

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**Cholinergní transmise na muskarinových receptorech:
vliv β -amyloidu a role jednotlivých G-proteinů**

**Muscarinic cholinergic transmission: effect of β -amyloid
and role of individual G-proteins**

Diplomová práce

Školitel: MUDr. Vladimír Doležal, DrSc.

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

Helena Smyčková

Praha, 2009

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233145704

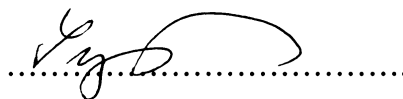
Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli MUDr. Vladimíru Doležalovi, DrSc. za odborné vedení, ochotu a trpělivý přístup při vypracovávání mé diplomové práce. Za pomoc a podporu děkuji také Mgr. Janu Jakubíkovi, PhD. a Mgr. Aleně Randákové a dále pak všem členům skvělého kolektivu oddělení neurochemie za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za zájem a cenná doporučení při vypracování mé diplomové práce.

Prohlášení

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

V Praze dne: 14.7.2009

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized cursive letters, is written over a horizontal dotted line.

Obsah

A.	Úvod	6
B.	Cíl práce	9
C.	Seznam použitých zkratk	10
D.	Teoretická část	12
	1. Muskarinové receptory	12
	1.1 Molekulární struktura muskarinových receptorů	12
	1.2 Spřahování muskarinových receptorů s heterotrimerickými G-proteiny	13
	1.3 Výskyt muskarinových receptorů a jejich podtypů v organismu	15
	1.4 Signální dráhy muskarinových receptorů	16
	1.5 Fyziologické funkce muskarinových receptorů	20
	1.6 Farmakologie muskarinových receptorů	22
	1.7 Desenzitizace, down-regulace a internalizace muskarinových receptorů	24
	1.8 Cholinergní mechanismy u Alzheimerovy nemoci.	25
E.	Praktická část	30
	2. Materiály a přístroje	30
	2.1 Chemikálie a materiály	30
	2.2 Přístroje	31
	2.3 Biologický materiál	31
	3. Metody	32
	3.1 Pěstování buněk a příprava membrán	32
	3.2 Měření proteinů	32
	3.3 Saturační a vytěšňovací pokusy	33
	3.3.1 Vazba agonistů k M2 mAChR po vyřazení jednotlivých podtypů G-proteinů pomocí protilátek	34
	3.3.2 Vazba agonistů k M2 mAChR po vyřazení jednotlivých podtypů G-proteinů pomocí protilátek a současném potlačení exprese α -podjednotek G_i G-proteinů	34
	3.3.3 Exprese jednotlivých podtypů mAChR a jejich afinita k [3 H]-NMS při akutním a po chronickém působení β -amyloidu.	35
	3.3.4 Vazba karchololu na jednotlivé podtypy mAChR při akutním a po chronickém působení β -amyloidu	35
	3.4 Vyhodnocení výsledků	36

3.4.1 Saturační vazebné pokusy	36
3.4.2 Vytěšňovací vazebné pokusy	36
4. Výsledky	38
4.1 Vazba agonistů k M2 mAChR po vyřazení jednotlivých typů G-proteinů pomocí protilátek	38
4.2 Vazba agonistů k M2 mAChR po vyřazení jednotlivých typů G-proteinů pomocí protilátek po inhibici exprese α -podjednotek G_i G-proteinů pomocí RNA interference	42
4.3 Vliv akutního a chronického působení β -amyloidu na vazebné vlastnosti mAChR pro antagonistu 3H -NMS	46
4.4 Vliv akutního a chronického působení β -amyloidu na vazebné vlastnosti mAChR pro agonistu karbachol	51
5. Diskuze	56
6. Shrnutí	60
F. Seznam citované literatury	61

A: Úvod

Muskarinové receptory, jimiž jsem se zabývala ve své práci, patří do velké skupiny receptorů spřahujících se s G-proteiny (G-protein coupled receptors - GPCRs). Tato rozsáhlá skupina proteinů zahrnuje velké množství strukturálně i funkčně odlišných receptorů, které jsou na základě podobnosti v aminokyselinových sekvencích rozděleny do šesti rodin. Klasifikace GPCRs není vždy jednotná, avšak nejčastěji bývají řazeny do šesti tříd podle sekvenční homologie a funkční podobnosti:

Třída A – rhodopsinová rodina (rhodopsin family)

Třída B – sekretinová rodina (secretin-like family)

Třída C – metabotropní glutamát/feromonová rodina (metabotropic glutamate/pheromone family)

Třída D – receptory fungálních feromonů (fungal pheromone mating factor receptors)

Třída E – cAMP receptory (cyclic AMP receptors)

Třída F - frizzled/smoothened receptory (Frizzled/Smoothened)

Do největší rhodopsinové rodiny patří také muskarinové receptory, u kterých rozeznáváme pět podtypů: M1, M2, M3, M4 a M5 /*Bonner et al. 1987, Peralta et al. 1987*/.

Receptory spřažené s G-proteiny jsou transmembránové receptory, mezi jejichž ligandy patří široká škála molekul - hormony, neurotransmitery, feromony, odoranty nebo sloučeniny citlivé na světlo (rhodopsin). Vazba agonisty k GPCR vede ke konformačním změnám receptoru a spřaženého G-proteinu. Ty spouští kaskádu nitrobuněčných dějů, které například mění koncentraci druhých posílů (cyklický adenosinmonofosfát - cAMP), vápenatých iontů nebo ovlivňují vodivost iontových kanálů. Jsou to jednořetězcové polypeptidy obvykle sestávající z přibližně 300 aminokyselin, které se vyznačují střídáním hydrofilních a hydrofobních oblastí. Hydrofobní části peptidového řetězce tvoří transmembránové domény. Typickým strukturálním rysem GPCR je sedm transmembránových domén s extracelulárním

-NH₂ koncem a intracelulárním -COOH koncem. Většina receptorů s touto strukturou jsou receptory spřažené s G-proteiny, avšak u všech nebyla signalizace prostřednictvím G-proteinů prokázána. Na druhou stranu všechny receptory spřažené s G-proteiny tuto typickou strukturu mají, proto bývají GPCRs také někdy alternativně nazývány „seven transmembrane“ (7 TM) nebo serpentinné receptory. Velkou část nadrodiny GPCR tvoří takzvané „sirotčí GPCRs“ (orphan GPCR), pro něž dosud nebyl objeven přirozený ligand.

Geny kódující GPCRs tvoří u živočichů 3 – 5% celého genomu. Navíc ústřední role, kterou GPCRs hrají v buněčné komunikaci, z nich činí hlavní cíle známých farmak a zároveň jedny z nejčastějších molekul, na které se zaměřuje současný farmakologický výzkum. Podle odhadu z roku 2000 je více než 40% v současnosti distribuovaných léků zaměřeno právě na GPCR /Wilson a Bergsma 2000/. Do budoucna je možné očekávat další výrazný nárůst, protože lidský genom obsahuje geny pro 800 až 1000 různých GPCRs, zatímco momentálně používané léky jsou zaměřeny pouze na méně než 50 z nich /Eglen et al. 2007/.

GPCRs se spřahují s heterotrimerickými G-proteiny, které přenášejí extracelulární signál primárně zprostředkovaný agonistou receptoru dále do nitra buňky. Heterotrimerické G-proteiny jsou dle charakteru své alfa podjednotky řazeny do čtyř tříd, Gi, Gq, Gs a G12. Každá ze tří podjednotek G-proteinu může existovat v několika izoformách, z nichž mnohé mají různé sestřihové varianty, které jsou společně schopné tvořit stovky variant různých G-proteinů. Specifická kombinace podjednotek heterotrimerických G-proteinů ovlivňuje nejen vazbu ke konkrétnímu receptoru, ale také spřažení s cílovou metabolickou dráhou, případně iontovým kanálem. Jednotlivé třídy G-proteinů aktivují či inhibují rozdílné metabolické dráhy nebo regulují iontové kanály. Například Gs stimuluje produkci cAMP, zatímco Gi ji inhibuje. Gq stimuluje tvorbu fosfolipázy C a jejím prostřednictvím uvolňuje zásoby intracelulárního kalcia.

Muskarinové receptory zprostředkovávají mnoho fyziologických funkcí, které zahrnují například kontrakci hladké svaloviny, sekreci hormonů nebo ovlivnění exprese různých genů. V centrálním nervovém systému se účastní na procesech učení a paměti, které jsou porušeny u Alzheimerovy choroby (AD). Existuje proto hypotéza, podle které je za úbytek kognitivních funkcí u AD zodpovědná právě snížená cholinergní transmise na muskarinových receptorech, především podtypu M1. V současné době se rozvoj Alzheimerovy choroby zpomaluje léky, které inhibují enzym cholinesterázu. Cholinesteráza štěpí acetylcholin uvolněný z presynaptického nervového zakončení do synaptické štěrbině a proto inhibice tohoto enzymu napomáhá zvyšovat koncentraci acetylcholinu v synaptické štěrbině a prodlužuje působení acetylcholinu na muskarinových receptorech. Vývoj těchto léků byl stimulován právě poznatkem, že progresse Alzheimerovy choroby je doprovázena ztrátou cholinergních neuronů v bazálním předním mozku a také hladina acetylcholinu v mozku při AD na rozdíl od jiných neurotransmiterů klesá /Bowen et al. 1983/. Průvodním jevem Alzheimerovy choroby je tvorba amyloidových plaků v mozku, které jsou tvořeny β -amyloidem. β -Amyloid, peptid o 39 – 42 aminokyselinách, vzniká postupným amyloidogenním štěpením bílkoviny prekurzor amyloidu (amyloid precursor protein, APP) /Selkoe 2001/. Je neurotoxický zvláště ve své

oligomerní formě /Selkoe 2002/ a podle některých prací spolu tíže cholinergního deficitu a hladina β -amyloidu v průběhu nemoci koreluje /Beach et al. 1997/. Bylo prokázáno, že stimulace M1 a M3 podtypů muskarinových receptorů, které se preferenčně spřahují se signální dráhou Gq/11 G-proteinů, podporuje štěpení APP α -sekretázou uprostřed amyloidové sekvence, čímž snižuje pravděpodobnost vzniku toxického β -amyloidu /Nitsch et al. 1993/. Oslabováním muskarinové signalizace v důsledku snižování dostupnosti acetylcholinu se tak může urychlovat postup onemocnění.

Ve své práci jsem se zabývala molekulárními mechanismy spřahování muskarinového receptoru podtypu M2 se třemi hlavními třídami G-proteinů: Gi/o, Gq/11 a Gs. Liché podtypy muskarinových receptorů se preferenčně spřahují s Gq/11, kdežto sudé podtypy s Gi/o třídou G-proteinů. Tato specifita však není absolutní. Například při dostatečné koncentraci agonisty a zároveň vysoké hustotě muskarinových receptorů v membráně byla pozorována aktivace nepreferenčních Gs a Gq/11 G-proteinů u buněk stabilně exprimujících pouze M2 nebo M4 podtyp muskarinových receptorů /Michal et al. 2001, 2007, 2009/. Dále jsem se zabývala otázkou, zda β -amyloid (fragment 1-42) poškozuje cholinergní transmissi a zkoumala jsem, zda akutní či chronické působení β -amyloidu ovlivňuje vazebné vlastnosti nebo expresi jednotlivých podtypů muskarinových receptorů.

B: Cíl práce

Cílem mé práce bylo zhodnotit vliv spřáhování jednotlivých hlavních tříd heterotrimerických G-proteinů na afinitu vazby vybraných ortosterických agonistů u muskarinového receptoru M2 a prozkoumat vliv akutního a chronického působení β -amyloidu na vazebné vlastnosti agonisty karcholu u jednotlivých podtypů muskarinového receptoru.

C: Seznam použitých zkratek

AC	adenylátcykláza
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
APP	amyloid precursor protein (protein prekurzor amyloidu)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CHO	Chinese hamster ovary (fibroblasty z ovárií zlatého křečka)
CNS	centrální nervový systém
DAG	diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EC50	effective concentration 50 (koncentrace vyvolávající polovinu max. odpovědi)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermal growth factor (epidermální růstový faktor)
Emax	maximální stimulace
eNOS	endoteliální forma NO syntázy
GDP	guanosin-difosfát
GPCR	receptor spřahující se s G-proteinem (G-protein-coupled receptor)
GTP	guanosin-trifosfát
G-proteiny	proteiny vážící GTP
Gi/o, Gq/11, Gs a G12	alfa podjednotky jednotlivých podtypů heterotrimerických G-proteinů
GIRK kanály	G-protein Inward Rectifying Potassium
HEK-293	(Human Embryonic Kidney cells) fibroblasty z lidských ledvin
³ H-NMS	tritiovaná forma N-methylskopolaminu
IC50	half maximal inhibitory concentration (koncentrace, která vytěsňuje 50% značeného ligandu)
IP ₃	inositoltrisfosfát
Kd	rovnovážná disociační konstanta (koncentrace, při níž je obsazena polovina vazebných míst)
M1, M2, M3, M4 a M5	jednotlivé podtypy muskarinového receptoru
mAChR	muskarinový acetylcholinový receptor
Na-Hepes	sodná sůl kyseliny 1-[2-hydroxyethyl]piperazin-1-ethansulfonové
nNOS	neuronální forma NO syntázy
PBS	Phosphate Buffered Saline

PC12	buněčná linie odvozená z krysího feochromocytomu
PDE	fosfodiesteráza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLA2	fosfolipáza A2
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
RGS proteiny	regulator of G-protein signaling proteins (regulátory G-proteinové signalizace)
VOCCs	voltage operated Ca ²⁺ channels (napětově závislé Ca ²⁺ kanály)

D: Teoretická část

1. Muskarinové receptory

Muskarinové receptory (mAChR) jsou acetylcholinové receptory, které patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. Kromě muskarinových receptorů působí acetylcholin (ACh) také na nikotinové acetylcholinové receptory, které však patří do skupiny chemicky řízených iontových kanálů. V organismu jsou muskarinové receptory distribuovány jak v mozku tak v periferních nervových i nenervových tkáních. Existuje celkem pět podtypů muskarinových receptorů (M1-M5), z nichž vždy liché a sudé podtypy jsou si vzájemně funkčně i strukturně blízce podobné.

1.1 Molekulární struktura muskarinových receptorů

V počátcích studia mAChR se farmakologickými metodami podařilo identifikovat nejprve dva různé podtypy muskarinových receptorů, M1 a M2, a to na základě jejich odlišné afinity k pirenzepinu. Avšak až ve chvíli, kdy byla naklonována cDNA a příslušné geny kódující mAChR, bylo možné s jistotou říci, že existuje přinejmenším pět podtypů muskarinových receptorů /Bonner et al. 1987, 1988; Peralta et al. 1987/.

Molekulová hmotnost mAChR se pohybuje mezi 51 000 (M1, M2) až 66 000 (M3). Tak jako u všech ostatních receptorů spřažených s G-proteiny, aminokyselinové sekvence muskarinových receptorů obsahují sedm hydrofobních segmentů v délce 20–30 aminokyselin, které tvoří transmembránové domény. Jednotlivé podtypy receptoru jsou u savčích druhů dobře konzervované (89 – 98% sekvenční homologie). Většina substitucí se vyskytuje na extracelulárním $-NH_2$ konci peptidového řetězce nebo v cytoplazmatické oblasti spojující transmembránové domény V a VI (třetí intracelulární smyčka), naopak maximum sekvenční homologie je v oblasti transmembránových domén. Transmembránové domény jsou také nejvíce konzervované mezi členy celé rozsáhlé nadrodiny GPCR /Brann et al. 1993/. Jednotlivé podtypy mAChR jsou si do značné míry podobné i mezi sebou a z celkové délky zhruba 500 aminokyselin obsahují 160 invariantních zbytků. Velmi malá sekvenční homologie je však na $-NH_2$ konci třetí intracelulární smyčky pro 15 – 20 posledních aminokyselin.

Specifické spřahování mAChR s orthosterickými ligandy je závislé především na druhé, třetí a sedmé transmembránové doméně. Tyto funkční domény byly identifikovány v průběhu osmdesátých a devadesátých let prostřednictvím konstrukce chimérických receptorů. Pomocí bodových mutací pak byly nalezeny konkrétní aminokyseliny zodpovědné

za do určité míry specifické spřáhování jednotlivých mAChR s jejich ligandy /*Bonner 1989*/. Aminokyselinové zbytky důležité pro vazbu ligandu jsou umístěné na vnitřním povrchu transmembránových helixů, jeden až tři závitů od jejich předpokládaného extracelulárního konce /*Hulme et al. 1993*/. Zásadní roli ve vazbě ligandů hraje aspartát ve třetí transmembránové doméně. S tímto aspartátem interaguje amoniiová skupina přirozeného mediátoru ACh, která je také součástí většiny muskarinových ligandů. Právě vznik iontové vazby mezi aspartátem třetí transmembránové domény a amoniiovou skupinou je hlavním krokem v interakci muskarinového receptoru a jeho ligandu. Tento aspartátový zbytek se nachází u všech GPCR, které vážou kationtové amoniiové skupiny /*Curtis et al. 1989*/.

Studium transmembránových domén dále odhalilo threoninové zbytky v páté transmembránové doméně a tyrosinové zbytky v šesté transmembránové doméně identické u všech pěti podtypů mAChR, které se však nevyskytují u ostatních receptorů spřažených s G-proteiny. Substitute těchto zbytků alaninem a fenylalaninem snížila vazbu agonistů k receptoru, neměla však žádný vliv na vazbu antagonistů /*Wess et al. 1991*/.

Transmembránové domény číslo 2, 4, 5 a 6 se shlukují kolem domény číslo 3 a tvoří tak útvar připomínající pravidelný šestistěn. Transmembránová doména číslo 1 není součástí tohoto šestistěnu a vyčnívá na jeho okraji. Svazek transmembránových domén je na vnitřní straně cytoplazmatické membrány velmi těsně sbalený, avšak směrem extracelulárním se poněkud rozevírá a tvoří kapsu, do které se pod úrovní povrchu fosfolipidové dvojvrstvy membrány zachycuje ligand. Stejně jako u mnoha dalších členů rodiny GPCR, také konformace mAChR je stabilizována disulfidovým můstkem, který spojuje extracelulární konec třetí transmembránové domény a druhou extracelulární smyčku mezi doménami čtyři a pět. Transmembránové domény 1–5 a domény 6 a 7, které jsou vzájemně odděleny dlouhou třetí intracelulární smyčkou, mohou fungovat do jisté míry nezávisle na sobě a v membráně se dokáží spontánně shlukovat. Pokud byly tyto dvě skupiny domén v některých studiích ko-exprimovány nezávisle na sobě, aktivita receptoru zůstala zachována /*Maggio et al. 1993*/.

1.2 Spřáhování muskarinových receptorů s heterotrimerickými G-proteiny

Název této skupiny proteinů je odvozen od faktu, že G-proteiny vážou na svou α podjednotku guaninové nukleotidy guanosindifosfát (GDP) nebo guanosintrifosfát (GTP) a zároveň vykazují vnitřní GTPázovou aktivitu. G-proteiny hrají zásadní roli v mezibuněčné komunikaci, buněčném růstu, membránovém transportu, syntéze proteinů a dalších buněčných pochodech. Savčí G-proteiny mohou být rozděleny do dvou základních skupin:

heterotrimerické G-proteiny a malé G-proteiny. Heterotrimerické G-proteiny zprostředkovávají přenos signálu u všech podtypů muskarinových receptorů.

V klidovém stavu existují G-proteiny jako heterotrimery s navázaným GDP, které jsou asociovány s transmembránovými receptory nebo se pohybují v membráně a mohou s receptory náhodně interagovat. Navázání agonisty na receptor podnítky konformační změnu tohoto receptoru, která dále způsobí změnu konformace asociovaného G-proteinu. Ta vede k výměně GDP navázaného na α podjednotku za GTP. Konformační změna α podjednotky podnítky konformační změnou receptoru a navázáním GTP vede k disociaci G-proteinu od receptoru a jeho rozpadu na dimer podjednotek $\beta\gamma$ a α podjednotku. Jak uvolněná podjednotka α , tak heterodimer podjednotek $\beta\gamma$ jsou biologicky aktivní a mohou ovlivňovat nejrůznější buněčné děje. Celý systém se vrací do klidového stavu poté, co je agonista uvolněn z receptoru a GTPázová aktivita vlastní α podjednotce hydrolyzuje GTP zpět na GDP. To nakonec vede k reasociaci jednotlivých podjednotek do původního heterotrimeru a možnosti jejich zpětného spřažení s receptorem /Nestler a Duman 1999/.

