,6
tab.	tabulka
TBA	kyselina thiobarbiturová
TM pufr	pufr o složení 50mM Tris, 10mM MgCl ₂ ; pH 7,4
tzv.	tak zvaný
UTP	uridin trifosfát
vs.	versus

ÚVOD A CÍL PRÁCE

Hlavní inhibiční signální systém v mozku savců přijímá informaci zprostředkovanou γ -aminomáselnou kyselinou (GABA) dvěma typy membránově vázaných receptorů - ionotropními ($GABA_A$ a $GABA_C$) a metabotropními ($GABA_B$) receptory. Metabotropní $GABA_B$ receptory iniciují různé buněčné odpovědi prostřednictvím pertussistoxin-senzitivních GTP vázajících regulačních proteinů (G proteiny) G_i/G_o rodiny (*Morishita a kol., 1990; Kerr a Ong, 1995*). Tato rodina G proteinů je vysoce rozšířena v tkáni mozku a jejich důležitým efektozem je adenylylcykláza (*Gierschik a kol., 1986; Mumby a kol., 1988*).

Předchozí studie ukázaly, že aktivita adenylylcyklázy (AC) se během ontogeneze mozku potkana značně mění. Její enzymatická činnost po narození roste a dosahuje výrazného maxima okolo 12. postnatálního dne (PD 12) a poté rychle klesá na úroveň vyskytující se v dospělosti (*Keshles a Levitzki, 1984; Matsuoka a kol., 1997; Ihnatovych a kol., 2002a*). Zdá se, že tuto významnou změnu nelze jednoduše vysvětlit na základě kvantitativních změn v expresi hlavních součástí signálního systému AC. Úroveň exprese různých AC izoform (AC1, AC2, AC4 a AC6) a stejně tak $G_s\alpha$ proteinů je v mozkové kůře potkana buď nezměněna, nebo zvýšena mezi PD 12 (nezralí potkani) a PD 90 (dospělí potkani) (*Ihnatovych a kol., 2002b; Ihnatovych a kol., 2002a*).

Cílem této práce bylo dostupnými metodami podrobně porovnat transdukční systém receptor – G protein – adenylylcykláza v nezralé a dospělé mozkové kůře potkana a poodhalit možnou příčinu dramatické změny v AC aktivitě mezi oběma věkovými skupinami. Za tímto účelem byly sledovány vazebné charakteristiky v mozku se hojně vyskytujících $GABA_B$ receptorů pomocí vazebných studií s jejich antagonistou [3H]CGP54626A. Také byla měřena funkční aktivita G proteinů v sérii experimentů měřících jak schopnost vázat GTP (vazba [^{35}S]GTP γ S), tak ho hydrolyzovat (stanovení vysokoafinní GTPázové aktivity) a zároveň byl sledován i možný vliv endogenních či exogenně přidaných RGS proteinů na jejich vnitřní GTPázovou aktivitu. Další část experimentů měla detailně prozkoumat vliv různých modulátorů, lipidové peroxidace a fosforylace přímo na AC aktivitu u obou typů preparátů. Nakonec byly také porovnávány vlastnosti AC (a její spřažení s $G_s\alpha$ proteiny) obou věkových skupin pomocí vazby [3H]forskolinu, účinného aktivátoru AC aktivity, na vysokoafinní vazebná místa na tomto enzymu.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Receptory spřažené s G proteiny (GPCR)

Receptory spřažené s G proteiny (GPCR) jsou nejen nejpočetnější rodinou membránově vázaných receptorů, ale tvoří i největší skupinu proteinových molekul v přírodě vůbec. Podle současných odhadů jsou kódovány přibližně jedním procentem savčího genomu a předpokládá se existence okolo tisíce GPCR (*Marinissen a Gutkind, 2001; Lefkowitz, 2004*).

Všechny GPCR mají podobnou strukturu, kdy jediný polypeptidový řetězec sedmkrát protíná plazmatickou membránu svými hydrofobními segmenty (o délce 20–30 aminokyselin), které jsou spojeny hydrofilními extra- a intracelulárními smyčkami různé délky (*Strader a kol., 1994*). Podobně u všech GPCR N-konec směřuje extracelulárně a C-konec intracelulárně a zároveň se segmenty 6 a 7 nacházejí v blízkosti segmentů 1 a 2 a transmembránové úseky tak tvoří v membráně prstenec (*Dohlman a kol., 1991; Schertler a kol., 1993*). Stejně tak je pro všechny GPCR společné, že N-konec, extracelulární smyčky a případně také dutina mezi hydrofobními transmembránovými helixy, jsou odpovědné za vazbu ligandu, kdežto intracelulární oblasti receptoru se účastní rozpoznávání a aktivace příslušných G proteinů (*Strader a kol., 1995*). Díky výše uvedeným strukturálním charakteristikám jsou také často nazývány serpentínové, heptahelikální nebo sedmitransmembránové receptory (7TM receptory). Zde je třeba z terminologického hlediska podotknout, že ačkoli většina 7TM receptorů přenáší signál prostřednictvím G proteinů, tak současný výzkum dokládá stále větší počet alternativních signálních mechanismů, které mají tyto receptory k dispozici (*Pierce a kol., 2002*). Vedle všech popsaných vlastností jsou GPCR také schopné tvořit homo-, hetero- i oligomery, a vše nasvědčuje tomu, že dimer je základní funkční jednotka (*Milligan, 2004*).

GPCR jsou aktivovány celou škálou ligandů, zahrnující hormony, neurotransmitery, chemokiny a kalciové ionty, a jsou také receptory pro různé odoranty, hořkou a sladkou chuť, a dokonce i fotony světla. Aktivace GPCR vede ke konformačním změnám samotného receptoru a následné aktivaci příslušného G proteinu (viz dále). Aktivovaný G protein následně reguluje aktivitu jednoho či více efektorů (např. adenylycykláza, guanylycykláza, fosfodiesteráza, fosfolipáza A2, fosfolipáza C a další), a tím buď stimuluje či inhibuje produkci rozličných druhých posílů, jako jsou cAMP, cGMP,

diacylglycerol, inositol-1,4,5-trifosfát atd. Navíc volné podjednotky $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ mohou aktivovat nebo inhibovat iontové kanály (*Marinissen a Gutkind, 2001*).

Klasifikace GPCR receptorů

GPCR lze dělit podle ligandů, které vážou, nebo častěji na základě jejich sekvenční podobnosti. Místa s největší sekvenční homologií se nacházejí v hydrofobních transmembránových segmentech, naopak v hydrofilních úsecích se jednotlivé receptory značně liší. Nejjednodušší klasifikace na základě sekvenční příbuznosti a sdílení některých konzervovaných motivů dělí 7TM receptory do tří skupin (*Pierce a kol., 2002*):

Rodina A je nejobsáhlejší skupinou. Typickými zástupci jsou receptor světla (rodopsin) a adrenergní receptory. Nejpočetnější podskupinu tvoří receptory pro odoranty, a přesto tato rodina obsahuje ještě přibližně dalších 200 receptorů pro 80 různých ligandů (*Lee a kol., 2002*). Jedná se o receptory pro „malé“ neurotransmitery (např. katecholaminy či opioidy), receptory pro peptidové hormony (např. bradykinin, somatostatin či angiotensin) a dále o receptory pro velké glykoproteinové hormony (např. lutropin) a prostaglandiny.

Rodina B má jen přibližně 25 členů. Radí se do ní receptory pro gastrointestinální hormony (sekretin, glukagon, vasoaktivní intestinální peptid), liberin růstového hormonu, kortikotropin uvolňující hormon, kalcitonin a parathormon. Pravděpodobně všechny receptory této třídy jsou spřažené se stimulačním G proteinem G_s .

Rodina C je též relativně malá a radí se do ní metabotropní glutamátové receptory, $GABA_B$ receptory, receptory pro vápník a některé chuťové receptory. Typickou vlastností této třídy je dlouhý extracelulární N-konec, kde je lokalizováno vazebné místo pro ligand.

Kolakowskiho A – F klasifikace je jedním z nejužívanějších dělení GPCR receptorů (*Kolakowski, 1994*):

Rodina A obsahuje receptory příbuzné rhodopsinu, včetně receptorů pro biogenní aminy.

Rodina B obsahuje receptory pro glukagon, parathormon, kalcitonin a příbuzné receptory.

Rodina C jsou metabotropní glutamátové receptory, $GABA_B$ receptory, receptory pro vápník, chuťové receptory a feromonové receptory.

Rodina D jsou STE2 kvasinkové feromonové receptory.

Rodina E jsou STE3 feromonové receptory.

Rodina F jsou receptory příbuzné cAMP receptorům hlenek.

Avšak ne všem nově klonovaným či analyzovaným GPCR receptorům toto rozdělení vyhovuje. Příkladem mohou být Frizzled rodina, savčí feromonové receptory či GPCR rostlin (*Perez, 2003*).

Kolakowskiho dělení se drží i současná databáze naměřených primárních dat (sekvence, mutace, vazba ligandů) a dat druhotných (modely, fylogenetické stromy), která je dostupná na internetu na adrese: www.gpcr.org/7tm/ (*Horn a kol., 1998*).

Za zmínku stojí i nejaktuálnější fylogenetický systém pro GPCR lidského genomu tzv. klasifikační systém „**GRAFS**“, který dělí receptory do 5 základních skupin: „Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/taste2, a Secretin“ (*Fredriksson a kol., 2003*).

GABA_B receptory

Kyselina γ -aminomáselná (GABA) je hlavním inhibičním neurotransmiterem v centrálním nervovém systému (CNS) obratlovců a jako taková hraje klíčovou roli v modulaci neuronální aktivity. GABA působí prostřednictvím dvou odlišných receptorových systémů. Na jedné straně jsou to ionotropní **GABA_A** a **GABA_C** receptory, které formují iontové kanály a na straně druhé to jsou metabotropní **GABA_B** receptory signalizující pomocí systému druhého posla (*Kerr a Ong, 1995; Bormann, 2000; Billinton a kol., 2001; Bettler a kol., 2004*). GABA_B receptory jsou hojně rozšířeny v CNS a stejně tak se nacházejí i v periferních tkáních. Aktivované GABA_B receptory vyvolávají mnoho účinků zahrnující neuronální hyperpolarizaci, snížené uvolňování hormonů a neurotransmiterů, antinocicepci, epileptogenesi, zhoršení absenčních záchvatů, modulaci dlouhodobé potenciace (LTP), snížení kognitivních funkcí, depresi, anxiету, potlačení vývoje drogové závislosti a další. Na periférii se jejich aktivace projevuje např. bronchodilatací, svalovou relaxací, kontrakcí oviduktu a utera, redukcí intestinální peristaltiky (*Bettler a kol., 2004; Bowery, 2006*).

Klasifikace GABA_B receptorů

Metabotropní GABA_B receptory ovlivňují synaptickou transmisí prostřednictvím pertussistoxin senzitivních G proteinů G_i/G_o rodiny (*Hill a kol., 1984; Asano a kol., 1985*). Jsou lokalizovány v GABAergních a glutamátérních neuronech post- i presynapticky stejně jako na extrasynaptických membránách (*Bettler a Tiao, 2006*). **Presynaptické GABA_B** receptory se dají rozdělit na autoreceptory, které kontrolují uvolňování GABA z GABAergních synapsí, a heteroreceptory, které blokují uvolňování všech ostatních neurotransmiterů. V obou případech jsou GABA_B receptory nepřímě spřažené s vápníkovými kanály a inhibují vtok Ca²⁺ do presynaptického zakončení (*Takahashi a kol., 1998; Bettler a kol., 2004*). Naproti tomu **postsynaptické GABA_B** receptory vyvolávají pomalý inhibiční postsynaptický potenciál (IPSP) aktivací dovnitř usměřujících draslíkových kanálů (*Andrade a kol., 1986; Lüscher a kol., 1997; Bettler a Tiao, 2006*). Pro pre- a postsynaptické GABA_B receptory se předpokládají také odlišné farmakologické charakteristiky, avšak elektrofyziologické a neurochemické studie k dnešní době zaznamenaly jen nepatrné rozdíly. Problém stanovení rozdílných farmakologických

subtypů GABA_B receptorů tkví v nedostatku vysoce selektivních látek pro tato předpokládaná místa (*Bowery a Enna, 2000*).

Dosud jediný klinicky významný agonista GABA_B receptorů je baclofen (β p-chlorfenyl-GABA), který je používán v terapeutické praxi již od roku 1972, tedy dávno předtím než byly tyto receptory v roce 1981 popsány jako GABA receptor, který není citlivý k bikukulinu a může být aktivován právě baclofenem (*Hill a Bowery, 1981; Bowery, 2006*). Teprve v roce 1987 se podařilo objevit první látku s antagonistickým účinkem k těmto receptorům faklofen (derivát kyseliny fosforové a baclofenu) a brzy po něm byly připraveny účinnější sloučeniny (*Marescaux a kol., 1992; Bittiger a kol., 1993; Froestl a kol., 2003*).

O dalších deset let později právě specifictí antagonisté přispěli k naklonování prvního GABA_B receptoru – **GABA_{B1}**, který patří do nadrodiny 7TM receptorů, připomíná metabotropní glutamátový receptor a má dvě hlavní sestřihové varianty GABA_{B1a} a GABA_{B1b}. Tento naklonovaný receptor se od nativního GABA_B receptoru překvapivě lišil nižší schopností vázat agonistu (*Kaupmann a kol., 1997*). To bylo vysvětleno na základě lokalizace rekombinantního GABA_{B1} receptoru, který po expresi nedosáhne plazmatické membrány a zůstává v endoplazmatickém retikulu (*Couve a kol., 1998*).

Krátce poté se začala rýsovat konečná struktura GABA_B receptoru díky naklonování druhé podjednotky – **GABA_{B2}** (*Jones a kol., 1998; Kaupmann a kol., 1998a; White a kol., 1998*). V současnosti je všeobecně uznáváno, že pouze koexprese podjednotek GABA_{B1} a GABA_{B2} vytváří funkční heterodimer GABA_B receptoru, kde GABA_{B1} je ligand vázající podjednotka určující farmakologické vlastnosti, zatímco GABA_{B2} podjednotka je nezbytná jednak pro lokalizaci receptoru do plazmatické membrány a dále pro zprostředkování signalizace G proteiny, a také je místem vazby alosterických modulátorů. Obě podjednotky heterodimeru jsou spojeny „coiled-coil“ interakcí α helixů jejich C-konců (*Jones a kol., 1998; Kaupmann a kol., 1998a; White a kol., 1998; Bowery a Smart, 2006*). Do dnešní doby bylo v lidské a potkaní tkáni identifikováno okolo devíti sestřihových variant GABA_{B1} a tří izoform GABA_{B2} podjednotky, přesto se zdá, že na diverzitě GABAergního systému se podílejí hlavně GABA_{B1a} a GABA_{B1b}, protože ostatní popisované izoformy buď nejsou konzervované mezi různými druhy, nebo jsou nestabilní in vivo či jsou považovány za artefakty klonování (*Billinton a kol., 2001; Bettler a kol., 2004; Bettler a Tiao, 2006*).

Distribuce GABA_B receptorů

GABA_B receptory v CNS a periferních tkáních byly zkoumány různými experimentálními přístupy zahrnující vazebné studie, kvantitativní autoradiografii, elektroforetické blotovací metody, imunohistochemii a další.

Už starší studie popisovaly rozličnou distribuci vazebných míst GABA_B receptorů v mnoha regionech mozku, největší počet byl zjištěn v corpora geniculata mediale et laterale, coliculus superior a určitých jádrech amygdaly (*Chu a kol., 1990*). Dále pro GABA_B agonistu [³H]CGP27492 na četných oblastech mozku včetně kortexu byla popsána nízko a vysokoafinní vazebná místa (*Mathivet a kol., 1996*). S rozvojem metod a poznatků se aktuálnější studie zaměřily na studování distribuce obou známých podjednotek GABA_B receptoru a případně jejich izoform. Byla potvrzena rozsáhlá exprese GABA_{B1} a GABA_{B2} v CNS různých druhů obratlovců (*Billinton a kol., 1999; Bischoff a kol., 1999; Billinton a kol., 2000; Clark a kol., 2000; Liang a kol., 2000; Towers a kol., 2000; Berthele a kol., 2001; Munoz a kol., 2001; Serrats a kol., 2003*). Nejvyšší úrovně exprese GABA_{B1} podjednotky v mozku potkana jsou popisovány v hipokampu, jádrech talamu a mozečku. Pro GABA_{B2} podjednotky jsou kortex, hipokampus, habenula medialis, talamus a Purkyněho buňky mozečku místem největší exprese (*Jones a kol., 1998; Kaupmann a kol., 1998b; Durkin a kol., 1999; Berthele a kol., 2001*).

Podobně byly studovány GABA_B receptory i v tkáních periferních orgánů. Exprese GABA_{B1} podjednotky byla potvrzena ve všech zkoumaných periferních tkáních zahrnujících srdce, slezinu, plíce, játra, GIT, ledviny, nadledviny, testes, ovaria a močový měchýř (*Isomoto a kol., 1998; Castelli a kol., 1999; Schwarz a kol., 2000; Wei a kol., 2001*), naopak GABA_{B2} podjednotka ve většině periferních orgánů překvapivě nebyla exprimována (*Kaupmann a kol., 1998a; Calver a kol., 2000*). GABA_{B2} mRNA byla na periferii dosud detekována pouze v kardiomyocytech, testes a spermatu potkana (*Lorente a kol., 2000; He a kol., 2001*).

Ontogeneze GABA_B receptorů v mozkové kůře

Distribuce GABA_B receptorů se v jednotlivých regionech mozku potkana v průběhu postnatálního vývoje velmi specificky mění (*Garant a kol., 1992; Turgeon a Albin, 1994; Malitschek a kol., 1998; Fritschy a kol., 1999; Princivalle a kol., 2000; Hejnova a kol., 2002; Liu a Wong-Riley, 2005; Lujan a Shigemoto, 2006*). V mozkové kůře potkana většina uvedených studií popisuje nárůst počtu GABA_B receptorů během 2 – 3 týdnů po

narození a poté jejich pokles až na úroveň vyskytující se v dospělosti. Konkrétně ontogenetická studie využívající kvantitativní autoradiografii detekovala maximální počet GABA_B receptorů 14. postnatální den (PD) a poté jejich signifikantní pokles směrem k dospělosti (*Turgeon a Albin, 1994*). Pomocí imunoprecipitace byla stanovena exprese GABA_{B1a} a GABA_{B1b} podjednotky v synaptických membránách této tkáně, kdy obě sestříhové varianty postupně klesaly mezi PD 7 a dospělostí. Zároveň mezi PD 2 a PD 14 byla hladina izoformy GABA_{B1a} vyšší než GABA_{B1b} (*Malitschek a kol., 1998*). Užitím protilátek proti GABA_{B2} podjednotce byla detekována její hojná exprese během celého postnatálního vývoje (*Kaupmann a kol., 1998a*). Imunolokalizací GABA_B receptorů byla pozorována zvýšená exprese u PD 1 a PD 7 a její progresivní pokles během druhého a třetího postnatálního týdne. Mezi PD 12 a dospělým kortexem nebyly zjištěny žádné rozdíly (*Princivalle a kol., 2000*). Zvyšující se specifická vazba [³H]baclofenu byla detekována v mozkové kůře mezi PD 1 a PD 25, kdy bylo dosaženo maxima. Poté se počet receptorů snižoval na hodnotu přibližně stejnou, jaká byla stanovena u PD 12 (*Hejnova a kol., 2002*).

Heterotrimerní GTP vazebné proteiny (G proteiny)

V 70. letech minulého století byla na základě zjištění, že receptor pro glukagon je schopen aktivovat svůj efektor adenylcyklázu pouze v přítomnosti GTP, vyslovena myšlenka existence jejich spřažení prostřednictvím proteinu vázajícího guaninové nukleotidy (*Rodbell a kol., 1971; Rodbell, 1995*). Tento významný krok vedl později k objevu skupiny heterotrimerních GTP vazebných proteinů (G proteinů) složených ze tří odlišných podjednotek $G\alpha$, $G\beta$ a $G\gamma$, jejichž hlavní funkcí je zprostředkovávat funkční spojení GPCR s jejich efektor. K dnešnímu dni bylo identifikováno přibližně dvacet různých $G\alpha$ podjednotek, pět $G\beta$ podjednotek a dvanáct $G\gamma$ podjednotek, z nichž některé mají více sestřihových variant. Náhodnou asociací těchto jednotek by mohly vzniknout stovky heterotrimerních proteinů. Ale zdá se, že různé izoformy utvářejí pouze preferované kombinace, ať už na základě jejich trojrozměrného uspořádání či jejich exprese v čase a prostoru, a tak tento počet kombinací je ve skutečnosti mnohem menší (*Hamm a Gilchrist, 1996*).

Heterotrimerním G proteinům jsou evolučně příbuzné monomerní G proteiny (*Kjeldgaard a kol., 1996*). Tyto malé G proteiny zahrnující Ras, Rab, Rho, ARF, faktory EF-Tu a EF-G, dynamin aj. hrají důležitou úlohu v mnoha buněčných procesech jako je např. buněčný růst, dělení či diferenciaci, translace, sekrece neurotransmiterů, intracelulární vezikulární transport, internalizace receptorů (*Hall, 1990; Sprang, 1997*).

Struktura podjednotek G proteinů

$G\alpha$ podjednotky jsou součástí rodiny proteinů o relativní molekulové váze 39 – 52 kDa, které sdílejí přibližně 45 – 80% sekvenční podobnost. Izoformy $G\beta$ podjednotky jsou přibližně 36kDa proteiny, které vykazují nejvyšší 50 – 90% homologii. Nejmenší součástí G proteinů je $G\gamma$ podjednotka, jejíž izoformy mají relativní molekulovou váhu 6 – 9 kDa a jsou navzájem od sebe nejvíce odlišné s 27 – 75% aminokyselinovou homologií (*Hamm a Gilchrist, 1996; Sprang, 1997*).

$G\alpha$ podjednotka se skládá ze dvou domén – G domény (struktury vyskytující se u všech proteinů s GTPázovou aktivitou) a helikální domény, které svírají hlubokou šterbinu vázající guaninové nukleotidy.

G doména se skládá z pěti α helixů obklopených šesti vlákny β listů. Obsahuje místa pro vazbu GTP, Mg^{2+} , receptorů, příslušných efektorů a $G\beta\gamma$ podjednotky. Uvnitř této domény

jsou i tři flexibilní oblasti „Switch I, II a III“, které mění konformaci v závislosti na tom, zda je na $G\alpha$ podjednotku vázáno GTP či jeho hydrolyzovaná forma GDP. Tento efekt je zesílen a přenášen na celou molekulu $G\alpha$ podjednotky, včetně vzájemného postavení obou jejích domén, a tak je ovlivněna interakce s $G\beta\gamma$ podjednotkou a dalšími signálními proteiny (Noel a kol., 1993; Sprang, 1997).

Druhá doména $G\alpha$ podjednotky – helikální doména, je specifická pro heterotrimerní G proteiny a je celá tvořena výhradně α helixy, konkrétně svazkem 6 α šroubovic. Její funkce není plně objasněna, ale předpokládá se, že funguje jako jakési víčko uzavírající štěrbinu s navázaným GTP (Noel a kol., 1993), napomáhá jeho štěpení a funguje tedy jako GTPázu aktivující protein (GAP) (Markby a kol., 1993) a také se účastní rozpoznání molekuly efektoru (Benjamin a kol., 1995).

$G\beta$ a $G\gamma$ podjednotky vytvářejí ve specifických kombinacích složitý dimer, který disociuje pouze za denaturačních podmínek. (Neer, 1995). Rentgenovou krystalografií získané trojrozměrné struktury **$G\beta\gamma$ heterodimeru** ukázaly, že menší $G\gamma$ podjednotka je tvořena dvěma helikálními segmenty spojených smyčkou a je rozprostřena po povrchu $G\beta$ podjednotky a pevně do něj vnořena. Amfipatický α helix na N-konci $G\beta$ podjednotky je následován sedmi WD repeticemi, které se skládají ze sedmi β listů formující prstencovou strukturu připomínající listy vrtule, tzv. β vrtuli. N-koncové α helixy obou podjednotek jsou spojeny „coiled-coil“ interakcí (Sprang, 1997).

Posttranslační modifikace mastnými kyselinami $G\alpha$ a $G\gamma$ podjednotek jsou nejen dalším zdrojem jejich variability, ale i nových funkčních vlastností.

$G\alpha$ podjednotky podléhají reversibilní palmitoylaci či ireversibilní myristoylaci (Duncan a Gilman, 1998). Zatímco $G_{s\alpha}$ a $G_{q\alpha}$ proteiny jsou modifikovány pouze thioesterovou vazbou kyseliny palmitové na cystein v blízkosti N-konce, tak $G_{i\alpha}$, $G_{o\alpha}$ a $G_{z\alpha}$ proteiny jsou modifikovány nejen připojením kyseliny palmitové, ale též amidovou vazbou kyseliny myristové na N-koncový glycinový zbytek. Myristoylace $G_{i\alpha}$ proteinů byla popsána pouze u tranzientních COS buněk, nikoli po purifikaci z retiny (Mumby a kol., 1990). Tyto lipidové modifikace jsou nezbytné pro ukotvení $G\alpha$ podjednotky do plazmatické membrány a kromě toho N-koncová myristoylace $G_{i\alpha}$ a $G_{o\alpha}$ proteinů významně zvyšuje vysokoafinní vazbu na $G\beta\gamma$ podjednotky (Linder a kol., 1991).

$G\gamma$ podjednotky jsou na C-koncových cysteinových zbytcích ireversibilně modifikovány prenylovými skupinami a to buď připojením 15uhlíkatého izoprenoidu farnesyly nebo

20uhlíkatého *izoprenoidu geranylgeranylu*. Tyto modifikace jsou nezbytné pro interakci $G\beta\gamma$ podjednotky s plazmatickou membránou, $G\alpha$ podjednotkou a dalšími signálními proteiny (Iniguez-Lluhi a kol., 1992). $G\gamma$ podjednotky sítnice jsou farnesylovány (Fukada a kol., 1990), naproti tomu ve většině ostatních tkání jsou $G\gamma$ podjednotky geranylgeranylovány (Clarke, 1992).

Přenos signálu G proteiny

Mechanismus signalizace zprostředkované G proteiny je vcelku dobře znám a lze ho zjednodušeně popsat následujícím způsobem. V základním stavu G protein existuje jako **$G\alpha\beta\gamma$ heterotrimer s navázaným GDP** na vysokoafinním vazebném místě $G\alpha$ podjednotky. Specifickým agonistou aktivovaný receptor interaguje s příslušným heterotrimerním G proteinem, na kterém jsou vyvolány konformační změny a dochází k výměně GDP za GTP na $G\alpha$ podjednotce. Tím je vyvolán posun tří flexibilních oblastí GTPázové domény („Switch I, II a III“), který pozmění konformaci celé $G\alpha$ podjednotky, což indukuje její oddělení od $G\beta\gamma$ heterodimeru i od aktivovaného receptoru. Jak aktivovaná $G\alpha$ podjednotka s navázaným GTP, tak uvolněný $G\beta\gamma$ heterodimer interagují s příslušnými efektory buď nezávisle, synergisticky či antagonisticky a modulují jejich funkce. Signalizace přetrvává do té doby, než je vnitřní GTPázovou aktivitou $G\alpha$ podjednotky GTP hydrolyzováno na GDP. Nakonec deaktivovaná $G\alpha$ podjednotka se znovu spojuje s $G\beta\gamma$ heterodimerem a vrací se do svého klidového uspořádání $G\alpha\beta\gamma$ heterotrimeru s navázaným GDP, který je připraven vstoupit do dalšího signalizačního cyklu (Helmreich a Hofmann, 1996; Morris a Malbon, 1999).

Regulátory G proteinové signalizace (RGS)

G proteiny fungují jako molekulární přepínače, které jsou signálem aktivovány navázáním GTP a poté vypnuty jeho hydrolyzou na GDP. Tento inaktivační mechanismus, který vrací G protein do původního nestimulovaného stavu a umožňuje připravit signální dráhu na přenos dalšího signálu, je stejně důležitý jako aktivační mechanismus. Avšak jak ukázaly studie na izolovaných komponentách signální kaskády *in vitro* (Gilman, 1987), vnitřní GTPázová aktivita je poměrně pomalá a nedostatečná pro vysvětlení pozorované rychlosti přenosu signálu, a to zejména u G proteiny zprostředkované fotoelektrické transdukce či aktivace iontových kanálů (Arshavsky a kol., 2002). V organismu se však nacházejí proteiny, které podstatně urychlují fázi deaktivace $G\alpha$ podjednotky a značně

zkracují délku sepnutí signální dráhy aktivované G proteinem, tzv. **regulátory G proteinové signalizace (RGS)**, které mohou tento efekt vyvolávat několika různými mechanismy.

Jednak mohou fungovat jako GTPázu aktivující proteiny (GAP) pro aktivované $G\alpha$ podjednotky a urychlovat hydrolýzu na ní navázaného GTP. Dále se mohou chovat jako efektorví antagonisté, kteří fyzicky blokují vazbu G proteinů ke svým efektorům. RGS také mohou zvýšením afinity $G\alpha$ podjednotek k $G\beta\gamma$ podjednotkám (urychlením vytvoření neaktivního heterotrimeru) změnit množství volných $G\beta\gamma$ podjednotek, a tak ovlivnit interakci s jejich efektoru (*De Vries a kol., 2000*). V poslední době bylo objeveno, že RGS mohou G protein-efektorové interakce regulovat i jinými způsoby, které nejsou dosud dobře pochopeny (*Abramow-Newerly a kol., 2006*).

