

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů

Katedra fyziologie



Mgr. Eva Dolejší

Mechanismy přenosu signálu muskarinovými receptory

Mechanisms of signal transduction via the muscarinic receptors

Dizertační práce

Pracoviště: Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.
oddělení Neurochemie

Vedoucí práce: MUDr. Vladimír Doležal, DrSc.

Praha, 2014

PROHLÁŠENÍ

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

V Praze, 25. 11. 2014

podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala v první řadě svému školiteli MUDr. Vladimíru Doležalovi, DrSc., Mgr. Janu Jakubíkovi, PhD. a všem ostatním současným i bývalým kolegům a kolegyním z oddělení Neurochemie za cenné rady a podněty, které mi během studia poskytovali, a také za příjemné a vstřícné pracovní prostředí. Bez nich by tato práce nikdy nevznikla. Dále děkuji svému manželovi Milanovi za nejen technickou pomoc a kritické připomínky při psaní dizertační práce a své i manželově rodině za neutuchající podporu. V neposlední řadě děkuji i oponentům této práce za to, že si na její přečtení našli čas.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	6
ABSTRAKT	7
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
1.1 Úvod	9
1.2 Klasifikace a struktura muskarinových receptorů	10
1.2.1 Podtypy muskarinových receptorů	10
1.2.2 Struktura muskarinových receptorů	10
1.2.2.1 Ortosterické vazebné místo	12
1.2.2.2 Alosterická vazebná místa, alosteričtí a atypičtí agonisté muskarinových receptorů	13
1.3 Xanomelin – prototyp funkčně selektivního agonisty M ₁ /M ₄ receptorů	17
1.4 Lokalizace, signalizace a funkce muskarinových receptorů	23
1.4.1 Lokalizace muskarinových receptorů	23
1.4.1.1 Lokalizace muskarinových receptorů na periférii	23
1.4.1.2 Lokalizace muskarinových receptorů v centrální nervové soustavě	24
1.4.1.3 Cholinergní systém v mozku	26
1.4.2 Signalizace muskarinových receptorů	28
1.4.2.1 Obecný mechanismu signalizace receptorů spřažených s G-proteiny	28
1.4.2.2 Spřahování s G-proteiny a příklady signálních drah aktivovaných M ₁ receptory	28
1.4.2.3 Spřahování s G-proteiny a příklady signálních drah aktivovaných M ₂ receptory	29
1.4.2.4 Spřahování s G-proteiny a příklady signálních drah aktivovaných M ₃ receptory	30
1.4.2.5 Spřahování s G-proteiny a příklady signálních drah aktivovaných M ₄ receptory	30
1.4.2.6 Spřahování s G-proteiny a příklady signálních drah aktivovaných M ₅ receptory	30
1.4.3 Funkce muskarinových receptorů	31
1.4.3.1 Funkce M ₁ receptorů	31
1.4.3.2 Funkce M ₂ receptorů	32
1.4.3.3 Funkce M ₃ receptorů	33
1.4.3.4 Funkce M ₄ receptorů	34
1.4.3.5 Funkce M ₅ receptorů	35
1.5 Farmakologie muskarinových receptorů a lidská onemocnění centrálního nervového systému	37
1.5.1 Alzheimerova choroba	38
1.5.2 Schizofrenie.....	40
1.5.3 Parkinsonova choroba	42
2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	44
3 MATERIÁL A METODY	45
3.1 Buněčná kultura	45
3.2 Chemikálie.....	45
3.3 Přechodná transfekce	46
3.4 Stanovení koncentrace nitrobuněčného vápníku rychlou mikrofluorimetrií	46