Heterotrimerické G-proteiny byly poprvé identifikovány a charakterizovány začátkem osmdesátých let. Mezi jejich cílové efektorové proteiny patří například iontové kanály nebo enzymy adenylátcykláza, fosfodiesteráza (PDE), fosfoinositid-specifická fosfolipáza C (PLC) katalyzující hydrolýzu fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu (PIP_2) a fosfolipáza A_2 (PLA_2) katalyzující hydrolýzu membránových fosfolipidů, ze kterých následně vzniká arachidonová kyselina. Krátce po objevu G-proteinů byly identifikovány tři jejich různé typy: G_t , nazývaný transducin, který se spřahuje s rhodopsinem a pomáhá regulovat funkci světločivých buněk a dále G_s a G_i , které byly identifikovány jako proteiny zprostředkovávající stimulaci nebo inhibici enzymu adenylátcyklázy zodpovědného za tvorbu cyklického adenylátmonofosfátu (cAMP). Později bylo identifikováno ještě mnohem více různých G-proteinů, například G_q , G_o , G_{olf} , G_{gust} , G_z , G_{11-16} a $G_{12/13}$.

Jednotlivé typy G-proteinů obsahují různé podjednotky α , které vykazují alespoň částečně specifickou funkční aktivitu. Současná nomenklatura rozeznává čtyři základní podrodiny G-proteinů podle obsažené podjednotky α : G_i , G_q , G_s a G_{12} . Aktivita G_i α podjednotky může být blokována pertussis toxinem, G_s podjednotky pak choleroým toxinem. Molekulová váha G-proteinů se pohybuje mezi 38 000 až 52 000. Původně se mělo za to, že podjednotky β a γ patřící různým α podjednotkám jsou vždy stejné. Později však bylo objeveno nejméně pět různých podjednotek β (M_r 35 000 až 36 000) a 14 různých podjednotek γ (M_r 6000 až 9000) /Lanzafame et al. 2003/.

Jednotlivé podtypy mAChR se specificky spřahují s různými typy G-proteinů. Za tuto specifitu spřahování je zodpovědná variabilita $-NH_2$ části třetí intracelulární smyčky, jejíž struktura se podobá vždy navzájem mezi lichými a sudými podtypy mAChR. Liché podtypy M1, M3 a M5 se spřahují specificky s G_q proteiny, které aktivují fosfolipázu C a podílejí se tak na regulaci fosfatidylinositolového metabolismu. Sudé podtypy M2 a M4 se specificky spřahují s G_i proteiny, které inhibují adenylátcyklázu. Specifita spřahování však není absolutní a například sudé podtypy se vedle preferenčního G_i proteinu mohou spřahovat také s G_q proteinem stimulujícím fosfolipázu C.

1.3 Výskyt muskarinových receptorů a jejich podtypů v organismu

Muskarinové receptory se vyskytují prakticky v celém organismu, a to jak v inervovaných tak i v neinervovaných tkáních a buňkách. V inervovaných tkáních jsou exprimovány v neuronech centrálního i periferního nervového systému, srdeční a hladké svaloviny a žlázách s vnější i vnitřní sekrecí. Mezi neinervované tkáně, které exprimují muskarinové receptory, patří například chrupavka, bílé krvinky nebo endoteliální buňky. Distribuce mAChR v periferních tkáních i centrálním nervovém systému se původně zjišťovala pomocí radioaktivně značených antagonistů, jako jsou například neselektivní 3H -N-methylskopolamin (3H -NMS) nebo 3H -pirenzepin, který vykazuje určitou selektivitu k M1 receptorům. Vazba ligandů byla lokalizována pomocí autoradiografické vizualizace, použité ligandy však neumožňovaly spolehlivě rozlišit jednotlivé podtypy mAChR.

Studie s komplementární RNA schopnou hybridizovat s mRNA jednotlivých podtypů mAChR přinesly o distribuci mAChR detailnější poznatky. Pokud je však receptor exprimován v neuronech, mohou být studie s hybridizací mRNA zavádějící. mRNA je totiž produkována v buněčném těle, které může být i značně vzdáleno od výběžků neuronu, kde je nakonec funkční receptor lokalizován. Ještě přesnější určení lokalizace mAChR bylo dosaženo pomocí specifických protilátek, zaměřených proti $-NH_2$ konci třetí intracelulární smyčky, nejvariabilnější části receptorů specifické pro jednotlivé podtypy /Levey 1993/. Studie s hybridizací mRNA a imunoprecipitační studie však nemusí, z důvodů uvedených výše, dávat vždy stejné výsledky (finální receptor může být lokalizován v membráně buněčného těla, ale také na nervových zakončeních vzdálených od místa vzniku receptorové mRNA).

V mozku byla prokázána exprese mRNA pro všechny podtypy muskarinového receptoru /Krejčí a Tuček 2002/. Nejhojněji je zastoupena mRNA pro M1 a nejvzácnější je

mRNA pro M5 podtyp receptoru. Mezi oblasti CNS, ve kterých byla nalezena jak M1 mRNA tak M1 imunoreaktivita, patří mozková kůra, hipokampus, thalamus, caudatum, putamen a amygdala. V bulbus olfactorius a gyrus dentatus byla nalezena pouze M1 mRNA bez příslušné imunoreaktivity. Oblastmi bohatými na M2 mRNA a zároveň vykazujícími M2 imunoreaktivitu jsou bazální telencefalón, caudatum, putamen, hipokampus, hypothalamus, amygdala a pontinní jádra. V bulbus olfactorius, habenulech, jádrech retikulární formace a locus coeruleus byla nalezena pouze M2 mRNA /Caulfield 1993/.

M3 receptor je typickým periferním receptorem, který se v CNS vyskytuje méně často. Existuje studie, ve které nebyla pro M3 receptor nalezena imunoreaktivita v žádné ze studovaných oblastí mozku /Levey et al. 1991/. Na druhou stranu, přítomnost M3 mRNA byla prokázána v mozkové kůře, hipokampu, mediálním thalamu, caudatum, putamen a amygdale /Buckley et al. 1988, Levey et al. 1991/. Jiná studie rovněž prokázala M3 imunoreaktivitu v mozkové kůře a hipokampu /Wall et al. 1991/.

Pro M4 receptor byla nalezena M4 mRNA a také imunoreaktivita v mozkové kůře, hipokampu, thalamu, caudatum a putamen.

Stejně jako pro M3 nebyla pro M5 receptor podle Leveyho studie zjištěna v mozku žádná imunoreaktivita. Velmi nízká M5 imunoreaktivita však byla dle jiné studie nalezena ve striatu, hipokampu, středním mozku, pontomedulární oblasti a v mozečku /Yasuda et al. 1993/. M5 mRNA byla naopak prokázána v hipokampu, substantia nigra, amygdale, thalamu, hypothalamu a laterálních habenulech.

V periferních tkáních potvrdily pokusy s protilátkami i hybridizační mRNA studie přítomnost podtypů M1 a M3 v exokrinních žlázách (především slinných a slzných) /Dorje et al. 1991, Levey 1993/. V srdci byl prokázán pouze M2 receptor. V hladké svalovině tenkého a tlustého střeva, trachey a močového měchýře nejsou výsledky různých studií jednotné, avšak obecně tyto tkáně obsahují především více či méně podtypů M2, M3 a M4. V plicní tkáni byla nalezena převaha podtypů M2 a M4.

1.4 Signální dráhy muskarinových receptorů

Interakce muskarinových receptorů s agonistou a příslušným G-proteinem aktivuje signální dráhy, které regulují enzymy, iontové kanály, růstové a transformační faktory a další proteiny. Sudé podtypy mAChR se preferenčně spřahují s $G_{i/o}$ G-proteiny a jejich aktivace vede obvykle k inhibičním projevům, jako je inhibice adenylátcyklázy nebo inhibice vápníkových kanálů (ale aktivace draslíkových kanálů v srdci). Liché podtypy se

preferenčně spřahují s $G_{q/11}$ a G_s G-proteiny, jejichž aktivace vede obvykle ke stimulačním projevům jako je aktivace různých fosfolipáz ($G_{q/11}$) nebo aktivace adenylátcyklázy (G_s). To vede ke zvýšení tvorby různých druhých poslů, jako je inositol 1,4,5-trisfosfát a diacylglycerol štěpením fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu fosfolipázou C nebo zvýšení tvorby cAMP. Specifita spřahování receptoru s G-proteinem uvedená výše však není absolutní a závisí mimo jiné i na typu aktivujícího agonisty. Také kombinace různých typů podjednotek α , β a γ tvořících G-protein dává možnost aktivovat různým způsobem různé signální dráhy /Akam et al. 2001, Lanza et al. 2003/. Tak bylo například zjištěno, že M3 receptory exprimované v buňkách HEK293 aktivují fosfolipázu D skrze G_{12} proteiny, zatímco fosfolipázu C skrze G_q proteiny. Již delší dobu je známo, že kromě podjednotek α se na aktivaci různých signálních drah podílejí také podjednotky $\beta\gamma$. Ty mohou aktivovat fosfolipázu C, adenylátcyklázu a srdeční K^+ kanály, případně inhibovat Ca^{2+} kanály /Caulfield 1993/.

Interakce receptoru s G-proteinem může být ovlivněna dalšími proteiny, například regulátory G-proteinové signalizace (regulator of G-protein signaling proteins, RGS proteiny). RGS proteiny zpravidla urychlují deaktivaci G-proteinů, čímž snižují účinnost signalizace skrze GPCRs. Muskarinové receptory kromě heterotrimerických G-proteinů aktivují také Rho G-proteiny, které patří mezi malé monomerní G-proteiny. Ty se účastní na regulaci buněčného růstu, organizace aktinového cytoskeletu a dalších buněčných funkcích. Aktivace Rho G-proteinů je pravděpodobně zprostředkována G_{12} a G_{13} proteiny.

Základními enzymy aktivovanými muskarinovými receptory jsou fosfolipáza C, A a D, adenylátcykláza, NO syntáza a různé typy MAP kináz. Mezi nejlépe prostudované patří fosfolipáza C, u které v dnešní době rozeznáváme více než deset různých typů navzájem se lišících strukturou a regulačními mechanismy. V mozku je základním izozymem fosfolipázy C PLC- β , a přestože převažujícím podtypem mAChR v mozku je M1 receptor, na aktivaci mozkové PLC- β se podílejí i zbývající dva liché podtypy. Při vyšších koncentracích agonisty byla pozorována i aktivace PLC sudými podtypy mAChR, i když tato aktivace byla nižší než u lichých podtypů /Offermanns et al. 1994/.

Fosfolipáza A_2 (PLA_2) katalyzuje hydrolýzu membránových fosfolipidů vedoucí ke vzniku volné arachidonové kyseliny a příslušných lysofosfolipidů. Liché podtypy mAChR aktivují PLA_2 prostřednictvím inositol-1,4,5-trisfosfátu. Sudé podtypy mAChR pravděpodobně PLA_2 přímo neaktivují. Význam PLA_2 se může projevit také v některých patologických situacích, neboť potlačení reakcí katalyzovaných PLA_2 v mozku je spojena

například s degenerativními změnami při Alzheimerově chorobě /*Gattaz et al. 1995*/. Na možný vztah mezi PLA₂ a Alzheimerovou chorobou ukazuje i fakt, že v buňkách transfekovaných M1 podtypem mAChR snížila inhibice PLA₂ karcholem stimulovanou sekreci prekurzorového proteinu β -amyloidu (amyloid precursor protein, APP), zatímco aktivace PLA₂ tuto sekreci zvyšovala /*Emmerling et al. 1993*/. Mnoho GPCRs včetně mAChR aktivuje také fosfolipázu D. U mAChR k tomu pravděpodobně dochází skrze G₁₂ protein s účastí Rho kinázy.

Také u adenylátcyklázy, enzymu specificky inhibovaného sudými podtypy mAChR, existuje nejméně deset izoforem. Rozdílné expresní vzorce těchto izoforem umožňují integrovat stimulační i inhibiční signály zprostředkované jednotlivými mAChR a jemně tak regulovat hladinu cAMP uvnitř buňky. Kromě klasické inhibiční cesty skrze G_i proteiny mohou M2 receptory snižovat hladinu cAMP také aktivací fosfodiesterázy. Vliv receptoru na koncentraci cAMP závisí také na koncentraci působícího agonisty. Při nízkých koncentracích muskarinového agonisty je tvorba cAMP inhibována, avšak se vzrůstající koncentrací agonisty se tato inhibice oslabuje /*Michal et al. 2001*/. Při vyšších koncentracích se totiž zvyšuje účinek spřáhování receptoru s nepreferenčním G_s proteinem, který stimuluje tvorbu cAMP.

Mezi enzymy, jejichž činnost muskarinové receptory regulují, patří i NO syntáza, především její neuronální forma (nNOS). Liché podtypy M1, M3 a M5 jsou schopné mobilizovat intracelulární zásoby kalcia skrze G_{q/11} PLC signální dráhu a každý z těchto receptorů tak dokáže aktivovat NO syntázu závislou na intracelulární hladině kalcia přinejmenším v některých typech buněk a v některých tkáních *in vivo* /*Wang et al. 1996*/. Podle některých studií způsobuje inhibice nNOS v mozku zhoršení paměti a schopnosti učit se a tento efekt může být potlačen aktivací mAChR /*Kopfa Baratti 1996*/. Na rozdíl od nNOS může být endoteliální forma NO syntázy (eNOS) aktivována sudým podtypem M2. Právě vliv M2 receptoru lokalizovaného v srdci na eNOS pravděpodobně vysvětluje již dříve zjištěnou schopnost NO modulovat kontraktilitu myokardu.

Stimulace muskarinových receptorů může vést také k aktivaci několika různých MAP kinázových signálních drah. Ty se účastní regulace takových buněčných funkcí, jako je fosforylace aktin vázícího proteinu (actin-binding protein), akutní inhibice a chronická stimulace sekrece žaludeční HCl nebo indukce některých genů. Mezi MAP kinázy aktivované mAChR patří ER1 a 2, JNK, p38MAPK a ERK5. Spouští také transaktivaci epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor, EGF). GPCR včetně muskarinových receptorů mají schopnost skrze podjednotky β a γ G-proteinu spustit intracelulární signál, který aktivuje

extracelulární metaloproteinázu štěpící prekurzor EGF. EGF potom aktivuje transmembránový EGF receptor, který reguluje různé intracelulární procesy.

Z hlediska mé práce je zajímavé, že někteří agonisté mAChR (např. karbachol) mohou aktivovat sekreci prekurzorového proteinu β -amyloidu v PC12 buňkách exprimujících M1 podtyp mAChR /*Haring et al. 1998*/. Na této aktivaci se podílí Ras-ERK dependentní dráha, na jejímž počátku stojí produkce kyslíkových radikálů, a zároveň dráha PKC dependentní. Rovněž bylo zjištěno, že ukládání amyloidových depozit a fosforylace tau proteinu v mozku myši s mutací v genu pro APP je spojena s aktivací JNK a p38MAPK /*Savage et al. 2002*/.

Kromě enzymů a různých buněčných faktorů ovlivňují mAChR také funkci (vodivost) některých typů iontových kanálů. Například GIRK kanály (G-protein Inward Rectifying Potassium) jsou charakterizovány nízkou bazální aktivitou, která se zvyšuje po aktivaci receptorů spřažených s $G_{i/o}$ proteiny. Aktivace těchto kanálů způsobuje snížení buněčné excitability díky hyperpolarizaci a zároveň prodlužuje refrakterní fázi mezi dvěma akčními potenciály. Obecně se neuronální GIRK kanály účastní regulace neuronové excitability a pravděpodobně hrají roli také v regulaci klidového potenciálu. M2 a M4 podtypy mAChR zprostředkovávají aktivaci GIRK kanálů skrze dimer podjednotek β a γ $G_{i/o}$ proteinů. Aktivace mAChR může vést ke zvýšení hladiny vápenatých iontů skrze IP_3 dráhu a uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásob, avšak mAChR mohou ovlivňovat hladinu intracelulárního kalcia rovněž skrze vstup Ca^{2+} do buňky dalšími typy vápníkových kanálů. Tak například ovlivňují prostřednictvím dimeru podjednotek $\beta\gamma$ napětově závislé Ca^{2+} kanály (voltage operated Ca^{2+} channels, VOCCs), které se otevírají při depolarizaci buněčné membrány, a to jak u excitabilních tak u neexcitabilních buněk. Vápenaté ionty plní úlohu důležitého druhého posla s mnoha funkcemi. V buňkách je zvýšení koncentrace vápenatých iontů následující po aktivaci muskarinových receptorů často nutná pro stimulaci PLA_2 , PLD, $PLC\gamma$, tyrosin kináz, Ca^{2+} /kalmodulin dependentní adenylátcyklázy a tvorbu NO, a nezbytné pro regulované uvolňování transmiterů. Ca^{2+} se také účastní regulace strukturální plasticity u neuronů ovlivněním cytoskeletu a asociovaných proteinů.

V hladkých svalových buňkách byla nalezena spojitost mezi M2 podtypem mAChR a otevřením neselektivních kationtových kanálů. Tyto kanály jsou regulovány pravděpodobně skrze dráhu $PI_3/PKC\gamma$ aktivovanou $\beta\gamma$ podjednotkou. Otevření neselektivních kationtových kanálů v hladkých svalových buňkách se podílí na následné aktivaci VOCCs, které spouštějí protražovanou kontrakci hladké svalové tkáně. Také pohyb chloridových iontů může být ovlivněn mAChR. Aktivace mAChR sice přímo neotevírá chloridové kanály, může však

iniciovat Ca^{2+} dependentní otevření jiných kanálů vedoucí nakonec k efluxu Cl^- iontů a k výsledné depolarizaci, která zahájí influx vápenatých iontů skrze VOCCs /Lanzafame et al. 2003/.

1.5 Fyziologické funkce muskarinových receptorů

Muskarinové receptory jsou v organismu zodpovědné za regulaci velkého množství fyziologických dějů. V různých tkáních a buněčných typech je však většinou zároveň exprimováno více podtypů mAChR. Protože neexistují ligandy, které by spolehlivě rozlišily jednotlivé podtypy, nebylo dlouho možné určit přesnou roli jednotlivých podtypů mAChR. Rozvoj poznatků v této oblasti umožnil až rozvoj molekulárně biologických metod a studie s knock-outovanými myši postrádajícími vždy gen pro jeden podtyp mAChR.

Mutantní myši postrádající geny pro M1, M2, M3, M4 i M5 nevykazují žádné zjevné změny fenotypu. Jsou životaschopné a fertilní a žádný z mutantních kmenů nevykazuje zjevné morfologické abnormality ani výrazné změny v chování. Podrobnější studie za použití fyziologických, farmakologických, behaviorálních, biochemických a neurochemických metod však u každého z mutantních kmenů objevily charakteristické odchylky nebo deficity ve fenotypu. Z výsledků dosavadních studií také vyplývá, že vyřazení jednoho podtypu mAChR nevyvolá kompenzatorní zvýšení exprese u ostatních podtypů /Wess 2004/.

M1 podtyp je hlavním podtypem mAChR exprimovaným v mozku. Podílí se především na vyšších kognitivních funkcích, učení a paměti. Úvodní studie s myši postrádajícími M1 receptor testovala schopnost pilokarpinu indukovat u těchto myší epileptický záchvat. Na rozdíl od nemutovaných myší a kmenů s vyřazeným M2, M3, M4 a M5 receptorem nebylo možné u M1 knock-out myší vyvolat pilokarpinem epileptický záchvat. Tyto výsledky naznačují, že signalizace M1 receptorů se podílí na vzniku alespoň některých typů epileptických záchvatů /Hamilton et al. 1997/. Mezi další změny, které byly u M1 deficientních myší nalezeny, patří například zvýšená koncentrace dopaminu ve striatu, zvýšená lokomoční aktivita, ztráta aktivace MAP kináz muskarinovými agonisty v některých typech buněk nebo ztráta vlivu muskarinových agonistů na vodivost některých typů vápníkových kanálů v sympatických nervových gangliích.