Dosud bylo identifikováno více než 30 RGS proteinů sdílejících společnou RGS nebo RL doménu („RGS like“ doménu), která váže aktivovanou $G\alpha$ podjednotku. Jednotliví členové této rodiny proteinů interagují s různými $G\alpha$ podjednotkami všech hlavních tříd trimerních G proteinů. Na základě strukturní a funkční podobnosti lze RGS rozdělit do šesti odlišných skupin A/RZ, B/R4, C/R7, D/R12, E/RA a F/RL, kde za lomítkem je uvedeno alternativní značení podle prototypických zástupců každé podrodiny.

Většina zástupců prvních dvou podrodin A/RZ a B/R4 (např. RGSZ1 a 2, RGS1 – 5, RGS16) jsou jednoduché proteiny, které neobsahují o mnoho víc než RGS doménu a fungují zejména jako GAP pro trimerní G proteiny, tedy jako modulátory G proteinové funkce.

Naproti tomu členové skupin C/R7, D/R12, E/RA a F/RL (např. RGS7, RGS12, Axin, AKAP2) jsou mnohem složitější proteiny, které obsahují ještě další pro jednotlivé podrodiny specifické domény. Tyto větší RGS proteiny fungují jako multifunkční proteiny schopné vázat nejen G proteiny, ale i jiné signální makromolekuly. Působí tedy jako integrátory G proteinové funkce, eventuelně jako neobvyklí efektoru či proteinové lešení („scaffolding proteins“) (*Hollinger a Hepler, 2002*).

Klasifikace G proteinů

G proteiny lze na základě aminokyselinové sekvenční podobnosti $G\alpha$ podjednotek rozdělit do čtyř hlavních tříd G_s/G_{olf} , G_i/G_o , G_q/G_{11} a $G_{12/13}$ (*Simon a kol., 1991; Wilkie a kol., 1992; Yokoyama a Starmer, 1992*).

Třída G_s/G_{olf}

Tato třída zahrnuje $G_s\alpha$ a $G_{olf}\alpha$ proteiny, které sdílejí 88% sekvenční homologii (Jones a Reed, 1989). Oba proteiny podléhají ADP-ribozylaci specifického argininu působením cholera toxinu bakterie *Vibrio cholerae*, což vede k inhibici vnitřní GTPázové aktivity $G\alpha$ podjednotek a k jejich následné permanentní aktivaci (Obara a kol., 1991).

$G_s\alpha$ proteiny jsou kódovány jediným genem a alternativním sestřihem vzniká minimálně pět různě velikých izoform. $G_s\alpha S$ neboli krátké izoformy zahrnují $G_s\alpha 1$ a $G_s\alpha 2$ proteiny o relativní molekulové váze 45 kDa a $G_s\alpha L$ neboli dlouhé izoformy 52 kDa $G_s\alpha 3$ a $G_s\alpha 4$ proteiny (Bray a kol., 1986; Robishaw a kol., 1986; Kozasa a kol., 1988). $G_s\alpha L$ a $G_s\alpha S$ izoformy se liší přítomností či nepřítomností sekvence 15 aminokyselin na místě Asp71 zbytku. $G_s\alpha 1$ (380 AK) na rozdíl od $G_s\alpha 2$ (381 AK) izoformy je o jeden serinový zbytek kratší. Podobně chybí serinový zbytek u $G_s\alpha 3$ (394 AK) na rozdíl od $G_s\alpha 4$ (395 AK) izoformy (Kozasa a kol., 1988; Pollard a kol., 2002). Relativně novým členem je $G_s\alpha XL$ protein, skládající se z neobvyklé 37 kDa domény následovanou 41 kDa αs doménou. Převážně se nachází v neuroendokrinních buňkách a jeho funkce je zatím málo prozkoumána (Kehlenbach a kol., 1994; Klemke a kol., 2000).

$G_{olf}\alpha$ protein se skládá z 381 AK a je přítomný výhradně v čichovém epitelu (Jones a kol., 1990).

Všichni zástupci G_s/G_{olf} rodiny stimulují adenylylcyklázu (Jones a kol., 1990). Kromě toho $G_s\alpha$ proteiny regulují napětově závislé iontové kanály – aktivují dihydropyridinové vápníkové kanály v kosterním svalu (Mattera a kol., 1989) a inaktivují sodíkové kanály v srdci (Schubert a kol., 1989).

Třída G_i/G_o

Tuto třídu tvoří $G_i\alpha$ ($G_i\alpha 1$, $G_i\alpha 2$, $G_i\alpha 3$), $G_t\alpha$ ($G_t\alpha 1$ a $G_t\alpha 2$), $G_o\alpha$ ($G_o\alpha 1$ a $G_o\alpha 2$), $G_g\alpha$ a $G_z\alpha$ proteiny. Všechny proteiny G_i/G_o rodiny (s výjimkou $G_z\alpha$) obsahují C-koncový cysteinový zbytek, který je místem ADP-ribozylace katalyzované *pertussis toxinem* (PTX) bakterie *Bordetella pertussis*. Tato kovalentní modifikace udržuje $G\alpha$ podjednotku v jejím inaktivním stavu s navázaným GDP, kdy aktivovaný receptor není schopen vyvolat jeho výměnu za GTP (Homburger a kol., 1987).

$G_i\alpha$ proteiny jsou produkty tří separátních genů a podle pořadí jejich naklonování byly pojmenovány $G_i\alpha 1$, $G_i\alpha 2$ a $G_i\alpha 3$. V tomto pořadí jsou složeny z 354, 355 a 354 AK a jejich relativní molekulová hmotnost je mezi 40 a 41 kDa (Murphy a kol., 1987; Suki a

kol., 1987). Aktivace $G_i\alpha$ proteinů vyvolává inhibici aktivity adenylcyklázy a otevření draslíkových kanálů (*Yatani a kol., 1988*).

$G_o\alpha$ proteiny jsou hlavní neurální G proteiny. Vyskytují se ve dvou hlavních izoformách $G_o\alpha1$ a $G_o\alpha2$, které vznikají alternativním sestřihem (*Hsu a kol., 1990; Strathmann a kol., 1990*). Vedle nich existuje ještě třetí izoforma $G_o\alpha3$, která vzniká posttranslační deaminací Asn346 na Asp a je biochemicky i funkčně odlišná od prvních dvou izoform. Změněný náboj jejího C-konce např. snižuje citlivost na PTX ADP-ribozylaci nebo zpomaluje kinetiku aktivace. $G_o\alpha3$ představuje 30 % z celkového obsahu $G_o\alpha$ v mozku (*Exner a kol., 1999*). Všechny G_o proteiny inhibují adenylcyklázu typu I (*Taussig a kol., 1994*) a zprostředkovávají zavírání vápníkových kanálů (*Taussig a kol., 1992*).

$G_t\alpha$ proteiny (transduciny) se nacházejí výhradně v sítnici oka a zprostředkovávají přenos z fotoreceptorů (rhodopsin) na cGMP fosfodiesterázu, která je hlavním efektoem v přenosu světelného signálu (*Arshavsky a kol., 1992*).

$G_z\alpha$ protein inhibuje adenylcyklázu typu I a V (*Taussig a Gilman, 1995*).

Třída G_q/G_{11}

Vedle G_q a G_{11} proteinů tato třída obsahuje ještě G_{14} , G_{15} a G_{16} proteiny. Všechny uvedené proteiny aktivují fosfolipázu $C\beta$ (PLC- β) (*Hepler a kol., 1993; Kozasa a kol., 1993*). Zatímco exprese G_q a G_{11} proteinů není tkáňově specifická, tak G_{14} , G_{15} a G_{16} proteiny se vyskytují výhradně v pojivových a epiteliálních tkáních a také v buňkách myelomu. Zástupci této rodiny nepodléhají *cholera* toxinem ani *pertussis* toxinem katalyzované ADP-ribozylaci (*Hepler a kol., 1993; Kozasa a kol., 1993*).

Třída G_{12}/G_{13}

$G_{12/13}$ proteiny jsou exprimovány v celé řadě tkání, avšak jejich funkce zatím nebyla zcela uspokojivě objasněna. Jedním z doložených účinků je aktivace Na^+/H^+ antiportu (*Dhanasekaran a kol., 1994; Voyno-Yasenetskaya, 1998*). Kromě toho také interagují s MAP-kinázovými dráhami a podílejí se na regulaci buněčného růstu a dělení (*Voyno-Yasenetskaya a kol., 1996*).

G proteiny v mozku

Různé G proteiny se nacházejí ve velkém množství v centrální nervové soustavě. Nicméně nejhojnějšími G proteiny v mozku jsou izoformy $G_o\alpha$ proteiny, které dosahují až 1 % celkového množství proteinů membrán mozkové tkáně (*Gierschik a kol., 1986; Asano a kol., 1988; Ihnatovych a kol., 2002b*). Dále byly v této tkáni identifikovány jak tři typy adenylcyklázy inhibujících proteinů, $G_i\alpha1$, $G_i\alpha2$ a $G_i\alpha3$, tak i dlouhá ($G_s\alpha L$) a krátká ($G_s\alpha S$) izoforma stimulačního $G_s\alpha$ proteinu (*Bray a kol., 1986; Mumby a kol., 1988; Ihnatovych a kol., 2002b*). Vysokých koncentrací v mozku dosahují také $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ proteiny, které jsou spřažené s fosfolipázou C (*Milligan, 1993; Ihnatovych a kol., 2002b*). Signifikantní množství hlavních představitelů $G_{12}\alpha/G_{13}\alpha$ skupiny G proteinů bylo detekováno v nervové tkáni (*Harhammer a kol., 1994; Harhammer a kol., 1996*). Také byla v různých studiích na mozku popsána distribuce $G\beta$ podjednotky (*Asano a kol., 1988; Kitamura a kol., 1989; Sohma a kol., 1993; Ihnatovych a kol., 2002b*).

Adenylylcykláza (AC)

Adenylylcykláza (AC) je významným efektozem G proteinové signalizace, který katalyzuje produkci cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (cAMP) z ATP. Již v polovině minulého století se cAMP stalo prvním objeveným intracelulárním poslem, který kromě aktivace iontových kanálů plazmatické membrány některých vysoce specializovaných buněk, působí ve většině živočišných buněk hlavně aktivací cAMP-závislé proteinkinázy A (PKA). Ta fosforylaci specifických serinů nebo threoninů reguluje aktivitu vybraných cílových proteinů, které se podílejí na mnoha buněčných dějích. PKA může zprostředkovávat jak velmi rychlé odpovědi na cAMP (metabolismus glykogenu), tak odpovědi v řádu hodin stimulací transkripce některých genů fosforylaci CREB proteinu (*Smith a kol., 1999; Antoni, 2000; Sunahara a Taussig, 2002*).

Struktura a izoformy AC

AC jako termolabilní a vzácná komponenta buňky (~0.001% membránových proteinů) byla částečně purifikována neiontovými detergenty z různých tkání teprve v 70. letech 20. století (*Neer, 1974; Ishikawa a Homcy, 1997*) a zhruba o dvacet let později byla naklonována první savčí izoforma AC (*Krupinski a kol., 1989*). Doposud bylo identifikováno devět savčích genů kódujících membránově vázané AC a jeden gen pro rozpustnou izoformu. Membránově vázané AC jsou velké proteiny (~120 – 140 kDa), které sdílejí společnou sekundární strukturu nápadně připomínající ATP-závislé transportní proteiny či iontové kanály (*Greenberger a Ishikawa, 1994*). Krátký intracelulární N-konec následovaný hydrofobní membránovou doménou (M1), složenou ze šesti transmembránových α helixů, je spojený velkou (~40 kDa) cytoplazmatickou smyčkou označovanou C1 doména s druhou analogickou šesti α helixovou membránovou doménou (M2) a C-koncovou cytoplazmatickou C2 doménou. ATP vázající C1 a C2 domény jsou nejvíce konzervované regiony mezi AC izoformami a svou vzájemnou interakcí formují katalytickou jednotku zodpovědnou za forskolinem a G proteiny stimulovanou katalýzu (*Zhang a kol., 1997; Cooper a Crosswaite, 2006*).

AC izoformy lze na základě jejich AK sekvence a funkčních vlastností rozdělit do pěti podrodin (*Krupinski a kol., 1992; Sunahara a Taussig, 2002*):

Ca²⁺ a Ca²⁺/kalmodulin stimulované izoformy jsou AC1, AC3 a AC8, kde každá s těchto izoform vytváří vlastní větev v AC rodině. AC1 je dále ještě přímo inhibována

Gβγ podjednotkami G_iα proteinů (Tang a Gilman, 1991; Taussig a kol., 1993b) a je pravděpodobně jako jediná AC izoforma inhibována G_oα proteiny (Taussig a kol., 1994). Všechny tři izoformy jsou exprimovány hlavně v tkáni mozku a AC3 je kromě toho také významně zastoupena v čichovém epitelu (Xia a kol., 1991; Xia a kol., 1992; Ishikawa a Homcy, 1997).

Gβγ podjednotkami stimulované izoformy AC2, AC4 a AC7 tvoří svou vlastní AC podrodinu s 84% AK sekvenční podobností. Stimulace všech těchto tří izoform Gβγ podjednotkami je podmíněna koaktivací G_sα proteinů (Tang a Gilman, 1991). Celá skupina se zdá imunní vůči inhibici G_iα proteiny (Taussig a kol., 1994; Sunahara a Taussig, 2002). Zatímco AC2 a AC7 izoformy jsou stimulovány prostřednictvím fosforylace proteinkinázou C (PKC), tak u AC4 tato posttranslační modifikace inhibuje stimulaci vyvolanou G_sα a Gβγ proteiny (Zimmermann a Taussig, 1996; Sunahara a Taussig, 2002). Všichni zástupci jsou široce zastoupeni v různých tkáních zahrnující mozek, plíce, srdce, játra, ledviny atd. (Simonds, 1999).

Ca²⁺ a G_iα proteiny inhibované izoformy jsou AC5 a AC6, které jsou z 83% homologní. Kromě silné inhibice G_iα1, G_iα2 a G_iα3 a G_zα proteiny (Taussig a kol., 1993a; Taussig a kol., 1994) a Ca²⁺ ionty (Chiono a kol., 1995; Cooper a kol., 1998) mohou být oba zástupci této skupiny také negativně regulovány fosforylací zprostředkovanou PKA (Iwami a kol., 1995; Chen a kol., 1997). Obě izoformy jsou ve velkém množství exprimovány v srdci, ale nachází se i v jiných tkáních včetně mozku, ledvin, jater, plic a dalších (Simonds, 1999).

AC9 izoforma je nejvíce odlišná od všech membránově vázaných izoform. Podobně jako všechny membránové AC izoformy je stimulovaná G_sα proteiny, avšak není citlivá k diterpenu forskolinu (Hacker a kol., 1998). Dále není ovlivňována ani Ca²⁺/kalmulinem ani Gβγ podjednotkami (Premont a kol., 1996). Vysoké hladiny její mRNA se nacházejí v tkáních kosterních svalů, srdce a mozku (Hacker a kol., 1998).

sAC izoforma byla popsána jako poslední a je nejvíce se lišící zástupce savčí AC rodiny, který se spíše podobá adenylylcyklázám v kyanobakteriích. Na rozdíl od ostatních devíti izoform je sAC rozpustná a je tedy lokalizována v buněčném cytosolu (Buck a kol., 1999).

Regulace AC aktivity

Regulace G proteiny

G proteiny hrají v regulaci AC rozhodující úlohu a ovlivňují AC aktivitu jak svými aktivovanými $G\alpha$ podjednotkami, tak i uvolněným $G\beta\gamma$ heterodimerem. $G_s\alpha$ proteiny stimuluje aktivitu všech savčích membránově vázaných AC izoform (Jones a kol., 1990; Klemke a kol., 2000). Naproti tomu $G_i\alpha$ proteiny inhibují jen určité izoformy (AC1, AC5 a AC6) (Taussig a kol., 1993a; Taussig a kol., 1994). Podobně selektivně $G_o\alpha$ proteiny inhibují AC1 (a možná AC8) (Taussig a kol., 1994; Sunahara a Taussig, 2002). $G\beta\gamma$ heterodimer je silný modulátor AC aktivity, který buď, může být *aktivátorem* v případě AC2, AC4 a AC7 a nebo *inhibitorem* pro AC1 a AC8 (Gao a Gilman, 1991; Tang a Gilman, 1991; Taussig a kol., 1993b).

Regulace Ca^{2+} a kalmodulinem

Ca^{2+} ionty působí dvěma různými modulačními efekty na určité AC izoformy. Prvním účinkem Ca^{2+} a Ca^{2+} /kalmodulinu (CaM) je *aktivace* AC1, AC3 a AC8 izoform (Choi a kol., 1992; Xia a kol., 1993; Cali a kol., 1994). Druhý *inhibiční* efekt nevykazují pouze milimolární nefyziologické koncentrace Ca^{2+} , které inhibují všechny AC izoformy, ale i mikromolární koncentrace tohoto kationtu, a to specificky pro AC5 a AC6 (Cooper a kol., 1998).

Regulace fosforylací

Fosforylace je dalším důležitým regulačním mechanismem AC aktivity. Regulační účinek této posttranslační modifikace je obecně považován za inhibiční na AC aktivitu stimulovanou různými aktivátory, kde je součástí zpětné vazby. Avšak i zde platí specifita pro jednotlivé AC izoformy a to i v rámci fosforylace zprostředkované stejným typem proteinkináz. Fosforylací PKA jsou *negativně* regulovány AC5 a AC6 izoformy (Iwami a kol., 1995; Chen a kol., 1997). PKC značně *zvysuje* AC aktivitu u AC1, AC2, AC3, AC5 a AC7, a naopak *inhibuje* $G_s\alpha$ stimulovanou aktivitu AC4 a AC6 izoform (Yoshimura a Cooper, 1993; Kawabe a kol., 1994; Zimmermann a Taussig, 1996; Lin a kol., 2002). Zatímco CaM kináza II *snižuje* aktivitu AC1, tak CaM kináza IV *inhibuje* AC3 izoformu (Wayman a kol., 1994; Wayman a kol., 1995).

Další typy regulace

V současné době bylo popsáno **mnoho dalších proteinů**, které interagují přímo s AC, ale jejich úloha nebyla dosud většinou stanovena. Příkladem mohou být protein asociovaný s Myc (PAM) *inhibující* AC1 a AC5, avšak ne AC2 izoformu, nebo protein SlyD (cis-trans peptidylprolyl izomeráza z *Escherichia coli*) *inhibující* AC7 (Sunahara a Taussig, 2002). Mnohem významnější je interakce mezi AC3 a RGS2, který je popisován jako GAP pro G₁α, G_qα a G₁₂α proteiny, vedoucí ke *snížení* její aktivity (Sinnarajah a kol., 2001).

AC aktivitu vedle proteinů a Ca²⁺ iontů ovlivňují i **některé malé sloučeniny**. Asi nejznámější je diterpen forskolin rostliny *Coleus forskohlii*, který *stimuluje* všechny známé membránově vázané AC izoformy s výjimkou AC9 (Premont a kol., 1996). Inhibitoři P-místa, adenosin a jeho deriváty, *inhibují* bez rozdílu všechny AC izoformy (Dessauer a kol., 1999). Pyrofosfát, druhý produkt AC katalýzy vedle cAMP, v dostatečně vysoké koncentraci brání navázání ATP a tím *snižuje* AC aktivitu stejně jako jeho analog s antivirovým účinkem foscarnet (Sunahara a Taussig, 2002). Také některé deriváty ATP byly prezentovány jako účinné *inhibiční* látky AC aktivity, jako příklad za všechny možno jmenovat asi nejúčinnějšího reverzibilního AC inhibitora β-L-2',3'-dideoxy-5'-ATP (Shoshani a kol., 1999).

Distribuce AC v mozku

Všech devět membránově vázaných AC izoform bylo nalezeno v CNS. Některé AC izoformy (AC3 a AC5) jsou exprimovány převážně ve specifických oblastech, zatímco jiné (AC2, AC4 a AC7) jsou v mozku mnohem více rozšířené (Chern, 2000).

Kalmodulin senzitivní AC1 se vyskytuje ve specifických oblastech mozku, které jsou spojovány s učením a pamětí, zahrnujících pyramidální a granulární buňky hipokampu a neokortex (Xia a kol., 1991). AC2 se nachází v mnoha hlavních oblastech mozku a to zejména v mozečku, hipokampu a piriformním kortexu (Hellevuo a kol., 1995). AC3 je obsažena zejména v cílích čichových neuronů (Wei a kol., 1998). AC4 byla identifikována v mnoha částech CNS jako například v hipokampu, bulbi olfactori, kortexu či thalamu (Olianas a kol., 1998; Baker a kol., 1999; Ihnatovych a kol., 2002a). AC5 je lokalizována převážně v bazálních gangliích (Mons a Cooper, 1994). AC6 je slabě exprimována v celém mozku (Mons a Cooper, 1994). AC7 se velmi specificky nalézá ve vrstvě granulárních buněk mozečku (Hellevuo a kol., 1995). AC8 a AC9 jsou velmi hojné v hipokampu (Cali a kol., 1994; Premont a kol., 1996).

AC izoformy jsou v mozku exprimovány v místně i věkově specifickém množství během postnatálního vývoje. Například (*Matsuoka a kol., 1997*) se zabývali stanovením exprese tří hlavních AC podtypů mozku (AC1, AC2 a AC5). AC2 mRNA byla během ontogeneze v mozku široce rozšířena a její hladina se neměnila. Naproti tomu mRNA pro AC1 dosahovala v kortexu a některých dalších regionech (thalamus, striatum, mozkový kmen a coliculus inferior) maximální úroveň krátce po narození a poté klesala na úroveň v dospělosti a naopak v jiných oblastech mozku (mozeček a hipokampus) se počáteční její velmi nízké hladiny výrazně zvýšily během druhého postnatálního týdne. AC5 mRNA byla exprimována v omezeném množství v neonatálním mozku, které se značně zvýšilo během druhého postnatálního týdnu v některých regionech (striatum, nucleus accumbens a čichový hrbolek) (*Matsuoka a kol., 1997*). Rozdílnou distribuci AC izoform během ontogenetického vývoje mozku potvrzují i výsledky naší laboratoře (*Ihnatovych a kol., 2002a*). Pomocí imunoblotů měřená exprese AC2, AC4 a AC6 byla výrazně zvýšena během prvních třech týdnů ve všech měřených oblastech mozku (kortexu, thalamu a hipokampu). Naproti tomu hladina AC1 se neměnila během ontogeneze (*Ihnatovych a kol., 2002a*).

METODY

Chemikálie

U firmy Amersham Biosciences byly zakoupeny [³H]ouabain (32 Ci/mmol), [³⁵S]GTPγS (1113 Ci/mmol), [α-³²P]ATP (30 Ci/mmol) a [³H]cAMP (37 Ci/mmol). Ostatní radioligandy byly od následujících firem: [³H]CGP54626A od Tocris (40 Ci/mmol), [γ-³²P]GTP (25 Ci/mmol) od MP Biomedicals (dříve ICN) a [³H]forskolin (34 Ci/mmol) od Perkin Elmer, Life Sciences. Ostatní chemikálie jsme zakoupili u firem Sigma, Serva, Fluka a Lachema.

Příprava vzorků

Samci potkanů kmene Wistar byli dekapitováni 12. nebo 90. postnatální den (PD) a ihned z nich byla izolována mozková kůza. Vzorky byly zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -70°C. Mozková tkáň byla po roztátí zhomogenizována v 10 ml STME pufru na gram vlhké váhy (250mM sacharóza, 20mM Tris HCl, 3mM MgCl₂, 1mM EDTA; pH 7,6) pomocí Potter-Elvehjem homogenizéru (Teflon-sklo). Jádra a nerozbité buňky byly odděleny nízko-rychlostní centrifugací (600 x g, 5 min, 4 °C). Supernatant byl centrifugován 200 000 x g po 30 min a výsledný pelet membrán byl resuspendován v STME pufru, tak aby výsledný objem odpovídal pětinasobku původní vlhké váhy tkáně. Poté byly membrány mozkové kůry ještě dvakrát promyty v STME pufru vysokorychlostní centrifugací (200 000 x g po 30 min). Takto připravené vzorky byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80°C.

Vazebné studie

Stanovení vazby [³H]ouabainu na Na/K-ATPázu

Vazba [³H]ouabainu na membránový protein Na/K-ATPázu byla stanovena podle Svoboda a kol. (*Svoboda a kol., 1988*). 100 μg proteinů membrán mozkové kůry bylo inkubováno s 20nM [³H]ouabainem. Reakce probíhala při 37 °C, 90 min v 0,4 ml inkubačního média (50mM Tris-HCl, pH = 7,4 s 5mM MgCl₂ a 5mM NaH₂PO₄). Nespecifickou vazbu byla stanovena inkubací s 10μM ouabainem. Reakci byla ukončena

přidáním 3 ml vychlazeného promývacího pufru (5mM Tris-HCl, pH = 7,4, s 1mM MgCl₂) a následnou vakuovou filtrací na Brandel cell-harvesteru přes filtry Whatman GF/B, které byly preinkubovány 1 hod v 0,3% PEI. Nakonec byly filtry ještě 3x promyty 3 ml promývacího pufru. Pro určení vazebných parametrů byla data analyzována pomocí programu GraphPad (PRISM, GraphPad Software Inc.; San Diego, Calif.).

Stanovení GABA_B receptorů pomocí [³H]CGP54626A

GABA_B receptory byly stanoveny vazebnými studiemi s radioligandem selektivního GABA_B antagonisty [³H]CGP54626A. V celkovém objemu 0,5 ml bylo 100 µg proteinu membrán mozkové kůry inkubováno s radioligandem (o koncentraci v rozmezí 0,15 - 25 nM), 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 2,5mM CaCl₂ po 60 min při 25 °C. Inkubace byla ukončena filtrací přes Whatman GF/C filtr s následujícím promytím (3 x 3 ml) ledově studeným 50mM Tris-HCl (pH 7,4) na Brandel cell-harvesteru. Radioaktivita zachycena na filtrech byla stanovena scintilačním detektorem. Nespecifická vazba byla určena za přítomnosti 1mM GABA. Pro určení vazebných parametrů byla data analyzována pomocí programu GraphPad (PRISM, GraphPad Software Inc.; San Diego, Calif.).

Agonistou stimulovaná vazba [³⁵S]GTPγS na G proteiny

Funkční stav GTP vázajících proteinů byl měřen pomocí agonistou stimulované vazby [³⁵S]GTPγS, jak bylo dříve popsáno (*Fong a kol., 1998; Fong a Milligan, 1999*). 10 µg proteinu membránových vzorků bylo inkubováno s radioligandem (okolo 1,5x10⁵ dpm/vzorek) v konečném objemu 100 µl reakční směsi 20mM HEPES (pH 7,4), 3mM MgCl₂, 100mM NaCl, 2µM GDP, 0,2mM kyseliny askorbové, a to s 1mM baclofenem (total) nebo bez něj (bazal) po 30 min při 30 °C. Vazebná reakce byla ukončena filtrací přes Whatman GF/C filtr s následujícím promytím (3 x 3 ml) ledově studeným 20mM HEPES (pH 7,4), 3mM MgCl₂ na Brandel cell-harvesteru. Radioaktivita zachycena na filtrech byla změřena scintilačním detektorem. Pro určení vazebných parametrů byla data analyzována pomocí programu GraphPad (PRISM, GraphPad Software Inc.; San Diego, Calif.). Afinita GTPγS vazebných míst byla počítána z kompetitivních vytěšňovacích křivek (5.10⁻⁶ - 1.10⁻¹⁰ M GTPγS) aplikací výpočtu podle DeBlasiho (*DeBlasi a kol., 1989*).

Stanovení vazby [³H]forskolinu na adenylylcyklázu

Vysokoafinní vazebná místa [³H]forskolinu v membránách mozkové kůry nezralých a dospělých potkanů byla stanovena, jak bylo popsáno dříve (*Nelson a Seamon, 1986*). Membránová suspenze byla naředěna 50mM Tris pufru (pH 7.4) na koncentraci proteinů 2 mg/ml. Reakční směs (konečný objem 0,4 ml) obsahovala 200 µg proteinů membrán mozkové kůry, 50mM Tris-HCl pufr (pH 7,4), 10mM MgCl₂ (jestli nebylo uvedeno jinak), 5mM cytochalasin B a 20nM [³H]forskolin (okolo 6x10⁵ dpm/vzorek). Inkubace byla provedena při 20 °C po 60 min buď bez žádných dalších přidavných látek nebo v přítomnosti AlF₄⁻ (10 mM NaF and 1 mM AlCl₃) nebo Gpp(NH)p (1×10⁻⁷ – 1×10⁻⁴ M). Stanovení bylo ukončeno přidáním 4 ml ledově studeného TM pufru (50mM Tris, 10mM MgCl₂; pH 7,4) a rychlou filtrací přes Whatman GF/C filtry pomocí Brandel cell harvesteru (Gaithersburg, Md.). Zfiltrované vzorky byly opláchnuty ledově studeným TM puftrem (3 promytí 3 ml pufru) od nenavázaného radioligandu a radioaktivita zachycená na filtrech byla stanovena scintilačním detektorem. Specifická vazba [³H]forskolinu byla definována jako pomocí nadbytku neznačeného forskolinu (2×10⁻⁵ M). Nespecifická vazba obvykle byla menší než 35 % celkové vazby [³H]forskolinu. Pro určení vazebných parametrů byla data analyzována pomocí programu GraphPad (PRISM, GraphPad Software Inc.; San Diego, Calif.).