3.5 Stanovení hustoty a vazebných vlastností muskarinových receptorů v membránách	48
3.6 Stanovení proteinů	50
3.7 Vyhodnocení výsledků	50
3.7.1 Mikrofluorimetrická měření	50
3.7.2 Vazebné pokusy.....	51
4 VÝSLEDKY	52
4.1 Okamžité a opožděné účinky krátkého působení xanomelinu na hladinu nitrobuněčného vápníku	52
4.2 Účinek blokády ortosterického vazebného místa muskarinových receptorů na hladinu vápenatých iontů zvýšenou působením xanomelinu	57
4.3 Vliv N-metylskopolaminu na vznik neodmyvatelné vazby xanomelinu	59
4.4 Vliv N-metylskopolaminu na tvorbu a účinky neodmyvatelné vazby xanomelinu na M ₅ receptoru	61
4.5 Vliv xanomelinu na počet membránových receptorů	62
4.6 Vliv dlouhodobého působení ortosterických agonistů karcholu, oxotremorinu a pilokarpinu na hladinu nitrobuněčného vápníku	65
5 DISKUSE	68
5.1 Rozdíly v okamžitých a dlouhodobých účincích xanomelinu na jednotlivé podtypy muskarinových receptorů	68
5.2 Vliv ortosterického antagonisty N-metylskopolaminu na tvorbu neodmyvatelné vazby xanomelinu a aktivovaný receptor neodmyvatelně navázaným xanomelinem	70
5.3 Kinetika tvorby neodmyvatelné vazby a vliv neodmyvatelné vazby xanomelinu na počet membránových receptorů	71
6 ZÁVĚR	73
7 SEZNAM PUBLIKACÍ	75
8 SEZNAM LITERATURY	76
9 PŘÍLOHY	96

SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
A β	β -amyloid
B _{MAX}	maximální vazba
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBC	karbachol
DB	diagonální Brocův pás
DMEM	médium dle Eagla v Dulbeccově modifikaci
EC ₅₀	koncentrace agonisty, při které má polovinu maximálního účinku
EL1–EL3	první až třetí extracelulární klička
E _{MAX}	maximální odpověď
GDP	guanosindifosfát
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny
GTP	guanosintrifosfát
Ch1–Ch6	cholinergní jádra v mozku
CHO	fibroblasty z vaječníků čínského křečka
IL1–IL3	první až třetí intracelulární klička
IQR	mezikvartilové rozpětí
K _D	rovnovážná disociační konstanta
K _G	afinita G-proteinu pro komplex agonista-receptor
KHB	Krebsův HEPES pufr
LDT	laterodorzální tegmentum
LTP	dlouhodobá potenciace
mAChR	muskarinové acetylcholinové receptory
M ₁ –M ₅	jednotlivé podtypy mAChR
MAP	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MS	mediální septum
nBM	bazální Meynertovo jádro
NMS	N-metylskopolamin
PBS	izotonický roztok NaCl s fosfátovým pufr
PD	Parkinsonova choroba
pEC ₅₀	záporný dekadický logaritmus EC ₅₀
PLC	fosfolipáza C
PPT	pedunkulopontinní jádro
S.E.M.	střední chyba průměru
TM	transmembránový
xano	xanomelin

ABSTRAKT

Muskarinové acetylcholinové receptory (mAChR) patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Existují v pěti podtypech označovaných jako M_1 až M_5 , které se v různém podtypovém zastoupení nacházejí jak v centrálním nervovém systému, tak na periférii. Muskarinové receptory hrají důležitou roli v mnoha specifických fyziologických funkcích. Narušení přenosu přes mAChR se vyskytuje u závažných onemocnění jako jsou Alzheimerova choroba, schizofrenie či Parkinsonova choroba. Provází je úpadek kognitivních funkcí, který významně souvisí s narušením aktivace M_1 receptorů v mozku. Vysoký stupeň homologie ortosterického vazebného místa mAChR velice ztěžuje vývoj podtypově selektivních agonistů. Jedním z mála známých je xanomelin, který účinně aktivuje zejména M_1 a M_4 podtypy. Xanomelin interaguje s mAChR unikátním způsobem, neboť je kromě reverzibilní vazby do ortosterického místa schopen se na receptor vázat neodmyvatelnou vazbou a alostericky ovlivňovat funkci receptoru. Zatím nevíme, co je podstatou funkční selektivity xanomelinu.

Ve snaze o objasnění těchto mechanismů jsme studovali okamžité a dlouhodobé účinky xanomelinu na aktivaci muskarinových receptorů. Použili jsme fibroblasty z vaječníků čínské křečka exprimující jednotlivé podtypy mAChR. Buňky obsahující M_2 a M_4 receptory jsme přechodně transfekovali α podjednotkou G-proteinu G_{16} , což nám umožnilo měřit změny hladiny nitrobuněčného vápníku jako ukazatel aktivace receptoru u všech podtypů mAChR. V saturačních vazebných pokusech jsme se soustředili na vliv xanomelinu na počet receptorů a jejich vazebné vlastnosti.