Studie s kmeny postrádajícími jednotlivě nebo současně M2 a M4 receptor ukázaly, že mnoho fyziologických funkcí je zprostředkováno kombinací těchto receptorů. U M2 knock-outu je nejnápadnější vliv na regulaci srdečního rytmu. Acetylcholin uvolňovaný parasympatickým nervovým systémem působí na mAChR v srdci, které jsou zde zastoupeny

téměř výhradně M2 podtypem. Za normálních okolností snižuje aktivace M2 receptorů srdeční frekvenci, avšak u M2 knock-out myši nemá acetylcholin na rytmicitu stahů srdeční svaloviny žádný vliv. Tyto pokusy byly provedeny na srdeční svalovině *in vitro* a později také *in vivo* se stejným výsledkem. Mezi další změny nalezené u M2 knock-outů patří absence oxotremorinem indukovaného třesu a snížení hypotermie indukované oxotremorinem, dále některé již zmíněné změny nalezené rovněž u dalších knock-outů (např. ztráta vlivu muskarinových agonistů na vodivost některých typů vápníkových kanálů v sympatických nervových gangliích) nebo absence muskarinem zprostředkované desenzitizace periferních nociceptorů /Wess 2004/.

M3 knockoutované myši kmeny měly výrazně sníženou tělesnou hmotnost (přibližně o 25%) a zásoby periferního tuku snížené zhruba o 50%. Rovněž sérové hladiny leptinu a inzulinu byly nižší, patrně v reakci na nízkou tělesnou hmotnost. Bylo zjištěno, že za snížení tělesné hmotnosti u M3 knock-outů je zodpovědný celkově nižší příjem potravy, avšak jinak nebyla zaznamenána žádná retardace růstu, závažné metabolické odchylky nebo rozdíly v chování či lokomoci. Snížený příjem potravy byl posléze vysvětlen jako důsledek nižší tvorby slin, protože M3 podtyp mAChR je většinou zastoupen právě ve slinných žlázách. Při dalším zkoumání byla prokázána snížená salivace indukovaná muskarinovými agonisty. Další odchylky pozorované u M3 knock-outů byly například větší velikost zornice a distenze močového měchýře (oboje charakterizované *in vivo*) /Wess 2004/.

U M4 knock-outů byla stejně jako u M1 pozorována zvýšená lokomoce, a to jak za kontrolních podmínek tak po podání agonistů dopaminového D1 receptoru. Dále byla zjištěna zhoršená migrace epidermálních keratinocytů nebo snížení vlivu oxotremorinu na uvolňování draslíku ze striatálních řízků /Wess 2004/.

M5 podtyp mAChR je posledním naklonovaným a nejméně zastoupeným podtypem muskarinového receptoru. O jeho fyziologických funkcích je toho známo poměrně málo. Přestože je M5 receptor v různých tkáních exprimován méně než ostatní podtypy, je jediným podtypem detekovatelným v dopaminergních neuronech mezencefala. Kmeny myši bez M5 receptoru například nedilatovaly mozkové arterie na popud acetylcholinu a stejně jako M4 knock-outy vykazovaly snížený vliv oxotremorinu na uvolňování draslíku ze striatálních řízků nebo nevykazovaly zvýšené uvolňování dopaminu v nucleus accumbens stimulované elektrickou stimulací laterodorsálního tegmentálního nukleu /Wess 2004/.

1.6 Farmakologie muskarinových receptorů

Zpočátku byly k charakterizaci jednotlivých podtypů mAChR používány vazebné studie s radioaktivně značenými ligandy. Klasifikaci mAChR určily především pokusy s antagonistou pirenzepinem. Pirenzepin se váže s relativně vysokou afinitou k muskarinovým receptorům v mozkové kůře, hipokampu a gangliích. Tato vazebná místa byla označena jako M1. Muskarinové receptory v srdci, žlázách, hladké svalovině, mozkovém kmeni, mozečku a thalamu vykazovaly 30 až 50krát nižší afinitu pro pirenzepin. Přímé vazebné studie s radioaktivně značeným pirenzepinem potvrdily, že pouze některé tkáně a oblasti mozku váží pirenzepin s vysokou afinitou. Ukázalo se také, že pirenzepin blokuje muskarinovou odpověď v gangliích lépe než v srdci. Afinita pro klasické antagonisty jako je N-methylskopolamin byla však ve všech těchto oblastech stejná. Mozek a srdce byly následně použity k purifikaci M1 a M2 muskarinových receptorů a byla také izolována cDNA odpovídající těmto receptorům /Nestler a Duman 1999/.

V pokusech provedených na membránách či homogenátech získaných ze srdce, mozku a dalších tkání kompetovali muskarinová agonisté o vazebná místa antagonistů s Hillovým sklonem menším než jedna. To naznačovalo, že agonisté interagují s více než jednou uniformní populací muskarinových receptorů. Také výsledky přímých vazebných experimentů s radioaktivně značenými agonisty naznačily existenci několika různých populací vazebných míst pro agonisty. Nebylo však zřejmé, zda se jedná o interakce ligandu s různými podtypy muskarinového receptoru nebo o různé konformace jednoho podtypu. Naklonování podtypů muskarinových receptorů umožnilo přímé studium vazebných vlastností jednotlivých podtypů. Kompetiční křivky bylo možno nejlépe proložit rovnicí, která zahrnovala vazebná místa s nízkou a s vysokou afinitou a v některých případech i s velmi vysokou (superhigh) afinitou pro agonisty. Přídavek GTP do vazebného pokusu měl významný vliv na tvar vazebné křivky agonistů jak v kompetičních tak v saturačních pokusech ve smyslu snížení afinity receptoru pro agonistu a změny tvaru saturačních a kompetičních křivek, které v přítomnosti GTP odpovídaly interakci pouze dvou molekul (Hillův sklon 1). Vliv GTP na vazebné vlastnosti agonistů muskarinových receptorů vyplývá z interakce mezi receptorem a G-proteinem vážícím buď GDP nebo GTP, nebo z interakce agonisty s rozpřaženým receptorem (bez interagujícího G-proteinu). Tvar vazebných křivek agonistů tedy odráží alosterické interakce mezi G-proteinem, receptorem a agonistou.

Alosterické místo je definováno jako doména na receptoru, která je prostorově odlišná od místa, do kterého se váže endogenní ligand (místo vazby endogenního ligandu se označuje

jako „orthosterické“). Tato prostorová separace dovoluje alosterickým a orthosterickým ligandům vázat se simultánně a reverzibilně k receptoru. Tato dvě vazebná místa jsou také konformačně spojena, takže vazba ligandu do jednoho místa mění konformaci nebo posunuje rovnováhu mezi dvěma konformačními stavy na druhém vazebném místě. Muskarinové receptory mají, podobně jako další transmembránové receptory, na vnitřní straně membrány alosterická místa pro endogenní ligandy. Na tato místa se váží například G-proteiny, receptorové kinázy nebo sodné kationty /Birdsall a Lazareno 2005/. Kromě toho mají na vnější straně membrány (extracelulární smyčky) vazebná místa pro různé exogenní alosterické ligandy.

Muskarinové receptory byly prvními GPCRs, které poskytly důkazy o alosterickém modulačním místě pro exogenní ligandy na tomto typu receptorů. První náznaky, že některé ligandy mohou působit spíše alostericky než kompetitivně, vzešly ze studií interakce muskarinových ligandů na celých tkáních, například acetylcholinu s analogy hexamethonia v ileu a s gallaminem v srdci. Křivka koncentrace/odpověď agonisty je v přítomnosti fixní koncentrace antagonisty posunutá doprava a pokud je antagonist kompetitivní, pravostranný posun se zvyšuje se zvyšující se koncentrací antagonisty, aniž by v posunu byl patrný nějaký limit. Při interakci zmíněných ligandů byl při nízkých koncentracích antagonisty pozorován pravostranný posun dle očekávání, avšak rozsah posunu byl limitován a pokud dosáhla koncentrace antagonisty určité výše, neměla již další vliv na posun křivky. Dále bylo zjištěno, že účinky jednotlivých koncentrací testovaného antagonisty a kompetitivního antagonisty atropinu nebyly aditivní, jak by se dalo očekávat u antagonisty účinkujícího rovněž kompetitivně. Výsledky všech těchto studií odpovídaly již dříve vypracovaným teoretickým modelům interakce ligandů na receptoru, označovaném jako alosterické nebo také metaafinoidní interakce /Clark a Mitchelson 1976/.

Také následné vazebné studie s radioligandy potvrdily a rozšířily poznatky o podstatě alosterické interakce gallaminu na mAChR. Omezený inhibiční účinek gallaminu na vazbu značeného orthosterického ligandu byl demonstrován konstrukcí inhibičních křivek gallaminu v přítomnosti zvyšujících se koncentrací radioligandu $^3\text{H-N-methylskopolaminu}$ ($^3\text{H-NMS}$). Gallamin nedokázal kompletně inhibovat vazbu $^3\text{H-NMS}$ a tento efekt se stal ještě výraznější při vyšších koncentracích radioligandu. Dalším zásadním pozorováním bylo, že gallamin inhibuje disociaci $^3\text{H-NMS}$ z receptoru. Tento efekt musí být již ze své podstaty zprostředkován vazebným místem, které je odlišné od orthosterického místa vážícího radioligand. Gallamin interaguje alostericky, avšak s rozdílnými afinitami v jednotlivých tkáních, které exprimují rozdílné podtypy mAChR /Stockton et al. 1983/. Později byla také

demonstrována přítomnost alosterického vazebného místa pro gallamin na všech pěti podtypech mAChR /Lee a el-Fakahany 1991/.

Různí muskarinová agonisté se ve svých vazebných vlastnostech liší. Například přirozený ligand acetylcholin nebo jemu blízce podobný karchol se vážou s vysokou afinitou k velkému procentu všech vazebných míst. Další, jako oxotremorin nebo pilokarpin, se zdají vázat na převážně jedinou třídu vazebných míst a vykazují relativně malou vysokoafinitní vazbu. Na rozdíl od agonistů většina muskarinových antagonistů (např. N-methylskopolamin nebo atropin) se váže k receptorům s Hillovým sklonem rovným jedné, což odpovídá jediné konformaci receptoru. Mezi jednotlivými tkáněmi je jen malý rozdíl v afinitě k jednotlivým antagonistům. Právě počáteční pokusy prováděné s antagonisty vedly původně k domněnce, že existuje pouze jediný typ mAChR. Na základě pokusů s agonisty a také na základě funkčních pokusů byl učiněn závěr, že existuje více podtypů mAChR a později byli nalezeni také někteří částečně selektivní antagonisté.

1.7 Desenzitizace, down-regulace a internalizace muskarinových receptorů

Desenzitizace receptoru je reverzibilní proces, v průběhu kterého se membránové receptory stávají necitlivými k agonistovi a ani v jeho přítomnosti neaktivují příslušnou signální dráhu. Desenzitizace může proběhnout rychlostí v řádu sekund a zahrnuje fosforylaci receptoru a/nebo asociovaných G-proteinů, což má za následek odpražení receptoru od jeho G-proteinu. Fosforylace mAChR probíhá především na serinových a threoninových zbytcích lokalizovaných ve třetí intracelulární smyčce. Pokud jsou tyto aminokyselinové zbytky experimentálně odstraněny, výsledný receptor není desenzitizován nebo internalizován ani po dlouhé expozici agonistovi. Na desenzitizaci mAChR se pravděpodobně podílí celá řada kináz, včetně proteinkináz A a C. Rovněž důležité jsou GRK kinázy (G-protein coupled receptor kinases, GRK) a β -arrestiny. Rodina GRK zahrnuje rhodopsinovou kinázu GRK1 a dále kinázy GRK2-GRK6. Muskarinové receptory podtypu M1, M2 a M3 mohou být fosforylovány především kinázami GRK2 a GRK3, podstatně méně pak kinázami GRK1, 5 a 6. Důležitou roli v molekulárních mechanismech desenzitizace hrají také arrestiny. Fosforylace receptoru pomocí GRK kináz umožňuje vazbu arrestinu k receptoru a patrně právě tato vazba hraje primární roli při snížení přenosu signálu receptorem, pravděpodobně skrze snížení interakce mezi receptorem a G-proteinem.

Desenzitizační proces může zahrnovat také internalizaci receptoru, na kterou můžeme zároveň pohlížet jako na počátek resenzitizace, během kterého je receptor defosforylován

specifickými fosfatázami. Po internalizaci a defosforylaci se může značný počet receptorů znovu objevit na buněčném povrchu. Tento děj je zpravidla rychlý a pravděpodobně nevyžaduje syntézu receptorů *de novo*.

V mnoha případech má prolongovaná expozice receptoru jeho agonistovi za následek takzvanou down-regulaci receptoru, proces charakterizovaný snížením počtu receptorů v membráně. Ten může být opět doplněn pouze jejich syntézou *de novo*. Za proces down-regulace mohou být zodpovědné tři mechanismy: zvýšená degradace proteinů, změny ve stabilitě mRNA kódující mAChR a změny v rychlosti transkripce receptorových genů. Homologní regulace exprese muskarinových receptorů zahrnuje patrně všechny tyto tři mechanismy, které jsou však specifické podle podtypu muskarinového receptoru a také podle buněčného typu.

1.8 Cholinergní mechanismy u Alzheimerovy nemoci

Alzheimerova choroba (Alzheimer disease, AD) je celosvětově nejčastější příčina demence. Projevuje se jako postupný úpadek paměti, myšlení, orientace v čase i prostoru a řečových schopností. Dále dochází ke změnám v chování a v pokročilém stádiu není postižená osoba schopná sebeobsluhy a samostatného života. V důsledku celkového stárnutí populace ve vyspělých zemích je Alzheimerova choroba stále častější a podle údajů Světové zdravotnické organizace bude do roku 2025 postiženo touto nemocí zhruba 36 miliónů osob. Poprvé v roce 1906 popsal Alois Alzheimer charakteristické znaky AD, amyloidové plaky a neurofibrilární klubka. Kromě těchto základních změn je v mozku osob s AD možné zaznamenat úbytek neuronů a synapsí, atrofii mozkové tkáně a změny v hladinách některých neurotransmiterů (acetylcholinu). Již dlouho je známo postižení cholinergního systému v mozku /Bowen 1990/. Poruchy muskarinové transmise odpovídají za některé příznaky onemocnění a pravděpodobně se také podílejí na vzniku nebo alespoň postupu onemocnění. Tato je charakterizována úpadkem mentálních funkcí, hlavně paměti, prostorové orientace a schopnosti se učit. Především receptory podtypu M1 jsou distribuovány v některých částech mozku (kůra, hipokampus atd.) zodpovědných za paměť a další mentální schopnosti. Cholinergní transmise na mAChR je při AD snižena, není však dosud jasné, zda je to příčina či důsledek onemocnění.

U Alzheimerovy choroby je možné rozlišit dvě formy onemocnění, sporadickou a familiární. Familiární forma AD je autozomálně dominantně dědičná a začíná podstatně dříve než sporadická forma, první projevy se objevují ještě před 65. rokem života. Mnohem častější

sporadická forma AD představuje většinu případů a začíná se projevovat až po 65. roce života. Spolu s věkem její výskyt prudce stoupá a každých pět let se počet nemocných v dané věkové skupině přibližně zdvojnásobí. Zatímco ve věkové kategorii 65 – 74 let je postiženo asi 5% populace, ve věkové kategorii 85 let a starších už je to téměř 50 %. Přestože některé projevy a morfologické i funkční změny u AD blízce připomínají projevy a změny normálního stárnutí, nelze AD považovat jen za silněji vyjádřené příznaky stárnutí.

Charakteristickým rysem onemocnění je přítomnost amyloidních uloženin (plaků) v mozku. Kromě AD můžeme tyto plaky najít také u starších pacientů s Downovým syndromem a v mnohem menším rozsahu i ve zdravých mozcích starých lidí. Kromě β -amyloidu obsahují senilní plaky také zbytky degradovaných nervových výběžků, výběžků glie a příležitostně i mikrogliových buněk. Termín „amyloid“ obecně popisuje fibrilární proteiny se strukturou bohatou na β -listy ukládané v organismu za patologických podmínek. Struktura bohatá na β -list je zodpovědná za dvojlom v polarizovaném světle, který proteiny vykazují po obarvení například konžskou červení. V elektronovém mikroskopu jsou amyloidové fibrily viditelné jako rovná nevětvená vlákna variabilní délky a šířky mezi 6 – 10 nm. Většina amyloidogenních proteinů vzniká štěpením větších prekurzorových proteinů. Špatná rozpustnost amyloidových vláken ve vodě je pak důvodem, proč není amyloid štěpen buněčnými proteázami.

β -amyloid vzniká štěpením takzvaného prekurzorového proteinu β -amyloidu (APP, amyloid precursor protein) o délce 695 aminokyselin a jeho umírněná produkce je fyziologický proces. Štěpení APP může být zahájeno α - nebo β -sekretázou. Zatímco štěpení β -sekretázou zahajuje proces, při kterém vzniká po dalším štěpení γ -sekretázou neurotoxický β -amyloid, štěpení α -sekretázou, ke kterému dochází uprostřed amyloidové sekvence, jeho vznik vylučuje. Místo štěpení β -sekretázou se nachází těsně při N- konci β -amyloidové domény, směrem k extracelulárnímu konci. Při tomto štěpení se uvolní velká extracelulární doména APP, označovaná jako APPs β a zároveň C terminální konec označovaný dle počtu AMK jako C99, který zůstává uložený v buněčné membráně. C99 je dále štěpen γ -sekretázou, která působí hluboko uvnitř membrány a C99 může štěpit nejméně na třech možných místech. Ta jsou označovaná písmeny ϵ , ζ a γ a určují přesnou délku výsledného β -amyloidu, která se může pohybovat mezi 39 – 42 aminokyselinami. Nejčastěji γ -sekretáza štěpí v místě γ , čímž vzniká převažující typ β -amyloidu, A β 40. A β 40, jehož produkce obvykle převažuje, je méně toxický než o dvě aminokyseliny delší A β 42. Proto je pro vznik AD důležité nejen absolutní množství vyprodukovaného β -amyloidu, ale také relativní množství vzniklého A β 42, který

snadněji oligomerizuje, tvoří amyloidové fibrily a je toxicitější pro neurony než A β 40. Všechny bodové mutace v APP, které mají za následek familiární formu AD, jsou lokalizovány poblíž štěpných míst ϵ , ζ a γ a buď zvyšují celkové množství vznikajícího ϵ , ζ a γ -amyloidu nebo zvyšují relativní množství A ϵ , ζ a γ 42.

Již v počátcích studia AD bylo prokázáno, že za neurotoxicitu je minimálně spoluzodpovědná agregace β -amyloidu. Možnost charakterizace β -amyloidových agregátů *in vitro* však byla poměrně omezená a protože dobře detekovatelné byly především amyloidové fibrily, mělo se za to, že právě tyto fibrily jsou hlavním nositelem neurotoxicity. Ve skutečnosti u pacientů s AD byla jen malá korelace mezi závažností demence a densitou fibrilárních amyloidních plaků. Až s nástupem novějších metod se začaly množit důkazy, že neurotoxické jsou především rozpustné nefibrilární oligomerické formy β -amyloidu. Novější studie prokázaly významnou korelaci mezi hladinou rozpustných oligomerických forem β -amyloidu a rozsahem poškození synapsí a také kognitivním deficitem /Lue et al. 1999, McLean et al. 1999, Wang et al. 1999/.