Stanovení aktivity adenylylcyklázy

Aktivita adenylylcyklázy (AC) byla stanovena metodou podle Whita (*White, 1974*). Reakční směs o konečném objemu 0,1 ml obsahovala 30 µg proteinu (membrán mozkové kůry), 50mM Tris-HCl pufr (pH 7,4), 5mM MgCl₂, 50U/ml pyruvát kinázy, 10mM fosfoenolpyruvátu draselného, 160µg/ml BSA, 0,2mM 3-isobutyl-1-methylxanthinu, 20µM GTP, 0,1mM cAMP, 10 000 cpm na vzorek [³H]cAMP a 0,4mM ATP s [³²P]ATP (okolo 1x10⁶ dpm na vzorek). Vedle klasických aktivátorů aktivity AC (forskolinu, Mn²⁺, GTPγS a AlF₄⁻) byly také použity některé další modulátory (dithiotreitol, Fe²⁺, kyselina askorbová, suramin) v koncentracích konkrétně uvedených v detailním popisu jednotlivých experimentů. Před spuštěním reakce, tj. po nepipetování všech komponent kromě izotopu, byly mikrozkušavky preinkubovány po 10 min při 30°C. Vlastní stanovení pak probíhalo po 30 min při 30°C a enzymatická reakce byla ukončena přidáním 0,2 ml 0,5M HCl a zahřátím na 100°C po 5 min. Poté roztok byl neutralizován 0,2 ml 1,5M imidazolem.

Obsah každé mikrozkušavky, tj. výsledných 0,5 ml, byl dán na polypropylenovou kolonu naplněnou 1 ml neutrální aluminy a ústící nad scintilační lahvičku. Následně byly přidány 3 ml vyvíjecího roztoku 10 mM imodazolu, pH 7,6 a vzniklé radioaktivní cyklické AMP bylo separováno od nerozštěpeného $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ pomocí sloupcové eluční chromatografie. Radioaktivita zachycena v scintilačních lahvičkách byla změřena scintilačním detektorem.

Stanovení agonistou stimulované vysokoafinní GTPázové aktivity

GTPázová aktivita membránových vzorků byla určena měřením radioaktivity anorganického fosfátu ^{32}P , uvolněného z $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, jak bylo dříve popsáno (*Fong a kol., 1998; Fong a Milligan, 1999*). Reakční směs o konečném objemu 0,1 ml obsahovala 10 μg proteinu (membrán mozkové kůry), 10mM kreatinfosfát, 0,05 jednotek/ μl kreatin kinázy, 100 μM App(NH)p, 1mM ATP, 1 mM ouabain, 100mM NaCl, 5mM MgCl_2 , 2mM EDTA (pH 7,4), 40mM Tris-HCl pufr (pH 7,4), 0,5 μM GTP, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (okolo 2×10^6 dpm na vzorek). GTPázová aktivita byla stanovena buď bez přítomnosti stimulačního ligandu (bazální aktivita) nebo v přítomnosti 1mM baclofenu (agonistou stimulovaná aktivita) a dále v přítomnosti nebo bez RGS proteinů (0,44 μM). 30min inkubace při 37 °C byla ukončena přidáním 5% aktivního uhlí v 10mM kyselině fosforečné. Po oddělení aktivního uhlí centrifugací (10 000 x g po 20 min) byla radioaktivita ^{32}P změřena scintilačním detektorem. Nespecifická GTPázová aktivita byla určena za přítomnosti 100 μM GTP.

Stanovení peroxidace lipidů

Peroxidace lipidů byla měřena pomocí testu kyseliny thiobarbiturové (TBA) pro formování malondialdehydu (MDA). Toto stanovení bylo s mírnými modifikacemi provedeno podle dříve popsaného protokolu (*Baba a kol., 1981b*). Po přidání určitého množství různých zkoumaných látek (DTT, Fe^{2+} nebo kyseliny askorbové) byla reakční směs (100 μl) pro stanovení aktivity adenylylcyklázy (viz výše) bez ATP inkubována po 40 min při 32 °C. Po ukončení inkubace byly vzorky smíchány se stejným objemem (100 μl) ledově vychlazené 10% kyseliny trichloroctové a centrifugovány při 10,000 rpm po dobu 5 min. Výsledný supernatant (150 μl) byl smíchán s 0,67% TBA (150 μl) a 10 min vařen. Absorbance byla poté změřena při 535 nm. Formování MDA v testovaných vzorcích bylo dopočítáno z kalibrační křivky, která byla získána paralelním měřením standardu (1,1,3,3-tetramethoxypropanu).

Stanovení proteinů

Proteiny byly stanoveny modifikovanou metodou podle Lowryho (*Lowry a kol., 1951*). Alikvot každého vzorku membrán byl naředěn vodou do konečného objemu 500 μ l, který se dále zředil 1,5 ml roztoku A+B+C, jenž je připravován v následujícím poměru: 50 ml A + 1 ml B + 1 ml C a kde jednotlivé složky odpovídají: A = 2% Na₂CO₃ v 0,1N NaOH, B = 2% vlnan sodno-draselný, C = 1% CuSO₄ x 5 H₂O. Po řádném promíchání se roztok nechal reagovat 10 min při laboratorní teplotě a poté bylo přidáno 150 μ l Folin-Ciocalteauva zkoumadla (čerstvě naředěného s H₂O 1:1 objemově) a vše neprodleně promícháno. Přesně po 30 min byla stanovena absorbance při 720 nm. Kalibrační křivka byla měřena paralelně s 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 a 200 μ g proteinového standardu hovězí sérový albumin (BSA). Pro proložení kalibrační křivky byla použita nelineární regresní analýza podle kvadratické rovnice $y=ax^2+bx+c$ a z ní byla interpolována data pro jednotlivé vzorky pomocí programu GraphPad (PRISM, GraphPad Software Inc.; San Diego, Calif.).

Analýza dat

Pokud není uvedeno jinak, všechna data byla získána ze tří nezávislých izolací. Čísla v grafech a tabulkách představují průměr \pm standardní chyba naměřených hodnot z vazebných studií či enzymatických měření. Rozdíly mezi vzorky z nezralých a dospělých zvířat byly vyhodnocovány testem two-way ANOVA s následujícím Bonferroniho srovnávacím post-testem. Data uvnitř každé skupiny byla analyzována testem one-way ANOVA s Dunnettovým srovnávacím post-testem. Uvedené statistické testy byly provedeny v programu GraphPad (PRISM, GraphPad Software Inc.; San Diego, Calif.).

VÝSLEDKY

Plazmatické membrány - vazba [³H]ouabainu

Abychom porovnali množství plazmatických membrán v připravených vzorcích z mozkové kůry potkanů obou věkových skupin, změřili jsme specifickou vazbu [³H]ouabainu, antagonisty transmembránového proteinu Na/K-ATPázy. Počet jeho vazebných míst se signifikantně nelišil mezi vzorky nezralých ($15,6 \pm 2,1$ pmol.mg⁻¹ proteinu) a dospělých ($13,8 \pm 2,7$ pmol.mg⁻¹ proteinu) potkanů.

GABA_B receptory - vazba [³H]CGP54626A

GABA_B receptory v membránách mozkové kůry nezralých a dospělých zvířat byly charakterizovány pomocí vazebných studií s jejich specifickým antagonistou [³H]CGP54626A. Pro saturační vazebné pokusy byla použita koncentrace radioligandu v rozmezí 0,15–25 nM. Nebyly zjištěny žádné signifikantní změny vazebných charakteristik mezi oběma skupinami (**Obr.1**). Počet specifických vazebných míst pro [³H]CGP54626A a jeho afinita k nim se neodlišovaly u nezralých potkanů ($B_{max} = 0,79 \pm 0,22$ pmol.mg⁻¹ proteinu, $K_D = 3,5 \pm 1,3$ nM) od počtu a afinity u dospělých zvířat ($B_{max} = 0,85 \pm 0,20$ pmol.mg⁻¹ proteinu, $K_D = 5,2 \pm 0,6$ nM).

Vysokoafinní GTPázová aktivita

Paralelně k vazebným pokusům byla stanovena na stejných vzorcích vysokoafinní GTPázová aktivita pro srovnání funkčního stavu membrán obou vzorků. GTPázová aktivita v membránách mozkové kůry dospělých potkanů byla signifikantně vyšší než naměřená aktivita v membránách nezralých 12denních potkanů (**Obr.2**). Jak bazální, tak baclofenem stimulovaná GTPázová aktivita byla u 90denních zvířat ve srovnání s 12denními významně zvýšena (o asi 45 %). Baclofen, agonista GABA_B receptoru, zvýšil GTPázovou aktivitu u vzorků mozkové kůry z nezralých zvířat o 57 % a z dospělých o 55 %. Samotný RGS16 neovlivnil bazální GTPázovou aktivitu ani u jedné testovaných membrán, RGS1 neměl žádný účinek na bazální GTPázovou aktivitu u nezralých potkanů, ale u dospělých ji zvýšil (o 33 %). Úroveň baclofenem stimulované GTPázové aktivity byla dále zvýšena (o asi 63 %) přidáním RGS1 u obou typů membrán. Jen velmi malý stimulační efekt byl pozorován v případě RGS16.

Za účelem zjištění případného vlivu endogenních GTPázu aktivujících proteinů (GAP) na GTPázovou aktivitu stimulovanou agonistou byla v obou preparátech GTPázová aktivita měřena při konstantním množství izotopu [³²γP]GTP a zvyšující se koncentraci neradioaktivního GTP v rozmezí 1x10⁻⁹ – 1x10⁻⁶ M pro získání vytěšňovacích křivek. Analýza enzymové kinetiky z obržených dat ukázala, že GABA_B agonista baclofen zvyšoval V_{max} bez ovlivnění K_m pro GTP (směrnice přímky v Eadie-Hofsteeho výnosu dat) (**Obr.3**). Tento rovnoběžný posun v Eadie-Hofsteeho výnosu byl pozorován jak u 12denních, tak 90denních potkanů. Jak bylo popsáno dříve (*Cavalli a kol., 2000; Bahia a kol., 2003*), pro GTPázovou aktivitu stimulovanou agonistou, která je regulovaná pomocí GAP (jako jsou RGS), námi získané kinetické charakteristiky neodpovídají tomuto modelu, možná z důvodu malého množství RGS proteinů obsažených v našich membránách. Zcela jiný pohled se naskytl po přidání exogenních RGS1 a RGS16. V tomto případě baclofenem stimulovaná GTPázová aktivita vykazovala nárůst jak u V_{max} , tak u K_m pro GTP (zvýšený sklon přímky). Tyto výsledky ukazují, že oba exogenní RGS proteiny by mohly působit jako GAP na receptorem aktivované G proteiny, protože vliv na V_{max} a K_m pro GTP jsou popisovanými změnami v těchto charakteristikách při takovém působení (*Cavalli a kol., 2000; Hoffmann a kol., 2001; Cladman a Chidiac, 2002*). Signifikantní nárůst hodnot V_{max} a K_m v přítomnosti RGS1 a RGS16 byl stanoven u obou věkových skupin (**Tab.1**).

Vazba [³H]GTPγS

Souběžná měření vazby [³H]GTPγS ukázala, že vysokoafinní typ vazby radioligandu byl vyšší u membrán mozkové kůry izolovaných z dospělých potkanů než u vzorků z nezralých potkanů (**Obr.4**). Tento rozdíl byl prokázán v případě jak bazální, tak baclofenem stimulované vazby [³H]GTPγS. Relativní zvýšení úrovně vazby baclofenem bylo téměř stejné u obou typů membrán, o 31 % (nezralí) a 28 % (dospělí). Hodnoty K_D , které byly vypočítány z kompetitivních vytěšňovacích křivek pomocí výpočtu podle DeBlasiho (*DeBlasi a kol., 1989*), se významně nelišily mezi vzorky z nezralých (38,6 nM) a dospělých (33,5 nM) zvířat. To ukazuje na nezměněnou afinitu GTPγS vazebné reakce. U obou typů membrán přidání baclofenu indukovalo malý posun vytěšňovací křivky doleva, což naznačuje zvýšení afinity. To se odrazilo v snížení hodnot K_D z 38,6 na 28,2 nM (33,5 na 24,3 nM) u vzorků nezralých (dospělých) zvířat.

Adenylylcyklázová aktivita

Aktivace adenylylcyklázy forskolinem, GTP γ S, AlF $_4^-$ a Mn $^{2+}$

V dalším sledu experimentů na vzorcích membrán mozkové kůry obou věkových skupin byla stanovena aktivita adenylylcyklázy (AC). Nejprve byly změřeny křivky dávka-odpověď pro forskolin a GTP γ S, aby byly nalezeny optimální podmínky pro použití těchto klasických aktivátorů AC aktivity (**Obr.5**). Forskolin a GTP γ S byly poté užívány buď v jejich maximálně stimulujících koncentracích (5×10^{-5} M forskolin a 1×10^{-4} M GTP γ S) a nebo v případě některých pokusů v nižších koncentracích (1×10^{-5} M forskolin a 3×10^{-6} M GTP γ S), aby mohly být sledovány účinky některých dalších modulátorů AC aktivity. AlF $_4^-$ (10mM NaF a 1mM AlCl $_3$) a Mn $^{2+}$ (10mM MnCl $_2$) byly použity pro všechny experimenty v uvedených koncentracích. Za všech podmínek byla AC aktivita v membránách mozkové kůry nezralých potkanů výrazně (přibližně dvakrát) vyšší než ve vzorcích dospělých potkanů.

Vliv dithiotreitolu

Podle dřívějších pozorování redukční činidlo SH skupin dithiotreitol (DTT) může také ovlivňovat aktivitu AC (*Baba a kol., 1981a; Oyama a Kubota, 1991*). Naše předpokusy ukázaly, že DTT neovlivnil bazální aktivitu AC, ale pomohlo zvýšit forskolinem stimulovanou aktivitu tohoto enzymu (data nejsou ukázána). Zesilující efekt DTT byl nicméně detekovatelný pouze v submaximálních koncentracích forskolinu (srovnej **Obr.6A a 6B**). DTT ve své nejúčinnější koncentraci (10 mM) zvýšil forskolinem stimulovanou AC aktivitu přibližně o 37 % v membránách mozkové kůry nezralých potkanů a o 28 % u dospělých zvířat. Kombinace 1×10^{-5} M forskolinu s 10mM DTT dosáhla stejného stimulačního účinku na AC aktivitu, jako bylo dosaženo samotným forskolinem o maximální stimulační koncentraci (5×10^{-5} M). Při nižší koncentraci forskolinu (1×10^{-6} M) se tento maximální stimulační efekt neprojevil, ale přesto aktivita AC byla signifikantně zvýšena (přibližně o 20–30 %) v přítomnosti DTT (**Obr.7**). Mn $^{2+}$ ionty stimulovaná AC aktivita byla zesílena přidáním DTT podobně jako v případě forskolinu (**Obr.6C**). Relativní nárůst AC aktivity vyvolaný DTT byl zhruba o 20 % vyšší v membránách mozkové kůry nezralých potkanů než u vzorků z dospělých zvířat. Naopak AlF $_4^-$ stimulovaná AC aktivita byla DTT poměrně snížena. Podobný pokles (přibližně o 16 %) byl pozorován u preparátů obou věkových skupin. Dále byl analyzován možný vliv

DTT na AC aktivitu stimulovanou GTP γ S, nehydrolyzovatelným analogem GTP. V těchto pokusech DTT signifikantně neovlivnil AC aktivitu stimulovanou ani maximální ani submaximální koncentrací GTP γ S (**Obr.8**).

Vliv Fe²⁺ a kyseliny askorbové

Některé předchozí studie ukázaly, že volné radikály uvolněné Fe²⁺/kyselinou askorbovou mohou změnit funkci transdukčního systému AC v určitých tkáních (*Baba a kol., 1981a; Baba a kol., 1981b; Schimke a kol., 1989; Schimke a kol., 1992*). Naše měření naznačila, že zvýšená koncentrace Fe²⁺ značně redukuje bazální i forskolinem stimulovanou AC aktivitu v membránách mozkové kůry jak nezralých potkanů, tak dospělých (**Obr.9**). Dříve bylo prezentováno, že AC aktivita v synaptické membránové frakci mozku potkana by mohla být potencována lipidovou peroxidací indukovanou některými ionty kovů (včetně Fe²⁺) v přítomnosti DTT (*Baba a kol., 1981a; Baba a kol., 1981b*). Překvapivě jsme v našich pokusech nepozorovali žádný stimulační efekt kterékoli koncentrace Fe²⁺ s DTT (**Obr.10**). Výsledky souběžných stanovení utváření MDA prokázaly, že Fe²⁺ ionty v oblasti mikromolárních koncentrací v přítomnosti zvýšeného množství DTT (nad 1 mM) zjevně vyvolaly lipidovou peroxidaci (**Obr.11**), ale aktivita AC nebyla změněna za těchto podmínek. Značně překvapivé je, že Fe²⁺ ionty při koncentraci 1x10⁻⁴ M vcelku zřetelně vyvolaly nárůst utváření MDA, které bylo zcela zastaveno přidáním 5mM DTT (**Obr.11A**). Navíc DTT výrazně zmenšil negativní efekt zvýšené koncentrace Fe²⁺ iontů na AC aktivitu. Zatímco 0,1mM Fe²⁺ snížilo bazální AC aktivitu přibližně o 67 %, aktivita enzymu poklesla pouze o 16 % v přítomnosti 5mM DTT (srovnej **Obr.9** a **Obr.10**). V následujících experimentech jsme hodnotili předpokládanou úlohu kyseliny askorbové v modulaci AC aktivity. Navzdory našim očekáváním, kyselina askorbová při nižších koncentracích (až do 1 mM) neovlivnila ani bazální ani forskolinem stimulovanou AC aktivitu a ve vysokých koncentracích silně snížila aktivitu AC v membránových vzorcích obou věkových skupin (**Obr.12**). Kyselina askorbová při optimální koncentraci (přibližně 1x10⁻⁵ – 1x10⁻⁴ M) byla rovněž účinná pro vyvolání lipidové peroxidace v membránách mozkové kůry nezralých i dospělých potkanů (**Obr.11C**).

Vliv suraminu

Suramin, polysulfonovaná naftylurea, může pravděpodobně vyvolávat různé biologické odezvy. Vedle ostatních je známo přímé působení na G proteinovou α podjednotku a

blokování její aktivace inhibicí výměny GDP za GTP (*Butler a kol., 1988; Beindl a kol., 1996; Freissmuth a kol., 1996*). V našich studiích jsme se rozhodli vyzkoušet tohoto potenciálního antagonistu G proteinů pro jeho možný modulační vliv na AC aktivitu. Vcelku neočekávaně suramin vyvolal zřetelný inhibiční efekt jak na bazální, tak na různě stimulovanou AC aktivitu a jeho vyšší koncentrace (nad 1×10^{-4} M) zcela anulovaly tuto enzymovou aktivitu (**Obr.13**). Vysloveně negativní účinek se projevoval ve stejném rozsahu v membránách mozkové kůry nezralých i dospělých potkanů. IC_{50} suraminu (přibližně 3×10^{-5} M) bylo prakticky stejné jak pro bazální, tak přímo (Mn^{2+}) stimulovanou AC aktivitu, stejně tak pro enzymovou aktivitu stimulovanou G proteiny (AlF_4^-) nebo stimulovanou přímo i G proteiny (forskolin), proto by suramin mohl být považován za přímý inhibitor katalytické podjednotky AC. Tato domněnka byla potvrzena následnými experimenty s plazmatickými membránami získaných z S49 cyc^- lymfomových buněk s nedostatkem $G_s\alpha$ proteinu (*Ross a kol., 1978*). **Obr.14** ukazuje, že suramin (1×10^{-4} M) značně redukoval AC aktivitu v cyc^- membránách stimulovanou buď Mn^{2+} nebo forskolinem na hodnoty korespondující s bazální enzymovou aktivitou, která se přibližuje nule.

Vliv fosforylace

Abychom našli možné změny v regulaci AC aktivity v preparátech mozkové kůry z nezralých a dospělých potkanů, zaměřili jsme se také na možnou modulační funkci fosforylace. Je známo, že některé typy AC vyšších organismů mohou být regulovány proteinovými kinázami (*El-Mowafy a White, 1998; Patel a kol., 2001; Tan a kol., 2001*). Postranlační fosforylační modifikace AC mohou buď stimulovat nebo inhibivovat enzymovou aktivitu. Proto jsme se zajímali o posouzení případného vlivu AC fosforylace katalyzované proteinkinázou C (PKC) a stejně tak protein tyrosinovými kinázami (PTK). Pro tento účel byly použity jako účinné aktivátory forbol myristát acetát (PMA) pro PKC a pervanadát (PV) pro PTK (*Patrizio a kol., 1997; Tan a kol., 1999*). Stanovili jsme jak bazální, tak forskolinem nebo AlF_4^- stimulovanou AC aktivitu v homogenátech mozkové kůry obou věkových skupin. Testované vzorky byly buď kontrolní, tedy bez inkubace s PMA či PV, a nebo byly inkubovány v jejich přítomnosti za účelem dosažení žádaného typu fosforylace. Jak je vidět na **Obr.15**, inkubace homogenátů mozkové kůry s proteinkinázovými aktivátory zřejmě neovlivnila AC aktivitu, protože nebyla signifikantně změněna ani při jedněch experimentálních podmínkách.

Vazba [³H]forskolinu

Přímé a kompetitivní vazebné studie

Další sled experimentů byl soustředěn na stanovení specifických vysokoafinních vazebných míst pro [³H]forskolin v membránách mozkové kůry nezralých a dospělých potkanů. Na **Obr.16** je ukázána reprezentativní saturační izoterma pro vazbu [³H]forskolinu v těchto membránách, která byla měřena v přítomnosti 10mM MgCl₂. Zaoblený průběh křivky u Scatchardova výnosu získaných dat (vložené grafy v **Obr.16A,B**) indikuje možný výskyt dvou tříd vazebných míst jak u nezralých, tak i dospělých zvířat. Nicméně vazebné parametry se výrazně lišily u těchto dvou typů preparátů (**Tab.2**). Membrány mozkové kůry nezralých potkanů obsahovaly nižší počet vysokoafinních vazebných míst [³H]forskolinu ($B_{max} = 200 \text{ pmol.mg}^{-1}$ proteinu) než membrány dospělých jedinců ($B_{max} = 296 \text{ pmol.mg}^{-1}$ proteinu), avšak afinita těchto míst byla zřetelně vyšší u nezralých ($K_D = 33 \text{ nM}$) oproti dospělým zvířatům ($K_D = 136 \text{ nM}$). Vedle těchto vysokoafinních vazebných míst bylo detekováno ještě malé množství super-vysokoafinních vazebných míst [³H]forskolinu u obou věkových skupin, ale jejich charakteristiky se vzájemně výrazně neodlišovaly (**Tab.2**). Oba typy vazebných míst [³H]forskolinu byly zachovány, i při provedení měření v přítomnosti AlF₄⁻. V tomto případě se počet vysokoafinních vazebných míst [³H]forskolinu v membránách mozkové kůry nezralých potkanů zvýšil přibližně o 75 %, a to na podobnou úroveň jaká byla stanovena u dospělých zvířat (**Obr.17, Tab.2**). Zatímco hodnoty K_D nebyly výrazně ovlivněny přítomností AlF₄⁻, tak na druhou stranu tento aktivátor značně zvýšil (přibližně 20krát) počet detekovaných super-vysokoafinních vazebných míst [³H]forskolinu ve vzorcích obou věkových souborů (**Tab.2**).

Následující kompetitivní vazebný experiment s neznačeným forskolinem jako kompetitorem neodhalil žádné větší rozdíly mezi membránovými vzorky obou věkových skupin, kromě vyšších hodnot vazby [³H]forskolinu u membrán nezralých potkanů dosažených při konstantní koncentraci (20 nM) radioligandu (**Obr.18**). Vypočítané disociační konstanty (K_i) pro neznačený forskolin byly $87 \pm 27 \text{ nM}$ u preparátů z nezralých a $98 \pm 19 \text{ nM}$ u vzorků z dospělých potkanů. Hodnoty K_i se zdají být poměrně velmi blízké hodnotám K_D , které byly stanovené přímými vazebnými studiemi.

Vliv Mg^{2+} iontů a Gpp(NH)p

Již dříve bylo ukázáno, že Mg^{2+} ionty hrají významnou roli ve vazbě [3H]forskolinu (Seamon a kol., 1984; Nelson a Seamon, 1986). Zvýšená koncentrace Mg^{2+} je obzvláště důležitá pro efektivní zvýšení vazby [3H]forskolinu fluoridem sodným nebo analogy GTP. Stanovili jsme vliv zvyšující se koncentrace Mg^{2+} na vazbu [3H]forskolinu stimulovanou malou (1×10^{-7} M) a vysokou (1×10^{-4} M) koncentrací Gpp(NH)p (Obr.19). Vazba [3H]forskolinu byla velmi nízká v nepřítomnosti Mg^{2+} iontů a dosahovala v membránách mozkové kůry okolo 40 fmol.mg⁻¹ proteinu u nezralých a 20 fmol.mg⁻¹ proteinu u dospělých potkanů. Přidáním $MgCl_2$ (10mM nebo 100mM) se zvýšily „bazální“ hodnoty vazby [3H]forskolinu na membrány z nezralých potkanů o 37 % a o 131 % na membrány z dospělých zvířat (Obr.20). Vyšší koncentrace Mg^{2+} iontů nezměnila signifikantně výši vazby [3H]forskolinu (data nejsou ukázána). Gpp(NH)p, nehydrolyzovatelný analog GTP, umožnil další zvýšení úrovně vazby [3H]forskolinu, ale tohoto efektu bylo dosaženo jen v přítomnosti vyšších koncentrací Mg^{2+} iontů (> 100 mM). Podobné účinky byly pozorovány u preparátů z mozkové kůry obou věkových skupin (Obr.19).

Křivky dávka-odpověď pro Gpp(NH)p (1×10^{-7} – 1×10^{-4} M) nám umožnily odhalit jisté rozdíly mezi vzorky z nezralých a dospělých zvířat (Obr.20). Jak je poznamenáno výše, vazba [3H]forskolinu stanovená v přítomnosti Mg^{2+} iontů byla signifikantně vyšší u vzorků z nezralých (přibližně 55 fmol.mg⁻¹ proteinu) oproti dospělým potkanům (přibližně 40 fmol.mg⁻¹ proteinu). Jak nízké (1×10^{-7} M), tak vysoké (1×10^{-4} M) koncentrace Gpp(NH)p zřetelně zvýšily vazbu [3H]forskolinu na membrány mozkové kůry z nezralých zvířat na maximální hodnoty (přibližně 80 fmol.mg⁻¹ proteinu), naopak u vzorků z dospělých potkanů bylo dosaženo maximální úrovně vazby [3H]forskolinu jen v případě přidání vysokých koncentrací Gpp(NH)p (> 1×10^{-5} M). Gpp(NH)p neovlivnilo vazbu [3H]forskolinu na vzorky ani jedné věkové skupiny v přítomnosti 10mM $MgCl_2$.

Vliv AlF_4^- , isoprenalinu a baclofenu

Zhodnocení účinku AlF_4^- (10mM NaF a 1mM $AlCl_3$) ukázalo, že tento klasický aktivátor G proteinů (v přítomnosti 100mM $MgCl_2$) umožnil zvýšení vazby [3H]forskolinu na membrány mozkové kůry o 67 % z nezralých a o 124 % z dospělých potkanů (Obr.21). AlF_4^- indukované zvýšení úrovně vazby [3H]forskolinu (přibližně na 90 fmol.mg⁻¹ proteinu) bylo srovnatelné u vzorků obou věkových skupin a dokonce bylo o něco vyšší než vyvolané přidáním Gpp(NH)p v maximálně účinné koncentraci (přibližně 80 fmol.mg⁻¹ proteinu).

Další část experimentů byla zaměřena na modulaci vazby [³H]forskolinu zvýšené Gpp(NH)p, a to pomocí agonistů receptorů spřažených buď s G_s nebo G_i/G_o proteiny. Pro tyto účely byly použity isoprenalin – agonista β-adrenergických receptorů a baclofen – agonista GABA_B receptorů. **Obr.21** ukazuje, že vazba [³H]forskolinu zvýšená Gpp(NH)p (1×10^{-7} M) nebyla signifikantně změněna v obou preparátech ani přidáním isoprenalinu (1×10^{-5} M) ani baclofenu (1×10^{-3} M).

Vliv suraminu

Dále jsme se zabývali možným vlivem suraminu na vazebné charakteristiky [³H]forskolinu. Tato látka je známa schopností ovlivnit funkci G proteinů (*Butler a kol., 1988; Beindl a kol., 1996*), avšak naše předchozí pozorování nasvědčují také tomu, že může působit jako přímý inhibitor adenylycyklázové aktivity (*Stöhr a kol., 2005a*). Naše předběžné pokusy naznačily, že tato látka by mohla silně inhibovat vazbu [³H]forskolinu (**Obr.21**). Proto jsme provedli kompletní kompetitivní vazebné studie na membránách mozkové kůry obou věkových skupin (**Obr.22**). Tyto studie ukázaly, že suramin dosti účinně inhiboval vazbu [³H]forskolinu, s hodnotou K_i okolo 5 μM ve vzorcích membrán nezralých i dospělých potkanů. Strmost kompetitivních vazebných křivek byla charakterizována faktorem sklonu křivky (Hillův koeficient), který byl $0,88 \pm 0,05$ u preparátů z nezralých a $0,85 \pm 0,08$ z dospělých zvířat. Tato data (Hillův koeficient vypočítaný z dat kompetitivních vazebných studií jako blízký hodnotě 1,0) naznačují, že suramin by mohl být považován za kompetitivní inhibitor vazby [³H]forskolinu.