Zjistili jsme, že krátká (20s) stimulace 0,1–10 μ M xanomelinem vedla u všech podtypů mAChR k rychlému vzestupu hladiny nitrobuněčného vápníku s tím, že v případě M_1 a M_4 receptorů byl vzestup nejvýraznější a navíc zvýšená hladina vápníku po stimulaci těchto dvou podtypů neklesala na bazální úroveň. Po delší (1, 3 nebo 10minutové) stimulaci 10 μ M xanomelinem se hladina vápníku nevrátila na původní úroveň u M_1 , M_3 a M_4 receptorů ani po 1 hodině promývání. Zvýšená hladina vápníku byla v případě M_1 a M_4 receptorů doprovázena oscilacemi a následná stimulace klasickým agonistou karcholem nevyvolala žádnou odpověď u M_1 podtypů. Neodmyvatelně navázaný xanomelin měl v dlouhodobém měřítku antagonistické účinky u M_5 receptorů. Na rozdíl od klasických ortosterických agonistů nevedla 10minutová aplikace xanomelinu k internalizaci žádného z podtypů mAChR. Klasický antagonist N-metylskopolamin (NMS) potlačoval účinek neodmyvatelně vázaného xanomelinu u M_1 – M_4 receptorů. Odstranění NMS přineslo obnovení vápníkové odpovědi u M_1 a M_4 receptorů. Neodmyvatelně navázaný xanomelin různou měrou snižoval potenci vazby NMS u všech podtypů mAChR jak po 10-, tak i 60minutovém promývání médiem, což naznačuje kompetici o klasické vazebné místo.

Závěrem lze říci, že co se týče vlastností reverzibilní a neodmyvatelné vazby xanomelinu a jeho okamžitých účinků na receptor, chová se podobným způsobem na všech pěti podtypech mAChR. Naše výsledky však naznačují, že u M_1 a M_4 receptorů existuje odlišný aktivační mechanismus. Tuto představu podporuje jednak větší účinnost xanomelinu co do vyvolání vápníkové odpovědi u M_1 a M_4 než u ostatních podtypů, ale také schopnost xanomelinu vyvolat dlouhodobou vápníkovou odpověď s oscilacemi jen u M_1 a M_4 podtypů mAChR.

ABSTRACT

Muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) belong to the family of G-protein coupled receptors. There are five subtypes of mAChR denoted M₁ to M₅ that are widely and differentially distributed in both the central nervous system and periphery and play an important role in many specific physiological functions. Impairment of muscarinic neurotransmission occurs in serious disorders such as Alzheimer's disease, schizophrenia or Parkinson's disease that are accompanied by cognitive decline mainly due to the disruption of M₁ receptor signaling in the brain. Unfortunately, the high degree homology of the orthosteric binding site among muscarinic receptor subtypes makes it very difficult to obtain subtype-selective agonists. One of the few known selective agonists is xanomeline that preferentially activates the M₁ and M₄ subtypes. Xanomeline exerts unique interactions with muscarinic receptors comprising reversible binding to the orthosteric domain, and wash-resistant allosteric interaction with a secondary binding site.

The basis of xanomeline functional selectivity remains largely unknown. In an attempt to probe into such mechanisms we investigated the immediate and long-term effects of xanomeline on activation of muscarinic receptors, using intact Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing individual subtypes of mAChR. CHO cells expressing M₂ and M₄ receptors were transiently transfected with the promiscuous G α_{16} G-protein subunit to enable measuring changes in intracellular calcium level as an indicator of receptor activation at all subtypes of mAChR. In saturation binding experiments we assayed changes in receptor density and binding characteristics following xanomeline treatment.

We found that short (20s) stimulation with 0,1–10 μ M xanomeline resulted in a fast increase in intracellular calcium level at all mAChR subtypes that was most pronounced at M₁ and M₄ receptors. At these two subtypes increased calcium level did not return to its basal level value. After longer (1, 3, or 10min) stimulation with 10 μ M xanomeline calcium level did not return to its resting level even after 1h washing at M₁, M₃ and M₄ receptors. Increased calcium level at M₁ and M₄ receptors showed oscillations and subsequent stimulation with the classical agonist carbachol after 1h washing did not induce any additional response at the M₁ subtype. Wash-resistantly bound xanomeline behaved as a long-lasting antagonist at M₅ receptors. Unlike classical orthosteric agonists, 10 min xanomeline treatment did not induce receptor internalization at any receptor subtype. The classical antagonist N-methylscopolamine (NMS) inhibited the effects of wash-resistantly bound xanomeline at M₁–M₄ receptors. Withdrawal of NMS resulted in reappearance of calcium response at M₁ and M₄ receptors. Wash-resistantly bound xanomeline decreased the potency of NMS binding to a different extent at all receptor subtypes both after 10 and 60 min washing, which indicates competition for the orthosteric binding site.