Pokud koncentrace β -amyloidových monomerů stoupne nad určitou kritickou mez, začnou monomerní jednotky samovolně tvořit dimery, trimery a větší oligomery. Z oligomerů se postupně mohou tvořit nerozpustné fibrily. Bylo zjištěno, že jak kontrolní zdravé mozky tak mozky lidí s AD obsahují různé koncentrace všech forem rozpustného β -amyloidu, od monomerů až k oligomerům. Rozpustné oligomery β -amyloidu byly rovněž detekovány v extraktu z amyloidových plaků a v mozcích myši mutantních v genu pro APP, které produkovaly vysoké množství β -amyloidu /Roher et al. 1996, McLean et al. 1999/. U některých těchto myších kmenů se objevily změny v chování analogické AD u člověka ještě před tím, než byly v mozku detekovatelné první amyloidové plaky /Moechars et al. 1999/. To podporuje hypotézu, že neurotoxicky působí již samotné rozpustné oligomery /Selkoe 2002/. V dalších studiích mikroinjekce malého množství solubilních oligomerů do mozku krys přechodně zhoršila jejich výsledky v kognitivních testech, které se však po 24 hodinách vrátily k normálu /Cleary et al. 2005/.

Příčiny vzniku AD nejsou dosud známy, o vysvětlení se však pokoušejí dvě hlavní hypotézy. Takzvaná amyloidová teorie vychází z předpokladu, že toxické působení β -amyloidu poškozuje nervové buňky a jejich synapse a spouští celou kaskádu patologických dějů, jejichž vyústěním je ztráta paměti a klinické příznaky demence. Druhá hypotéza se zaměřuje na další základní morfologickou zvláštnost v mozcích pacientů s AD, neurofibrilární klubka. Ta jsou tvořena hyperfosforylovaným proteinem tau, který se váže na cytoskelet a

mimo jiné ovlivňuje buněčný transport. Podle této hypotézy je právě poškození buněčného transportu a z toho vyplývající nedostatečná výživa nervových výběžků původní příčinou vzniku Alzheimerovy choroby. Pro obě základní teorie vysvětlující vznik AD lze najít dostatek podpůrných dat a výsledků. Pro amyloidovou hypotézu však svědčí také skutečnost, že všechny doposud známé mutace způsobující familiární formu AD byly identifikovány v genech pro APP, ze kterého β -amyloid vzniká, nebo pro dva proteiny ovlivňující štěpení APP a sekreci β -amyloidu (presenilin-1 a 2, PS1 a PS2). Sporadická forma AD je častější u některých polymorfismů apolipoproteinu E, který se podílí na řízení hladiny krevních lipidů. Nositelé alely $\epsilon 4$ pro apolipoprotein E mají vyšší riziko vzniku AD než zbytek populace.

Gen pro APP je uložen na q raménku 21. chromozomu. V současné době je známo více než 30 mutací genu pro APP zodpovědných za vznik familiární formy AD a dosud bylo nalezeno 78 rodin, ve kterých se tyto mutace přenášejí /*Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database; Bertram a Tanzi 2008*/. Mutace v genu pro APP buď zvyšují celkovou produkci β -amyloidu nebo zvyšují relativní množství toxičtějšího A β 42 (poměr A β 42/ A β 40). Mutace v genu pro APP způsobující AD se obvykle nacházejí blízko štěpného místa pro sekretázy β - a γ -. Hypotéza o vztahu mezi β -amyloidem, β -amyloidovými plaky a vznikem AD byl ještě podpořen objevem vzácného případu Downova syndromu, u kterého zlom chromozomu 21 v distální části q raménka způsobil, že pacient byl pro gen APP diploidní (namísto triploidie typické pro pacienty s Downovým syndromem). Tento pacient nejevil žádné známky demence a v jeho mozku nebyla po smrti ve věku 78 let nalezena žádná amyloidová depozita /*Prasher et al. 1998*/. Nedávno bylo také objeveno, že duplikace APP lokusu na chromozomu 21 měla za následek časný vznik AD a/nebo cerebrální amyloidovou angiopatii u pěti různých nezávislých rodin /*Rovelet-Lecrux et al. 2006*/. Presenilin-1 a presenilin-2 jsou proteiny nacházející se v katalytickém centru γ -sekretázového komplexu a tak se podílejí na štěpení APP. Gen pro PS1 je uložen na q raménku 14. chromozomu, gen pro PS2 na q raménku 1. chromozomu. Je známo 166 mutací spojených se vznikem AD pro PS1 (362 postižených rodin) a 10 mutací pro PS2 (18 rodin). Mutace v obou těchto genech zvyšují poměr A β 42/ A β 40 a pravděpodobně také ovlivňují enzymatickou funkci γ -sekretázy /*Bertram a Tanzi 2008*/.

Kromě zmíněných čtyř genů, jejichž spojitost s AD je známa již dlouho, byla v poslední době objevena i spojitost mezi AD a geny pro dva různé receptory: sortilin-related receptor a GAB2 /*Williamson et al. 2009*/. Výsledky studií, které se pokusily odhalit skutečný podíl jednotlivých mutací na výskytu familiární formy AD v populaci, nejsou jednotné.

Zatímco podle některých studií je možné téměř všechny případy vysvětlit mutacemi v již známých třech genech (pro APP, PS1 a PS2), podle jiných je frekvence těchto mutací nízká a je potřeba vzít v úvahu i účast dalších dosud neznámých genů /Lleó et al. 2002/.

Cholinergní teorie AD předpokládá vyšší citlivost cholinergních neuronů k toxickému působení β -amyloidu, která má za následek snížení cholinergní transmise na nikotinových a muskarinových receptorech. Jedním z nejvýraznějších histologických znaků AD je těžká degenerace cholinergních neuronů spojujících bazální telencefalum s hipokampálními a korovými oblastmi. U některých pacientů byla nalezena až 90% redukce těchto neuronů, jiné neurotransmitery (serotonin, noradrenalin, dopamin) však nevykazovaly žádný významný pokles /Yan a Feng 2004/. Také snížení hladiny cholinacetyltransferázy, limitujícího enzymu v syntéze acetylcholinu, pozitivně koreluje s poklesem kognitivních funkcí u AD pacientů. Existují údaje naznačující, že za kognitivní deficit při AD jsou zodpovědné poruchy v cholinergním systému. V mozku pacientů s AD bylo například pozorováno snížení koncentrace acetylcholinových receptorů nebo presynaptických cholinergních markerů v mozkové kůře /Perry et al. 1977a,b/. Také některé léky s anticholinergním působením (používané například k léčbě Parkinsonovy choroby) vyvolávají u pacientů amnézii připomínající příznaky u AD /Bymaster et al. 1993/. Rovněž bylo zjištěno, že pacienti užívající dlouhodobě léky s anticholinergním působením mají významně vyšší riziko vzniku AD /Perry, 2003/. Amnézie vyvolaná anticholinergiky je patrně způsobena bloádou muskarinových acetylcholinových receptorů, protože některé studie zároveň ukázaly, že muskarinová agonistická léčiva mají příznivý účinek na paměť /Terry et al. 2002/. Podle jiných studií i nikotin (kouření) zlepšuje pozornost, soustředění a paměť. Stimulace nikotinových acetylcholinových receptorů může zlepšovat tvorbu paměťových stop a má i protektivní účinek vůči rozvoji AD /Kihara et al. 2001, Shimohama et al. 1996/. Vazebné studie ukázaly, že u pacientů s AD byl signifikantně snížen počet nikotinových receptorů v mozkové kůře, hipokampu, putamen a nukleus basalis Meynerti /Kihara a Shimohama 2004/.

2. Materiály a přístroje

2.1 Chemikálie a materiály

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

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

Karbachol (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Oxotremorin (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Pilokarpin (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Furmethid (Sigma - Aldrich, Česká republika)

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

GDP (Sigma - Aldrich, Česká republika)

GTPγS (Sigma - Aldrich, Česká republika)

NMS (Sigma, Česká republika)

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

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

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

Hovězí fetální sérum (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Geneticin (Sigma - Aldrich, Česká republika)

Butyrát sodný (Sigma - Aldrich, Česká republika)

NaCl p.a. (Penta, Česká republika)

Na-HEPES (Sigma - Aldrich, Česká republika)

EDTA p.a. (ethyldiamintetraoctová kyselina) (Serva, Německo)

MgCl₂ p.a. (Lachema, Česká republika)

NaOH p.a. (Penta, Česká republika)

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

Atropin (Sigma - Aldrich, Česká republika)

β-amyloid 1-42 (United Peptides, USA nebo Sigma - Aldrich, Česká republika)

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

Scintilační roztok - Rotiszint eco plus (Roth, Německo)

Scintilační plátky - Meltilex A (Wallac, Finsko)

Betaplate Scint (Perkin Elmer, USA)

2.2 *Přístroje*

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

Centrifugy: Biofuge freco (Heraeus, Německo)

Sigma 3K18 (Sigma Laborzenrifugen, Německo)

Universal 16R (Hettich, Německo)

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

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

Filtrační zařízení: Tomtec Cell Harvester Mach III (USA)

Filtrační zařízení: Brandel Cell Harvester (USA)

scintilační počítač Wallac Microbeta 1450 (Finsko)

Čtečka destiček Wallac Victor™ (Finsko)

2.3 *Biologický materiál*

Fibroblasty z ovárií zlatého křečka (CHO - Chinese hamster ovary) stabilně exprimující jednotlivé podtypy lidských muskarinových receptorů (označované M1-5) byly laskavě poskytnuty profesorem T. I. Bonnerem (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

CHO buňky stabilně exprimující M1-M5 podtypy mAChR, u nichž byla transfekcí příslušné siRNA potlačena exprese α podjednotky Gi proteinu. Tyto transfekované buňky připravil kolega J. Jakubík.

3. Metody

3.1 Pěstování buněk a příprava membrán

CHO buňky stabilně exprimující lidské muskarinové receptory M1-5 byly pěstovány při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂ v médiu pro tkáňové kultury (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM) doplněném o 0,005 % geneticin a 10 % fetální telecí sérum /*Jakubík et al. 1995*/ v Petriho miskách (75-78 cm²). Před sklizením byly buňky vystaveny 24 hodin působení butyrátu sodnému o koncentraci 5 mM pro zvýšení exprese muskarinových receptorů /*Dion et al. 1997*/.

Buňky byly sklizeny po dosažení konfluence po pěti dnech růstu v kultuře. Nejprve byly opláchnuty dvakrát 5 ml fosfátového izotonického roztoku (PBS; Phosphate Buffered Saline; 150 mM NaCl s 10 mM fosfátovým pufrem, pH=7.4) a následně, po přidání 3 ml PBS, jemně sklizeny pomocí škrabky. Poté následovala centrifugace 3 min při 300 g a po odsátí supernatantu byly uskladněny v -20 °C.

Zamražené CHO buňky sklizené z dvaceti Petriho misek byly resuspendovány ve 20 ml homogenizačního média (100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Hepes, 10 mM etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), pH=7.4) a na ledu homogenizovány v homogenizátoru Ultra-Turrax při 22000 otáčkách/min dvakrát po dobu 30 vteřin s přestávkou 30 vteřin. Hrubé fragmenty byly odstraněny nízkootáčkovou centrifugací při 300 g po dobu 3 minut a při 4 °C. Supernatant byl rozdělen do mikrozkušavek po 1,4 ml a centrifugován 30 min při 30000 g a 4 °C. Supernatant byl odsát a sediment (hrubá membránová frakce) byl promyt 1 ml reakčního media (100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Hepes, pH=7.4). Následovala opětovná centrifugace 30 min při 30000 g a 4 °C. Po odsátí supernatantu byly membrány zamrazeny při -70 °C.

Pro stanovení účinku chronického působení β -amyloidu byl do média k rostoucím buňkám přidán druhý den β -amyloid 1-42 v koncentraci 100 nM.

3.2 Měření proteinů

Množství proteinů bylo stanovováno spektrofotometricky při 690 nm Lowryho metodou /*Lowry et al. 1951*/ v Petersonově modifikaci /*Peterson 1977*/ . Stanovení byla provedena vždy v triplikátech v mikrotitračních 96-jamkových destičkách. Vzorky (aliquoty sedimentovaných membrán) byly rozpuštěny v 1 M NaOH. Kalibrační křivka byla tvořena roztoky lidského sérového albuminu o výsledných koncentracích 0-1,25-2,5-5-10-20

µg/jamku s přidáním roztoku 1 M NaOH v množství odpovídajícím aliqvotu stanovovaných vzorků, pro zachování stejného pH jako u stanovovaných vzorků.

3.3 Saturační a vytěšňovací pokusy

Saturační vazebný pokus umožňuje přímo sledovat vazbu radioaktivně značeného ligandu k receptoru. Tato metoda umožňuje kvantifikovat maximální počet vazebných míst (maximální vazba, B_{\max}) a afinitu ligandu k receptoru (rovnovážná disociační konstanta, K_d). Hlavní nevýhodou saturačních pokusů je nutnost mít studovaný ligand označený radioaktivním isotopem. V mé práci jsem saturačními pokusy měřila přímo pouze vazbu [^3H]-N-methylskopolaminu ([^3H]-NMS), který jsem měla k dispozici označený s vysokou specifickou aktivitou tritiem.

Vytěšňovací studie obcházejí potřebu radioaktivně značeného ligandu tak, že měří afinitu neznačeného ligandu pomocí jeho interference se značeným ligandem. Neznačený ligand vytěšňuje z vazebného místa radioaktivně značený ligand a pokles radioaktivního signálu je použit k určení afinity neznačeného ligandu. Z vazebné křivky vytěšňovacího pokusu můžeme odečíst koncentraci neznačeného agonisty, při které je z vazebných míst vytěšněno 50 % značeného kompetujícího antagonisty (IC_{50}).

Úkolem vazebných studií je kvantifikovat vztah mezi koncentrací ligandu přítomného v inkubačním médiu a množstvím navázaného ligandu (množstvím obsazených receptorů). Proto je potřeba odlišit část ligandu navázaného k vazebnému místu receptoru (specifická vazba) a část ligandu navázanou nespecificky například k filtru nebo membránovým proteinům. Specifická vazba je obvykle definována jako množství ligandu, které může být vytěšněno vysokou koncentrací neznačeného a k receptoru specifického antagonisty. Pro určení nespecifické vazby je možné použít stejného antagonistu (homologní vytěšňování), jehož vazbu v pokuse sledujeme, avšak v neznačené podobě, anebo (lépe) strukturně odlišného specifického antagonistu.

Všechny vazebné pokusy byly prováděny v 96-jamkových destičkách v triplikátech až kvadruplikátech. Po stanovené době inkubace byly destičky filtrovány na filtračních zařízeních Tomtec Cell Harvester Mach III (USA) nebo Brandel Cell Harvester (USA) a membrány s navázaným radioaktivně značeným ligandem byly zachyceny na filtrech Whatmann GF/F nebo případně filtračních destičkách opatřených filtry Whatmann GF/C . Filtry či filtrační destičky byly předem namočený v polyethyleniminu (snižuje nespecifickou vazbu kladně nabitého [^3H]-NMS).

Usušené filtry byly zalaty do scintilačního vosku a radioaktivita zachycená na filtrech v místech jednotlivých jamek změřená scintilačním počítačem Microbeta 1450 scintillation counter Wallac. Filtrační destičky byly naplněny scintilačním roztokem Betaplate Scint (Perkin Elmer, USA) a radioaktivita v jednotlivých jamkách rovněž změřena scintilačním počítačem Microbeta. Koncentrace značeného ligandu byla stanovována ze známé specifické radioaktivity $^3\text{H-NMS}$ a z radioaktivity v médiu, stanovené v alikvotech přidávaného média kapalným scintilačním měřením.

3.3.1 Vazba agonistů k M2 mAChR po vyřazení jednotlivých typů G-proteinů pomocí protilátek

Membrány CHO buněk selektivně exprimujících M2 podtyp mAChR byly resuspendovány v inkubačním médiu (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2) tak, aby byla zachována přibližná koncentrace 10 μg proteinu na jamku. Celkový inkubační objem byl 200 μl . Membrány byly rozděleny do čtyř skupin. Ke třem skupinám membrán byly přidány jednotlivě polyklonální protilátky anti $\text{G}\alpha_{i-3}$, anti $\text{G}\alpha_{s/olf}$ a anti $\text{G}\alpha_{q/11}$ naředěné v inkubačním médiu 4x (zásobní roztoku protilátek 200 $\mu\text{g/ml}$ byl před použitím zředěn 12,5x konečná koncentrace v jamce 4 $\mu\text{g/ml}$), ke čtvrté kontrolní skupině pouze médium. Do inkubačního média byl dále přidán agonista v příslušné koncentraci a $[\text{}^3\text{H}]\text{-NMS}$ v konečné koncentraci 1 nmol/l. Vazba agonisty byla určena pomocí kompetice se značeným $[\text{}^3\text{H}]\text{-NMS}$. Pokusy byly provedeny se čtyřmi různými agonisty karcholem (v koncentraci 10-3-1-0,3-0,1-0,03-0,01-0,003-0,001-0,0003 mM), oxotremorinem (v koncentraci 1000-300-100-30-10-3-1-0,3-0,1-0,03), pilokarpinem (ve stejných koncentracích jako oxotremorin) a furmethidem (ve stejných koncentracích jako oxotremorin). Inkubace probíhala po dobu 60 minut při teplotě 30 °C. Nespecifická vazba byla stanovena přidáním neznačeného NMS v konečné koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$.

3.3.2 Vazba agonistů k M2 mAChR po vyřazení jednotlivých podtypů G-proteinů pomocí protilátek a současném potlačení exprese α -podjednotek G_i G-proteinů

Membrány k vazbě jsem připravila z CHO buněk selektivně exprimujících M2 podtyp mAChR, u kterých byla pomocí transfekce siRNA proti α -podjednotce G_i G-proteinů vyřazena exprese α podjednotky G_i proteinu a které mi laskavě připravil kolega Jan Jakubík. Vazba všech čtyř agonistů karcholu, oxotremorinu, pilokarpinu a furmethidu byla opět

určena pomocí kompetice s radioaktivně značeným [³H]-NMS a všechny podmínky pokusu byly shodné s těmi, jež jsou uvedeny výše.

3.3.3 Exprese jednotlivých podtypů mAChR a jejich afinita k [³H]-NMS při akutním a po chronickém působení β-amyloidu

Vazba [³H]-NMS na membrány CHO buněk selektivně exprimujících jednotlivé podtypy mAChR byla měřena přímo v saturačních vazebných pokusech. Membrány byly resuspendovány v inkubačním médiu tak, aby byla zachována přibližná koncentrace 10 μg proteinu na jamku. Pro určení účinku chronického působení β-amyloidu byly k vazbě použity membrány buněk, jež rostly 4 dny v přítomnosti 100 nM β-amyloidu 1-42. V inkubačním médiu pro vazbu [³H]-NMS již β-amyloid nebyl přítomen. Pro určení účinku akutního působení β-amyloidu byl do inkubačního média přidán β-amyloid 1-42 v konečné koncentraci 1 μmol/l. Celkový inkubační objem byl 400 μl.

Do inkubačního média byl přidán radioaktivně značený [³H]-NMS v koncentracích 2000-1000-500-250-125-62,5 pM. Pro určení nespecifické vazby byl navíc pro každou koncentraci radioligandu přidán do reakční směsi atropin v konečné koncentraci 10 μM. Inkubace probíhala po dobu 60 minut při teplotě 30 °C.

3.3.4 Vazba karcholu na jednotlivé podtypy mAChR při akutním a po chronickém působení β-amyloidu

Vazba agonisty karcholu na membrány CHO buněk selektivně exprimujících jednotlivé podtypy mAChR byla měřena ve vytěšňovacích vazebných studiích prostřednictvím kompetice se značeným [³H]-NMS. Membrány byly resuspendovány v inkubačním médiu tak, aby byla zachována přibližná koncentrace 10 μg proteinu na jamku. Pro určení účinku chronického působení β-amyloidu byly k vazbě použity membrány buněk, jež rostly 4 dny v přítomnosti 100 nM β-amyloidu 1-42. V samotném inkubačním médiu již β-amyloid nebyl přítomen. Pro určení účinku akutního působení β-amyloidu byl do inkubačního média přidán β-amyloid 1-42 v konečné koncentraci 1 μmol/l. Celkový inkubační objem byl 400 μl.

Agonista karchol byl v inkubačním médiu přítomen v koncentracích 1000-300-100-30-10-3-1-0,3-0,1 μM. Radioligand [³H]-NMS, se kterým agonista kompetoval, byl přítomen ve fixní konečné koncentraci 1 nmol/l. Pro určení nespecifické vazby byl do inkubačního

média přidán atropin v konečné koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Inkubace probíhala po dobu 60 minut při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$.