DISKUZE

Jednotlivé soubory experimentů zaměřené více či méně na jednotlivé části systému receptor – G protein – adenylylcykláza byly prováděny na preparátech membrán mozkové kůry z nezralých (12denních) a dospělých (90denních) potkanů. Tyto dvě věkové kategorie byly vybrány na základě některých dřívějších studií demonstrujících, že aktivita AC se významně mění během postnatálního vývoje potkaního mozku a zpravidla tato enzymová aktivita dosahuje zřetelného maxima okolo PD 12 a poté rychle klesá na úroveň vyskytující se v dospělosti (*Keshles a Levitzki, 1984; Matsuoka a kol., 1997; Ihnatovych a kol., 2002a*).

Odpověď zprostředkovaná GABA_B receptorem je reprezentativní pro konvenční model receptorem iniciované aktivace G proteinu. Proto určení základních charakteristik GABA_B receptorů pomocí **vazby [³H]CGP54626A** tvořilo úvodní část našich experimentů, které byly primárně zaměřeny na stanovení funkční aktivity G proteinu v membránových frakcích izolovaných z mozkové kůry nezralých a dospělých potkanů. Ontogenetická distribuce metabotropních GABA_B receptorů v mozkové tkáni byla zkoumána v množství dřívějších studií používajících různé experimentální přístupy (*Garant a kol., 1992; Turgeon a Albin, 1994; Malitschek a kol., 1998; Fritschy a kol., 1999; Princivalle a kol., 2000; Hejnova a kol., 2002*). Naše současné nálezy neukázaly žádnou signifikantní změnu v hustotě receptorů v mozkové kůře potkana mezi PD 12 a PD 90 a jsou v podstatě ve shodě s většinou těchto studií.

Pro zhodnocení funkčního spřažení mezi GABA_B receptory a inhibičních G proteinů byl použit baclofen jakožto agonista těchto receptorů. Měření bazální a baclofenem stimulované **vysokoafinní GTPázové aktivity** ukázalo, že obě enzymové aktivity byly velmi zvýšeny ve vzorcích z dospělých potkanů oproti nezralým zvířatům. GTPázová aktivita byla silně stimulována agonistou baclofenem v těchto 3x promytých membránách. Zajímavé je, že čistý přírůstek vysokoafinní GTPázové aktivity vyvolaný baclofenem byl prakticky shodný u obou typů membrán. Toto pozorování podporuje myšlenku, že signalizace zprostředkovaná GABA_B receptorem je již funkční u 12denních potkanů, ale dále se vyvíjí/modifikuje v průběhu další maturace.

Dříve bylo ukázáno, že nárůst vysokoafinní GTPázové aktivity mozku vyvolaný baclofenem opravdu odráží funkční aktivaci heterotrimerních G proteinů spřažených s GABA_B receptory (*Odagaki a kol., 1998*). Agonistou stimulovaná GTPázové aktivity

mozku byla zkoumána v několika dalších studiích (*Wojcik a kol., 1985; Sweeney a Dolphin, 1992; Odagaki a kol., 1995; Odagaki a Fuxe, 1995*), avšak tato zkoumání se týkala GTPázové aktivity stimulované jinými ligandy. Mimoto většina těchto studií se zabývala touto enzymovou aktivitou v jiných regionech než je mozková kůra (*Wojcik a kol., 1985; Sweeney a Dolphin, 1992; Odagaki a kol., 1995; Odagaki a Fuxe, 1995*). Nejsou tedy k dispozici žádné přímé informace o baclofenem vyvolaných změnách vysokoafinní GTPázové aktivity v průběhu postnatálního vývoje mozkové kůry potkana. Zde ukazujeme, že baclofen signifikantně zvýšil GTPázovou aktivitu v preparátech mozkové kůry z nezralých a dospělých potkanů. Naše předchozí měření naznačila, že mezi PD 12 a PD 90 množství $G_i\alpha(1,2)$ proteinů vzrostlo přibližně o 50 % a $G_o\alpha^*$ proteinů asi o 300 % (*Ihnatovych a kol., 2002b*). Vyšší hladiny těchto G proteinů by tedy mohly vysvětlit zvýšenou bazální i agonistou stimulovanou GTPázovou aktivitu u dospělého neokortexu potkana. Nicméně je také možné, že paralelní vzestup pozorovaný nejen u G proteinové aktivity, ale i deaktivace, by mohl být zapříčiněn účastí alternativního substrátu, takovým jako jsou inhibitory výměny guaninových nukleotidů, které působí na G proteiny a možná na GPCR kinázovou/arestinovou aktivitu. Kinetické parametry odvozené z Eadie-Hofsteeho výnosu dat (nezměněné hodnoty K_m) naznačily, že endogenní RGS proteiny zřejmě vůbec nehrají významnou úlohu ve zprostředkování tohoto efektu. Již dříve bylo popsáno, že „paralelní“ posun v Eadie-Hofsteeho výnosu není slučitelný s agonistou stimulovanou GTPázovou aktivitou regulovanou pomocí GTPázu aktivujícího proteinu jako je RGS (*Cavalli a kol., 2000; Bahia a kol., 2003*).

Další část naší práce byla zaměřena na předpokládané působení exogenně přidaných RGS proteinů, jmenovitě RGS1 a RGS16. Tyto dva RGS proteiny byly dříve popsány, že různě ovlivňují agonistou stimulovanou GTPázovou aktivitu v COS-7 buňkách exprimujících α_{2A} -adrenoceptor-G protein fúzní proteiny (*Hoffmann a kol., 2001*). V naší práci jsme využili membrán mozkové kůry, přirozené tkáň obsahující pouze endogenní receptory a G proteiny, pro porovnání účinků dvou blízkých příbuzných RGS proteinů na GTPázovou aktivitu. Zatímco RGS1 silně zvyšoval baclofenem stimulovanou GTPázovou aktivitu ve vzorcích z nezralých i dospělých potkanů, tak u RGS16 nebyl pozorován žádný takový efekt při standardních experimentálních podmínkách. Je zajímavé, že data získaná z analýzy enzymové kinetiky ukázala, že jak RGS1, tak RGS16 ovlivnily GTPázovou aktivitu. Tento zdánlivý rozpor by mohl být nejpravděpodobněji vysvětlitelný na základě mnohem slabšího regulačního potenciálu RGS16 ve srovnání s RGS1. Jako silný aktivátor, RGS1 sám o sobě zvýšil vysokoafinní GTPázu v preparátech z dospělých zvířat. Zřejmě

daleko méně účinný RGS16 byl schopen zvýšit agonistou stimulovanou GTPázovou aktivitu jen v přítomnosti vysokých koncentrací substrátu ($> 5\mu\text{M}$ GTP). A tak tato data poskytují další důkaz, že blízké příbuzné RGS proteiny nemusí fungovat se stejnou efektivitou (Hoffmann a kol., 2001).

Podobně jako vysokoafinní GTPázová aktivita byla vazba $\text{GTP}\gamma\text{S}$ stanovená u dospělých potkanů vyšší než u nezralých zvířat a baclofen zvýšil vazbu $\text{GTP}\gamma\text{S}$ o podobný rozsah v preparátech obou věkových skupin. Tyto výsledky tedy korespondují se zvýšenou GTPázovou aktivitou GTP vazebných proteinů mozkové kůry pozorovanou v dospělosti. Pro výpočet hodnot K_D vazby $\text{GTP}\gamma\text{S}$ v obou zkoumaných membránových preparátech byl využit DeBlasiho algoritmus (DeBlasi a kol., 1989) a vypočítané konstanty neukázaly signifikantní rozdíly mezi nezralými a dospělými potkany. Možná není příliš překvapivé, že hodnoty K_D pro baclofenem stimulovanou vazbu $\text{GTP}\gamma\text{S}$ byly o trochu nižší ve srovnání s kontrolními podmínkami, což pravděpodobně odráží pozitivní efekt agonistou podporovaného spřažení GABA_B receptorů se svými G proteiny.

V dalším sledu pokusů jsme se snažili důkladně porovnat **aktivitu adenylylcyklázy** v membránách mozkové kůry z nezralých a dospělých potkanů. Naše výsledky ukazují, že AC aktivita byla vždy výrazně (přibližně dvakrát) vyšší v preparátech mozkové kůry z nezralých potkanů než z dospělých zvířat. Nicméně některé zajímavé rozdíly bylo možno pozorovat v schopnosti různých aktivátorů stimulovat enzymovou aktivitu v obou typech testovaných vzorků, obzvláště když byla modulována přidáním dithiotreitolu (DTT) do reakční směsi. Zatímco samotný DTT signifikantně neovlivnil bazální aktivitu AC, enzymová aktivita stimulovaná forskolinem či Mn^{2+} byla značně zvýšena vysokými koncentracemi (přes 1 mM) této látky. Tento potenciační účinek DTT byl detekovatelný jen při použití submaximálních stimulačních koncentrací forskolinu, avšak DTT nebyl schopen dalšího zvýšení AC aktivity stimulované maximálně efektivní dávkou forskolinu. DTT byl o něco efektivnější v uplatňování tohoto pozitivního efektu na AC aktivitu u vzorků z nezralých potkanů než z dospělých jedinců. Zajímavé je, že DTT neovlivnil AC aktivitu stimulovanou $\text{GTP}\gamma\text{S}$ a o něco snížilo AC aktivitu stimulovanou AlF_4^- , a to u vzorků obou věkových skupin. Tyto výsledky naznačují, že DTT může zvýšit aktivitu AC, když je stimulovaná přímo (forskolinem nebo Mn^{2+}). Naproti tomu nedostatečně zřetelný vliv DTT na AC aktivitu stimulovanou G proteiny (G_s) naznačuje, že tato látka zřejmě silně neovlivňuje funkci těchto regulačních proteinů a jejich interakci s AC. Naše výsledky

nepřímého efektu na bazální aktivitu AC jsou v souladu s některými dříve publikovanými pozorováními (*Baba a kol., 1981a; Suen a kol., 1982*). Na druhou stranu Ozawa a kolegové detekovali jisté zvýšení v bazální AC aktivitě po preinkubaci thyroïdních membrán s DTT (*Ozawa a kol., 1979*). Pozitivně modulační úloha DTT na AC aktivitu stimulovanou forskolinem nebo Mn^{2+} nebyla dosud zaznamenána. Bylo však ukázáno, že DTT může částečně zabraňovat některým inhibitorům P-místa v inaktivaci AC (*Skurat a kol., 1985*). Podobně Lin a kolegové pozorovali, že inhibici enzymové aktivity způsobenou nízkými koncentracemi (≤ 0.1 mM) organických sloučenin rtuti lze zvrátit přidáním DTT (*Lin a kol., 1980*). Toto je ve shodě s našimi výsledky, kde DTT byl schopen znatelně redukovat negativní efekt zvýšených koncentrací Fe^{2+} na AC aktivitu. Tyto výsledky naznačují, že zabránění v oxidaci $-SH$ skupin enzymu by zřejmě mohlo být velmi důležité pro správnou funkci AC.

Dále jsme zkoušeli možný efekt různých koncentrací Fe^{2+} iontů na bazální a forskolinem stimulovanou AC aktivitu. Zvýšené množství Fe^{2+} (přes 10 μM) snížilo AC aktivitu podobným způsobem v membránách mozkové kůry z nezralých i dospělých zvířat. Jak bylo zmíněno výše, tento negativní efekt byl značně zmírněn v přítomnosti DTT. Nicméně ani kombinace Fe^{2+} s DTT neměla stimulační efekt na enzymovou aktivitu, přestože za některých testovaných podmínek probíhala lipidová peroxidace. Naše výsledky tedy neukazují žádný vztah mezi aktivitou AC a množstvím obklopujících peroxidů lipidů. To je trochu překvapivé, protože Baba a spolupracovníci již dříve informovali, že AC aktivita v synaptické membránové frakci mozku potkana byla selektivně aktivována stimulací peroxidace (*Baba a kol., 1981a; Baba a kol., 1981b*). Krátký přechodný vzestup v aktivitě AC byl také vyvolán lipidovou peroxidací v sarkolemálních membránách, který byl následován poklesem enzymové aktivity (*Schimke a kol., 1992*). Avšak v našich experimentálních podmínkách AC aktivita nebyla dokonce ovlivněna ani lipidovou peroxidací vyvolanou optimálními koncentracemi kyseliny askorbové. Naproti tomu vyšší koncentrace kyseliny askorbové značně redukovaly enzymovou aktivitu. Všechna tato pozorování jsou v souladu s dříve publikovanými daty (*Murphy, 1985; Murphy, 1986*), kde nebyla pozorována stimulace AC v neuroblastomálních buňkách vystavených Fe^{2+}/DTT . Kromě toho byla lipidová peroxidace spojována s redukcí AC aktivity (*Murphy, 1985*). Podobně Shin a spolupracovníci uvádějí, že AC aktivita je zmenšená aldehydickými produkty lipidové peroxidace v GH_4C_1 buňkách (*Shin a kol., 2003*). Tato pozorování jsou v rámci představ o celkově škodlivých účincích reaktivních oxidů a peroxidace na transmembránovou signalizaci.

V další řadě pokusů jsme měli v úmyslu otestovat možnost, že vyšší AC aktivita stanovená v preparátech mozkové kůry z nezralých potkanů oproti vzorkům z dospělých zvířat by třeba mohla být v nějakém vztahu k enzymatické interakci s G proteiny. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli využít suraminu jako známého blokátoru G proteinové funkce (inhibice GDP/GTP výměny) a zkusili otestovat tuto látku pro předpokládaný modulační efekt na AC aktivitu. Vcelku překvapivě suramin neinhiboval pouze AC aktivitu stimulovanou G proteiny, ale byl vysoce účinný ve snižování bazální, jakož i forskolinem nebo Mn^{2+} stimulované enzymové aktivity. Podobná inhibice byla zjištěna v preparátech mozkové kůry z obou věkových skupin. Tato pozorování naznačila, že suramin pravděpodobně funguje jako přímý inhibitor katalytické podjednotky AC. Další důkaz ve prospěch této domněnky přineslo měření vlivu suraminu na AC aktivitu v plazmatických membránách získaných z S49 cyc^- buněk. Přidání suraminu k těmto membránám, které mají nedostatek $G_s\alpha$ proteinu (*Ross a kol., 1978*), zcela zrušilo stimulační účinek Mn^{2+} a forskolinu na AC aktivitu.

Vedle vysoké schopnosti suraminu blokovat G proteinovou funkci (*Butler a kol., 1988; Beindl a kol., 1996; Freissmuth a kol., 1996*), mnoho předchozích studií prokázalo jeho schopnost bránit vazbě některým růstovým faktorům ke svým buněčným receptorům (*Coffey a kol., 1987; Mills a kol., 1990; Minniti a kol., 1992*). Mimoto suramin byl také identifikován jako látka silně interferující se signálními transdukčními dráhami prostřednictvím inhibice proteinkinázy C (PKC) a syntézy fosfoinositidů (*Hensey a kol., 1989; Kopp a Pfeiffer, 1990; Mahoney a kol., 1990*). Přesto je jen málo informací k dispozici o možném vztahu mezi suraminem a AC. Již dříve bylo pozorováno, že suramin jako antagonist P_2 -purinoceptoru dokázal zmírnit ATP nebo UTP zprostředkovanou inhibici forskolinem stimulované cAMP akumulace v pěstovaných mesangiálních buňkách (*Schulze-Lohoff a kol., 1995*). Podobně suramin v koncentračně závislém množství snižoval ADP indukovanou inhibici PGE_1 stimulované cAMP akumulace v lidských krevních destičkách (*Hall a Hourani, 1994*). Samotný suramin však neměl žádný signifikantní efekt na bazální hladinu intracelulárního cAMP a měl schopnost inhibovat akumulaci cAMP indukovanou submaximálními koncentracemi PGE_1 (*Hall a Hourani, 1994*). Naopak Lopez-Lopez a spolupracovníci zaznamenali, že přidání suraminu k buněčné linii rakoviny prsu MCF-7 vedlo k rychlému a signifikantnímu zvýšení AC aktivity (zvýšení intracelulárního množství cAMP), avšak tento efekt již nebyl pozorován u buněčné linie rakoviny prostaty PC3 (*Lopez-Lopez a kol., 1994*). Výsledky mnoha předchozích experimentů ukazují suramin jako látku způsobující různé poruchy v buněčné

signalizaci zahrnující různorodé efekty na cAMP metabolismus. Naše údaje přinášejí nový důkaz o přímé interakci suraminu s AC a naznačují, že tato látka by neměla být považována pouze za silný inhibitor G proteinů a PKC, ale i AC aktivity.

Jako poslední krok zkoumající důvod značně odlišné aktivity AC mozkové kůry z nezralých a dospělých potkanů jsme učinili stanovení možného modulačního efektu fosforylace. V preparátech mozkové kůry z obou věkových skupin byla stanovena jak bazální tak forskolinem nebo AlF_4^- stimulovaná AC aktivita. Na rozdíl od kontrolních vzorků byl k ostatním zkumavkám za účelem vyvolání požadované fosforylace přidán před měřením AC aktivity buď aktivátor forbol myristát acetát (PMA) pro PKC nebo pervanadát (PV) pro PTK (*Patrizio a kol., 1997; Tan a kol., 1999*). Nicméně po aktivaci těchto proteinových kináz jsme u vzorků nenalezli žádné signifikantní rozdíly v AC aktivitě. Dříve bylo pozorováno, že posttranslační modifikace některých typů AC fosforylací může buď stimulovat nebo inhibovat enzymovou aktivitu (*El-Mowafy a White, 1998; Patel a kol., 2001; Tan a kol., 2001*). Zatímco AC2 a AC7 mohou být stimulovány PKC (*Jacobowitz a Iyengar, 1994; Watson a kol., 1994*), tak AC4 a AC6 se zdají být inhibovány fosforylací zprostředkovanou PKC (*Zimmermann a Taussig, 1996; Lai a kol., 1999*). Některé *in vitro* experimenty naznačily, že PKC by mohla zvyšovat aktivitu AC5 (*Kawabe a kol., 1994*). Avšak přidání forbolesterů k buňkám signifikantně nezměnilo AC5 aktivitu a je stále nejasné zda v intaktních buňkách je či není aktivita tohoto typu AC měněna PCK (*Jacobowitz a kol., 1993*). Poslední studie ukázaly, že AC aktivita je také regulovaná receptorovými i nereceptorovými tyrosinkinázami a byl popsán jak stimulační, tak inhibiční efekt zprostředkovaný PTK (*Hadcock a kol., 1992; Valiquette a kol., 1995; Tan a kol., 1999; Tan a kol., 2001*). Jak bylo zmíněno výše, ani jeden proteinkinázový aktivátor, který byl přidán k homogenátům mozkové kůry, signifikantně neovlivnil AC aktivitu za našich experimentálních podmínek. Z tohoto důvodu by se dalo předpokládat, že případně rozdílné účinky fosforylace jsou více či méně vyrovnané na úrovni celkové aktivity AC mozkové kůry.

V další části naší studie jsme se snažili stanovit a porovnat vazebné parametry pro vazbu [3H]forskolinu v membránách mozkové kůry z nezralých a dospělých potkanů. Vysokoafinní vazebná místa pro forskolin byla identifikována v různých tkáních, zvláště v membránách z mozku a krevních destiček (*Seamon a kol., 1984; Gehlert a kol., 1985; Nelson a Seamon, 1985; Seamon a Daly, 1985; Jackman a Bobik, 1986; Nelson a Seamon,*

1986; Ross a kol., 1993). Malá pozornost byla však věnována možným změnám ve vazbě forskolinu během ontogenetického vývoje.

Naše analýzy naznačily, že pro vyhodnocování vazebných dat získaných ze standardních saturačních studií vazby [³H]forskolinu je vhodnější model pro dvě vazebná místa než jednovazebný model. Tímto způsobem jsme byli schopni rozlišit vysokoafinní a super-vysokoafinní vazebná místa v membránách mozkové kůry z nezralých i dospělých potkanů. Zatímco celkový počet běžných vysokoafinních míst byl vyšší (přibližně o 50%) u vzorků z dospělých zvířat oproti nezralým potkanům, tak afinita těchto míst byla mnohem nižší (přibližně 4krát) v dospělosti. Počet a afinita vysokoafinních [³H]forskolinu vazebných míst stanovená v našich preparátech vcelku dobře korespondovala s některými dříve publikovanými daty. V nich byly popsány následující vazebné parametry vazby [³H]forskolinu na membrány mozku potkana: $B_{\max} \approx 400$ fmol/mg a $K_D \approx 26$ nM (Seamon a kol., 1984), $B_{\max} \approx 200$ fmol/mg a $K_D \approx 15$ nM (Seamon a kol., 1985), $B_{\max} \approx 102$ fmol/mg a $K_D \approx 42$ nM (Gehlert a kol., 1985), $B_{\max} \approx 408$ fmol/mg a $K_D \approx 31$ nM (Odagaki a kol., 1991).

Vedle těchto vysokoafinních vazebných míst jsme byli schopni detekovat malé množství super-vysokoafinních vazebných míst pro [³H]forskolin v membránových preparátech obou testovaných věkových skupin, avšak jejich charakteristiky se navzájem výrazně nelišily (Tab.2). Překvapivě super-vysokoafinní vazebná místa pro [³H]forskolin nebyla na mozku ani jiné tkáni dosud popsána. Existují dvě možná vysvětlení pro naše úspěšné odhalení tohoto typu vazebných míst [³H]forskolinu. V našem případě jsme používali relativně malá množství proteinu (přibližně 200 µg na vzorek) ve srovnání s většinou dřívějších studií užívajících okolo 1 mg proteinu na zkumavku. Je pravděpodobné, že celý proces vazby [³H]forskolinu by mohl být ovlivněn těmito podmínkami alespoň do jisté míry. Druhým faktorem, který by mohl do určité výše ovlivnit výsledek našich vazebných experimentů s [³H]forskolinem, byl samotný proces přípravy vzorků. Naše membrány mozkové kůry byly třikrát promyty před následným použitím ve studiích. Tento krok by mohl mít zásadní význam pro odstranění nějakého endogenního ligandu (nebo ligandů), který mimo jiné mohl bránit vazbě [³H]forskolinu ke svému super-vysokoafinním vazebným místům.

Je velmi zajímavé, že oba typy vazebných míst [³H]forskolinu byly zřetelně detekovatelné dokonce i v přítomnosti G proteinového aktivátoru AlF_4^- . Zatímco AlF_4^- signifikantně neovlivnil množství vysokoafinních míst [³H]forskolinu v membránách

mozkové kůry z dospělých potkanů, počet těchto míst u nezralých zvířat se výrazně zvýšil a přiblížil se úrovni zjištěné v membránách z druhé věkové skupiny. Mimoto AlF_4^- enormně zvýšil počet super-vysokoafinních vazebných míst $[^3\text{H}]$ forskolinu ve vzorcích z obou věkových souborů, a to v podobné míře. Schopnost aktivovaných G proteinů zvyšovat vazbu $[^3\text{H}]$ forskolinu byla v minulosti popsána (*Seamon a kol., 1985; Gehlert, 1986; Goldman a kol., 1988*), ale přesný základní molekulární mechanismus není dosud zcela jasný. Dalo by se spekulovat, že interakce aktivovaného G_s proteinu s AC pozmění konformaci enzymu, který je poté lépe přístupný molekulám forskolinu. Tato představa je podporována pozorováním, že aktivita AC je mnohem efektivněji zesílena při nízkých koncentracích forskolinu v přítomnosti aktivovaného G_s proteinu než samotným forskolinem (*Daly a kol., 1982; Seamon a Daly, 1985*). Interakce G_s proteinu s AC zřejmě upřednostňuje nejen substrátovou katalýzu na aktivním místě, ale i vazbu forskolinu na pseudoaktivní místo enzymu (*Dessauer a kol., 1998*). Již dříve bylo předpokládáno, že vysokoafinní vazebná místa pro forskolin by mohla korespondovat s ternárním komplexem AC katalytické podjednotky, G_s proteinu a forskolinu (*Alousi a kol., 1991; Post a kol., 1995*).

V další řadě experimentů jsme podrobněji analyzovali vliv různých koncentrací Mg^{2+} iontů a Gpp(NH)p na specifickou vazbu $[^3\text{H}]$ forskolinu na membrány mozkové kůry. Podle očekávání přidání Mg^{2+} výrazně zvýšilo vazbu $[^3\text{H}]$ forskolinu u obou typů testovaných membrán, ale ta zůstala stále vyšší v preparátech z nezralých potkanů oproti dospělým. Již dříve bylo ukázáno, že Gpp(NH)p může podporovat vazbu $[^3\text{H}]$ forskolinu a bylo zjištěno, že Mg^{2+} ionty jsou esenciální pro tento efekt. Zatímco někteří badatelé uváděli, že Gpp(NH)p může zvýšit vazbu $[^3\text{H}]$ forskolinu v přítomnosti 5mM MgCl_2 (*Nelson a Seamon, 1985; Seamon a kol., 1985*), jiní pozorovali, že jsou třeba mnohem vyšší (100 mM) Mg^{2+} koncentrace (*Odagaki a kol., 1991*). Za našich experimentálních podmínek Gpp(NH)p zřetelně zvyšoval vazbu $[^3\text{H}]$ forskolinu, ale tento efekt se projevil jen při vysokých koncentracích Mg^{2+} (≥ 100 mM). Dále jsme zaznamenali rozdílnou schopnost Gpp(NH)p podporovat vazbu $[^3\text{H}]$ forskolinu ve vzorcích z nezralých a dospělých potkanů. Zatímco vazba $[^3\text{H}]$ forskolinu membránách mozkové kůry z nezralých potkanů byla maximálně zvýšena již při přidání malého množství Gpp(NH)p ($1 \cdot 10^{-7}$ M), mnohem vyšší koncentrace ($\geq 1 \cdot 10^{-5}$ M) tohoto nehydrolyzovatelného GTP analogu bylo třeba pro maximální zvýšení vazby v preparátech z dospělých zvířat. Tato data mohou naznačovat, že efektivita spřažení stimulačního G_s proteinu s AC je nižší u vzorků z dospělých zvířat na rozdíl od nezralých.

Inspirováni prací Nelsona a Seamona (1986), kteří pozorovali v membránách krevních destiček zřetelný stimulační účinek PGE₁ a PGD₂ na vazbu [³H]forskolinu zesílenou Gpp(NH), jsme měli v úmyslu stanovit předpokládaný efekt agonisty β-adrenergního receptoru – isoprenalinu a agonisty GABA_B receptoru – baclofenu na vazbu [³H]forskolinu. Přestože jsme přidali isoprenalin (1.10⁻⁵ M) a baclofen (1.10⁻³ M) do inkubační směsi v jejich maximálně účinných koncentracích běžně užívaných při měřeních AC aktivity (*Ihnatovych a kol., 2002a*), ani jedna z těchto látek signifikantně nezměnila vazbu [³H]forskolinu stanovenou v přítomnosti 1.10⁻⁷ M Gpp(NH)p. Je zajímavé, že v minulosti byl isoprenalin prezentován jako zvyšující vazbu [³H]forskolinu v S49 lymfomových buňkách, ale tyto pokusy byly prováděny na pěstovaných buněčných kulturách a ne na izolovaných membránách (*Alousi a kol., 1991; Post a kol., 1996*). Naproti tomu isoprenalin signifikantně neovlivnil vazbu [³H]forskolinu v srdečních myocytech, ačkoli tento agonista a forskolin vykazovaly v těchto buňkách zřetelný synergistický efekt na produkci cAMP (*Post a kol., 1995*). Námi získaná data neukazující žádný detekovatelný účinek isoprenalinu a baclofenu naznačují, že vazba [³H]forskolinu na membrány mozkové kůry nemá tendenci být modulována těmito dvěma agonisty, ačkoli jejich schopnost ovlivnit AC aktivitu byla demonstrována v tomto typu vzorků (*Ihnatovych a kol., 2002a*). Rovněž Odagaki a spolupracovníci nepozorovali žádný efekt isoprenalinu na vazbu [³H]forskolinu v tkáni mozku potkana (*Odagaki a kol., 1991*).

Na základě našich předcházejících studií, kde jsme identifikovali suramin jako přímý inhibitor AC aktivity (*Stöhr a kol., 2005a*), jsme se rozhodli tuto látku otestovat pro její pravděpodobnou schopnost interferovat s vazbou [³H]forskolinu. Kompetitivní vazebné studie provedené na membránách mozkové kůry ukázaly, že suramin byl schopen obdobně inhibovat vazbu [³H]forskolinu ve vzorcích z obou testovaných věkových skupin. Výsledky dalších analýz kompetitivních vazebných studií (Hillův koeficient blízký 1,0) naznačily, že suramin se zřejmě chová jako kompetitivní inhibitor vysokoafinní vazby [³H]forskolinu. Tato pozorování přinášejí docela novou informaci o této farmakologicky důležité látce. Suramin byl v posledních dvaceti letech nejčastěji užíván jako trypanocidní látka v léčbě spavé nemoci a v terapii některých typů rakoviny (*Jennings a kol., 2002; Kaur a kol., 2002; Ryan a kol., 2002*). Avšak molekulární mechanismus tohoto působení není dosud dobře znám. Suramin vykazuje antiproliferativní a antikancerogenní účinky díky interferenci s vazbou některých růstových faktorů ke svým receptorům (*Mills a kol., 1990; Minniti a kol., 1992; Firsching a kol., 1995*). Vedle toho suramin může poškozovat enzymovou funkci proteinkinázy C a protein tyrosinových fosfatáz (*Khaled a kol., 1995*;

Zhang a kol., 1998) a byla také popsána jeho schopnost interferovat s transmembránovou signalizací regulovanou trimerními G proteiny (*Butler a kol., 1988; Huang a kol., 1990; Beindl a kol., 1996*). V současnějších pracích byl suramin ukázán jako látka interagující přímo s místy rozpoznávajícím kalmodulin a aktivující ryanodinové receptory kosterních svalů (*Klinger a kol., 1999; Klinger a kol., 2001*). Naše současné výsledky, které ukazují suramin jako účinnou látku přímo inhibující adenylycyklázu a vazbu [³H]forskolinu, rozšířily existující množství jeho buněčných cílů.

SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ

Naše měření agonistou stimulované vysokoafinní GTPázové aktivity a vazby GTP γ S ve vyvíjející se mozkové kůře potkana ukázala výrazně vyšší funkční aktivitu GTP vázajících proteinů u dospělých (90denních) potkanů oproti nezralým (12denním) zvířatům. RGS1, na rozdíl od RGS16, může působit jako silný regulátor vysokoafinní GTPázové aktivity v membránách mozkové kůry potkana.

AC aktivita je regulována podobně v mozkové kůře nezralých i dospělých potkanů, ale enzymová aktivita je mnohem nižší u dospělých oproti nezralým zvířatům. Jak bylo doloženo dříve, rozdíl mezi AC aktivitou těchto dvou věkových skupin není vysvětlitelný na základě vývojových expresních profilů ani jedné z AC izoform (AC1, AC2, AC4 a AC6) a různých G proteinů (*Ihnatovych a kol., 2002b; Ihnatovych a kol., 2002a*). Lze však spekulovat, že zbývající typy AC by se mohly měnit v dospělosti. Tento předpoklad je podporován nálezy změněných charakteristik vazby [³H]forskolinu v membránách mozkové kůry z dospělých potkanů ve srovnání s nezralými zvířaty (*Stöhr a kol., 2005b*). Nicméně nemůže být vyloučena možnost, že AC aktivita v dospělé mozkové kůře potkana by možná mohla být ovlivněna dosud neznámým negativním regulačním faktorem či mechanismem, který je spuštěn během dospívání.

V mozkové kůře potkana mohou být detekována vysokoafinní a super-vysokoafinní vazebná místa pro [³H]forskolin. Kromě toho jsme zjistili, že parametry (K_D a B_{max}) specifické vazby [³H]forskolinu se v membránách mozkové kůry z nezralých a dospělých potkanů vcelku signifikantně liší. Lze předpokládat, že zřetelně odlišné afinity vazebných míst [³H]forskolinu u těchto dvou věkových skupin, které zajisté reflektují změněnou schopnost forskolinu interagovat s AC, jsou dány především kvalitativní změnou (změnami) tohoto enzymu. Existují některé údaje, že forskolin nemusí vázat a aktivovat všechny izoformy AC stejně účinnou měrou (*Sutkowski a kol., 1994*). Naše nálezy nižší afinity vazebných míst [³H]forskolinu a pravděpodobně nižší účinnosti spřažení G_s proteinu s AC v dospělosti může naznačovat, že se může lišit zastoupení AC izoform v mozkové kůře nezralých a dospělých potkanů. Pro ověření či vyvrácení těchto úvah je třeba dalšího studia.

Na úplný závěr je možno shrnout všechny výše uvedené výsledky z hlediska srovnání obou věkových skupin do následujícího stručného přehledu:

Žádné signifikantní rozdíly mezi vzorky z nezralé (12denního) mozkové kůry a analogickými preparáty z dospělého (90denního) potkana nebyly shledány pro:

- Vazebné charakteristiky GABA_B receptorů stanovené pomocí jejich specifického antagonisty [³H]CGP54626A.
- Hodnoty K_D respektive afinity k vazebnému místu na G proteinech pro GTP γ S vypočítaných z kompetitivních vytěšňovacích křivek s radioaktivním [³H]GTP γ S.
- Snížení AC aktivity zvýšenou koncentrací DTT v případě její stimulace G proteiny pomocí AlF₄⁻ a GTP γ S.
- Redukci AC aktivity zvýšenou koncentrací Fe²⁺ a zmírnění tohoto negativního efektu v přítomnosti DTT.
- Snížení AC aktivity vysokými koncentracemi kyseliny askorbové a neúčinnost nižších koncentrací.
- Neovlivnění AC aktivity fosforylací katalyzovanou proteinkinázou C a stejně tak protein tyrosinovými kinázami.
- Dva typy vazebných míst pro [³H]forskolin.
- Neovlivnění zvýšené vazby [³H]forskolinu pomocí Gpp(NH)p ani po přidání β -adrenergního agonisty isoprenalinu ani GABA_B agonisty baclofenu.
- Inhibiční efekt suraminu na AC aktivitu a vazbu [³H]forskolinu.

Vzorky membrán mozkové kůry obou věkových skupin byly navzájem signifikantně odlišné v následujících zkoumaných charakteristikách:

- Jak bazální, tak baclofenem stimulovaná GTPázová aktivita a stejně tak vazba [³H]GTP γ S byla vyšší u dospělých zvířat.
- RGS1 neměl účinek na bazální GTPázovou aktivitu u nezralých potkanů, ale u dospělých ji zvýšil.
- AC aktivita byla při všech měřeních výrazně vyšší u nezralých potkanů.
- Výrazněji se zvýšila AC aktivita u nezralých zvířat při vyšších koncentracích DTT v případě její přímé stimulace pomocí forskolinu a Mn²⁺.
- Nezralí potkani měli nižší počet vysokoafinních vazebných míst [³H]forskolinu, avšak afinita těchto míst byla znatelně vyšší.

- V přítomnosti AlF_4^- se počet vysokoafinních vazebných míst $[\text{}^3\text{H}]\text{forskolinu}$ výrazněji zvýšil u nezralých potkanů a dosáhl úrovně dospělých.
- V přítomnosti Mg^{2+} iontů se zvýšily „bazální“ hodnoty vazby $[\text{}^3\text{H}]\text{forskolinu}$ daleko více u dospělých zvířat.
- Jak nízké, tak vysoké koncentrace Gpp(NH)p zřetelně zvýšily vazbu $[\text{}^3\text{H}]\text{forskolinu}$ v přítomnosti Mg^{2+} iontů u nezralých zvířat na maximální hodnoty, naopak u vzorků z dospělých potkanů bylo dosaženo maximální úrovně vazby $[\text{}^3\text{H}]\text{forskolinu}$ jen v případě přidání vysokých koncentrací Gpp(NH)p .

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abramow-Newerly, M., Roy, A.A., Nunn, C. and Chidiac, P. (2006). RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. *Cell Signal* 18(5): 579-591.
- Alousi, A.A., Jasper, J.R., Insel, P.A. and Motulsky, H.J. (1991). Stoichiometry of receptor-Gs-adenylate cyclase interactions. *FASEB J.* 5(9): 2300-2303.
- Andrade, R., Malenka, R.C. and Nicoll, R.A. (1986). A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 234(4781): 1261-1265.
- Antoni, F.A. (2000). Molecular diversity of cyclic AMP signalling. *Front Neuroendocrinol* 21(2): 103-132.
- Arshavsky, V.Y., Dumke, C.L. and Bownds, M.D. (1992). Noncatalytic cGMP-binding sites of amphibian rod cGMP phosphodiesterase control interaction with its inhibitory gamma-subunits. A putative regulatory mechanism of the rod photoresponse. *J Biol Chem* 267(34): 24501-24507.
- Arshavsky, V.Y., Lamb, T.D. and Pugh, E.N., Jr. (2002). G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol* 64: 153-187.
- Asano, T., Semba, R., Kamiya, N., Ogasawara, N. and Kato, K. (1988). Go, a GTP-binding protein: immunochemical and immunohistochemical localization in the rat. *J Neurochem* 50(4): 1164-1169.
- Asano, T., Ui, M. and Ogasawara, N. (1985). Prevention of the agonist binding to gamma-aminobutyric acid B receptors by guanine nucleotides and islet-activating protein, pertussis toxin, in bovine cerebral cortex. Possible coupling of the toxin-sensitive GTP-binding proteins to receptors. *J Biol Chem* 260(23): 12653-12658.
- Baba, A., Kihara, T., Lee, E. and Iwata, H. (1981a). Activation of rat brain adenylate cyclase by copper plus dithiothreitol. *Biochem Pharmacol* 30(2): 171-174.
- Baba, A., Lee, E., Ohta, A., Tatsuno, T. and Iwata, H. (1981b). Activation of adenylate cyclase of rat brain by lipid peroxidation. *J Biol Chem* 256(8): 3679-3684.
- Bahia, D.S., Sartania, N., Ward, R.J., Cavalli, A., Jones, T.L., Druey, K.M. and Milligan, G. (2003). Concerted stimulation and deactivation of pertussis toxin-sensitive G proteins by chimeric G protein-coupled receptor-regulator of G protein signaling 4 fusion proteins: analysis of the contribution of palmitoylated cysteine residues to the GAP activity of RGS4. *J Neurochem* 85(5): 1289-1298.
- Baker, L.P., Nielsen, M.D., Impey, S., Hacker, B.M., Poser, S.W., Chan, M.Y. and Storm, D.R. (1999). Regulation and immunohistochemical localization of betagamma-stimulated adenylyl cyclases in mouse hippocampus. *J Neurosci* 19(1): 180-192.
- Beindl, W., Mitterauer, T., Hohenegger, M., Ijzerman, A.P., Nanoff, C. and Freissmuth, M. (1996). Inhibition of receptor/G protein coupling by suramin analogues. *Mol. Pharmacol.* 50(2): 415-423.
- Benjamin, D.R., Markby, D.W., Bourne, H.R. and Kuntz, I.D. (1995). Solution structure of the GTPase activating domain of alpha s. *J Mol Biol* 254(4): 681-691.
- Berthele, A., Platzer, S., Weis, S., Conrad, B. and Tolle, T.R. (2001). Expression of GABA(B1) and GABA(B2) mRNA in the human brain. *Neuroreport* 12(15): 3269-3275.

- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J. and Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* 84(3): 835-867.
- Bettler, B. and Tiao, J.Y. (2006). Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol Ther* 110(3): 533-543.
- Billinton, A., Ige, A.O., Bolam, J.P., White, J.H., Marshall, F.H. and Emson, P.C. (2001). Advances in the molecular understanding of GABA(B) receptors. *Trends Neurosci* 24(5): 277-282.
- Billinton, A., Ige, A.O., Wise, A., White, J.H., Disney, G.H., Marshall, F.H., Waldvogel, H.J., Faull, R.L. and Emson, P.C. (2000). GABA(B) receptor heterodimer-component localisation in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 77(1): 111-124.
- Billinton, A., Upton, N. and Bowery, N.G. (1999). GABA(B) receptor isoforms GBR1a and GBR1b, appear to be associated with pre- and post-synaptic elements respectively in rat and human cerebellum. *Br J Pharmacol* 126(6): 1387-1392.
- Bischoff, S., Leonhard, S., Reymann, N., Schuler, V., Shigemoto, R., Kaupmann, K. and Bettler, B. (1999). Spatial distribution of GABA(B)R1 receptor mRNA and binding sites in the rat brain. *J Comp Neurol* 412(1): 1-16.
- Bittiger, H., Froestl, W., Mickel, S. and Olpe, H.R. (1993). GABAB receptor antagonists: from synthesis to therapeutic applications. *Trends Pharmacol Sci* 14(11): 391-394.
- Bormann, J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21(1): 16-19.
- Bowery, N.G. (2006). GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr Opin Pharmacol* 6(1): 37-43.
- Bowery, N.G. and Enna, S.J. (2000). gamma-aminobutyric acid(B) receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* 292(1): 2-7.
- Bowery, N.G. and Smart, T.G. (2006). GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S109-119.
- Bray, P., Carter, A., Simons, C., Guo, V., Puckett, C., Kamholz, J., Spiegel, A. and Nirenberg, M. (1986). Human cDNA clones for four species of G alpha s signal transduction protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(23): 8893-8897.
- Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M.J. and Levin, L.R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1): 79-84.
- Butler, S.J., Kelly, E.C., McKenzie, F.R., Guild, S.B., Wakelam, M.J. and Milligan, G. (1988). Differential effects of suramin on the coupling of receptors to individual species of pertussis-toxin-sensitive guanine-nucleotide-binding proteins. *Biochem. J.* 251(1): 201-205.
- Cali, J.J., Zwaagstra, J.C., Mons, N., Cooper, D.M. and Krupinski, J. (1994). Type VIII adenylyl cyclase. A Ca²⁺/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J Biol Chem* 269(16): 12190-12195.
- Calver, A.R., Medhurst, A.D., Robbins, M.J., Charles, K.J., Evans, M.L., Harrison, D.C., Stammers, M., Hughes, S.A., Hervieu, G., Couve, A., Moss, S.J., Middlemiss, D.N. and Pangalos, M.N. (2000). The expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience* 100(1): 155-170.
- Castelli, M.P., Ingianni, A., Stefanini, E. and Gessa, G.L. (1999). Distribution of GABA(B) receptor mRNAs in the rat brain and peripheral organs. *Life Sci* 64(15): 1321-1328.

- Cavalli, A., Druey, K.M. and Milligan, G. (2000). The regulator of G protein signaling RGS4 selectively enhances alpha 2A-adreoreceptor stimulation of the GTPase activity of Go1alpha and Gi2alpha. *J Biol Chem* 275(31): 23693-23699.
- Cladman, W. and Chidiac, P. (2002). Characterization and comparison of RGS2 and RGS4 as GTPase-activating proteins for m2 muscarinic receptor-stimulated G(i). *Mol Pharmacol* 62(3): 654-659.
- Clark, J.A., Mezey, E., Lam, A.S. and Bonner, T.I. (2000). Distribution of the GABA(B) receptor subunit gb2 in rat CNS. *Brain Res* 860(1-2): 41-52.
- Clarke, S. (1992). Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* 61: 355-386.
- Coffey, R.J., Jr., Leof, E.B., Shipley, G.D. and Moses, H.L. (1987). Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. *J. Cell. Physiol.* 132(1): 143-148.
- Cooper, D.M. and Crossthwaite, A.J. (2006). Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends Pharmacol Sci* 27(8): 426-431.
- Cooper, D.M., Karpen, J.W., Fagan, K.A. and Mons, N.E. (1998). Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 32: 23-51.
- Couve, A., Filippov, A.K., Connolly, C.N., Bettler, B., Brown, D.A. and Moss, S.J. (1998). Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem* 273(41): 26361-26367.
- Daly, J.W., Padgett, W. and Seamon, K.B. (1982). Activation of cyclic AMP-generating systems in brain membranes and slices by the diterpene forskolin: augmentation of receptor-mediated responses. *J. Neurochem.* 38(2): 532-544.
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E. and Farquhar, M.G. (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 235-271.
- DeBlasi, A., O'Reilly, K. and Motulsky, H.J. (1989). Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* 10(6): 227-229.
- Dessauer, C.W., Tesmer, J.J., Sprang, S.R. and Gilman, A.G. (1998). Identification of a Gialpha binding site on type V adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 273(40): 25831-25839.
- Dessauer, C.W., Tesmer, J.J., Sprang, S.R. and Gilman, A.G. (1999). The interactions of adenylate cyclases with P-site inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 20(5): 205-210.
- Dhanasekaran, N., Prasad, M.V., Wadsworth, S.J., Dermott, J.M. and van Rossum, G. (1994). Protein kinase C-dependent and -independent activation of Na⁺/H⁺ exchanger by G alpha 12 class of G proteins. *J Biol Chem* 269(16): 11802-11806.
- Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60: 653-688.
- Duncan, J.A. and Gilman, A.G. (1998). A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J Biol Chem* 273(25): 15830-15837.
- Durkin, M.M., Gunwaldsen, C.A., Borowsky, B., Jones, K.A. and Branchek, T.A. (1999). An in situ hybridization study of the distribution of the GABA(B2) protein mRNA in the rat CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 71(2): 185-200.

- El-Mowafy, A.M. and White, R.E. (1998). Evidence for a tyrosine kinase-dependent activation of the adenylyl Cyclase/PKA cascade downstream from the G-protein-linked endothelin ETA receptor in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 251(2): 494-500.
- Exner, T., Jensen, O.N., Mann, M., Kleuss, C. and Nurnberg, B. (1999). Posttranslational modification of Galphao1 generates Galphao3, an abundant G protein in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1327-1332.
- Firsching, A., Nickel, P., Mora, P. and Allolio, B. (1995). Antiproliferative and angiostatic activity of suramin analogues. *Cancer Res.* 55(21): 4957-4961.
- Fong, C.W., Bahia, D.S., Rees, S. and Milligan, G. (1998). Selective activation of a chimeric Gi1/Gs G protein alpha subunit by the human IP prostanoid receptor: analysis using agonist stimulation of high affinity GTPase activity and [35S]guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate binding. *Mol Pharmacol* 54(2): 249-257.
- Fong, C.W. and Milligan, G. (1999). Analysis of agonist function at fusion proteins between the IP prostanoid receptor and cognate, unnatural and chimaeric G-proteins. *Biochem J* 342 (Pt 2): 457-463.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G. and Schioth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63(6): 1256-1272.
- Freissmuth, M., Boehm, S., Beindl, W., Nickel, P., Ijzerman, A.P., Hohenegger, M. and Nanoff, C. (1996). Suramin analogues as subtype-selective G protein inhibitors. *Mol Pharmacol* 49(4): 602-611.
- Fritschy, J.M., Meskenaite, V., Weinmann, O., Honer, M., Benke, D. and Mohler, H. (1999). GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur J Neurosci* 11(3): 761-768.
- Froestl, W., Bettler, B., Bittiger, H., Heid, J., Kaupmann, K., Mickel, S.J. and Strub, D. (2003). Ligands for expression cloning and isolation of GABA(B) receptors. *Farmacol* 58(3): 173-183.
- Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T., Akino, T. and Shimonishi, Y. (1990). Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature* 346(6285): 658-660.
- Gao, B.N. and Gilman, A.G. (1991). Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(22): 10178-10182.
- Garant, D., Sperber, E. and Moshe, S. (1992). The density of GABAB binding sites in the substantia nigra is greater in rat pups than in adults. *Eur J Pharmacol* 214(1): 75-78.
- Gehlert, D.R. (1986). Regional modulation of [3H]forskolin binding in the rat brain by guanylyl-5'-imidodiphosphate and sodium fluoride: comparison with the distribution of guanine nucleotide binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239(3): 952-958.
- Gehlert, D.R., Dawson, T.M., Yamamura, H.I. and Wamsley, J.K. (1985). Quantitative autoradiography of [3H]forskolin binding sites in the rat brain. *Brain Res.* 361(1-2): 351-360.
- Gierschik, P., Milligan, G., Pines, M., Goldsmith, P., Codina, J., Klee, W. and Spiegel, A. (1986). Use of specific antibodies to quantitate the guanine nucleotide-binding protein Go in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(7): 2258-2262.

- Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-649.
- Goldman, M.E., Mallorga, P., Pettibone, D.J. and Sugrue, M.F. (1988). Characterization of [³H]forskolin binding sites in the iris-ciliary body of the albino rabbit. *Life Sci.* 42(13): 1307-1314.
- Greenberger, L.M. and Ishikawa, Y. (1994). ATP-binding cassette proteins : Common denominators between ion channels, transporters, and enzymes. *Trends Cardiovasc Med* 4(4): 193-198.
- Hacker, B.M., Tomlinson, J.E., Wayman, G.A., Sultana, R., Chan, G., Villacres, E., Disteché, C. and Storm, D.R. (1998). Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). *Genomics* 50(1): 97-104.
- Hadcock, J.R., Port, J.D., Gelman, M.S. and Malbon, C.C. (1992). Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of beta 2-adrenergic receptors in response to insulin. *J. Biol. Chem.* 267(36): 26017-26022.
- Hall, A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249(4969): 635-640.
- Hall, D.A. and Hourani, S.M. (1994). Effects of suramin on increases in cytosolic calcium and on inhibition of adenylyl cyclase induced by adenosine 5'-diphosphate in human platelets. *Biochem. Pharmacol.* 47(6): 1013-1018.
- Hamm, H.E. and Gilchrist, A. (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 8(2): 189-196.
- Harhammer, R., Nurnberg, B., Harteneck, C., Leopoldt, D., Exner, T. and Schultz, G. (1996). Distinct biochemical properties of the native members of the G12 G-protein subfamily. Characterization of G alpha 12 purified from rat brain. *Biochem J* 319 (Pt 1): 165-171.
- Harhammer, R., Nurnberg, B., Spicher, K. and Schultz, G. (1994). Purification of the G-protein G13 from rat brain membranes. *Biochem J* 303 (Pt 1): 135-140.
- He, X.B., Hu, J.H., Wu, Q., Yan, Y.C. and Koide, S.S. (2001). Identification of GABA(B) receptor in rat testis and sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 283(1): 243-247.
- Hejnova, L., Ihnatovych, I., Novotny, J., Kubova, H., Mares, P. and Svoboda, P. (2002). Modulation of adenylyl cyclase activity by baclofen in the developing rat brain: difference between cortex, thalamus and hippocampus. *Neurosci Lett* 330(1): 9-12.
- Hellevuo, K., Yoshimura, M., Mons, N., Hoffman, P.L., Cooper, D.M. and Tabakoff, B. (1995). The characterization of a novel human adenylyl cyclase which is present in brain and other tissues. *J Biol Chem* 270(19): 11581-11589.
- Helmreich, E.J. and Hofmann, K.P. (1996). Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer. *Biochim Biophys Acta* 1286(3): 285-322.
- Hensey, C.E., Boscoboinik, D. and Azzi, A. (1989). Suramin, an anti-cancer drug, inhibits protein kinase C and induces differentiation in neuroblastoma cell clone NB2A. *FEBS Lett.* 258(1): 156-158.
- Hepler, J.R., Kozasa, T., Smrcka, A.V., Simon, M.I., Rhee, S.G., Sternweis, P.C. and Gilman, A.G. (1993). Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant Gq alpha and G11 alpha. Activation of purified phospholipase C isozymes by G alpha subunits. *J Biol Chem* 268(19): 14367-14375.
- Hill, D.R. and Bowery, N.G. (1981). 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* 290(5802): 149-152.
- Hill, D.R., Bowery, N.G. and Hudson, A.L. (1984). Inhibition of GABAB receptor binding by guanyl nucleotides. *J Neurochem* 42(3): 652-657.

- Hoffmann, M., Ward, R.J., Cavalli, A., Carr, I.C. and Milligan, G. (2001). Differential capacities of the RGS1, RGS16 and RGS-GAIP regulators of G protein signaling to enhance alpha2A-adrenoreceptor agonist-stimulated GTPase activity of G(o1)alpha. *J Neurochem* 78(4): 797-806.
- Hollinger, S. and Hepler, J.R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54(3): 527-559.
- Homburger, V., Brabet, P., Audigier, Y., Pantaloni, C., Bockaert, J. and Rouot, B. (1987). Immunological localization of the GTP-binding protein Go in different tissues of vertebrates and invertebrates. *Mol Pharmacol* 31(4): 313-319.
- Horn, F., Weare, J., Beukers, M.W., Horsch, S., Bairoch, A., Chen, W., Edvardsen, O., Campagne, F. and Vriend, G. (1998). GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res* 26(1): 275-279.
- Hsu, W.H., Rudolph, U., Sanford, J., Bertrand, P., Olate, J., Nelson, C., Moss, L.G., Boyd, A.E., Codina, J. and Birnbaumer, L. (1990). Molecular cloning of a novel splice variant of the alpha subunit of the mammalian Go protein. *J Biol Chem* 265(19): 11220-11226.
- Huang, R.R., Dehaven, R.N., Cheung, A.H., Diehl, R.E., Dixon, R.A. and Strader, C.D. (1990). Identification of allosteric antagonists of receptor-guanine nucleotide-binding protein interactions. *Mol. Pharmacol.* 37(2): 304-310.
- Chen, Y., Harry, A., Li, J., Smit, M.J., Bai, X., Magnusson, R., Pieroni, J.P., Weng, G. and Iyengar, R. (1997). Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 14100-14104.
- Chern, Y. (2000). Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system. *Cell Signal* 12(4): 195-204.
- Chiono, M., Mahey, R., Tate, G. and Cooper, D.M. (1995). Capacitative Ca²⁺ entry exclusively inhibits cAMP synthesis in C6-2B glioma cells. Evidence that physiologically evoked Ca²⁺ entry regulates Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase in non-excitabile cells. *J Biol Chem* 270(3): 1149-1155.
- Choi, E.J., Xia, Z. and Storm, D.R. (1992). Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin. *Biochemistry* 31(28): 6492-6498.
- Chu, D.C., Albin, R.L., Young, A.B. and Penney, J.B. (1990). Distribution and kinetics of GABAB binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 34(2): 341-357.
- Ihnatovych, I., Novotny, J., Haugvicova, R., Bourova, L., Mares, P. and Svoboda, P. (2002a). Ontogenetic development of the G protein-mediated adenylyl cyclase signalling in rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 133(1): 69-75.
- Ihnatovych, I., Novotny, J., Haugvicova, R., Bourova, L., Mares, P. and Svoboda, P. (2002b). Opposing changes of trimeric G protein levels during ontogenetic development of rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 133(1): 57-67.
- Iniguez-Lluhi, J.A., Simon, M.I., Robishaw, J.D. and Gilman, A.G. (1992). G protein beta gamma subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of gamma. *J Biol Chem* 267(32): 23409-23417.
- Ishikawa, Y. and Homcy, C.J. (1997). The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circ Res* 80(3): 297-304.

- Isomoto, S., Kaibara, M., Sakurai-Yamashita, Y., Nagayama, Y., Uezono, Y., Yano, K. and Taniyama, K. (1998). Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABAB receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 253(1): 10-15.
- Iwami, G., Kawabe, J., Ebina, T., Cannon, P.J., Homcy, C.J. and Ishikawa, Y. (1995). Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J Biol Chem* 270(21): 12481-12484.
- Jackman, G.P. and Bobik, A. (1986). Forskolin-mediated activation of cardiac, liver and lung adenylyl cyclase in the rat. Relation to [3H]forskolin binding sites. *Biochem. Pharmacol.* 35(13): 2247-2251.
- Jacobowitz, O., Chen, J., Premont, R.T. and Iyengar, R. (1993). Stimulation of specific types of Gs-stimulated adenylyl cyclases by phorbol ester treatment. *J. Biol. Chem.* 268(6): 3829-3832.
- Jacobowitz, O. and Iyengar, R. (1994). Phorbol ester-induced stimulation and phosphorylation of adenylyl cyclase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(22): 10630-10634.
- Jennings, F.W., Rodgers, J., Bradley, B., Gettinby, G., Kennedy, P.G. and Murray, M. (2002). Human African trypanosomiasis: potential therapeutic benefits of an alternative suramin and melarsoprol regimen. *Parasitol. Int.* 51(4): 381-388.
- Jones, D.T., Masters, S.B., Bourne, H.R. and Reed, R.R. (1990). Biochemical characterization of three stimulatory GTP-binding proteins. The large and small forms of Gs and the olfactory-specific G-protein, Golf. *J Biol Chem* 265(5): 2671-2676.
- Jones, D.T. and Reed, R.R. (1989). Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244(4906): 790-795.
- Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Yao, W.J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J.A., Morse, K., Laz, T., Smith, K.E., Nagarathnam, D., Noble, S.A., Branchek, T.A. and Gerald, C. (1998). GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396(6712): 674-679.
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W. and Bettler, B. (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386(6622): 239-246.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A. and Bettler, B. (1998a). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396(6712): 683-687.
- Kaupmann, K., Schuler, V., Mosbacher, J., Bischoff, S., Bittiger, H., Heid, J., Froestl, W., Leonhard, S., Pfaff, T., Karschin, A. and Bettler, B. (1998b). Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14991-14996.
- Kaur, M., Reed, E., Sartor, O., Dahut, W. and Figg, W.D. (2002). Suramin's development: what did we learn? *Invest. New Drugs*, 20(2): 209-219.
- Kawabe, J., Iwami, G., Ebina, T., Ohno, S., Katada, T., Ueda, Y., Homcy, C.J. and Ishikawa, Y. (1994). Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 269(24): 16554-16558.

- Kehlenbach, R.H., Matthey, J. and Huttner, W.B. (1994). XL alpha s is a new type of G protein. *Nature* 372(6508): 804-809.
- Kerr, D.I. and Ong, J. (1995). GABAB receptors. *Pharmacol Ther* 67(2): 187-246.
- Keshles, O. and Levitzki, A. (1984). The ontogenesis of beta-adrenergic receptors and of adenylate cyclase in the developing rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 33(20): 3231-3233.
- Khaled, Z., Rideout, D., O'Driscoll, K.R., Petrylak, D., Cacace, A., Patel, R., Chiang, L.C., Rotenberg, S. and Stein, C.A. (1995). Effects of suramin-related and other clinically therapeutic polyanions on protein kinase C activity. *Clin. Cancer Res.* 1(1): 113-122.
- Kitamura, Y., Mochii, M., Kodama, R., Agata, K., Watanabe, K., Eguchi, G. and Nomura, Y. (1989). Ontogenesis of alpha 2-adrenoceptor coupling with GTP-binding proteins in the rat telencephalon. *J Neurochem* 53(1): 249-257.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. and Clark, B.F. (1996). The GTP binding motif: variations on a theme. *Faseb J* 10(12): 1347-1368.
- Klemke, M., Pasolli, H.A., Kehlenbach, R.H., Offermanns, S., Schultz, G. and Huttner, W.B. (2000). Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit XLalphas. II. Signal transduction properties. *J Biol Chem* 275(43): 33633-33640.
- Klinger, M., Bofill-Cardona, E., Mayer, B., Nanoff, C., Freissmuth, M. and Hohenegger, M. (2001). Suramin and the suramin analogue NF307 discriminate among calmodulin-binding sites. *Biochem. J.* 355(Pt 3): 827-833.
- Klinger, M., Freissmuth, M., Nickel, P., Stabler-Schwarzbart, M., Kassack, M., Suko, J. and Hohenegger, M. (1999). Suramin and suramin analogs activate skeletal muscle ryanodine receptor via a calmodulin binding site. *Mol. Pharmacol.* 55(3): 462-472.
- Kolakowski, L.F., Jr. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2(1): 1-7.
- Kopp, R. and Pfeiffer, A. (1990). Suramin alters phosphoinositide synthesis and inhibits growth factor receptor binding in HT-29 cells. *Cancer. Res.* 50(20): 6490-6496.
- Kozasa, T., Hepler, J.R., Smrcka, A.V., Simon, M.I., Rhee, S.G., Sternweis, P.C. and Gilman, A.G. (1993). Purification and characterization of recombinant G16 alpha from Sf9 cells: activation of purified phospholipase C isozymes by G-protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19): 9176-9180.
- Kozasa, T., Itoh, H., Tsukamoto, T. and Kaziro, Y. (1988). Isolation and characterization of the human Gs alpha gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(7): 2081-2085.
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Feinstein, P.G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R.R. and Gilman, A.G. (1989). Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* 244(4912): 1558-1564.
- Krupinski, J., Lehman, T.C., Frankenfield, C.D., Zwaagstra, J.C. and Watson, P.A. (1992). Molecular diversity in the adenylylcyclase family. Evidence for eight forms of the enzyme and cloning of type VI. *J Biol Chem* 267(34): 24858-24862.
- Lai, H.L., Lin, T.H., Kao, Y.Y., Lin, W.J., Hwang, M.J. and Chern, Y. (1999). The N terminus domain of type VI adenylyl cyclase mediates its inhibition by protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* 56(3): 644-650.