In summary, xanomeline behaves in a similar manner at all mAChR subtypes regarding the characteristics of its reversible and wash-resistant binding and immediate effects. Nevertheless, our results indicate that distinct activation mechanisms exist at M₁ and M₄ receptors. This conclusion is foremost based on the higher efficacy of xanomeline to induce the primary fast calcium response at M₁ and M₄ than at other subtypes. The ability of xanomeline to induce fully developed oscillating calcium response in a long-term scale only at M₁ and M₄ receptors also supports this notion.

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Úvod

Chemická látka acetylcholin (ACh) se na poli fyziologie vyznačuje jedním primátem, neboť jde o neurotransmitter objevený jako první. Účastní se synaptického přenosu jak v periferním (PNS), tak i v centrálním (CNS) nervovém systému celé řady organismů včetně člověka. ACh je ester kyseliny octové a cholinu s chemickým vzorcem $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Systematický název zní 2-(acetyloxy)-N,N,N-trimethylethanaminium. Poprvé ho identifikoval Henry Hallett Dale v roce 1914 pro jeho účinky na srdeční sval. Funkce acetylcholinu coby neurotransmiteru byla prokázána Otto Loewim, který tuto látku nazval „Vagusstoff“, protože se uvolňovala ze zakončení nervu vagu neboli bloudivého nervu. Za odhalení acetylcholinu jako neuromediátoru a průkaz chemické neurotransmise obdrželi tyto dva autoři v roce 1936 Nobelovu cenu v oboru fyziologie a lékařství (Donnerer a Lembeck, 2006).

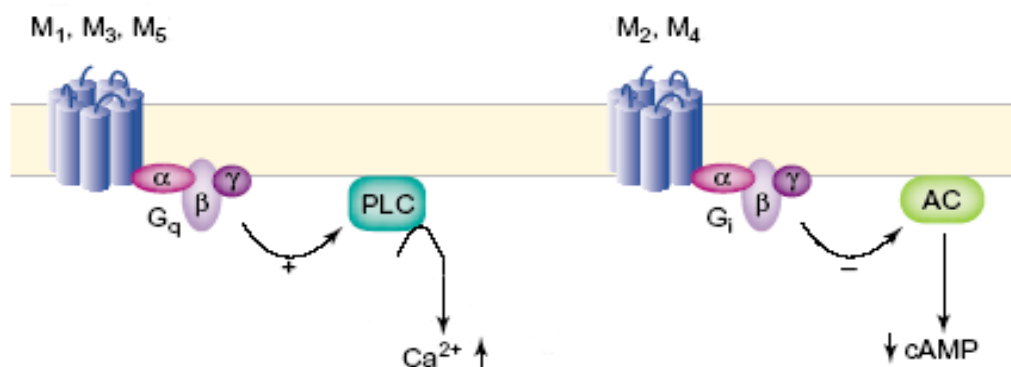
Acetylcholin vzniká v cytoplasmě cholinergních zakončení činností enzymu cholinacetyltransferázy (ChAT) z cholinu a acetylkoenzymu A (Tuček, 1983). Syntetizovaný acetylcholin je transportován do synaptických váček, ze kterých je uvolňován při depolarizaci zakončení do synaptické štěrbině. Acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza rozkládají uvolněný acetylcholin zpět na cholin a acetát. Tyto enzymy jsou odpovědné za rychlé „uklizení“ synaptické štěrbině po každém výlevu acetylcholinu (Chatonnet a Lockridge, 1989). Uvolnění acetylcholinu z presynaptického zakončení samo o sobě nestačí k dalšímu přenosu signálu. K tomu je zapotřebí receptorů – nikotinových nebo muskarinových – na postsynaptické membráně.

Letos je tomu tedy 100 let od chvíle, kdy odstartovala éra výzkumu cholinergního přenosu identifikací jeho mediátoru. Za tu dobu dosáhla světová věda četných pokroků v porozumění nejen fyziologickým funkcím acetylcholinu, ale i stavům, kdy je cholinergní přenos nějakým způsobem narušen. Tato dizertační práce je pouze střípkem v mozaice poznatků, které by mohly přispět k uplatnění selektivních agonistů muskarinových receptorů coby léčiv.