3.4 Vyhodnocení výsledků

Prokládání křivek a statistická zpracování dat byla provedena za použití programů Microsoft Office Excel a GraphPad Prism4 (GraphPad software, Inc., USA).

3.4.1 Saturační vazebné pokusy

V saturačních pokusech byla měřena vazba radioligandu [^3H]-NMS. Do grafu se vynáší závislost navázaného [^3H]-NMS (udávaná jako počet ccpm, případně dpm naměřených scintilačním počítačem) na jeho koncentraci. Získané body se prokládají rovnicí (1), výsledná funkce má tvar hyperboly. Z křivky odečítáme B_{max} (informuje nás o počtu vazebných míst, tedy expresi receptorů) a K_d (afinita receptorů pro [^3H]-NMS). Jednotlivé hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. (Standard Error of the Mean; střední chyba průměru).

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

y – vazba radioligandu při jeho koncentraci x , B_{max} – maximální vazebná kapacita, K_d – rovnovážná disociační konstanta

3.4.2 Vytěšňovací vazebné pokusy

Ve vytěšňovacích pokusech byla měřena vazba agonistů karbacholu, oxotremorinu, pilokarpinu a furmethidu jako pokles vazby kompetujícího radioligandu [^3H]-NMS. Do grafu se vynáší závislost vazby [^3H]-NMS na koncentraci neznačeného agonisty. Body se prokládají rovnicí (2) pro dvojmístnou kompetiční křivku (pokud se ligand váže k uniformní populaci vazebných míst se stejnou afinitou, prokládáme jednomístnou křivkou, pokud se váže ke dvěma různým populacím vazebných míst s rozdílnou afinitou, prokládáme dvojmístnou křivkou). Z dvojmístné křivky odečítáme $\text{IC}_{50\text{high}}$ a $\text{IC}_{50\text{low}}$ pro vysoko a nízkoafinitní vazebné místo a zároveň poměr zastoupení vysoko a nízkoafinitních míst v populaci receptorů. Jednotlivé hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M.

$$y = (100-f_{\text{low}})*(1 - x /(\text{IC}_{50\text{high}} + x)) + f_{\text{low}}*(1 - x /(\text{IC}_{50\text{low}} + x)) \quad (2)$$

y – vazba [^3H]-NMS při koncentraci agonisty x vyjádřená jako procento vazby v nepřítomnosti agonisty, $\text{IC}_{50\text{high}}$ – koncentrace agonisty vytěsňující 50% radioligandu na vysokoafinitním vazebném místě, $\text{IC}_{50\text{low}}$ - koncentrace agonisty vytěsňující 50% radioligandu na nízkoafinitním vazebném místě, f_{low} - frakce nízkoafinitních vazebných míst

4. Výsledky

4.1 Vazba agonistů k M_2 mAChR po vyřazení jednotlivých typů G-proteinů pomocí protilátek

Prostřednictvím vazby čtyř různých agonistů na membrány CHO buněk selektivně exprimujících M_2 podtyp mAChR jsem zjišťovala, jaký vliv mají na vazebnou afinitu M_2 receptoru jednotlivé třídy G-proteinů. M_2 podtyp mAChR se preferenčně spřahuje s G_i třídou G-proteinů, nepreferenčně pak s třídami G_q a G_s . Jednotlivé třídy G-proteinů jsem vždy vyřadila z činnosti prostřednictvím protilátky proti α -podjednotce daného G-proteinu. Protilátka se váže na tu část G-proteinu, která se za normálních okolností spřahuje s mAChR, a tím znemožňuje jeho interakci s receptorem.

Vazbu agonistů karcholu, oxotremorinu, pilokarpinu a furmethidu jsem měřila vždy za kontrolních podmínek (bez přidání protilátky) a dále po vyřazení G_i , G_q , a G_s třídy G-proteinů. Výsledky měření u všech čtyř agonistů jsem prokládala dvoumístnou vytěšňovací křivkou. Přestože ve skupině s vyřazenými G_i proteiny byl jasně patrný pokles velikosti frakce vysokoafinitních vazebných míst (způsobený odpřažením preferenčního G_i), tato frakce neklesla u žádného z agonistů až k nule a výsledky nebylo možné proložit jednomístnou vytěšňovací křivkou. Z grafů pro jednotlivé agonisty je zřejmá změna tvaru vazebné křivky na membrány, ke kterým byla přidána protilátka proti G_i proteinům. Jednotlivé afinity pro nízko a vysokoafinitní místo se však signifikantně nemění. Vyřazení nepreferenčních tříd G-proteinů G_q a G_s nemělo žádný vliv na velikost frakce vysokoafinitních míst a také nezpůsobilo žádný posun v poloze vazebné křivky (Obrázky 1-4, Tabulka 1).

Průměrná hodnota logaritmu IC_{50} vysokoafinitního vazebného místa ($\log IC_{50_{high}}$) při vazbě karcholu na kontrolní membrány byla $-6,17$, nízkoafinitního místa ($\log IC_{50_{low}}$) $-4,37$. Frakce vysokoafinitních míst tvořila u kontrolních membrán 44 % všech vazebných míst, po přidání protilátky proti G_i se zastoupení vysokoafinitních míst snížilo na 14 %. Průměrná hodnota $\log IC_{50_{high}}$ u oxotremorinu byla při vazbě na kontrolní membrány $-7,12$, $\log IC_{50_{low}}$ $-5,56$. Frakce vysokoafinitních míst pro oxotremorin tvořila u kontrolních membrán 40 %, po přidání protilátky proti G_i se snížila na 5 %. $\log IC_{50_{high}}$ pro pilokarpin byla při vazbě na kontrolní membrány $-6,49$, $\log IC_{50_{low}}$ $-4,97$. Vysokoafinitní frakce tvořila 46 % a po přidání anti G_i protilátky klesla na 8 %. Nakonec pro furmethid byla průměrná $\log IC_{50_{high}}$ u kontrolních membrán $-6,38$, $\log IC_{50_{low}}$ $-4,09$. Po přidání anti G_i protilátky klesla frakce vysokoafinitních míst z 52 % na 20 %. Hodnoty $\log IC_{50_{high}}$, $\log IC_{50_{low}}$,

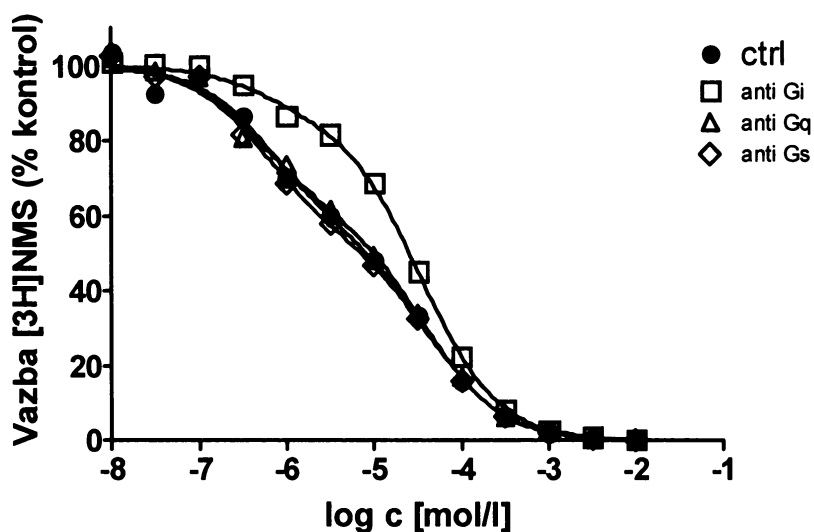
zastoupení vysokoafinitních frakcí a statistická hodnocení pro jednotlivé agonisty jsou shrnuty v Tabulce 1.

		kontrola	anti Gi	anti Gq	anti Gs
karbachol	logIC50high	-6,17± 0,13	-6,21± 0,20	-6,30± 0,12	-6,24± 0,08
	logIC50low	-4,37± 0,10	-4,45± 0,03	-4,42± 0,08	-4,36± 0,07
	vysokoafinitní frakce	0,44± 0,05	0,14 **± 0,03	0,39± 0,04	0,46± 0,03
	změna		3x	-	-
oxotremorin	logIC50high	-7,12± 0,14	-8,38± 0,71	-7,52± 0,14	-7,22± 0,18
	logIC50low	-5,56± 0,09	-5,67± 0,04	-5,66± 0,07	-5,61± 0,09
	vysokoafinitní frakce	0,40± 0,06	0,05 **± 0,02	0,32± 0,04	0,34± 0,06
	změna		7x	-	-
pilokarpin	logIC50high	-6,49± 0,14	-7,48*± 0,30	-6,38± 0,12	-6,60± 0,14
	logIC50low	-4,97± 0,12	-5,05± 0,03	-4,99± 0,11	-5,01± 0,11
	vysokoafinitní frakce	0,46± 0,07	0,08 **± 0,02	0,47± 0,07	0,44± 0,06
	změna		5,5x	-	-
furmethid	logIC50high	-6,38± 0,07	-6,36± 0,23	-6,47± 0,07	-6,58± 0,07
	logIC50low	-4,09± 0,08	-4,18± 0,06	-4,12± 0,07	-4,22± 0,06
	vysokoafinitní frakce	0,52± 0,03	0,20 **± 0,03	0,51± 0,02	0,47± 0,02
	změna		3x	-	-

Tabulka 1

Hodnoty IC50 a velikost frakcí vysokoafinitních vazebných míst získané z vytěšňovacích vazebných pokusů s jednotlivými agonisty a 1 nM [³H]NMS v kontrolním uspořádání a po vyřazení Gi, Gq a Gs tříd G-proteinů znázorněných na Obrázcích 1-4. V tabulce je uvedena také velikost změny v zastoupení vysokoafinitních míst po přidání anti Gi protilátky ve srovnání s kontrolními pokusy. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých pokusů provedených v kvadruplicatech ± SEM. *, p<0.05; **, p<0.01, statisticky významný rozdíl od kontrol (bez přidání protilátek) pomocí ANOVA a Dunnettova testu.

Karbachol

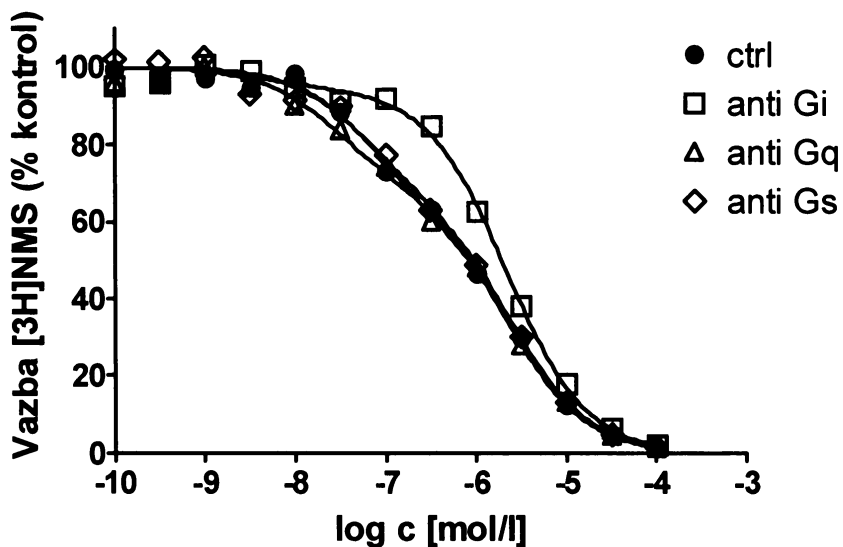


Obrázek 1

Vazba karbacholu k M2 receptoru

Kompetice mezi 1 nM [³H]NMS a karbacholem za kontrolních podmínek a po přidání protilátek proti α -podjednotkám Gi, Gq a Gs třídy G-proteinů. Symboly jsou popsány v grafu. Pouze přidání protilátky antiGi IgG způsobilo změnu tvaru vazebné křivky, která odráží snížení podílu vysokoafinitních vazebných míst.

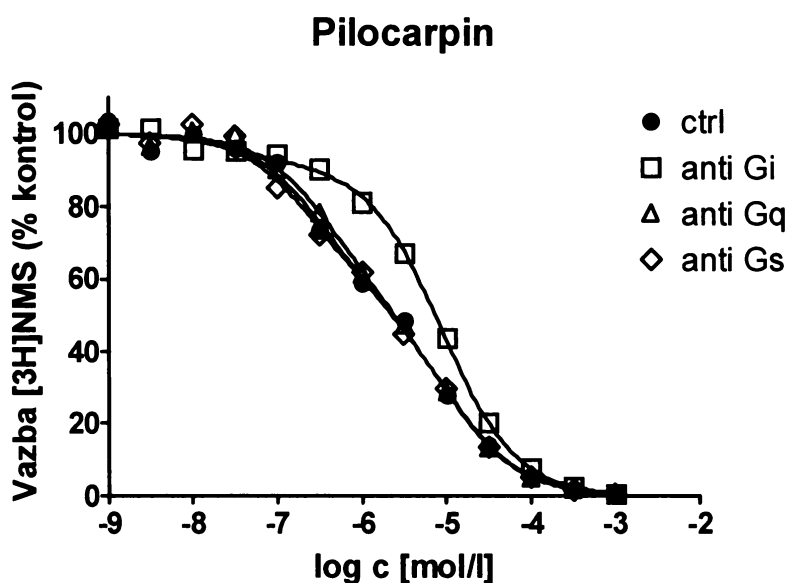
Oxotremorin



Obrázek 2

Vazba oxotremorinu k M2 receptoru

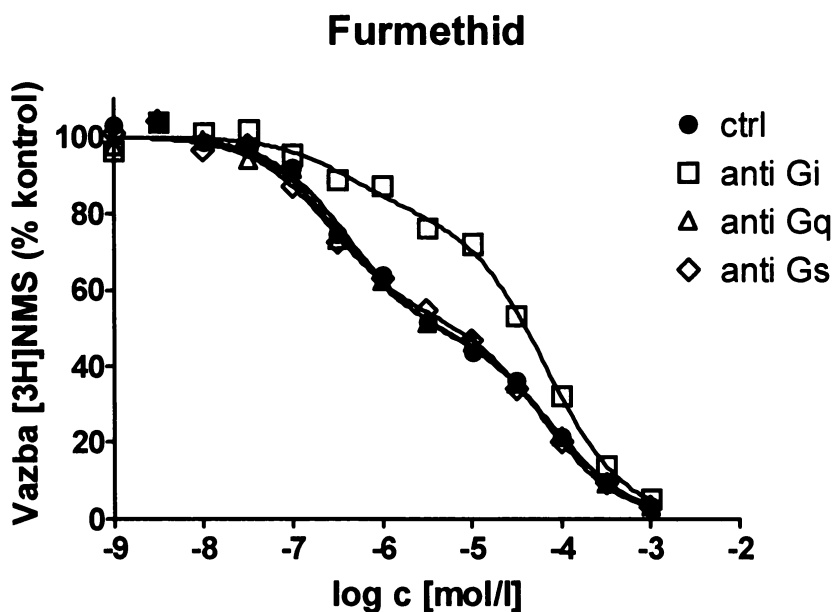
Kompetice mezi 1 nM [³H]NMS a oxotremorinem za kontrolních podmínek a po přidání protilátek proti α -podjednotkám Gi, Gq a Gs třídy G-proteinů. Symboly jsou popsány v grafu. Pouze přidání protilátky antiGi IgG způsobilo změnu tvaru vazebné křivky, která odráží snížení podílu vysokoafinitních vazebných míst.



Obrázek 3

Vazba pilokarpinu k M2 receptoru

Kompetice mezi 1 nM [³H]NMS a pilokarpinem za kontrolních podmínek a po přidání protilátek proti α -podjednotkám Gi, Gq a Gs třídy G-proteinů. Symboly jsou popsány v grafu. Pouze přidání protilátky antiGi IgG způsobilo změnu tvaru vazebné křivky, která odráží snížení podílu vysokoafinitních vazebných míst.



Obrázek 4

Vazba furmethidu k M2 receptoru

Kompetice mezi 1 nM [³H]NMS a furmethidem za kontrolních podmínek a po přidání protilátek proti α -podjednotkám Gi, Gq a Gs třídy G-proteinů. Symboly jsou popsány v grafu. Pouze přidání protilátky antiGi IgG způsobilo změnu tvaru vazebné křivky, která odráží snížení podílu vysokoafinitních vazebných míst.

4.2 Vazba agonistů k M2 mAChR po vyřazení jednotlivých typů G-proteinů pomocí protilátek po inhibici exprese α -podjednotek G_i G-proteinů pomocí RNA interference

Z výsledků první série pokusů vyplynulo, že vazbu agonistů na M2 receptory v membránách připravených z nativních buněk ovlivňují pouze preferenční G_i proteiny, které jsou v membráně v podstatně vyšší koncentraci, než ostatní G-proteiny. Provedla jsem proto další pokusy s vazbou agonistů k M2 receptoru na membránách buněk, u kterých byla pomocí transfekce siRNA proti α -podjednotce G_i G-proteinů inhibována jejich exprese. Účelem bylo zjistit, zda zbývající dvě třídy G-proteinů G_q a G_s v nepřítomnosti G_i G-proteinů budou ovlivňovat vazebné vlastnosti receptoru. Transfekované buňky mi laskavě poskytl kolega Jan Jakubík.

Stejně jako v předešlé sérii pokusů byly membrány rozděleny na kontrolní a dále do tří skupin, ke kterým byly přidány protilátky proti jednotlivým třídám G-proteinů. Inhibice exprese G_i proteinů pomocí siRNA způsobila pokles relativního množství vysokoafinitních míst pro jednotlivé agonisty (výsledky v Tabulce 1 a 2). Podíl vysokoafinitních vazebných míst u kontrolních membrán a membrán po inhibici exprese $G_{\alpha i}$ je (průměr \pm S.E.M.) pro karbachol 45 % \pm 5 a 23 % \pm 5, oxotremorin 40 % \pm 6 a 31 % \pm 8, pilokarpin 46 % \pm 7 a 33 % \pm 10, a furmethid 52 % \pm 3 a 28 % \pm 4. Průměrné zastoupení vysokoafinitních míst pro jednotlivé agonisty po přidání anti $G_{\alpha i}$ protilátky se, s výjimkou furmethidu, na rozdíl od nativních membrán statisticky významně nelišilo (Tabulka 2). Mírný pokles oproti kontrolám patrný u oxotremorinu, pilokarpinu a statisticky významný u furmethidu byl patrně způsoben nedokonalým zablokováním exprese preferenčních G_i proteinů. Podobně jako v sérii pokusů s nativními membránami nemělo vyřazení α -podjednotek G_q a G_s G-proteinů pomocí protilátek žádný vliv na afinitu vysoko- či nízkofinitního vazebného místa.