- Lee, D.K., George, S.R. and O'Dowd, B.F. (2002). Novel G-protein-coupled receptor genes expressed in the brain: continued discovery of important therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 6(2): 185-202.
- Lefkowitz, R.J. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 25(8): 413-422.
- Liang, F., Hatanaka, Y., Saito, H., Yamamori, T. and Hashikawa, T. (2000). Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 416(4): 475-495.
- Lin, M.C., Cooper, D.M. and Rodbell, M. (1980). Selective effects of organic mercurials on the GTP-regulatory proteins of adenylate cyclase systems. *J. Biol. Chem.* 255(15): 7250-7254.
- Lin, T.H., Lai, H.L., Kao, Y.Y., Sun, C.N., Hwang, M.J. and Chern, Y. (2002). Protein kinase C inhibits type VI adenylyl cyclase by phosphorylating the regulatory N domain and two catalytic C1 and C2 domains. *J Biol Chem* 277(18): 15721-15728.
- Linder, M.E., Pang, I.H., Duronio, R.J., Gordon, J.I., Sternweis, P.C. and Gilman, A.G. (1991). Lipid modifications of G protein subunits. Myristoylation of Go alpha increases its affinity for beta gamma. *J Biol Chem* 266(7): 4654-4659.
- Liu, Q. and Wong-Riley, M.T. (2005). Postnatal developmental expressions of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei of rats. *J Appl Physiol* 98(4): 1442-1457.
- Lopez-Lopez, R., Langeveld, C.H., Pizao, P.E., van Rijswijk, R.E., Wagstaff, J., Pinedo, H.M. and Peters, G.J. (1994). Effect of suramin on adenylate cyclase and protein kinase C. *Anticancer. Drug. Des.* 9(4): 279-290.
- Lorente, P., Lacampagne, A., Pouzeratte, Y., Richards, S., Malitschek, B., Kuhn, R., Bettler, B. and Vassort, G. (2000). gamma-aminobutyric acid type B receptors are expressed and functional in mammalian cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15): 8664-8669.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- Lujan, R. and Shigemoto, R. (2006). Localization of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1 and GABAB2 relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum. *Eur J Neurosci* 23(6): 1479-1490.
- Lüscher, C., Jan, L.Y., Stoffel, M., Malenka, R.C. and Nicoll, R.A. (1997). G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19(3): 687-695.
- Mahoney, C.W., Azzi, A. and Huang, K.P. (1990). Effects of suramin, an anti-human immunodeficiency virus reverse transcriptase agent, on protein kinase C. Differential activation and inhibition of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 265(10): 5424-5428.
- Malitschek, B., Ruegg, D., Heid, J., Kaupmann, K., Bittiger, H., Frostl, W., Bettler, B. and Kuhn, R. (1998). Developmental changes of agonist affinity at GABABR1 receptor variants in rat brain. *Mol Cell Neurosci* 12(1-2): 56-64.
- Marescaux, C., Vergnes, M. and Bernasconi, R. (1992). GABAB receptor antagonists: potential new anti-absence drugs. *J Neural Transm Suppl* 35: 179-188.

- Marinissen, M.J. and Gutkind, J.S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22(7): 368-376.
- Markby, D.W., Onrust, R. and Bourne, H.R. (1993). Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G alpha subunit. *Science* 262(5141): 1895-1901.
- Mathivet, P., Bernasconi, R., Bittiger, H. and Marescaux, C. (1996). Regional differences of the inhibition of GABAB ligand binding by the GTP analogue Gpp(NH)p. *Brain Res Mol Brain Res* 42(1): 18-24.
- Matsuoka, I., Suzuki, Y., Defer, N., Nakanishi, H. and Hanoune, J. (1997). Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. *J. Neurochem.* 68(2): 498-506.
- Mattera, R., Graziano, M.P., Yatani, A., Zhou, Z., Graf, R., Codina, J., Birnbaumer, L., Gilman, A.G. and Brown, A.M. (1989). Splice variants of the alpha subunit of the G protein Gs activate both adenylyl cyclase and calcium channels. *Science* 243(4892): 804-807.
- Mikalsen, S.O. and Kaalhus, O. (1996). A characterization of pervanadate, an inducer of cellular tyrosine phosphorylation and inhibitor of gap junctional intercellular communication. *Biochim. Biophys. Acta* 1290(3): 308-318.
- Milligan, G. (1993). Regional distribution and quantitative measurement of the phosphoinositidase C-linked guanine nucleotide binding proteins G11 alpha and Gq alpha in rat brain. *J Neurochem* 61(3): 845-851.
- Milligan, G. (2004). G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol Pharmacol* 66(1): 1-7.
- Mills, G.B., Zhang, N., May, C., Hill, M. and Chung, A. (1990). Suramin prevents binding of interleukin 2 to its cell surface receptor: a possible mechanism for immunosuppression. *Cancer. Res.* 50(10): 3036-3042.
- Minniti, C.P., Maggi, M. and Helman, L.J. (1992). Suramin inhibits the growth of human rhabdomyosarcoma by interrupting the insulin-like growth factor II autocrine growth loop. *Cancer. Res.* 52(7): 1830-1835.
- Mons, N. and Cooper, D.M. (1994). Selective expression of one Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase in dopaminergically innervated rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 22(1-4): 236-244.
- Morishita, R., Kato, K. and Asano, T. (1990). GABAB receptors couple to G proteins Go, Go* and Gi1 but not to Gi2. *FEBS Lett* 271(1-2): 231-235.
- Morris, A.J. and Malbon, C.C. (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79(4): 1373-1430.
- Mumby, S., Pang, I.H., Gilman, A.G. and Sternweis, P.C. (1988). Chromatographic resolution and immunologic identification of the alpha 40 and alpha 41 subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins from bovine brain. *J Biol Chem* 263(4): 2020-2026.
- Mumby, S.M., Heukeroth, R.O., Gordon, J.I. and Gilman, A.G. (1990). G-protein alpha-subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2): 728-732.
- Munoz, A., DeFelipe, J. and Jones, E.G. (2001). Patterns of GABA(B)R1a,b receptor gene expression in monkey and human visual cortex. *Cereb Cortex* 11(2): 104-113.

- Murphy, M.G. (1985). Membrane fatty acids, lipid peroxidation and adenylate cyclase activity in cultured neural cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132(2): 757-763.
- Murphy, M.G. (1986). Studies of the regulation of basal adenylate cyclase activity by membrane polyunsaturated fatty acids in cultured neuroblastoma. *J. Neurochem.* 47(1): 245-253.
- Murphy, P.M., Eide, B., Goldsmith, P., Brann, M., Gierschik, P., Spiegel, A. and Malech, H.L. (1987). Detection of multiple forms of Gi alpha in HL60 cells. *FEBS Lett* 221(1): 81-86.
- Neer, E.J. (1974). The size of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 249(20): 6527-6531.
- Neer, E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80(2): 249-257.
- Nelson, C.A. and Seamon, K.B. (1985). Regulation of [3H]forskolin binding to human platelet membranes by GppNHp, NaF, and prostaglandin E1. *FEBS Lett.* 183(2): 349-352.
- Nelson, C.A. and Seamon, K.B. (1986). Binding of [3H]forskolin to human platelet membranes. Regulation by guanyl-5'-yl imidodiphosphate, NaF, and prostaglandins E1 and D2. *J Biol Chem* 261(29): 13469-13473.
- Noel, J.P., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* 366(6456): 654-663.
- Obara, S., Yamada, K., Yoshimura, Y. and Shimoyama, M. (1991). Evidence for the endogenous GTP-dependent ADP-ribosylation of the α -subunit of the stimulatory guanyl-nucleotide-binding protein concomitant with an increase in basal adenylyl cyclase activity in chicken spleen cell membrane. *Eur J Biochem* 200(1): 75-80.
- Odagaki, Y., Dasgupta, S. and Fuxe, K. (1995). Additivity and non-additivity between dopamine-, norepinephrine-, carbachol- and GABA-stimulated GTPase activity. *Eur J Pharmacol* 291(3): 245-253.
- Odagaki, Y. and Fuxe, K. (1995). 5-HT_{1A}, GABAB, and pirenzepine-insensitive muscarinic receptors are functionally coupled to distinct pools of the same kind of G proteins in rat hippocampus. *Brain Res* 689(1): 129-135.
- Odagaki, Y., Koyama, T. and Yamashita, I. (1991). Effects of long-term treatment with lithium and antidepressants on [3H]forskolin binding to rat cerebral cortical membranes. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 15(5): 709-716.
- Odagaki, Y., Nishi, N., Ozawa, H., Saito, T., Takahata, N., Riederer, P. and Koyama, T. (1998). Measurement of receptor-mediated functional activation of G proteins in postmortem human brain membranes. *Brain Res* 789(1): 84-91.
- Olianas, M.C., Ingianni, A. and Onali, P. (1998). Role of G protein betagamma subunits in muscarinic receptor-induced stimulation and inhibition of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb. *J Neurochem* 70(6): 2620-2627.
- Oyama, M. and Kubota, K. (1991). Inhibition by EDTA and enhancement by divalent cations or polyamines of the dithiothreitol-induced activation of adenylate cyclase in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* 1092(1): 85-88.
- Ozawa, Y., Chopra, I.J., Solomon, D.H. and Smith, F. (1979). The role of sulfhydryl groups in thyrotropin binding and adenylate cyclase activities of thyroid plasma membranes. *Endocrinology* 105(5): 1221-1225.

- Patel, T.B., Du, Z., Pierre, S., Cartin, L. and Scholich, K. (2001). Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269(1-2): 13-25.
- Patrizio, M., Slepko, N. and Levi, G. (1997). Opposite regulation of adenylyl cyclase by protein kinase C in astrocyte and microglia cultures. *J Neurochem* 69(3): 1267-1277.
- Perez, D.M. (2003). The evolutionarily triumphant G-protein-coupled receptor. *Mol Pharmacol* 63(6): 1202-1205.
- Pierce, K.L., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 639-650.
- Pollard, A.J., Krainer, A.R., Robson, S.C. and Europe-Finner, G.N. (2002). Alternative splicing of the adenylyl cyclase stimulatory G-protein G alpha(s) is regulated by SF2/ASF and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1) and involves the use of an unusual TG 3'-splice Site. *J Biol Chem* 277(18): 15241-15251.
- Post, S.R., Aguila-Buhain, O. and Insel, P.A. (1996). A key role for protein kinase A in homologous desensitization of the beta 2-adrenergic receptor pathway in S49 lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 271(2): 895-900.
- Post, S.R., Hilal-Dandan, R., Urasawa, K., Brunton, L.L. and Insel, P.A. (1995). Quantification of signalling components and amplification in the beta-adrenergic-receptor-adenylate cyclase pathway in isolated adult rat ventricular myocytes. *Biochem. J.* 311 (Pt 1): 75-80.
- Premont, R.T., Matsuoka, I., Mattei, M.G., Pouille, Y., Defer, N. and Hanoune, J. (1996). Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 271(23): 13900-13907.
- Princivalle, A., Regondi, M.C., Frassoni, C., Bowery, N.G. and Spreafico, R. (2000). Distribution of GABA(B) receptor protein in somatosensory cortex and thalamus of adult rats and during postnatal development. *Brain Res Bull* 52(5): 397-405.
- Robishaw, J.D., Smigel, M.D. and Gilman, A.G. (1986). Molecular basis for two forms of the G protein that stimulates adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 261(21): 9587-9590.
- Rodbell, M. (1995). Nobel Lecture. Signal transduction: evolution of an idea. *Biosci Rep* 15(3): 117-133.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L. and Krans, H.M. (1971). The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* 246(6): 1877-1882.
- Ross, B., Dawson, D., Dewar, D., Macrae, M., Knowler, J. and McCulloch, J. (1993). Effects of post-mortem delay on high affinity forskolin binding sites and adenylyl cyclase activity in rat and human striatum and cerebral cortex. *Brain Res.* 629(2): 225-230.
- Ross, E.M., Howlett, A.C., Ferguson, K.M. and Gilman, A.G. (1978). Reconstitution of hormone-sensitive adenylyl cyclase activity with resolved components of the enzyme. *J Biol Chem* 253(18): 6401-6412.
- Ryan, C.W., Vokes, E.E., Vogelzang, N.J., Janisch, L., Kobayashi, K. and Ratain, M.J. (2002). A phase I study of suramin with once- or twice-monthly dosing in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 50(1): 1-5.

- Seamon, K.B. and Daly, J.W. (1985). High-affinity binding of forskolin to rat brain membranes. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 19: 125-135.
- Seamon, K.B., Vaillancourt, R. and Daly, J.W. (1985). Modulation of forskolin binding to rat brain membranes. *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res.* 10(6): 535-549.
- Seamon, K.B., Vaillancourt, R., Edwards, M. and Daly, J.W. (1984). Binding of [3H]forskolin to rat brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 81(16): 5081-5085.
- Serrats, J., Artigas, F., Mengod, G. and Cortes, R. (2003). GABAB receptor mRNA in the raphe nuclei: co-expression with serotonin transporter and glutamic acid decarboxylase. *J Neurochem* 84(4): 743-752.
- Shin, Y., White, B.H., Uh, M. and Sidhu, A. (2003). Modulation of D1-like dopamine receptor function by aldehydic products of lipid peroxidation. *Brain Res.* 968(1): 102-113.
- Shoshani, I., Boudou, V., Pierra, C., Gosselin, G. and Johnson, R.A. (1999). Enzymatic synthesis of unlabeled and beta-(32)P-labeled beta-L-2', 3'-dideoxyadenosine-5'-triphosphate as a potent inhibitor of adenylyl cyclases and its use as reversible binding ligand. *J Biol Chem* 274(49): 34735-34741.
- Schertler, G.F., Villa, C. and Henderson, R. (1993). Projection structure of rhodopsin. *Nature* 362(6422): 770-772.
- Schimke, I., Haberland, A., Will-Shahab, L., Kuttner, I. and Papias, B. (1989). Free radical-induced damage of cardiac sarcolemma (SL) and activity loss of beta-receptor adenylyl cyclase system (beta-RAS). A comparison of the time courses. *Biomed Biochim Acta* 48(2-3): S69-72.
- Schimke, I., Haberland, A., Will-Shahab, L., Kuttner, I. and Papias, B. (1992). In vitro effects of reactive O2 species on the beta-receptor-adenylyl cyclase system. *Mol. Cell. Biochem.* 110(1): 41-46.
- Schubert, B., VanDongen, A.M., Kirsch, G.E. and Brown, A.M. (1989). Beta-adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. *Science* 245(4917): 516-519.
- Schulze-Lohoff, E., Bitzer, M., Ogilvie, A. and Sterzel, R.B. (1995). P2U-purinergic receptor activation mediates inhibition of cAMP accumulation in cultured renal mesangial cells. *Ren. Physiol. Biochem.* 18(5): 219-230.
- Schwarz, D.A., Barry, G., Eliasof, S.D., Petroski, R.E., Conlon, P.J. and Maki, R.A. (2000). Characterization of gamma-aminobutyric acid receptor GABAB(1e), a GABAB(1) splice variant encoding a truncated receptor. *J Biol Chem* 275(41): 32174-32181.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P. and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252(5007): 802-808.
- Simonds, W.F. (1999). G protein regulation of adenylyl cyclase. *Trends Pharmacol Sci* 20(2): 66-73.
- Sinnarajah, S., Dessauer, C.W., Srikumar, D., Chen, J., Yuen, J., Yilma, S., Dennis, J.C., Morrison, E.E., Vodyanoy, V. and Kehrl, J.H. (2001). RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. *Nature* 409(6823): 1051-1055.
- Skurat, A.V., Yurkova, M.S., Baranova, L.A., Gulyaev, N.N., Bulargina, T.V. and Severin, E.S. (1985). Evidence for the existence of a sulfhydryl group in the adenylyl cyclase active site. *Biochem. Int.* 10(3): 451-461.

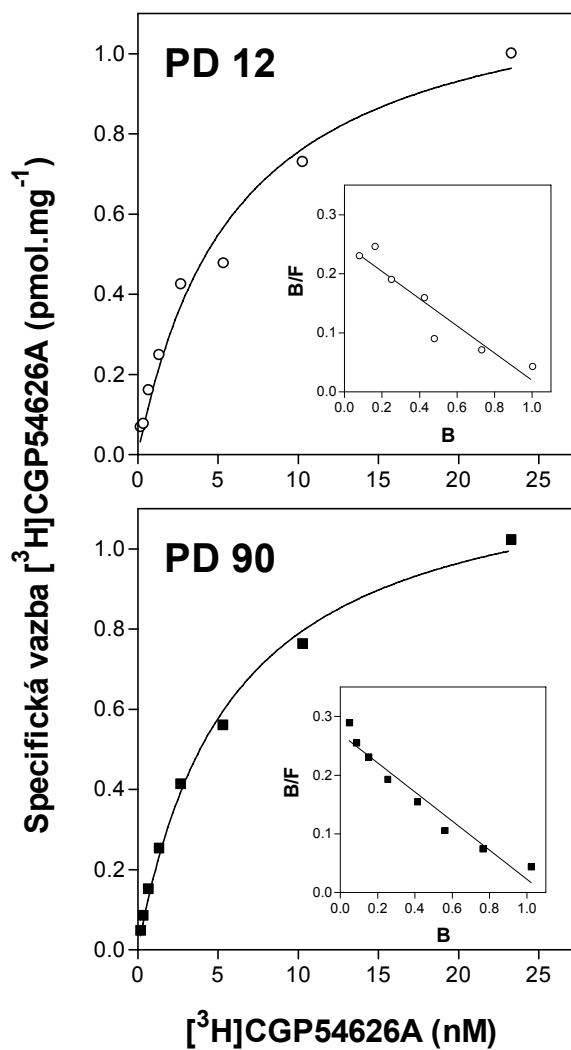
- Smith, C.M., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, Akamine, P. and Taylor, S.S. (1999). The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: prototype for an extended network of communication. *Prog Biophys Mol Biol* 71(3-4): 313-341.
- Sohma, H., Hashimoto, H., Hiraike, N., Ohguro, H. and Akino, T. (1993). Different functional forms of G-protein beta gamma-subunits, beta gamma-I and beta gamma-II, in bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 1178(1): 111-116.
- Sprang, S.R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 66: 639-678.
- Stöhr, J., Novotny, J., Bourova, L. and Svoboda, P. (2005a). Modulation of adenylyl cyclase activity in young and adult rat brain cortex. Identification of suramin as a direct inhibitor of adenylyl cyclase. *J Cell Mol Med* 9(4): 940-952.
- Stöhr, J., Novotny, J. and Svoboda, P. (2005b). Characterization of [³H]-forskolin binding sites in young and adult rat brain cortex: identification of suramin as a competitive inhibitor of [³H]-forskolin binding. *Can J Physiol Pharmacol* 83(7): 573-581.
- Strader, C.D., Fong, T.M., Graziano, M.P. and Tota, M.R. (1995). The family of G-protein-coupled receptors. *Faseb J* 9(9): 745-754.
- Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., Underwood, D. and Dixon, R.A. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63: 101-132.
- Strathmann, M., Wilkie, T.M. and Simon, M.I. (1990). Alternative splicing produces transcripts encoding two forms of the alpha subunit of GTP-binding protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(17): 6477-6481.
- Suen, E.T., Kwan, P.C. and Clement-Cormier, Y.C. (1982). Selective effects of an essential sulfhydryl group on the activation of dopamine- and guanine nucleotide-sensitive adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 22(3): 595-601.
- Suki, W.N., Abramowitz, J., Mattera, R., Codina, J. and Birnbaumer, L. (1987). The human genome encodes at least three non-allelic G proteins with alpha i-type subunits. *FEBS Lett* 220(1): 187-192.
- Summers, S.T., Walker, J.M., Sando, J.J. and Cronin, M.J. (1988). Phorbol esters increase adenylyl cyclase activity and stability in pituitary membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151(1): 16-24.
- Sunahara, R.K. and Taussig, R. (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* 2(3): 168-184.
- Sutkowski, E.M., Tang, W.J., Broome, C.W., Robbins, J.D. and Seamon, K.B. (1994). Regulation of forskolin interactions with type I, II, V, and VI adenylyl cyclases by Gs alpha. *Biochemistry*, 33(43): 12852-12859.
- Svoboda, P., Amler, E. and Teisinger, J. (1988). Different sensitivity of ATP + Mg + Na (I) and Pi + Mg (II) dependent types of ouabain binding to phospholipase A2. *J Membr Biol* 104(3): 211-221.
- Sweeney, M.I. and Dolphin, A.C. (1992). 1,4-Dihydropyridines modulate GTP hydrolysis by Go in neuronal membranes. *FEBS Lett* 310(1): 66-70.
- Takahashi, T., Kajikawa, Y. and Tsujimoto, T. (1998). G-Protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABAB receptor. *J Neurosci* 18(9): 3138-3146.

- Tan, C.M., Kelvin, D.J., Litchfield, D.W., Ferguson, S.S. and Feldman, R.D. (2001). Tyrosine kinase-mediated serine phosphorylation of adenylyl cyclase. *Biochemistry* 40(6): 1702-1709.
- Tan, C.M., McDonald, C.G., Chorazyczewski, J., Burry, A.F., Feldman, R.D. and Macdonald, C.J. (1999). Vanadate stimulation of adenylyl cyclase: an index of tyrosine kinase vascular effects. *Clin Pharmacol Ther* 66(3): 275-281.
- Tang, W.J. and Gilman, A.G. (1991). Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* 254(5037): 1500-1503.
- Taussig, R. and Gilman, A.G. (1995). Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 270(1): 1-4.
- Taussig, R., Iniguez-Lluhi, J.A. and Gilman, A.G. (1993a). Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science* 261(5118): 218-221.
- Taussig, R., Quarmby, L.M. and Gilman, A.G. (1993b). Regulation of purified type I and type II adenylyl cyclases by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem* 268(1): 9-12.
- Taussig, R., Sanchez, S., Rifo, M., Gilman, A.G. and Belardetti, F. (1992). Inhibition of the omega-conotoxin-sensitive calcium current by distinct G proteins. *Neuron* 8(4): 799-809.
- Taussig, R., Tang, W.J., Hepler, J.R. and Gilman, A.G. (1994). Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 269(8): 6093-6100.
- Towers, S., Princivalle, A., Billinton, A., Edmunds, M., Bettler, B., Urban, L., Castro-Lopes, J. and Bowery, N.G. (2000). GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 12(9): 3201-3210.
- Turgeon, S.M. and Albin, R.L. (1994). Postnatal ontogeny of GABAB binding in rat brain. *Neuroscience* 62(2): 601-613.
- Valiquette, M., Parent, S., Loisel, T.P. and Bouvier, M. (1995). Mutation of tyrosine-141 inhibits insulin-promoted tyrosine phosphorylation and increased responsiveness of the human beta 2-adrenergic receptor. *EMBO J.* 14(22): 5542-5549.
- Voyno-Yasenetskaya, T.A. (1998). G proteins and Na⁺/H⁺ exchange. *Biol Signals Recept* 7(2): 118-124.
- Voyno-Yasenetskaya, T.A., Faure, M.P., Ahn, N.G. and Bourne, H.R. (1996). Galpha12 and Galpha13 regulate extracellular signal-regulated kinase and c-Jun kinase pathways by different mechanisms in COS-7 cells. *J Biol Chem* 271(35): 21081-21087.
- Watson, P.A., Krupinski, J., Kempinski, A.M. and Frankenfield, C.D. (1994). Molecular cloning and characterization of the type VII isoform of mammalian adenylyl cyclase expressed widely in mouse tissues and in S49 mouse lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 269(46): 28893-28898.
- Wayman, G.A., Impey, S. and Storm, D.R. (1995). Ca²⁺ inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo. *J Biol Chem* 270(37): 21480-21486.
- Wayman, G.A., Impey, S., Wu, Z., Kindsvogel, W., Prichard, L. and Storm, D.R. (1994). Synergistic activation of the type I adenylyl cyclase by Ca²⁺ and Gs-coupled receptors in vivo. *J Biol Chem* 269(41): 25400-25405.
- Wei, J., Zhao, A.Z., Chan, G.C., Baker, L.P., Impey, S., Beavo, J.A. and Storm, D.R. (1998). Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron* 21(3): 495-504.

- Wei, K., Eubanks, J.H., Francis, J., Jia, Z. and Snead, O.C., 3rd (2001). Cloning and tissue distribution of a novel isoform of the rat GABA(B)R1 receptor subunit. *Neuroreport* 12(4): 833-837.
- White, A.A. (1974). Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography. *Methods Enzymol* 38: 41-46.
- White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M. and Marshall, F.H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396(6712): 679-682.
- Wilkie, T.M., Gilbert, D.J., Olsen, A.S., Chen, X.N., Amatruda, T.T., Korenberg, J.R., Trask, B.J., de Jong, P., Reed, R.R., Simon, M.I. and et al. (1992). Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nat Genet* 1(2): 85-91.
- Wojcik, W.J., Cavalla, D. and Neff, N.H. (1985). Co-localized adenosine A1 and gamma-aminobutyric acid B (GABAB) receptors of cerebellum may share a common adenylate cyclase catalytic unit. *J Pharmacol Exp Ther* 232(1): 62-66.
- Xia, Z., Choi, E.J., Wang, F., Blazynski, C. and Storm, D.R. (1993). Type I calmodulin-sensitive adenylyl cyclase is neural specific. *J Neurochem* 60(1): 305-311.
- Xia, Z., Choi, E.J., Wang, F. and Storm, D.R. (1992). The type III calcium/calmodulin-sensitive adenylyl cyclase is not specific to olfactory sensory neurons. *Neurosci Lett* 144(1-2): 169-173.
- Xia, Z.G., Refsdal, C.D., Merchant, K.M., Dorsa, D.M. and Storm, D.R. (1991). Distribution of mRNA for the calmodulin-sensitive adenylate cyclase in rat brain: expression in areas associated with learning and memory. *Neuron* 6(3): 431-443.
- Yatani, A., Mattera, R., Codina, J., Graf, R., Okabe, K., Padrell, E., Iyengar, R., Brown, A.M. and Birnbaumer, L. (1988). The G protein-gated atrial K⁺ channel is stimulated by three distinct Gi alpha-subunits. *Nature* 336(6200): 680-682.
- Yokoyama, S. and Starmer, W.T. (1992). Phylogeny and evolutionary rates of G protein alpha subunit genes. *J Mol Evol* 35(3): 230-238.
- Yoshimura, M. and Cooper, D.M. (1993). Type-specific stimulation of adenylyl cyclase by protein kinase C. *J Biol Chem* 268(7): 4604-4607.
- Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A.E. and Hurley, J.H. (1997). Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* 386(6622): 247-253.
- Zhang, Y.L., Keng, Y.F., Zhao, Y., Wu, L. and Zhang, Z.Y. (1998). Suramin is an active site-directed, reversible, and tight-binding inhibitor of protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 273(20): 12281-12287.
- Zimmermann, G. and Taussig, R. (1996). Protein kinase C alters the responsiveness of adenylyl cyclases to G protein alpha and betagamma subunits. *J. Biol. Chem.* 271(43): 27161-27166.