1.2 Klasifikace a struktura muskarinových receptorů

1.2.1 Podtypy muskarinových receptorů

Muskarinové acetylcholinové receptory patří do rozsáhlé rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR; G-protein coupled receptors). Konkrétně se řadí do její nejpočetnější třídy A, kterou tvoří GPCR odvozené od rhodopsinu. Po počátečních farmakologických studiích, které naznačovaly existenci tří podtypů mAChR, bylo na konci 80. let minulého století díky technikám molekulární biologie identifikováno všech pět podtypů muskarinových receptorů nesoucích označení M_1 až M_5 . Z funkčního hlediska rozlišujeme dvě skupiny muskarinových receptorů (Obr. 1.1). Podtypy M_1 , M_3 a M_5 neboli tzv. liché podtypy přenášejí signál do buňky preferenčně přes G-proteiny třídy $G_{q/11}$, zatímco podtypy M_2 a M_4 (sudé podtypy) se spřahují hlavně s $G_{i/o}$ G-proteiny (Bonner et al., 1987; Caulfield, 1993; Caulfield a Birdsall, 1998).



Obrázek 1.1: Schématické znázornění dvou skupin muskarinových receptorů, preferenčních typů G-proteinů a typických signálních drah.

Zástupci lichých podtypů jsou na obrázku vlevo, zástupci sudých vpravo. PLC je fosfolipáza C, AC je adenylátcykláza. O signálních drahách aktivovaných muskarinovými receptory bude podrobněji pojednáno dále.

1.2.2 Struktura muskarinových receptorů

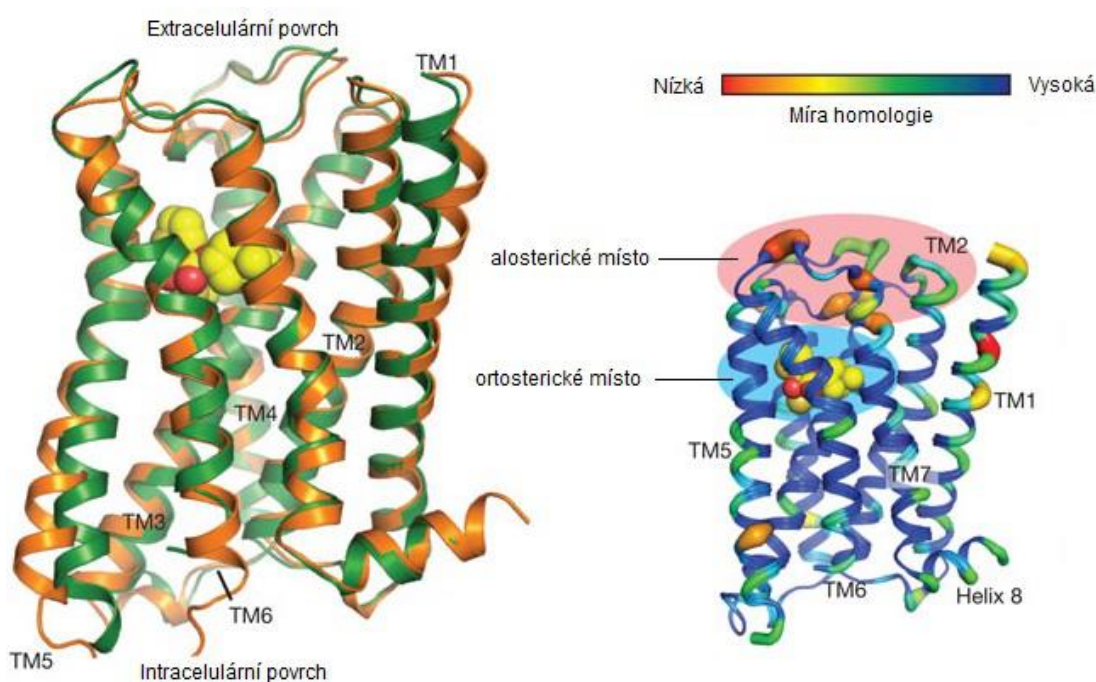
Jako zástupci GPCR se muskarinové receptory vyznačují charakteristickými strukturními motivy, mezi něž patří extracelulární N-koncová oblast, intracelulární C-koncová oblast a 7 transmembránových (TM) α -helikálních domén propojených 3 extracelulárními (EL) a 3 intracelulárními (IL) kličkami.