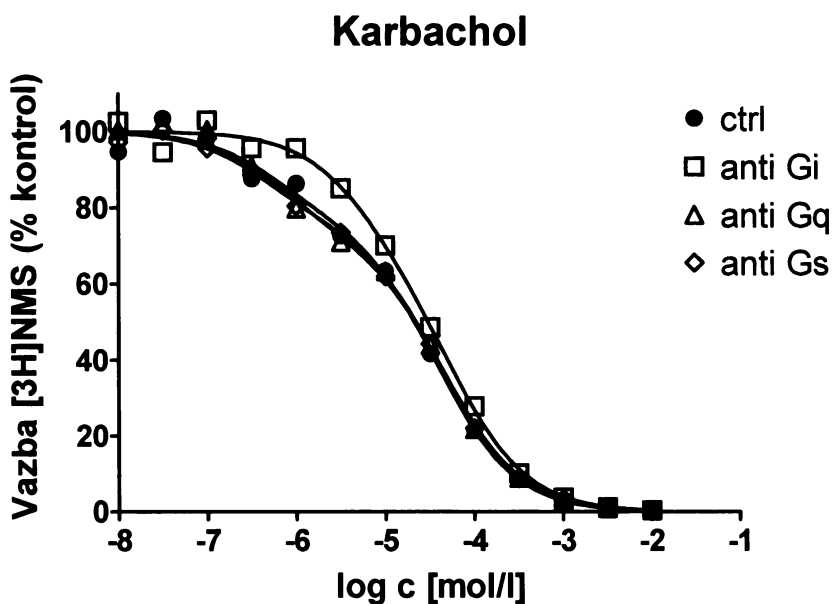
Průměrná hodnota $\log IC_{50_{high}}$ při vazbě karbacholu na kontrolní membrány byla $-6,22$, $\log IC_{50_{low}}$ $-4,42$. Frakce vysokoafinitních míst tvořila u kontrolních membrán 23 % všech vazebných míst, po přidání protilátky proti G_i se průměrné zastoupení vysokoafinitních míst pro karbachol překvapivě zvýšilo na 33 %, rozdíl však nebyl statisticky významný. Průměrná hodnota $\log IC_{50_{high}}$ u oxotremorinu byla při vazbě na kontrolní membrány $-6,78$, $\log IC_{50_{low}}$ $-5,47$. Frakce vysokoafinitních míst pro oxotremorin tvořila u kontrolních membrán 30 %, po přidání protilátky proti G_i se nesignifikantně snížila na 15 %, avšak také po přidání anti G_q protilátky kleslo zastoupení vysokoafinitních míst na 16 % (rovněž nesignifikantně). $\log IC_{50_{high}}$ pro pilokarpin byla při vazbě na kontrolní membrány $-6,40$, $\log IC_{50_{low}}$ $-4,94$.

Vysokoafinitní frakce tvořila 33 % a po přidání anti G_i protilátky nesignifikantně klesla na 14 %. Nakonec pro furmethid byla průměrná logIC_{50high} u kontrolních membrán -6,46, logIC_{50low} -4,11. Po přidání anti G_i protilátky klesla frakce vysokoafinitních míst nesignifikantně z 28 % na 16 %. Hodnoty logIC_{50high}, logIC_{50low} a zastoupení vysokoafinitních frakcí pro jednotlivé agonisty v této sérii pokusů jsou shrnuty v Tabulce 2.

		kontrola	anti Gi	anti Gq	anti Gs
karbachol	logIC_{50high}	-6,22± 0,26	-5,21 *± 0,38	-6,15± 0,16	-6,32± 0,08
	logIC_{50low}	-4,42± 0,08	-4,23± 0,18	-4,33± 0,06	-4,37± 0,03
	vysokoafinitní frakce	0,23± 0,05	0,33± 0,23	0,28± 0,04	0,25± 0,02
	změna	-	-	-	-
oxotremorin	logIC_{50high}	-6,78± 0,19	-6,63± 0,73	-7,59± 0,24	-7,14± 0,24
	logIC_{50low}	-5,47± 0,09	-5,54± 0,13	-5,63± 0,05	-5,55± 0,07
	vysokoafinitní frakce	0,31± 0,08	0,15± 0,17	0,16± 0,03	0,22± 0,05
	změna	-	-	-	-
pilocarpin	logIC_{50high}	-6,40± 0,28	-6,29± 0,52	-6,70± 0,21	-6,45± 0,15
	logIC_{50low}	-4,94± 0,14	-4,96± 0,08	-5,01± 0,07	-4,93± 0,07
	vysokoafinitní frakce	0,33± 0,10	0,14± 0,09	0,24± 0,05	0,31± 0,05
	změna	-	-	-	-
furmethid	logIC_{50high}	-6,46± 0,19	-6,10± 0,28	-6,62± 0,13	-6,30± 0,11
	logIC_{50low}	-4,11± 0,08	-4,07± 0,05	-4,10± 0,05	-4,07± 0,05
	vysokoafinitní frakce	0,28± 0,04	0,16*± 0,03	0,28± 0,02	0,31± 0,02
	změna	-	2x	-	-

Tabulka 2

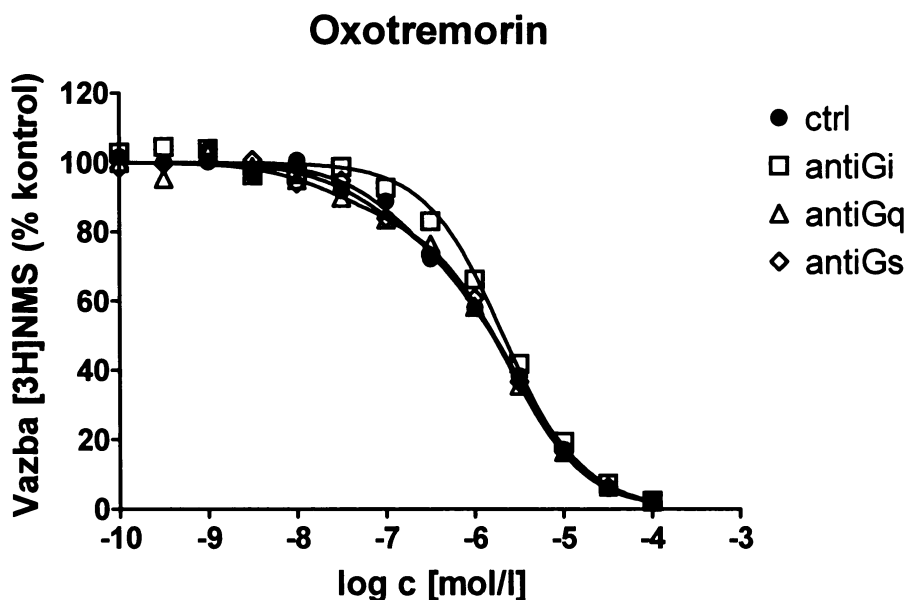
Hodnoty IC₅₀ a velikost frakcí vysokoafinitních vazebných míst získané z vytěšňovacích vazebných pokusů s jednotlivými agonisty a 1nM [³H]NMS v kontrolním uspořádání a při vyřazení Gi, Gq a Gs tříd G-proteinů na membránách z buněk, u kterých byla zablokována exprese Gi proteinů. Pouze vyřazení třídy Gi proteinů vedlo u karbacholu k signifikantní změně v afinitě vysokoafinitního místa a u furmethidu ke dvojnásobnému poklesu velikosti frakce vysokoafinitních míst oproti kontrolním membránám. Uvedené hodnoty jsou průměrem tří pokusů provedených v kvadruplicatech ± SEM. *, p<0.05, statisticky významný rozdíl od kontrol (bez přidání protilátek) pomocí ANOVÁ a Dunnettova testu.



Obrázek 5

Vazba karbacholu k M2 receptoru na membránách z buněk s potlačenou expresí Gi proteinů

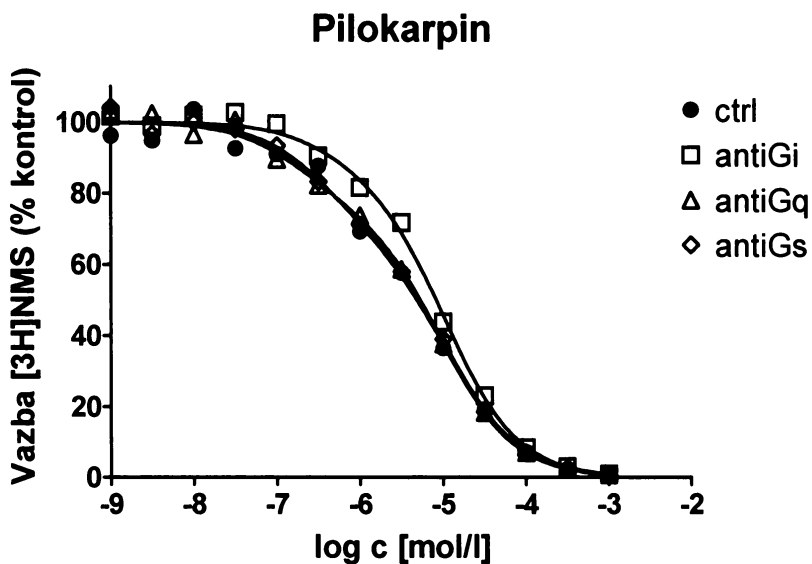
Kompetice mezi 1 nM [³H]NMS a karbacholem za kontrolních podmínek a po přidání protilátek proti α -podjednotkám Gi, Gq a Gs třídy G-proteinů. Symboly jsou popsány v grafu. Přidání protilátky antiGi IgG významně snížilo afinitu vysokoafinitního vazebného místa.



Obrázek 6

Vazba oxotremorinu k M2 receptoru na membránách z buněk s potlačenou expresí Gi proteinů

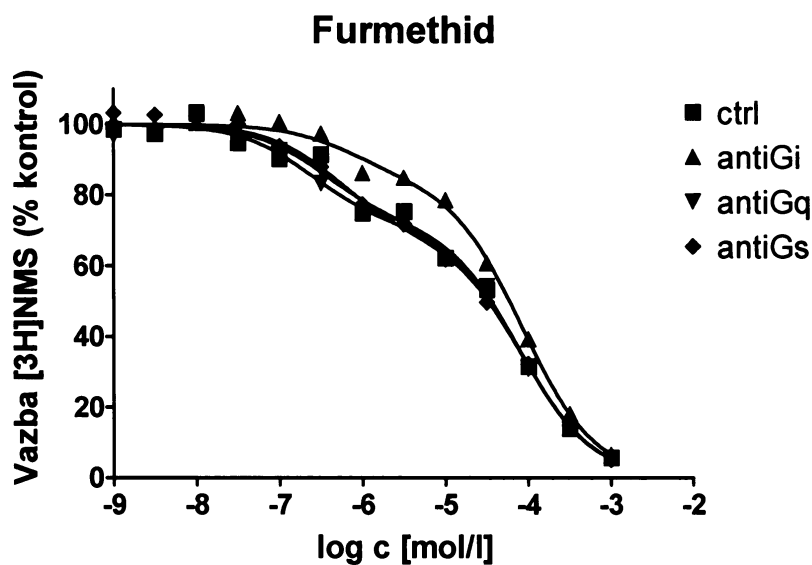
Kompetice mezi 1 nM [³H]NMS a oxotremorinem za kontrolních podmínek a po přidání protilátek proti α -podjednotkám Gi, Gq a Gs třídy G-proteinů. Symboly jsou popsány v grafu. Přidání žádné z protilátek nezměnilo afinitu vazebných míst ani podíl vysokoafinitních míst.



Obrázek 7

Vazba pilokarpinu k M2 receptoru na membránách z buněk s potlačenou expresí Gi proteinů

Kompetice mezi 1 nM [³H]NMS a pilokarpinem za kontrolních podmínek a po přidání protilátek proti α-podjednotkám Gi, Gq a Gs třídy G-proteinů. Symboly jsou popsány v grafu. Přidání žádné z protilátek nezměnilo afinitu vazebných míst ani podíl vysokoafinitních míst.



Obrázek 8

Vazba furmethidu k M2 receptoru na membránách z buněk s potlačenou expresí Gi proteinů

Kompetice mezi 1 nM [³H]NMS a furmethidem za kontrolních podmínek a po přidání protilátek proti α-podjednotkám Gi, Gq a Gs třídy G-proteinů. Symboly jsou popsány v grafu. Přidání protilátky antiGi IgG významně snížilo podíl frakce vysokoafinitních vazebných míst.

4.3 Vliv akutního a chronického působení β -amyloidu na vazebné vlastnosti mAChR pro antagonistu $^3\text{H-NMS}$

Na membránách připravených z buněk exprimujících selektivně všech pět podtypů mAChR vystavených akutnímu a chronickému účinku β -amyloidu jsem sledovala expresi receptorů (B_{\max}) a afinitu (rovnovážnou disociační konstantu, K_d) receptorů k antagonistovi [^3H]-NMS. Všechna uvedená data jsou průměrem z minimálně tří nezávislých pokusů provedených v kvadruplicatech, přesný počet provedených pokusů je uveden v Tabulce 3 a 4.

Expresce receptorů vyjádřená velikostí maximální vazby B_{\max} v saturačních pokusech s [^3H]-NMS nebyla ovlivněna akutním ani chronickým působením β -amyloidu. B_{\max} membrán vystavených akutnímu i chronickému působení β -amyloidu, vyjádřená jako procento kontrol v párovaných pokusech se stejným množstvím membrán (6-50 μg proteinu na vzorek), se pohybovala mezi 88 a 124 % B_{\max} naměřené u kontrolních membrán (Tabulka 3). Také afinita mAChR k [^3H]-NMS určená v saturačních pokusech se akutním nebo chronickým působením β -amyloidu nezměnila a odpovídala K_d získané měřením na kontrolních membránách (Obrázek 9, Tabulka 4). Afinita [^3H]-NMS, získaná jako průměr všech měření, byla nejvyšší k M4 receptoru a snižovala se v pořadí M1, M3, M2 a M5 (67, 195, 207, 427 a 596 pM).

	M1	M2	M3	M4	M5
Akutní Aβ	97 \pm 4	106 \pm 10	96 \pm 5	103 \pm 5	125 \pm 11
(% kontrol)	(6)	(4)	(4)	(4)	(7)
Chronický Aβ	110 \pm 5	89 \pm 12	105 \pm 12	114 \pm 24	91 \pm 17
(% kontrol)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)

Tabulka 3

Vliv akutního a chronického působení β -amyloidu na maximální vazbu [^3H]-NMS u jednotlivých podtypů muskarinových receptorů

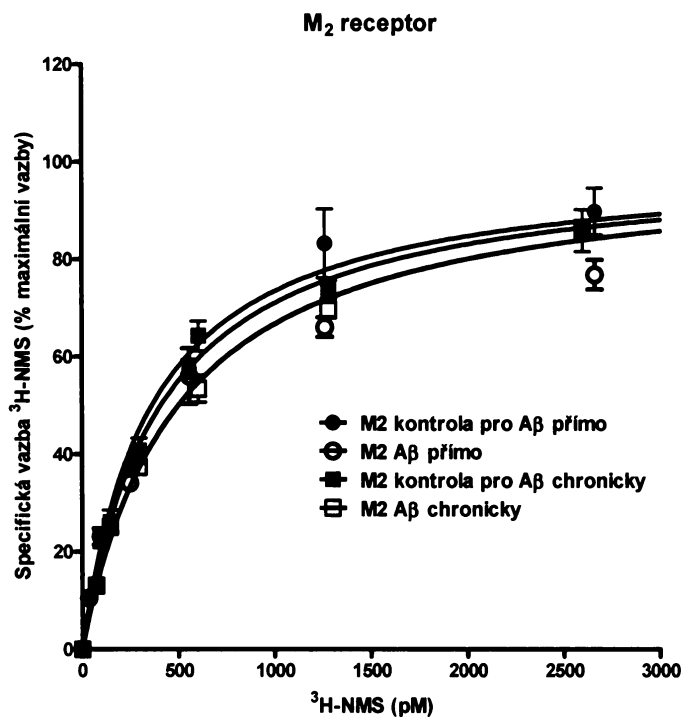
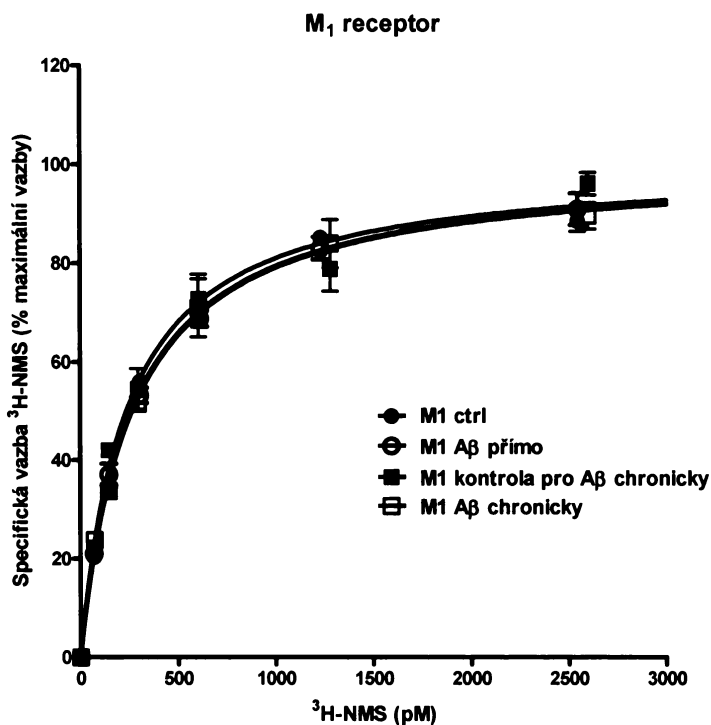
Hodnoty B_{\max} naměřené na membránách CHO buněk exprimujících jednotlivé podtypy mAChR vystavených akutnímu (akutní A β) a chronickému (chronický A β) působení β -amyloidu. Hodnoty jsou vyjádřené jako % kontrol \pm SEM. Počet pokusů je uveden v závorkách. Reprezentativní pokusy jsou znázorněny na Obrázku 9. Akutní ani chronické působení β -amyloidu signifikantně nezměnilo maximální vazbu u žádného z receptorů.

K_d (pM)	M1	M2	M3	M4	M5
Kontrola	197±16 (9)	411±87 (9)	221±32 (9)	74±94 (7)	625±82 (10)
Akutní A β	183±28 (6)	508±126 (4)	204±71 (4)	50±3 (4)	701±16 (7)
Chronický A β	217±31 (3)	368±77 (3)	169±19 (3)	76±12 (3)	387±64 (3)
Průměr	195±13 (18)	427±58 (16)	207±24 (16)	67±6 (14)	596±52 (20)

Tabulka 4

Vliv akutního a chronického působení β -amyloidu na afinitu jednotlivých podtypů muskarinových receptorů pro [3 H]-NMS

Výsledky jsou průměr \pm SEM rovnovážné disociační konstanty (K_d). Počet pokusů je uveden v závorkách. Reprezentativní pokusy jsou znázorněny na Obrázku 9. Afinita [3 H]-NMS byla měřena na membránách CHO buněk exprimujících jednotlivé podtypy mAChR vystavených akutnímu (1 μ M A β přítomný během vazebného pokusu) a chronickému (0.1 μ M A β po dobu 4 dní během kultivace buněk, vazebný pokus již v jeho nepřítomnosti) působení β -amyloidu. Akutní ani chronické působení β -amyloidu nemělo statisticky významný vliv na afinitu vazby [3 H]-NMS u žádného z receptorů. V posledním řádku (průměr) jsou hodnoty K_d vypočítané jako průměr ze všech měření, bez ohledu na působení β -amyloidu.