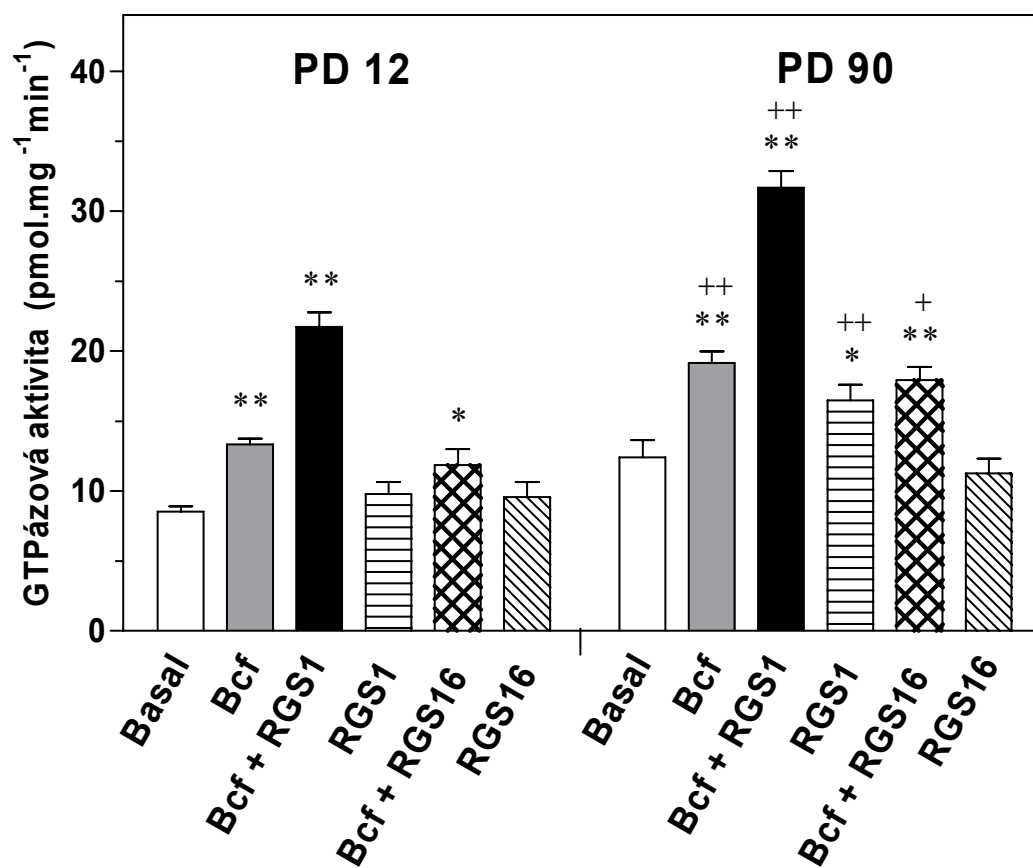
PŘÍLOHA I – OBRÁZKY

Obr.1 Vazba [3 H]CGP54626A



K určení počtu a afinity $GABA_B$ receptorů v membránách mozkové kůry z nezralých a dospělých potkanů byl použit specifický $GABA_B$ antagonist $[^3$ H]CGP54626A. Data představují průměr ze tří experimentů provedených v triplikátech. Vložené grafy: Scatchardův výnos dat získaných ze saturačních vazebných křivek.

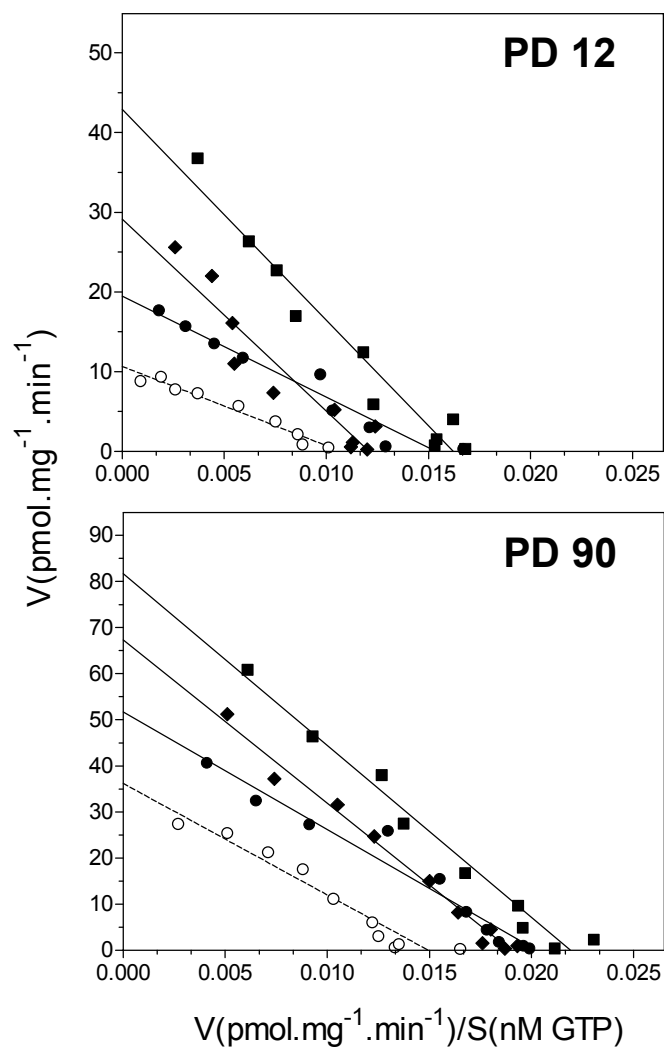
Obr.2 Vysokoafinní GTPázová aktivita



Bazální, baclofenem (BCF) a/nebo RGS stimulovaná GTPázová aktivita byla stanovena v membránách mozkové kůry z nezralých a dospělých potkanů. Čísla představují průměr ze tří experimentů provedených v triplikátech (průměr ± SEM).

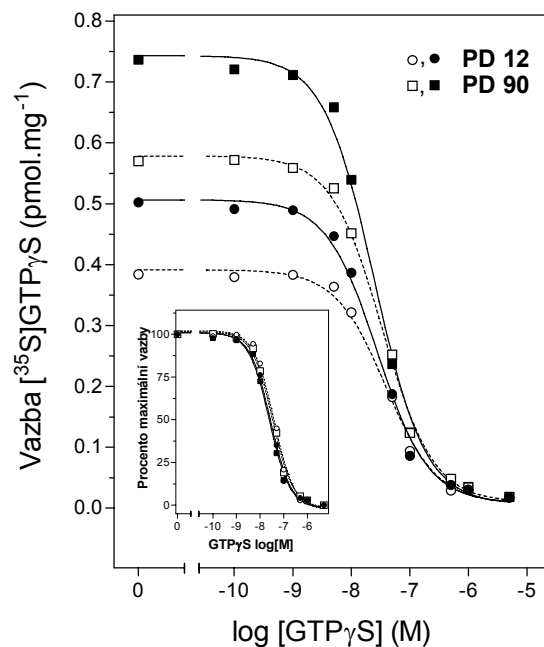
* $p < 0,1$, ** $p < 0,01$ vs. bazál; + $p < 0,1$, ++ $p < 0,01$ vs. PD 12

Obr.3 Kinetická analýza GTPázové aktivity



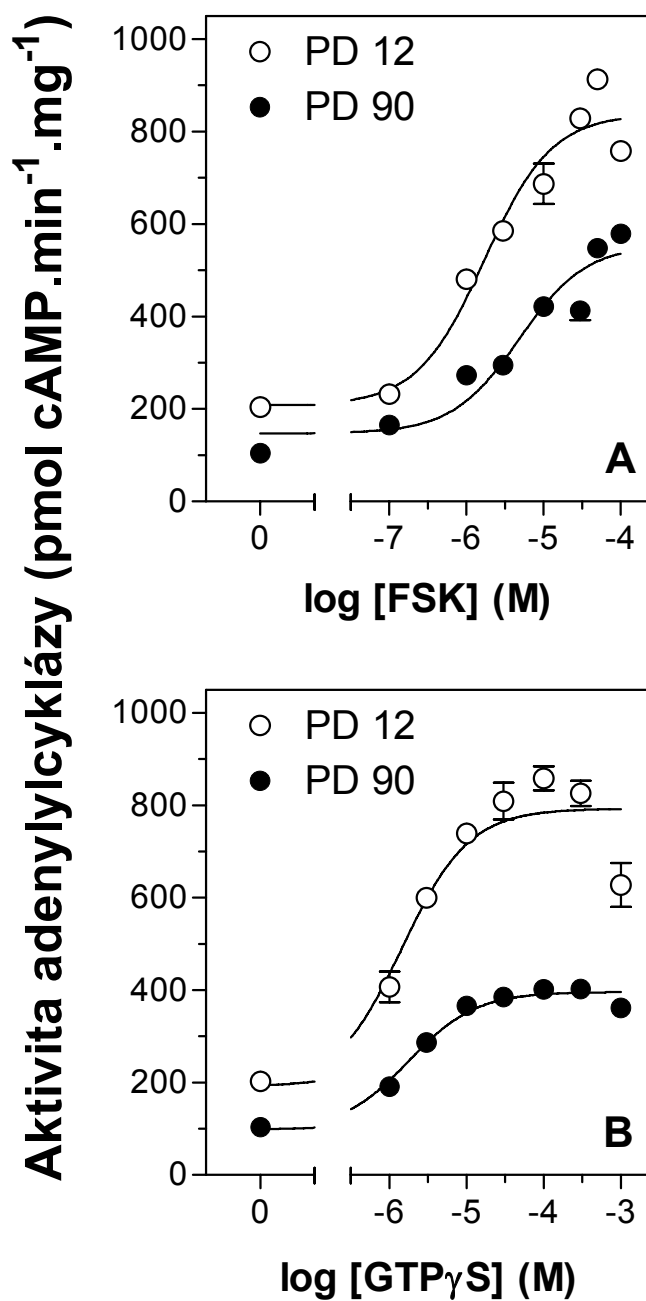
Bazální (prázdná kolečka), baclofenem (plná kolečka), baclofenem + RGS16 (plné kosočtverce) a baclofenem + RGS1 (plné čtverce) stimulovaná GTPázová aktivita byla měřena v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12) a dospělých (PD 90) potkanů jako funkce zvyšující se koncentrace GTP. Data jsou znázorněna jako Eadie-Hofsteeho výnos. Vypočítané hodnoty K_m a V_{max} jsou zobrazeny v **Tab.1**. Data představují průměr ze tří experimentů provedených v triplikátech

Obr.4 Vazba [^{35}S]GTP γS



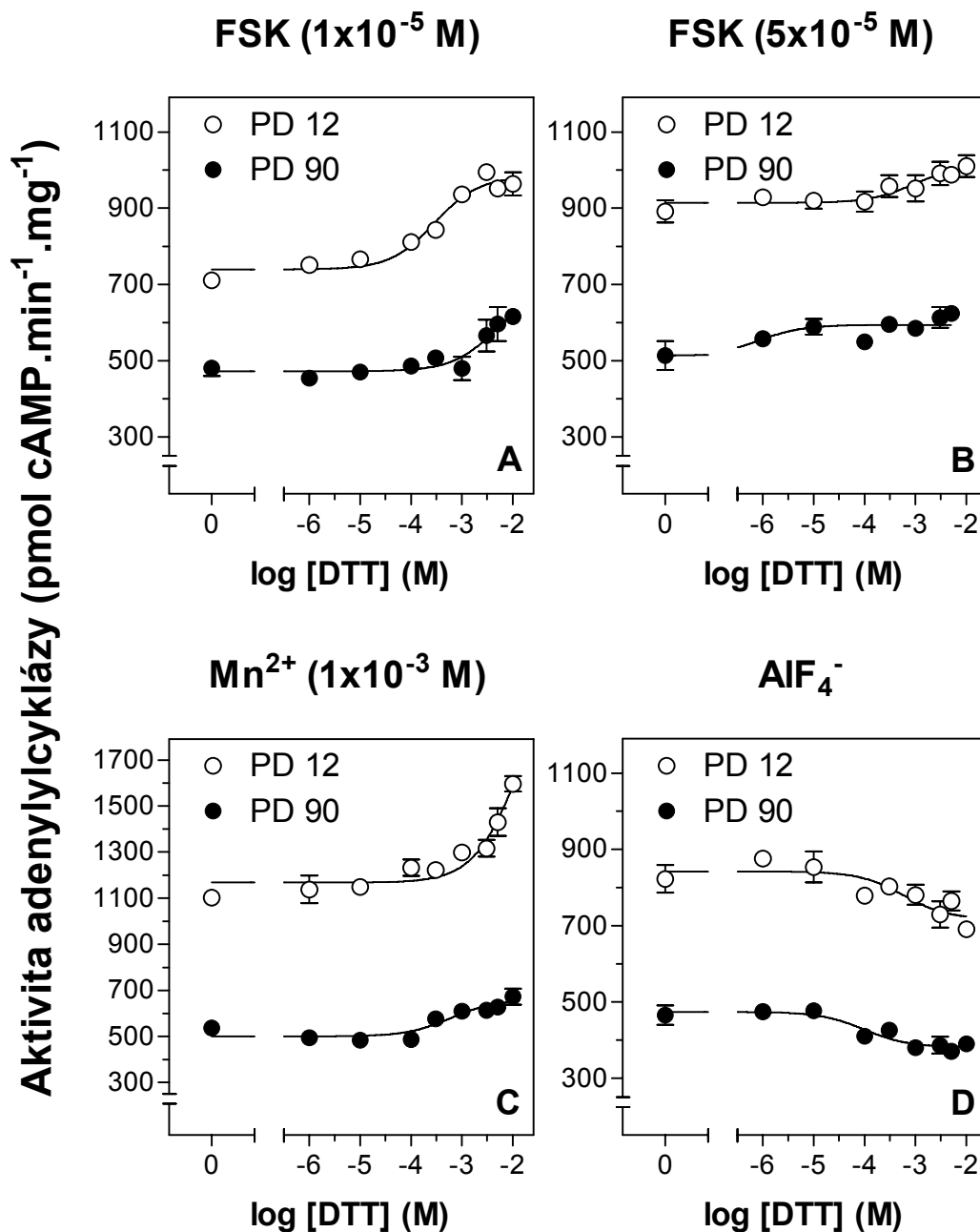
Data představují průměr ze tří experimentů provedených v triplikátech pro stanovení bazální (prázdné symboly) a baclofenem stimulovanou (plné symboly) vazbu [^{35}S]GTP γS v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12) a dospělých (PD 90) potkanů. Vložený graf: Data byla vynesena jako procento odpovídající maximální vazby.

Obr.5 Stimulace aktivity AC forskolinem (FSK) a $GTP\gamma S$



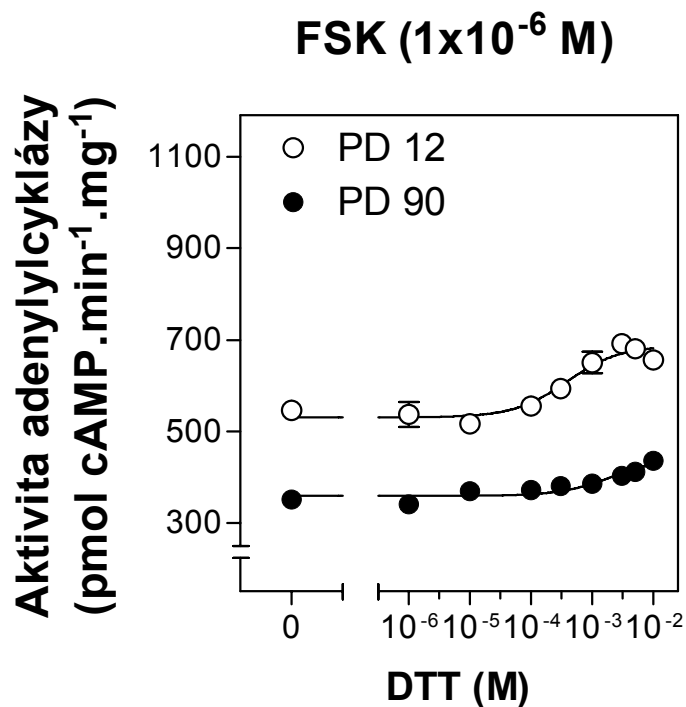
AC aktivita byla stanovena v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12 – prázdná kolečka) a dospělých (PD 90 – plná kolečka) potkanů a křivky dávka-odpověď byly vyneseny pro forskolin (A) a $GTP\gamma S$ (B). Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplikátech.

Obr.6 Vliv DTT na aktivitu AC stimulovanou forskolinem, Mn^{2+} a AlF_4^-



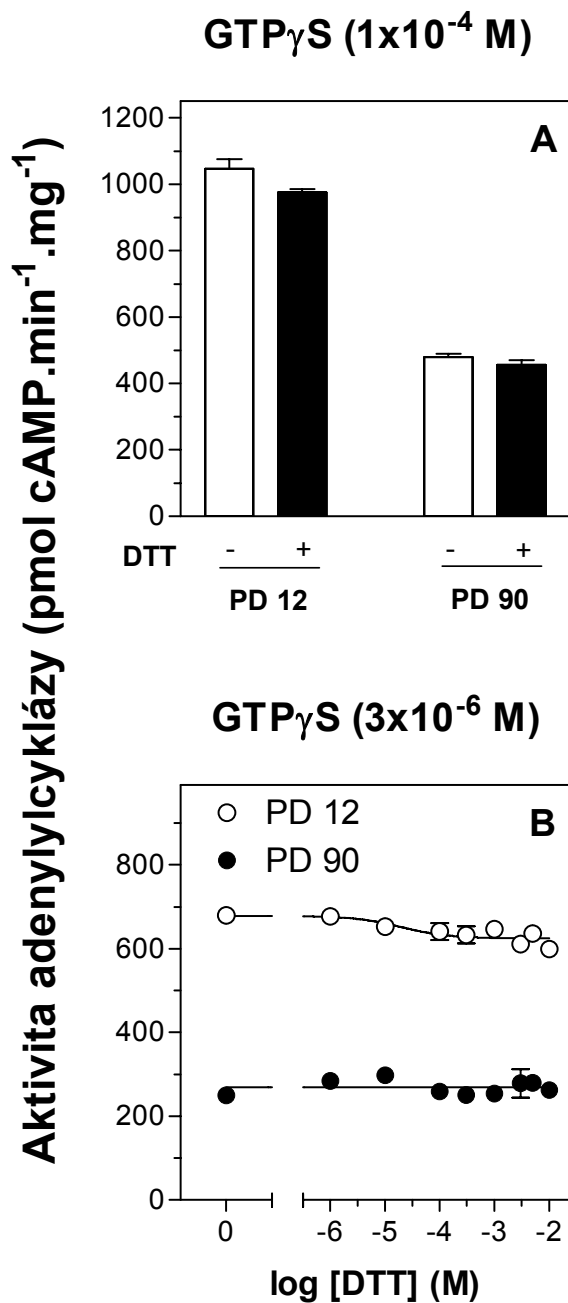
Za účelem modulace AC aktivity stimulované 1x10⁻⁵M forskolinem (A), 5x10⁻⁵M forskolinem (B), 1x10⁻²M Mn^{2+} (C) a AlF_4^- (D) byla přidána zvyšující se koncentrace DTT k membránám mozkové kůry z nezralých (PD 12 – prázdná kolečka) a dospělých (PD 90 – plná kolečka) potkanů. Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech.

Obr.7 Vliv DTT na aktivitu AC stimulovanou FSK o nízké koncentraci



Zvyšující se koncentrace DTT za účelem modulace AC aktivity stimulované nízkou koncentrací forskolinu (1×10^{-6} M) byla přidána k membránám mozkové kůry z nezralých (PD 12 – prázdná kolečka) a dospělých (PD 90 – plná kolečka) potkanů. Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplikátech.

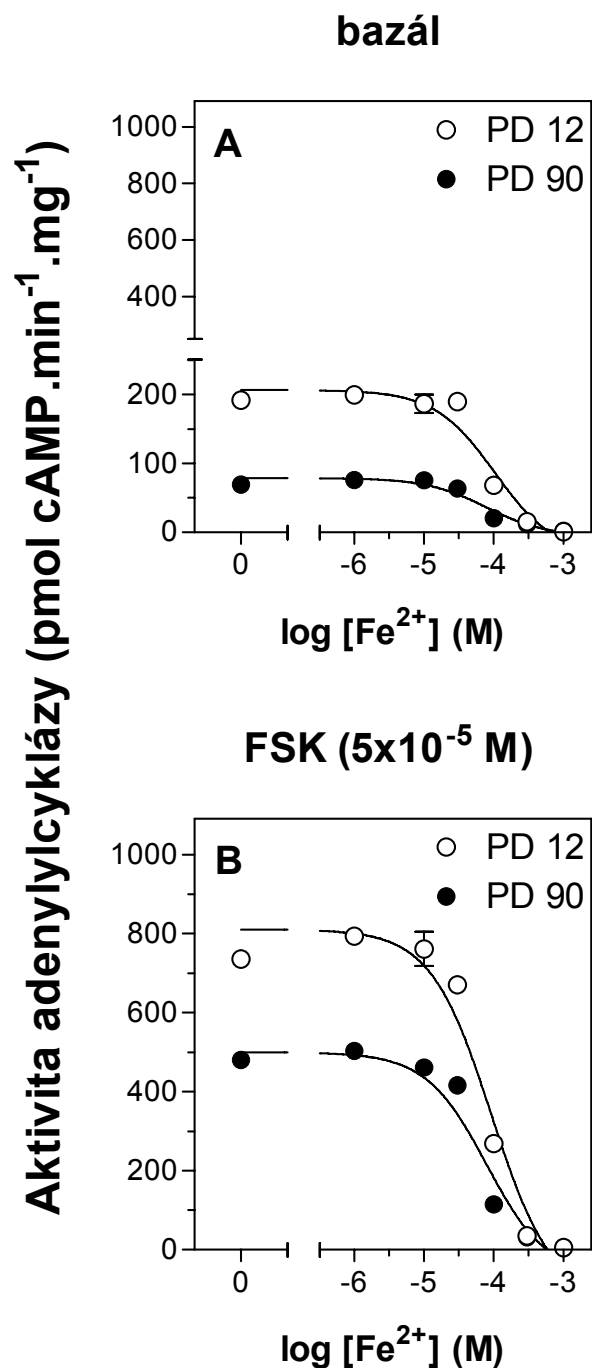
Obr.8 Vliv DTT na aktivitu AC stimulovanou $GTP\gamma S$



Vliv 1×10^{-2} M DTT na AC aktivitu stimulovanou maximálně efektivní koncentrací $GTP\gamma S$ (1×10^{-4} M) byl sledován v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12) a dospělých (PD 90) potkanů (A).

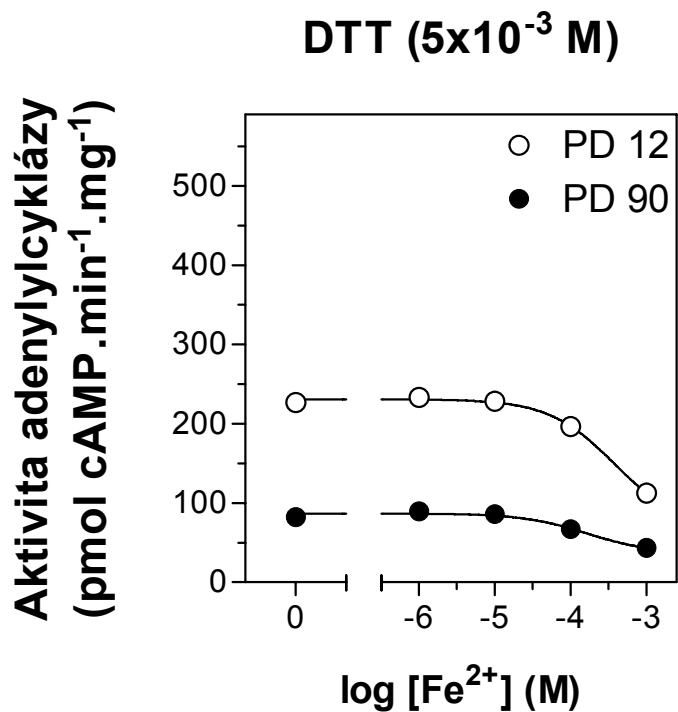
Zvyšující se koncentrace DTT byla přidána za účelem modulace AC aktivity stimulované submaximální koncentrací $GTP\gamma S$ (3×10^{-6} M) v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12 – prázdná kolečka) a dospělých (PD 90 – plná kolečka) potkanů. Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplikátech.

Obr.9 Vliv Fe^{2+} na bazální a forskolinem stimulovanou aktivitu AC



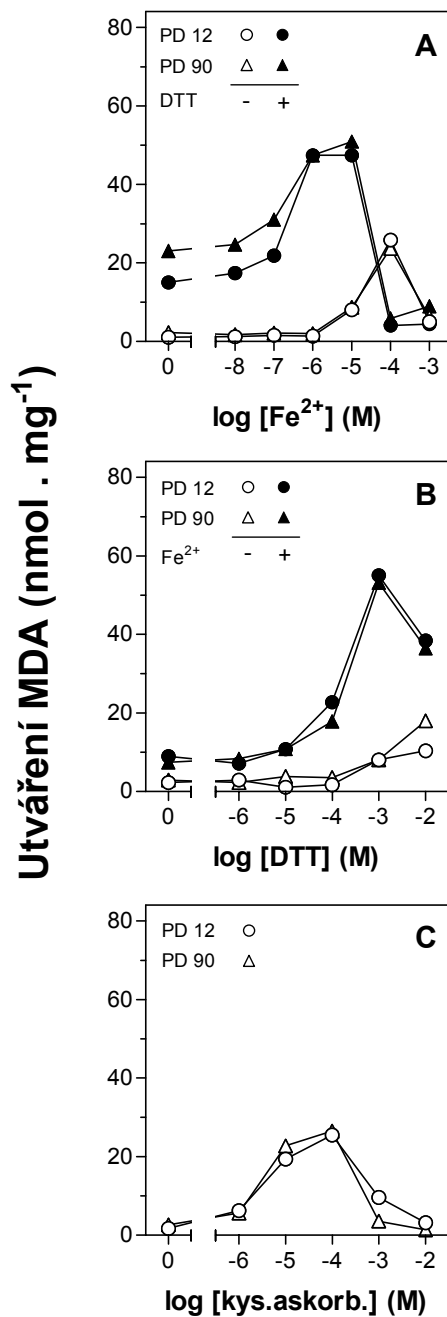
Zvyšující se koncentrace Fe^{2+} ($FeSO_4$) byla přidána za účelem modulace bazální (A) a forskolinem stimulované AC aktivity v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12 – prázdná kolečka) a dospělých (PD 90 – plná kolečka) potkanů. Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech.

Obr.10 Vliv Fe^{2+} /DTT na bazální aktivitu AC



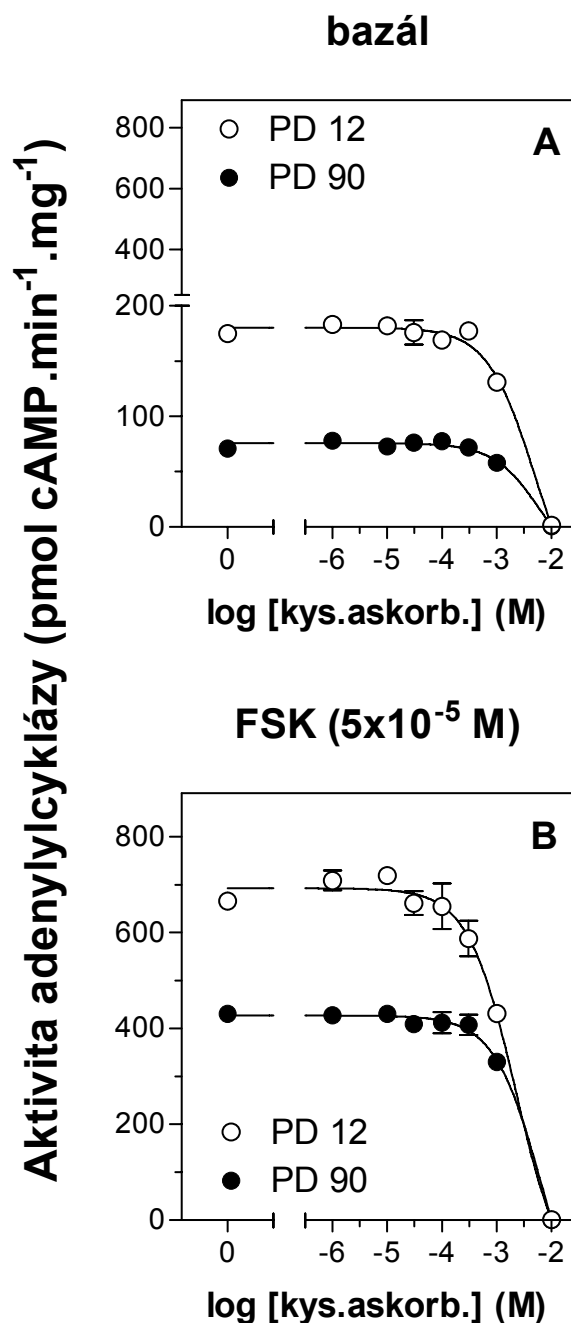
AC aktivity v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12 – prázdná kolečka) a dospělých (PD 90 – plná kolečka) potkanů byla stanovena v přítomnosti 5×10^{-3} M DTT a zvyšující se koncentrace Fe^{2+} ($FeSO_4$). Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplikátech.