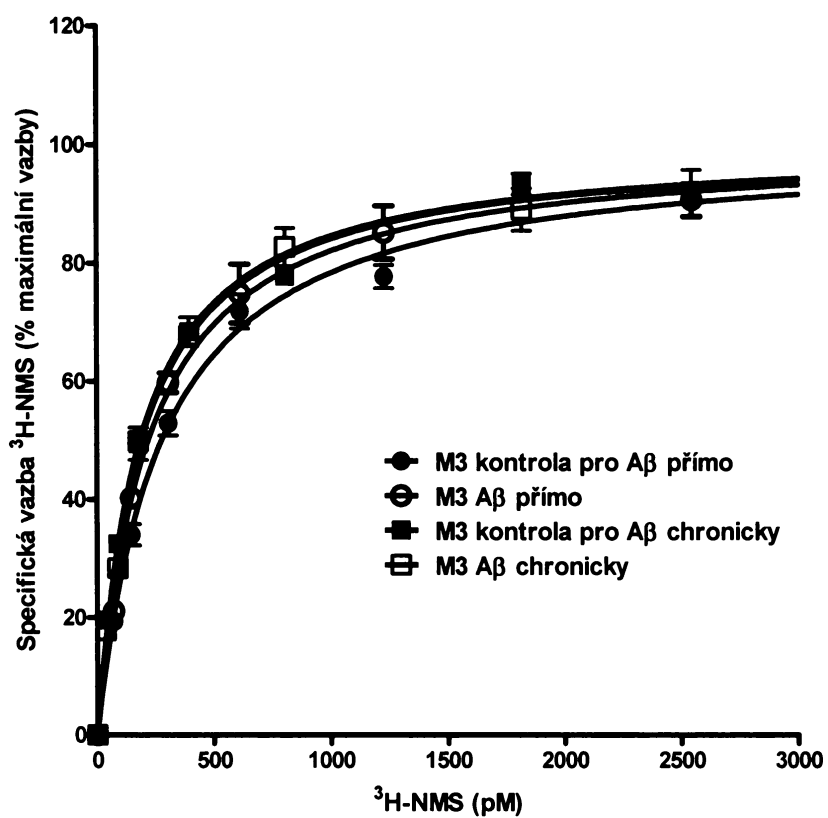


Obrázek 9

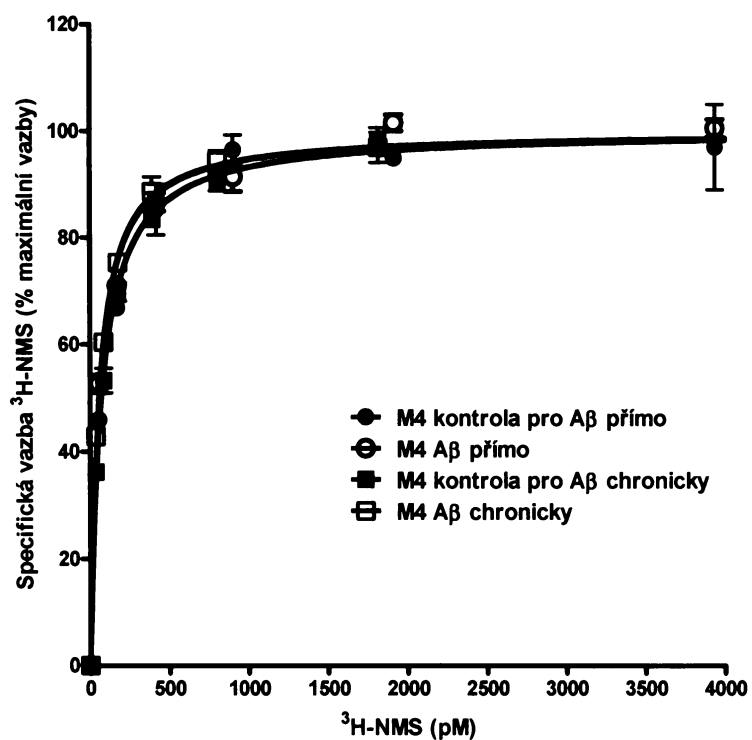
Akutní ani chronické působení β -amyloidu nemá vliv na afinitu jednotlivých podtypů muskarinových receptorů.

Výsledky reprezentativních měření jsou vyjádřeny jako procento vypočítané maximální vazby v párovaných pokusech. Body jsou průměr \pm SEM měření v kvadruplicatech. Parametry proložení měřených hodnot pravoúhlou hyperbolou jsou uvedeny v Tabulce 3 a 4. Symboly jsou popsány v obrázcích.

M₃ receptor

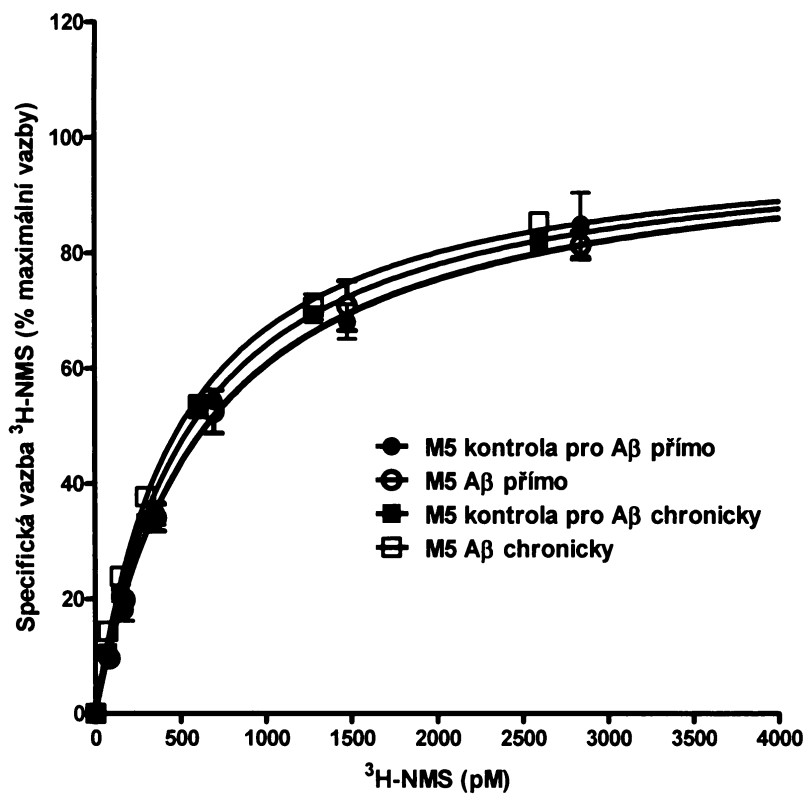


M₄ receptor



Pokračování Obrázku 9

M₅ receptor



Pokračování Obrázku 9

4.4 Vliv akutního a chronického působení β -amyloidu na vazebné vlastnosti mAChR pro agonistu karchol

V kompetičních pokusech s [3 H]-NMS kontrolních membrán vykazoval karchol u všech podtypů mAChR dvoumístnou kompetiční křivku (Obrázek 10, Tabulka 5). Akutní působení β -amyloidu (1 μ M A β během vazebného pokusu) nemělo žádný vliv na afinitu ke karcholu nebo velikost frakce vysokoafinitních míst. Chronické působení β -amyloidu (0,1 μ M A β po dobu 4 dnů během kultivace buněk) mělo vliv na tvar kompetičních křivek u membrán exprimujících M1 a M3 receptory. Afinita vysokoafinitních vazebných míst pro karchol byla chronickým působením β -amyloidu signifikantně snížena z 0,6 na 5,0 μ M u M1 podtypu mAChR. Frakce vysokoafinitních vazebných míst pro karchol pak byla signifikantně zvýšena u M1 podtypu z 19 na 32% a u M3 podtypu z 24 na 45%. Reprezentativní pokusy jsou znázorněny na Obrázku 10. Parametry vytěšňovacích křivek a statistické zpracování dat je uvedeno v Tabulce 5.

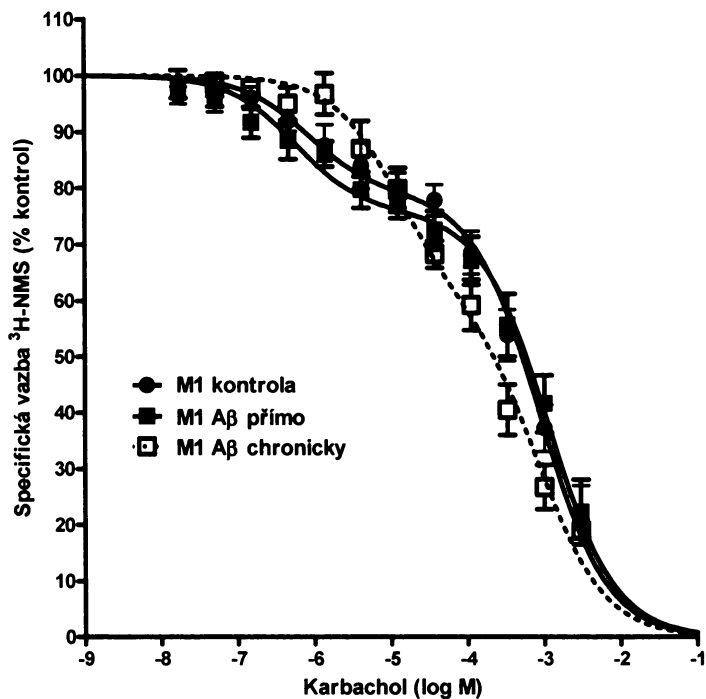
		pIC50 high	pIC50 low	vysokoaf. frakce
M1	kontrolní (9)	6,22±0,12	3,15±0,14	0,19±0,03
	akutní Aβ (6)	6,39±0,14	2,67±0,18	0,22±0,04
	chronický Aβ (5)	5,30±0,28**	3,30±0,16	0,32±0,04*
M2	kontrolní (12)	6,97±0,12	4,42±0,08	0,63±0,03
	akutní Aβ (5)	6,86±0,34	4,56±0,12	0,62±0,06
	chronický Aβ (5)	7,08±0,22	4,31±0,19	0,61±0,03
M3	kontrolní (11)	5,22±0,20	3,25±0,10	0,24±0,02
	akutní Aβ (5)	5,81±0,39	3,06±0,15	0,21±0,05
	chronický Aβ (5)	4,92±0,38	3,31±0,15	0,45±0,06**
M4	kontrolní (7)	6,19±0,05	3,74±0,09	0,47±0,02
	akutní Aβ (4)	6,16±0,09	3,70±0,13	0,49±0,02
	chronický Aβ (3)	6,30±0,08	3,90±0,06	0,47±0,01
M5	kontrolní (11)	6,25±0,16	4,34±0,14	0,45±0,03
	akutní Aβ (3)	6,28±0,19	4,58±0,08	0,54±0,05
	chronický Aβ (8)	5,84±0,14	3,93±0,13	0,52±0,05

Tabulka 5

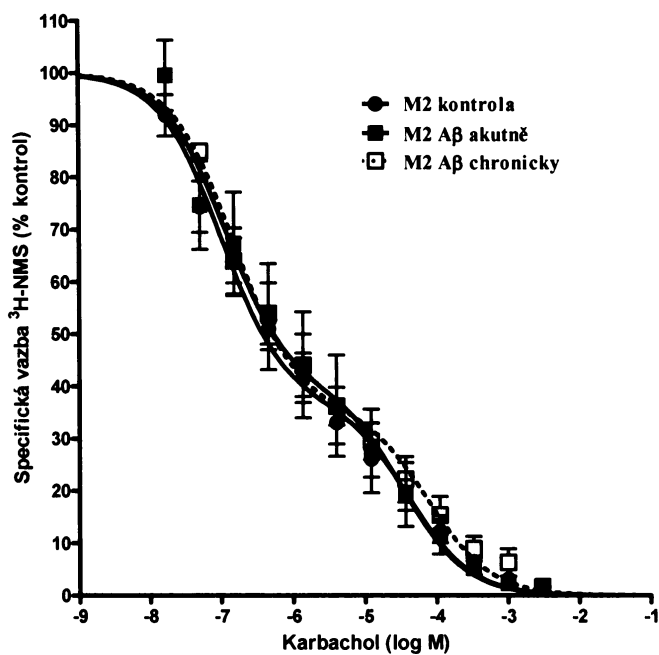
Hodnoty pIC50 high, pIC50 low a relativní zastoupení vysokoafinitní frakce naměřené v kompetičních pokusech s karcholem a [³H]-NMS na membránách CHO buněk exprimujících jednotlivé podtypy mAChR.

Vazba karcholu byla provedena v kontrolních podmínkách a na membránách vystavených akutnímu a chronickému vlivu β-amyloidu. Hodnoty IC50 nízko- a vysokoafinitních míst jsou vyjádřeny jako záporný logaritmus koncentrace karcholu ± SEM, vysokoafinitní frakce je frakce vysokoafinitních míst z celkového počtu vazebných míst rovnému jedné ± SEM. Počet pokusů je uvedený v závorkách. *, p<0.05; **, p<0.01, statisticky významný rozdíl od kontrol (bez působení β-amyloidu) pomocí ANOVA a Dunnettova testu. Reprezentativní pokusy jsou znázorněny na Obrázku 10.

M1: vytěsňování $^3\text{H-NMS}$ karbacholem



M2: vytěsňování $^3\text{H-NMS}$ karbacholem

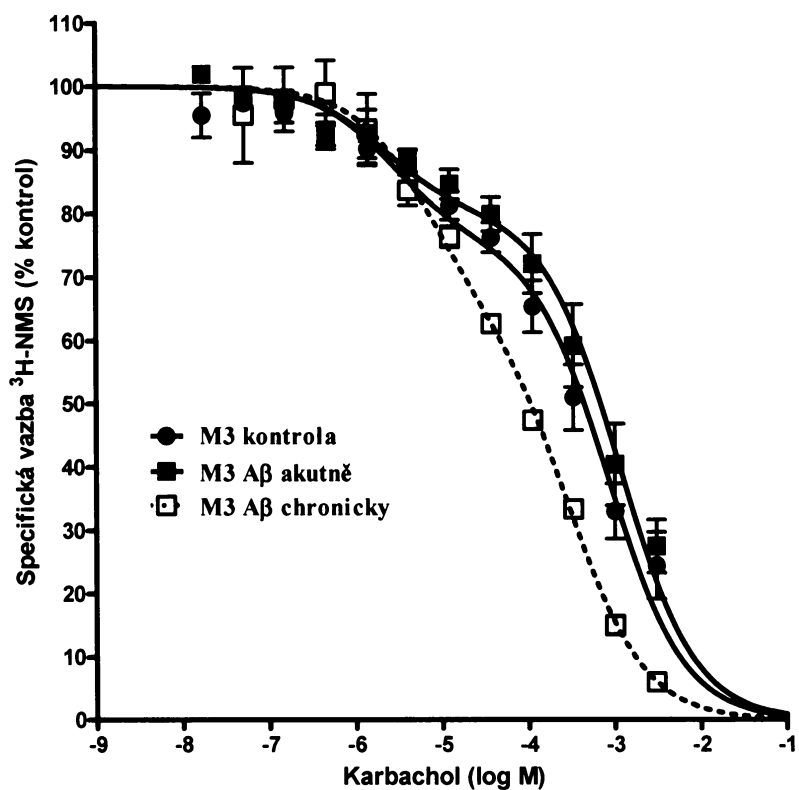


Obrázek 10

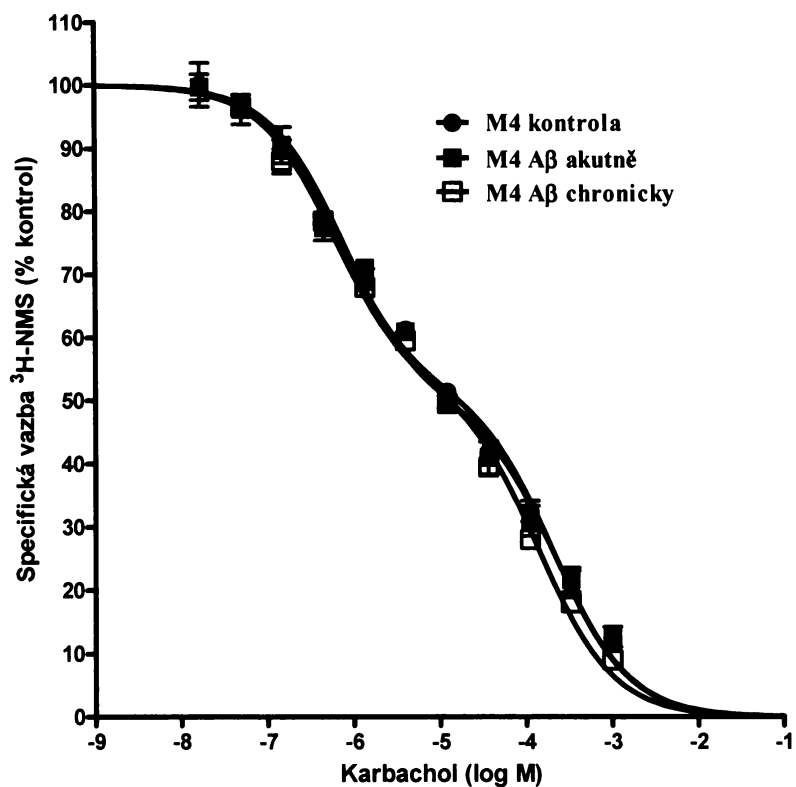
Vliv akutního a chronického působení β -amyloidu na vazebné vlastnosti muskarinového agonisty karbacholu

Výsledky reprezentativních měření jsou vyjádřeny jako procento vazby v nepřítomnosti karbacholu. Body jsou průměr \pm SEM měření v kvadruplicatech. Parametry proložení měřených hodnot dvoumístnou křivkou jsou vedeny v Tabulce 5. Symboly jsou popsány v obrázcích.

M3: vytěšňování $^3\text{H-NMS}$ karcholem

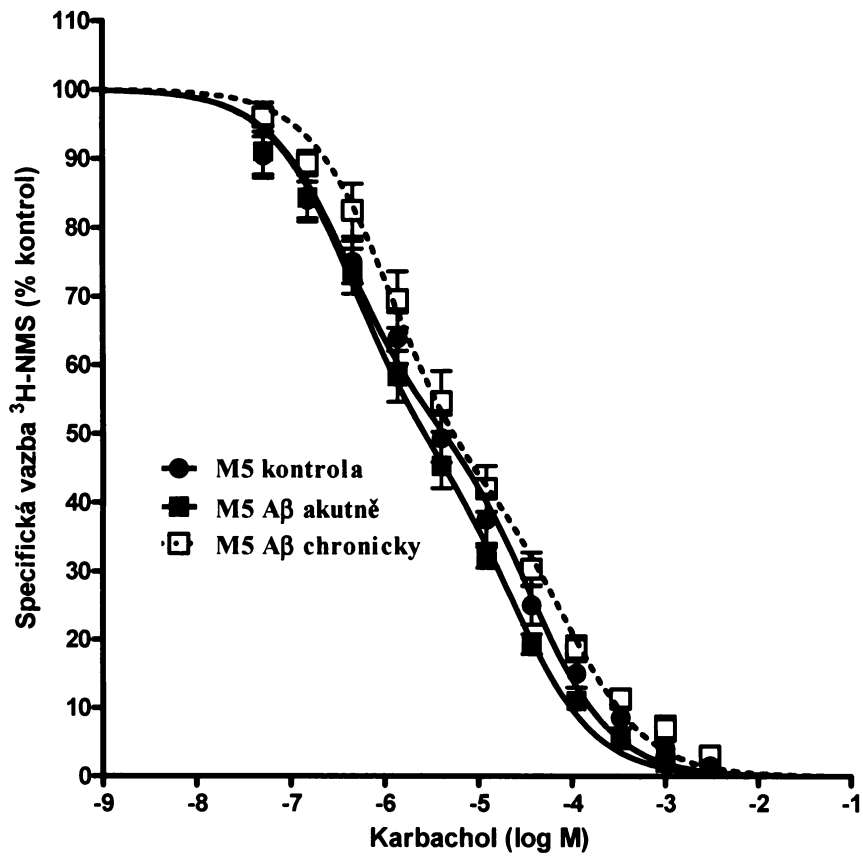


M4: vytěšňování $^3\text{H-NMS}$ karcholem



Pokračování Obrázku 10

M5: vytěšňování $^3\text{H-NMS}$ karcholem



Pokračování Obrázku 10

5. Diskuze

Muskarinové receptory slouží k přenosu chemického extracelulárního signálu na intracelulární signální dráhy. Mechanismus přenosu zajišťuje alosterická interakce mezi agonistou receptoru na vnější straně membrány a heterotrimerickým G-proteinem na vnitřní straně membrány. Receptor mění svou konformaci a tedy i svou afinitu k agonistům v závislosti na tom, zda je spřažen s G-proteinem. Pokud se na G-protein naváže GTP a G-protein následně disociuje od receptoru, sníží se afinita receptoru k agonistům. Ve vazebných pokusech s agonisty vykazují muskarinové receptory nejméně dvě konformace, které se vyznačují vysokou a nízkou afinitou. Vysokoafinitní konformace odpovídá receptoru, který interaguje s G-proteinem, nízkoafinitní konformace pak rozpřaženému receptoru (bez navázaného G-proteinu).

M2 podtyp mAChR se preferenčně spřahuje s G_i G-proteiny, avšak signalizace prostřednictvím G_q a G_s G-proteinů byla rovněž prokázána /Michal *et al.* 2001, 2007, 2009/. V první části své práce jsem se zabývala otázkou, zda afinitu receptoru ovlivňuje pouze preferenční G-protein (tj. G_i protein pro M2 podtyp mAChR), či zda tuto afinitu mohou ovlivňovat také ostatní podtypy G-proteinů (G_q a G_s). Již v bakalářské práci /abstrakt Smyčková *et al.* 2007/ jsem svými pokusy potvrdila známou skutečnost, že v přítomnosti vysoké koncentrace GTP mizí dvoumístný charakter vazebné křivky u všech sledovaných strukturně odlišných muskarinových agonistů a křivka se stává jednomístnou. IC₅₀ této jednomístné vazebné křivky odpovídá původnímu nízkoafinitnímu vazebnému místu. Tento výsledek lze interpretovat tak, že všechny G-proteiny po navázání GTP (které je přítomno v nadbytku) disociují od receptoru, který pak přechází do nízkoafinitního stavu.

Podobnou úlohu jako nukleotid GTP plnily v mé diplomové práci specifické protilátky proti α -podjednotce dané třídy G-proteinů. Tím, že se protilátka naváže na epitop G-proteinu, který za normálních okolností zajišťuje interakci s receptorem, zabrání spřahování G-proteinu s receptorem, který tak zůstává rozpřažený (v konformaci s nízkou afinitou pro agonisty). Přidání protilátky do inkubačního média by tedy mělo mít stejný efekt jako přidání GTP, avšak na rozdíl od GTP by mělo selektivně vyřazovat jednotlivé podtřídy G-proteinů. V mých pokusech pouze protilátka proti G_i G-proteinu snižovala zastoupení vysokoafinitních vazebných míst pro agonisty. Nikdy se však nepodařilo snížit frakce vysokoafinitních míst přidáním protilátky až k nule a dosáhnout jednomístné vazebné křivky. Frakce vysokoafinitních míst pravděpodobně neklesla až k nule proto, že se pomocí protilátky nepodařilo vyřadit všechny přítomné G_i G-proteiny.

Transfekce buněk siRNA měla za úkol snížit expresi G_i proteinů, které jsou nejen preferenční pro M2 podtyp mAChR, ale také přítomné ve velkém nadbytku v porovnání se zbývajícími typy G-proteinů /*Milligan 2003*/. Vzhledem k tomu, že nepreferenční G-proteiny třídy G_q a G_s se s M2 receptorem pravděpodobně v nepřítomnosti agonisty nespřahují (jak vyplynulo z výsledků měření), mělo by po inhibici exprese G_i proteinů dojít k poklesu v počtu vysokoafinních míst a v ideálním případě by se vazebná křivka agonistů měla změnit v jednomístnou. Výsledky měření na membránách z transfekovaných buněk ukázaly, že k určitému poklesu v počtu vysokoafinitních vazebných míst skutečně došlo, i když tento pokles se zdaleka neblížil nulovým hodnotám. V případě furmetidu došlo zablokováním G_i proteinů pomocí protilátek k dalšímu poklesu vysokoafinitních míst. Fakt, že se vazebná křivka agonistů po inhibici exprese G_i proteinů nezměnila v jednomístnou a zároveň skutečnost, že přidání anti G_i protilátky může vést k dalšímu snížení počtu vysokoafinitních míst, lze vysvětlit tak, že ani inhibice exprese G_i proteinů společně s inhibicí spřahování pomocí protilátky nebyla stoprocentně účinná. Je však také možné, že úplnému vymizení vysokoafinitních míst po inhibici exprese G_i proteinů zabránily přítomné nepreferenční G_q a G_s proteiny. Jejich vliv však byl natolik malý, že se neprojevil po přidání protilátek proti G_q a G_s třídám G-proteinů.

Pokles velikosti frakce vysokoafinitních míst byl u každého ze studovaných muskarinových agonistů po přidání anti G_i protilátky k membránám z netransfekovaných buněk jinak velký. Největší byl tento pokles u oxotremorinu (přibližně 7x) následovaný pilokarpinem (přibližně 5,5x), menší pokles byl zaznamenán u plných agonistů karcholu a furmethidu (oba přibližně 3x). Je tedy možné, že i struktura konkrétního agonisty (společně s jeho koncentrací) určuje, jak velkou roli hrají při přenosu signálu z aktivovaného receptoru preferenční či nepreferenční třídy G-proteinů. Ve většině případů výsledky měření neukázaly žádný rozdíl v afinitě nízko- či vysokoafinního vazebného místa mezi kontrolními membránami a membránami po přidání protilátky proti jednotlivým třídám G-proteinů. To souhlasí s představou, že volné (rozpřažené) receptory mají nízkou, kdežto receptory v komplexu s G-proteinem vysokou afinitu pro agonisty. Pouze v případě částečného agonisty pilokarpinu došlo po přidání anti G_i protilátky ke zvýšení afinity vysokoafinitního místa oproti kontrole. Toto pozorování lze vysvětlit existencí konformací receptoru specifických pro agonisty, a to tak, že u některých agonistů je afinita volného receptoru stejná jako afinita k receptoru s volným G-proteinem, kdežto u jiných se liší (v našem případě je pro pilokarpin vyšší). Potvrzení této hypotézy bude vyžadovat další detailní studii.

Na základě vazebných pokusů se čtyřmi různými muskarinovými agonisty jsem došla k závěru, že pouze preferenční G_i protein je s M2 podtypem mAChR v dostatečně těsném kontaktu, aby jeho odpražení mohlo mít vliv na konformaci celého receptoru. Tento závěr podporují i výsledky pokusů s potlačením exprese G_i proteinů pomocí transfekce siRNA. Ani po potlačení exprese preferenčních G_i G-proteinů se neprokázala těsná interakce s G_q a G_s G-proteiny v nepřítomnosti agonisty (takzvaný precoupling), což naznačuje, že preferenční interakce mezi receptorem a G-proteinem je založena na strukturní charakteristice α -podjednotky G-proteinu a receptoru. Kromě preferenčních G-proteinů mohou všechny podtypy mAChR přenášet signál také skrze nepreferenční třídy G-proteinů. K interakci mezi M2 receptorem a nepreferenčním G-proteinem však pravděpodobně dochází pomocí jiného mechanismu než při přenosu signálu prostřednictvím preferenčního G-proteinu. V nepřítomnosti agonisty ke spřažení mezi receptorem a nepreferenčním G-proteinem na rozdíl od preferenční třídy G-proteinů nedochází a to ani v nepřítomnosti preferenčního G-proteinu. Při signalizaci skrze nepreferenční G-proteiny, ke které dochází například při vysoké koncentraci agonisty se neuplatňuje precoupling, ale pravděpodobně kolizní mechanismus aktivace G-proteinů „kiss and run“.

V druhé sérii pokusů jsem studovala vliv β -amyloidu na přenos signálu přes všechny podtypy mAChR. Toxicita β -amyloidu ve vztahu k nervovým buňkám nejrůznějšího typu byla prokázána mnohokrát. Podle literárních údajů má β -amyloid negativní vliv na viabilitu buněk, dokáže indukovat apoptózu, zvyšuje hladinu kalcia v buňkách, stimuluje tvorbu volných kyslíkových radikálů a snižuje hladinu antioxidantních enzymů (např. superoxidodismutázy, glutathionreduktázy apod.) /Selkoe 2002, Giovanna et al. 2009/. Přímá injekce β -amyloidu do mozkových komor pokusných zvířat rovněž snižuje jejich výkony v behaviorálních a kognitivních testech /Cleary et al. 2005/.

Přímé působení β -amyloidu nemělo žádný vliv na vazebné vlastnosti muskarinových receptorů. Přítomnost β -amyloidu v inkubačním médiu neovlivnila nijak afinitu receptoru ani k agonistovi karcholu ani k antagonistovi [3 H]-NMS. To ukazuje, že β -amyloid nekompetuje s muskarinovými ligandy o klasické vazebné místo. Vzhledem k tomu, že vazebné pokusy byly prováděny na membránách, kdy β -amyloid má přístup k receptorům z obou stran membrány, to dále potvrzuje, že β -amyloid neovlivňuje přímo ani spřažení receptorů s G-proteiny.

Naopak chronické působení β -amyloidu na rostoucí buňky snížilo afinitu receptoru M1 k agonistovi a zároveň zvýšilo podíl vysokoafinitních vazebných míst u M1 a M3

podtypu mAChR, přestože v průběhu vazebného pokusu již β -amyloid nebyl v inkubačním médiu přítomen. Exprese žádného z receptorů nebo jejich afinita k antagonistovi [^3H]-NMS se však chronickým působením β -amyloidu nezměnila. Toxicita β -amyloidu přítomného v inkubačním médiu po dobu 4 dní se projevila na vazebných vlastnostech muskarinových receptorů pouze u lichých podtypů M1 a v menším měřítku také u M3. Právě podtyp M1 (kterému jsou druhé dva liché podtypy M3 a M5 strukturně podobné) se pravděpodobně v největší míře účastní na změnách, které vyvolávají nebo alespoň zhoršují příznaky Alzheimerovy choroby. M1 podtyp je v mozkové tkáni zastoupen nejhojněji ze všech mAChR. Naopak M3 se nachází především v periférii a v mozku se vyskytuje málo, avšak svou strukturou a specifikou spřáhování je podtyp M3 podtypu M1 podobný /Bonner 1989/.

Abychom mohli v budoucnu přesněji zhodnotit vliv β -amyloidu na vlastnosti a funkci mAChR, bude vhodné zjistit, do jaké míry použitý β -amyloid ovlivnil i další vlastnosti použitých CHO buněk (jejich životaschopnost, počet apoptotických jader). Dále je třeba zaměřit se na otázku, v jaké formě se nachází β -amyloid působící na buňky (monomerní, oligomerní, fibrilární), což lze prokázat například pomocí techniky western blotu.

6. Shrnutí

Ve své diplomové práci jsem studovala vliv jednotlivých tříd G-proteinů na afinitu vazby M2 podtypu mAChR a vliv akutního nebo chronického působení β -amyloidu na vazebné vlastnosti všech podtypů mAChR. Z výsledků vazebných pokusů s plnými agonisty karbacholem a furmethidem, a částečnými agonisty oxotremorinem a pilokarpinem vyplývá, že afinitu M2 podtypu mAChR ovlivňuje pouze preferenční podtyp G_i proteinů. Ani po inhibici exprese G_i proteinů pomocí siRNA nebyl patrný vliv zbývajících dvou podtypů G_q a G_s na afinitu M2 receptoru k agonistům. Zdá se tedy, že jednotlivé třídy G-proteinů spolu o sprážení s M2 receptorem nekompetují a že přenos signálu skrze preferenční G_i proteiny se děje jiným mechanismem než přenos signálu prostřednictvím nepreferenčních G_q a G_s proteinů. Vliv β -amyloidu na mAChR jsem sledovala pomocí vazebných pokusů s muskarinovým agonistou karbacholem, který se svou strukturou velmi podobá přirozenému ligandu acetylcholinu. Akutní působení β -amyloidu nemělo žádný vliv na vazebné vlastnosti žádného z podtypů mAChR. Tato pozorování vylučují přímou interakci β -amyloidu s klasickým vazebným místem nebo místem, kde se odehrává interakce s G-proteiny. Naopak chronické působení β -amyloidu snížilo afinitu vysokoafinitního místa u M1 mAChR pro karbachol a zvýšilo podíl frakce vysokoafinitních míst u M1 a M3 mAChR. M1 receptor se nejvíce ze všech podtypů mAChR vyskytuje v mozku a pravděpodobně hraje roli při vzniku Alzheimerovy choroby, v jejímž průběhu dochází v mozku ke zvýšené tvorbě β -amyloidu a jeho ukládání ve formě β -amyloidových plaků. M3 receptor (který je naopak zastoupen převážně v periferních tkáních) se svou strukturou blíží receptoru M1.

F: Seznam citované literatury

Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database

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

Beach, T.G, Honer, W.G., Hughes, L.H.: *Acta Neuropathol.* 93, 146-153 (1997)

Bertram, L., Tanzi, R.E.: *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 768-778 (2008)

Birdsall, N.J., Lazareno, S.: *Mini Rev. Med. Chem.* 5, 523-543 (2005)

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

Bonner, T.I., Young, A.C., Brann, M.R., Buckley, N.J.: *Neuron* 1, 403-410 (1988)

Bonner, T.I.: *Trends. Pharmacol. Sci. Suppl.* 11-15 (1989)

Bowen, D.M., Allen, S.J., Benton, J.S., Goodhardt, M.J., Haan, E.A., Palmer, A.M., Sims, N.R., Smith, C.C., Spillane, J.A., Esiri, M.M., Neary, D., Snowden, J.S., Wilcock, G.K., Davison, A.N.: *J. Neurochem.* 41, 266-272 (1983)

Bowen, D.: *Acta. Neurol. Scand. Suppl.* 129, 15-16 (1990)

Brann, M.R., Klimkowski, V.J., Ellis, J.: *Life. Sci.* 52, 405-412 (1993)

Buckley, N.J., Bonner, T.I., Brann, M.R.: *J. Neurosci.* 8, 4646-4652 (1988)

Bymaster, F.P., Heath, I., Hendrix, J.C., Shannon, H.E.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 16-24 (1993)

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

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

Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., Ashe, K.H.: *Nat. Neurosci.* 8, 79-84 (2005)

Curtis, C.A., Wheatley, M., Bansal, S., Birdsall, N.J., Eveleigh, P., Pedder, E.K., Poyner, D., Hulme, E.C.: *J. Biol. Chem.* 264, 489-495 (1989)

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

Dorje, F., Levey, A.I., Brann, M.R.: *Mol. Pharmacol.* 40, 459-462 (1991)

Eglen, R.M., Bosse, R., Reisine, T.: *Assay. Drug. Dev. Technol.* 5, 425-451 (2007)

Emmerling, M.R., Moore, C.J., Doyle, P.D., Carroll, R.T., Davis, R.E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 292-297 (1993)

Gattaz, W.F., Maras, A., Cairns, N.J., Levy, R., Forstl, H.: *Biol. Psychiatry* 37, 13-17 (1995)

Giovanna, C., Cecchi, C., Pensalfini, A., Bonini, S.A., Ferrari-Toninelli, G., Liguri, G., Memo, M., Uberti, D.: *Amino. Acids* (Epub ahead of print, 2009)

- Hamilton, S.E., Loose, M.D., Qi, M., Levey, A.I., Hille, B., McKnight, G.S., Idzerda, R.L., Nathanson, N.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13311-13316 (1997)
- Haring, R., Fisher, A., Marciano, D., Pittel, Z., Kloog, Y., Zuckerman, A., Eshhar, N., Heldman, E.: *J. Neurochem.* 71, 2094-2103 (1998)
- Hulme, E.C., Curtis, C.A., Page, K.M., Jones, P.G.: *Cell. Signal.* 5, 687-694 (1993)
- Jakubík, J., Bačáková, L., EL-Fakahany, E.E., Tuček, S.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 1077-1083 (1995)
- Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., Honda, K., Nakamizo, T., Shibasaki, H., Kume, T., Akaike, A.: *J. Biol. Chem.* 276, 13541-13546 (2001)
- Kihara, T., Shimohama, S.: *Acta Neurobiol. Exp.* 64, 99-105 (2004)
- Kopf, S.R., Baratti, C.M.: *Neurobiol. Learn. Mem.* 65, 207-212 (1996)
- Krejčí, A., Tuček, S.: *Mol. Pharmacol.* 61, 1267-1272 (2002)
- Lanzafame, A.A., Christopoulos, A., Mitchelson, F.: *Receptors. Channels.* 9, 241-260 (2003)
- Lee, N.H., el-Fakahany, E.E.: *Biochem. Pharmacol.* 42, 199-205 (1991)
- Levey, A.I., Kitt, C.A., Simonds, W.F., Price, D.L., Brann, M.R.: *J. Neurosci.* 11, 3218-3226 (1991)
- Levey, A.I.: *Life. Sci.* 52, 441-448 (1993)
- Lleó, A., Blesa, R., Queralt, R., Ezguerra, M., Molinuevo, J.L., Pena-Casanova, J., Rojo, A., Oliva, R.: *Arch. Neurol.* 59, 1759-1763 (2002)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., Rogers, J.: *Am. J. Pathol.* 155, 853-862 (1999)
- Maggio, R., Vogel, Z., Wess, J.: *FEBS Lett.* 319, 195-200 (1993)
- McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., Masters, C.L.: *Ann. Neurol.* 46, 860-866 (1999)
- Michal, P., Lysíková, M., Tuček, S.: *Br. J. Pharmacol.* 132, 1217-1228 (2001)
- Michal, P., El-Fakahany, E.E., Doležal, V.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 607-614 (2007)
- Michal, P., Rudajev, V., el-Fakahany, E.E., Doležal, V.: *Eur. J. Pharmacol.* 606, 50-60 (2009)
- Milligan, G.: *Trends. Pharmacol. Sci.* 24, 87-90 (2003)
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reverse, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C.V., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B., Van Leuven, F.: *J. Biol. Chem.* 274, 6483-6492 (1999)

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

Nitsch, R.M., Slack, B.E., Farber, S.A., Borghesani, P.R., Schulz, J.G., Kim, C., Felder, C.C., Growdon, J.H., Wurtman, R.J.: Ann. NY Acad. Sci. 695, 122-127 (1993)

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

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

Perry, E.K., Gibson, P.H., Blessed, G., Perry, R.H., Tomlinson, B.E.: J. Neurol. Sci. 34, 247-265 (1977a)

Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G., Tomlinson, B.E.: Lancet 1, 189 (1977b)

Perry, E.K., Kilford, L., Lees, A.J., Burn, D.J., Perry, R.H.: Ann. Neurol. 54, 235-238 (2003)

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

Prasher, V.P., Farrer, M.J., Kessling, A.M., Fisher, E.M., West, R.J., Barber, P.C., Butler, A.C.: Ann. Neurol. 43, 380-383 (1998)

Roher, A.E., Chaney, M.O., Kuo, Y.M., Webster, S.D., Stine, W.B., Haverkamp, L.J., Woods, A.S., Cotter, R.J., Tuohy, J.M., Krafft, G.A., Bonnell, B.S., Emmerling, M.R.: J. Biol. Chem. 271, 20631-20635 (1996)

Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laguerriere, A., Vital, A., Dumanchin, C., Feuillette, S., Brice, A., Vercelletto, M., Dubas, F., Frebourg, T., Campion, D.: Nat. Genet. 38, 24-26 (2006)

Savage, M.J., Lin, Y.G., Ciallella, J.R., Flood, D.G., Scott, R.W.: J. Neurosci. 22, 3376-3385 (2002)

Selkoe, D.J.: J. Alzheimers. Dis. 3: 75-80 (2001)

Selkoe, D.J.: Science 298, 789-791 (2002)

Shimohama, S., Akaike, A., Kimura, J.: Ann. N Y Acad. Sci. 777, 356-361 (1996)

Smyčková, H., Jakubík, J., Doležal, V.: abstrakt z konference v J. Neurochem. 102 (Suppl. 1), 236-296 (2007)

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

Terry, A.V. Jr., Buccafusco, J.J., Borsini, F., Leusch, A.: Psychopharmacology 162, 292-300 (2002)

Wall, S.J., Yasuda, R.P., Li, M., Wolfe, B.B.: Mol. Pharmacol. 40, 783-789 (1991)

Wang, S.Z., Lee, S.Y., Zhu, S.Z., el-Fakahany, E.E.: Pharmacology 53, 271-280 (1996)

Wang, J., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.: Exp. Neurol. 158, 328-337 (1999)

Wess, J., Gdula, J., Brann, M.R.: EMBO J. 10, 3729-3734 (1991)

Wess, J.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 423-450 (2004)

Williamson, J., Goldman, J., Marder, K.S.: *Neurologist.* 15, 80-86 (2009)

Wilson, S., Bergsma, D.: *Drug. Des. Discov.* 17, 105-114 (2000)

Yan, Z., Feng, J.: *Curr. Alzheimer Res.* 1, 241-248 (2004)

Yasuda, R.P., Ciesla, W., Flores, L.R., Wall, S.J., Li, M., Satkus, S.A., Weisstein, J.S., Spagnola, B.V., Wolfe, B.B.: *Mol. Pharmacol.* 43, 149-157 (1993)

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

Jméno a příjmení s adresou	<i>Číslo OP</i>	Datum vypůjčení	Poznámka