Obr.11 Vliv Fe^{2+} /DTT a kyseliny askorbové na lipidovou peroxidaci



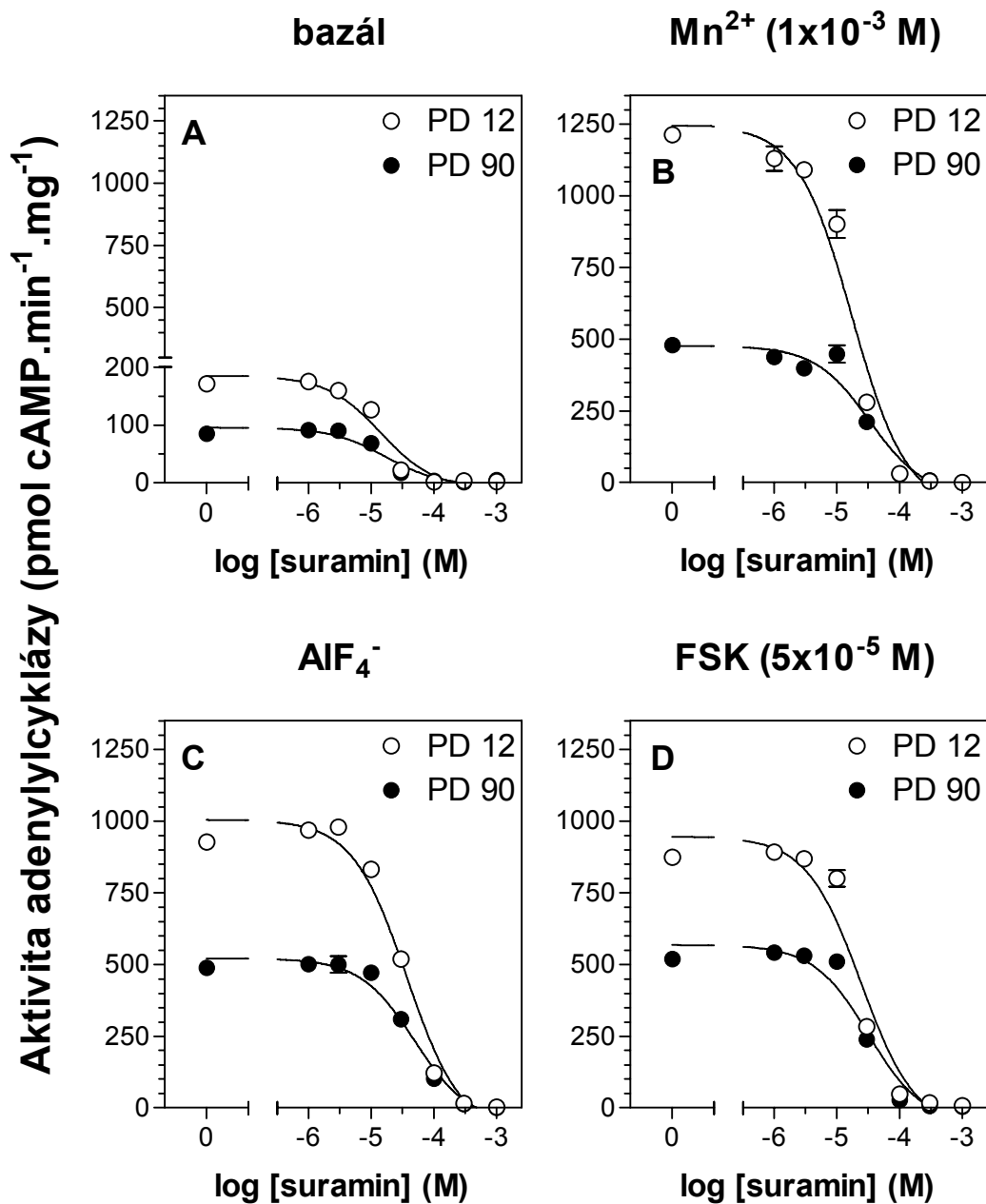
Lipidová peroxidace v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12 – kolečka) a dospělých (PD 90 – trojúhelníky) potkanů byla stanovena jako tvorba MDA s použitím buď zvyšující se koncentrace Fe^{2+} ($FeSO_4$) v přítomnosti (plné symboly) či nepřítomnosti (prázdné symboly) $1 \times 10^{-3} M$ DTT (A) nebo zvyšující se koncentrace DTT v přítomnosti (plné symboly) či nepřítomnosti (prázdné symboly) $1 \times 10^{-5} M$ Fe^{2+} (B) nebo v přítomnosti (prázdné symboly) zvyšující se koncentrace kyseliny askorbové (C). Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech.

Obr.12 Vliv kyseliny askorbové na bazální a forskolinem stimulovanou aktivitu AC



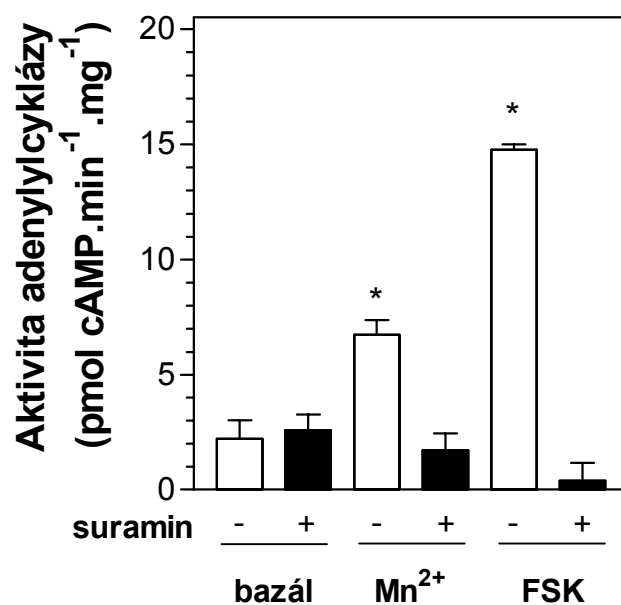
Bazální (A) a forskolinem stimulovaná AC aktivita v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12 – kolečka) a dospělých (PD 90 – trojúhelníky) potkanů byla stanovena v přítomnosti zvyšující se koncentrace kyseliny askorbové (C). Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech.

Obr.13 Vliv suraminu na bazální aktivitu AC a stimulovanou Mn^{2+} , AlF_4^- a forskolinem



Zvyšující se koncentrace suraminu byla přidána za účelem modulace bazální (A) a stejně tak AC aktivity stimulované 1×10^{-2} M Mn^{2+} (B), AlF_4^- (C) a 5×10^{-5} M forskolinem (D) v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12 – prázdná kolečka) a dospělých (PD 90 – plná kolečka) potkanů. Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech.

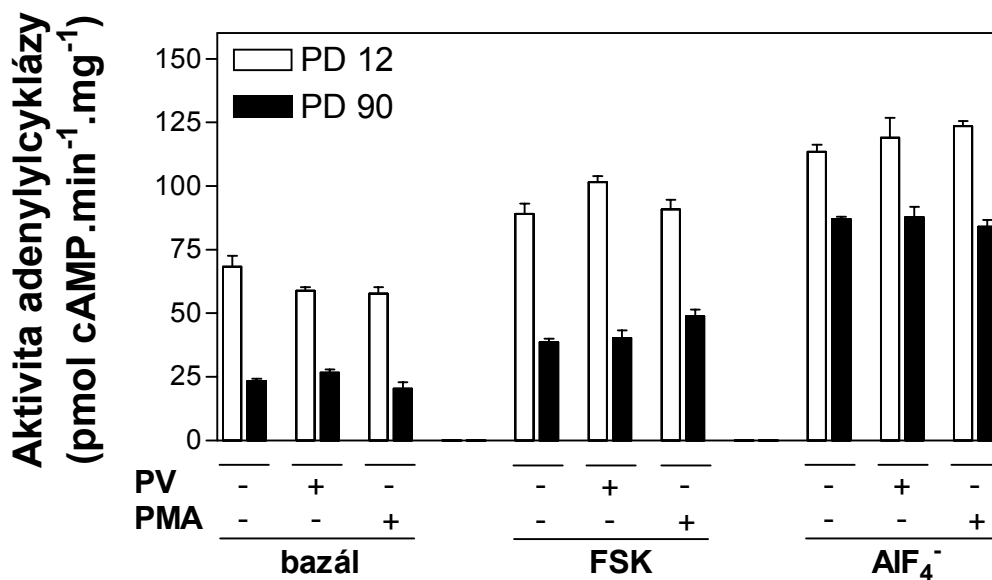
Obr.14 Vliv suraminu na aktivitu AC v cyc^- membránách



Bazální, Mn^{2+} (1×10^{-2} M) a forskolinem (5×10^{-5} M) stimulovaná AC aktivita v plazmatických membránách získaných z S49 cyc^- lymfomových buněk byla stanovena v přítomnosti (plné sloupce) či nepřítomnosti (prázdné sloupce) 1×10^{-4} M suraminu. Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech.

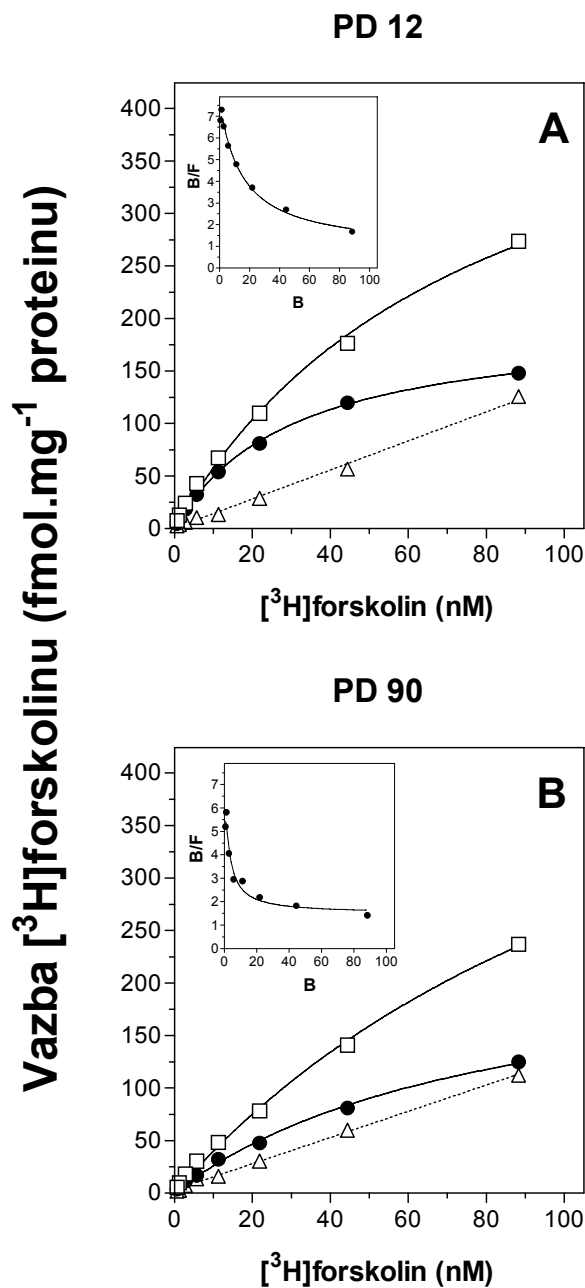
* $p < 0,1$ vs. suramin

Obr.15 Vliv fosforylace na aktivitu AC



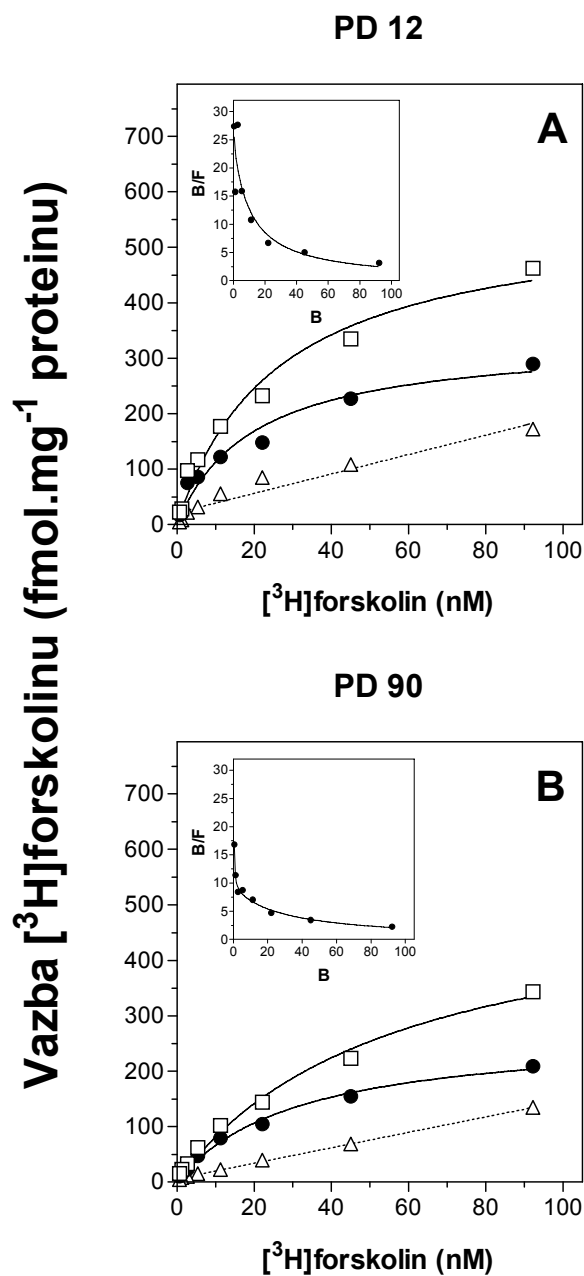
Fosforylace v membránách mozkové kůry z nezralých (PD 12 – prázdné sloupce) a dospělých (PD 90 – plné sloupce) potkanů byla katalyzována buď proteinkinázou C (PKC) nebo protein tyrosinovou kinázou (PTK) (Summers a kol., 1988). PKC byla aktivována 10min preinkubací vzorků při 30°C s 1μM forbol myristát acetátem (PMA) (Mikalsen a Kaalhus, 1996). Pro aktivacifosforylace PTK byla použita preinkubace vzorků (10 min při 30°C) s 10 μM pervanadátem (PV). Bazální, forskolinem (1×10^{-5} M) a AlF_4^- stimulovaná AC aktivita byla stanovena jak je popsáno v metodách. Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplikátech.

Obr.16 Saturační vazebné křivky [³H]forskolinu



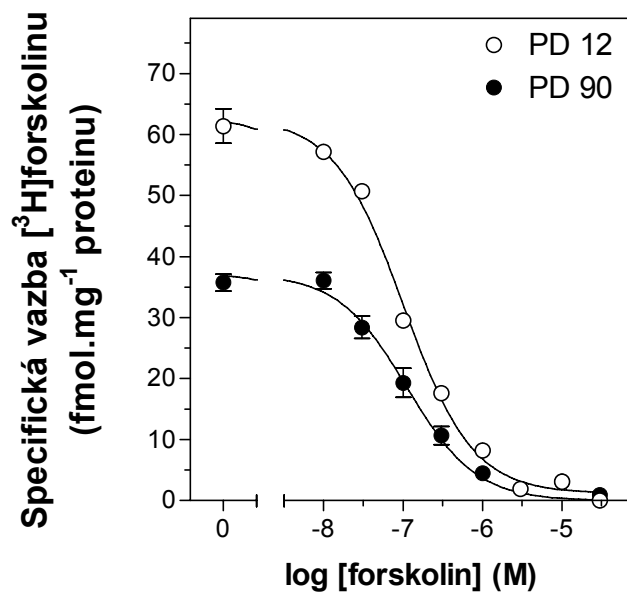
Membrány mozkové kůry z nezralých (A) a dospělých (B) potkanů byly inkubovány se zvyšující se koncentrací [³H]forskolinu a v přítomnosti 10mM MgCl₂ po 60 min při 20 °C. Specifická (●) vazba [³H]forskolinu odpovídá rozdílu mezi celkovou (□) a nespecifickou (Δ) vazbou, která byla měřena v přítomnosti 20μM neznačeného forskolinu. Data představují průměr (± SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech. Vložený graf: Scatchardův výnos dat získaných ze saturačních vazebných křivek.

Obr.17 Saturační vazebné křivky [^3H]forskolinu v přítomnosti AlF_4^-



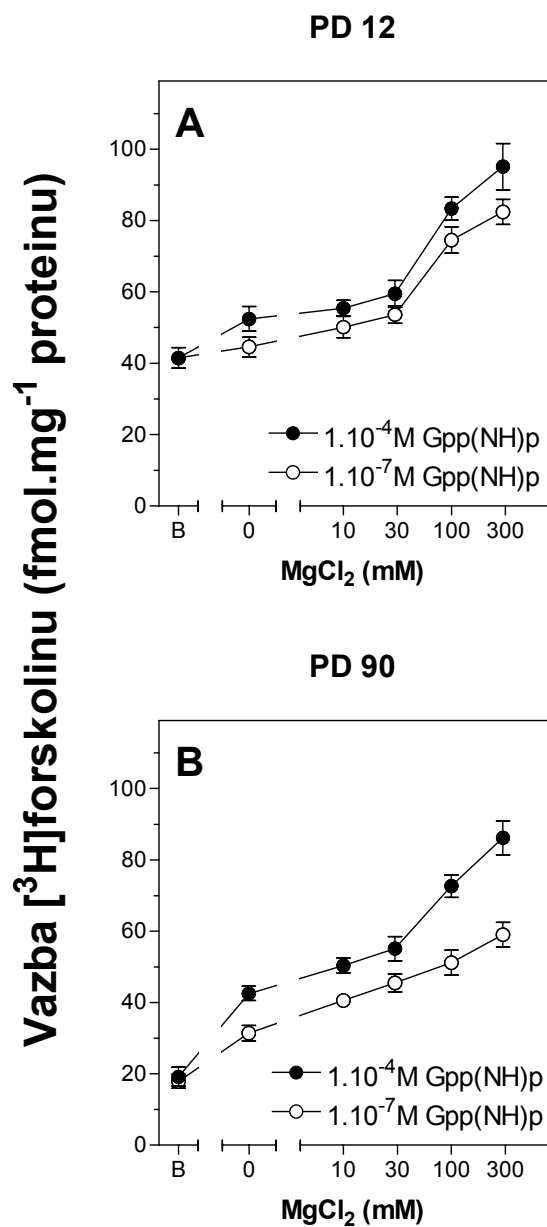
Membrány mozkové kůry z nezralých (A) a dospělých (B) potkanů byly inkubovány se zvyšující se koncentrací [^3H]forskolinu a v přítomnosti AlF_4^- a 10mM MgCl_2 po 60 min při 20 °C. Specifická (\bullet) vazba [^3H]forskolinu odpovídá rozdílu mezi celkovou (\square) a nespecifickou (Δ) vazbou, která byla měřena v přítomnosti 20 μM neznačeného forskolinu. Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech. Vložený graf: Scatchardův výnos dat získaných ze saturačních vazebných křivek.

Obr.18 Kompetice vazby [³H]forskolinu s neznačeným forskolinem



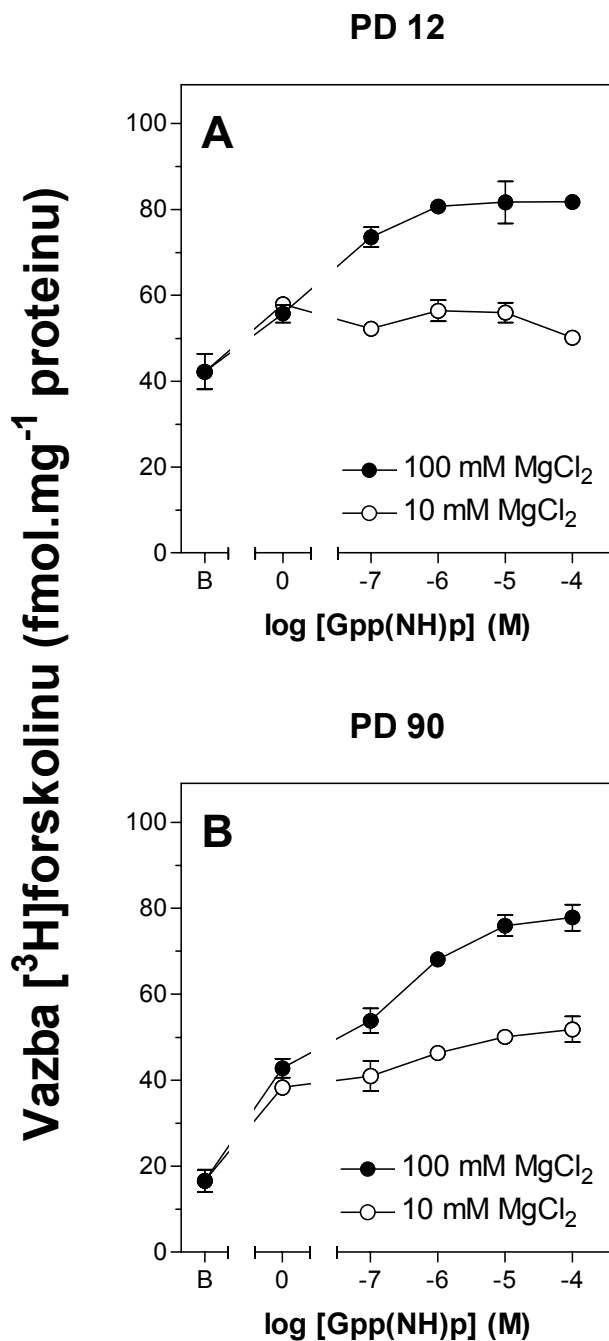
Membrány mozkové kůry z nezralých (prázdná kolečka) a dospělých (plná kolečka) potkanů byly inkubovány se zvyšující se koncentrací neznačeného forskolinu a při konstantní koncentraci [³H]forskolinu (20 nM) a v přítomnosti 10mM MgCl₂ po 60 min při 20 °C. Data představují průměr (± SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech.

Obr.19 Vliv Mg^{2+} na specifickou vazbu [3H]forskolinu modulovanou $Gpp(NH)p$



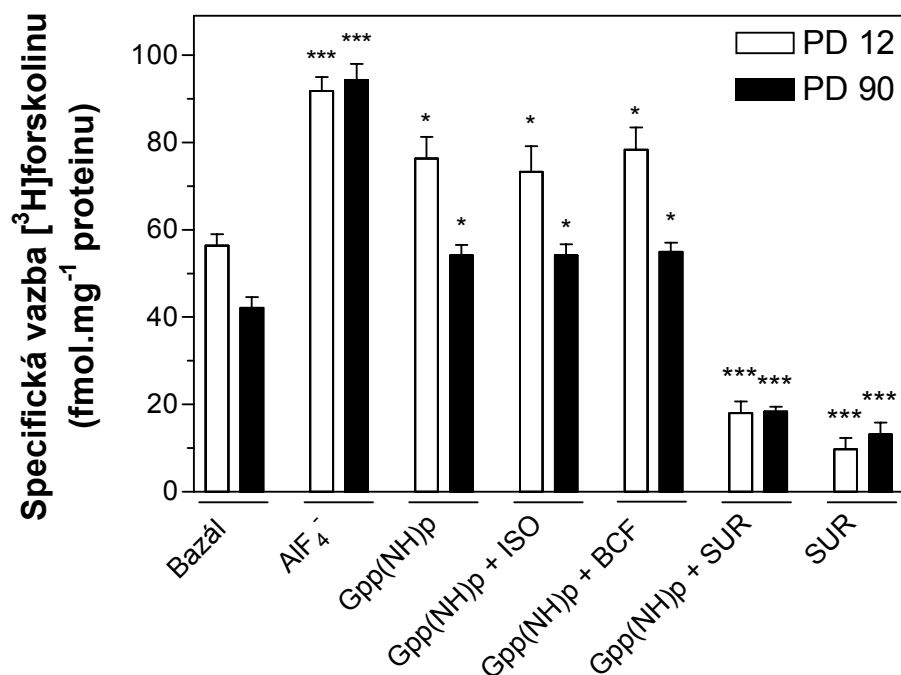
Membrány mozkové kůry z nezralých (A) a dospělých (B) potkanů byly inkubovány s 20nM [3H]forskolinem v přítomnosti 1×10^{-7} M (prázdná kolečka) nebo 1×10^{-4} M $Gpp(NH)p$ a zvyšující se koncentrací $MgCl_2$ po 60 min při 20 °C. „Bazální“ hodnoty vazby [3H]forskolinu získané v nepřítomnosti Mg^{2+} a $Gpp(NH)p$ jsou označeny „B“ na ose x. Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech. Vložený graf: Scatchardův výnos dat získaných ze saturačních vazebných křivek.

Obr.20 Vliv $Gpp(NH)p$ na specifickou vazbu [3H]forskolinu



Membrány mozkové kůry z nezralých (A) a dospělých (B) potkanů byly inkubovány s 20nM [3H]forskolinem v přítomnosti 10mM (prázdná kolečka) nebo 100mM Mg^{2+} po 60 min při 20 °C. „Bazální“ hodnoty vazby [3H]forskolinu získané v nepřítomnosti Mg^{2+} a $Gpp(NH)p$ jsou označeny „B“ na ose x. Data představují průměr (\pm SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech. Vložený graf: Scatchardův výnos dat získaných ze saturačních vazebných křivek.

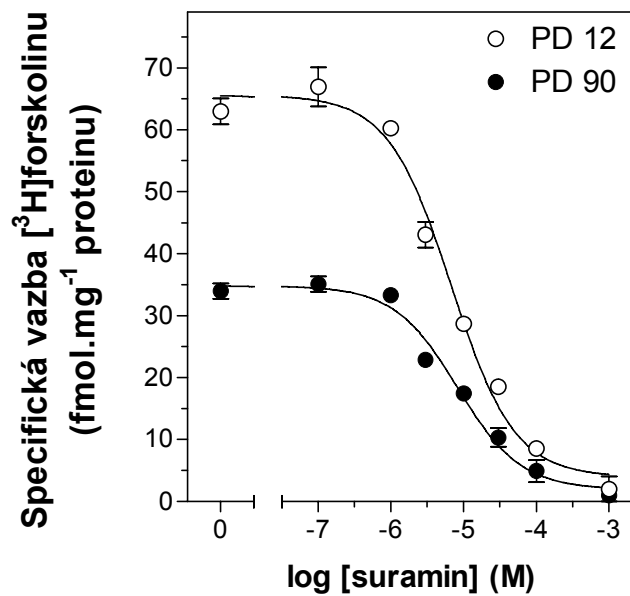
Obr.21 Modulace vazby [³H]forskolinu isoprenalinem, baclofenem, Gpp(NH)p, AlF₄⁻ a suraminem



Membrány mozkové kůry z nezralých (prázdné sloupce) a dospělých (plné sloupce) potkanů byly inkubovány v přítomnosti 100mM MgCl₂ s 20nM [³H]forskolinem a dále v přítomnosti buď samotného 1x10⁻⁷M Gpp(NH)p nebo v kombinaci s 1x10⁻⁵M isoprenalinem (ISO), 1x10⁻³M baclofenem (BCF) nebo 1x10⁻⁴M suraminem (SUR) po 60 min při 20 °C. Vliv samotného AlF₄⁻ (10mM NaF + 1mM AlCl₃) nebo 1x10⁻⁴M suraminu na vazbu [³H]forskolinu byl měřen při stejných podmínkách. Všechna data jsou reprezentativní ze tří pokusů provedených v triplikátech.

* $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. bazální vazba [³H]forskolinu

Obr.22 Vliv suraminu na vazbu [³H]forskolinu



Membrány mozkové kůry z nezralých (prázdná kolečka) a dospělých (plná kolečka) potkanů byly inkubovány se zvyšující se koncentrací suraminu a při konstantní koncentraci [³H]forskolinu (20 nM) po 60 min při 20 °C. Data představují průměr (± SEM) z reprezentativního pokusu provedeného v triplicátech.

PŘÍLOHA II – TABULKY

Tab.1 Kinetické charakteristiky vysokoafinní GTPázy v mozkové kůře potkana

	bazál	baclofen	baclofen + RGS1	baclofen + RGS16
<i>PD 12</i>				
K_m	0,99 ± 0,09	1,27 ± 0,12	2,65 ± 0,21 ^{↑↑}	2,41 ± 0,29 ^{↑↑}
V_{max}	10,7 ± 0,5	19,5 ± 1,1 ^{**}	42,9 ± 2,6 ^{↑↑↑}	29,2 ± 2,6 ^{↑↑}
<i>PD 90</i>				
K_m	2,43 ± 0,22	2,55 ± 0,19	3,73 ± 0,23 ^{↑↑}	3,55 ± 0,15 ^{↑↑}
V_{max}	36,2 ± 2,4	51,7 ± 2,9 ^{**}	81,7 ± 3,8 ^{↑↑}	67,3 ± 2,2 ^{↑↑}

Hodnoty K_m (μM) and V_{max} ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinu) byly vypočítány z dat uvedených na **Obr.3**. Čísla představují průměr ze 3 experimentů (průměr ± SEM).

** $p < 0,01$ vs. bazál; ^{↑↑} $p < 0,01$ vs. baclofen; ^{↑↑↑} $p < 0,001$ vs. baclofen

Tab.2 Vazba [³H]forskolinu na membrány mozkové kůry nezralých a dospělých potkanů

	K_D (nM)		B_{max} (fmol/mg)	
	K_H	K_{SH}	B_H	B_{SH}
<i>PD 12</i>				
Mg^{2+}	33 ± 6	3,1 ± 1,8	200 ± 16	3,2 ± 1,6
Mg^{2+}/AlF_4^-	45 ± 9	4,0 ± 2,3	351 ± 45 [†]	103 ± 15 [†]
<i>PD 90</i>				
Mg^{2+}	136 ± 26*	3,2 ± 1,9	296 ± 39*	8,6 ± 2,9
Mg^{2+}/AlF_4^-	168 ± 31*	5,6 ± 2,5	335 ± 34	101 ± 18 [†]

Charakteristiky vazby [³H]forskolinu na membrány mozkové kůry nezralých (PD 12) a dospělých (PD 90) potkanů v přítomnosti 10 mM MgCl₂ (Mg²⁺) nebo 10 mM MgCl₂ + AlF₄⁻ (Mg²⁺/AlF₄⁻) byly vypočítány z korespondujících Scatchardových výnosů. Hodnoty jsou průměry odhadů (± SEM) vysokoafinních (K_H) a super-vysokoafinních (K_{SH}) disociačních konstant nebo počet vysokoafinních (B_H) a super-vysokoafinních (B_{SH}) vazebných míst pro [³H]forskolin, které byly získány ze tří nezávislých pokusů měřených v triplikátech.

* p < 0,05 vs. PD 12; † p < 0,01 vs. Mg²⁺