TM segmenty jsou oblastmi s nejvyšší mírou homologie nejen mezi jednotlivými podtypy mAChR, ale i v rámci celé velké rodiny receptorů spřažených

s G-proteiny. Porovnáme-li aminokyselinové sekvence jednotlivých podtypů mAChR, uvidíme, že rozdíly v délkách pramení z odlišností v extracelulárním N-konci, cytoplazmickém C-konci a třetí intracelulární kličce. Zbývající části proteinu – tedy transmembránové α -helixy, všechny tři extracelulární kličky a první dvě intracelulární kličky jsou u všech podtypů mAChR stejně dlouhé. Existuje 63% shoda mezi podtypy muskarinových receptorů v aminokyselinovém složení sedmi transmembránových úseků lidských mAChR a ukázalo se, že většina odlišností v těchto úsecích pramení z konzervativních záměn aminokyselin. Zcela jiná situace panuje v oblasti třetí intracelulární kličky. Ta zahrnuje 34–45 % všech aminokyselin v proteinu a mezi jednotlivými podtypy vykazuje značné délkové variace. Porovnáním sekvencí vychází najevo, že liché a sudé podtypy mAChR vykazují vzájemné strukturní odlišnosti, které způsobují odlišné spřáhování s G-proteiny (Karczmar et al., 2007).

Celkové trojrozměrné uspořádání všech podtypů mAChR není zatím známo, protože rozluštění krystalickou strukturou kteréhokoli GPCR je nesmírně obtížný úkol. Průlom znamenalo objasnění trojrozměrné struktury hovězího rhodopsinu (Palczewski et al., 2000). Následovaly mnohé další receptory a z muskarinových receptorů se to zatím podařilo u jednoho sudého (M_2 ; Haga et al., 2012) a jednoho lichého (M_3 ; Kruse et al., 2012) podtypu. Obě posledně jmenované výzkumné skupiny využily faktu, že třetí intracelulární klička je velmi dlouhá a nahradily ji lysozymem z bakteriofága T4, který usnadňuje tvorbu krystalu. Tato náhrada neovlivňuje vazbu agonistů ani antagonistů na receptor. Struktura inaktivního M_2 receptoru (Obr. 1.2) je podobná jiným GPCR v inaktivní konformaci, hlavně co se týče TM domén. Naproti tomu se M_2 receptor odlišuje od ostatních GPCR dlouhým vodním kanálem, který je „protkán“ sítí vodíkových vazeb a kromě vazebného místa pro acetylcholin obsahuje tři hydrofobní aminokyselinové zbytky (Leu v pozici 65, Leu v pozici 114 a Ile v pozici 392), které ho přehrazují. Tyto tři aminokyseliny jsou na svých místech evolučně konzervované u všech pěti podtypů mAChR (Haga et al., 2012). Struktura inaktivního M_3 receptoru se v mnohém podobá struktuře inaktivního M_2 receptoru. Kupříkladu se zde vyskytuje ohyb směrem ven v TM4 segmentu, který se zdá být unikátním pro mAChR, neboť se u jiných GPCR nevyskytuje. Rozdíly mezi strukturami M_2 a M_3 receptorů se však dají nalézt. Jedním z nich je přítomnost fenylalaninu v EL2 (na jeho místě je u M_2 podtypu leucin), která s sebou nese dodatečný prostor ve vazebné kapse receptoru. Dále se zmíněné podtypy liší např. postavením segmentů TM7 či TM5. Rozdíly v uložení TM5 segmentu, který interaguje s určitými aminokyselinovými

zbytky na cytoplazmatickém konci segmentu TM6, stojí pravděpodobně za odlišným preferenčním spřahováním receptorů s G-proteiny, jak již bylo zmíněno v předchozím odstavci. To se týká nejen muskarinových receptorů, ale zřejmě i jiných GPCR, protože vzdálenost mezi segmenty TM5 a TM6 u M_2 receptoru je větší než u M_3 a je podobná odpovídající vzdálenosti u jiných GPCR spřahujících se s G_i G-proteiny. To samé lze říci o M_3 receptoru a jiných GPCR přenášejících signál do buňky hlavně přes G_q G-proteiny (Kruse et al., 2012).



Obrázek 1.2: Celková struktura M_2/M_3 receptoru a grafické znázornění strukturní homologie M_3 receptoru a ostatních muskarinových receptorů

Levá část obrázku ukazuje trojrozměrnou strukturu M_2 a M_3 receptoru zároveň – M_2 receptor je zakreslen oranžově a M_3 receptor zeleně. Je zde dobře patrné, jak si jsou zástupce lichých a sudých podtypů mAChR podobné. Barevné kuličky představují antagonistu navázaného do ortosterického místa. Pravá část obrázku ukazuje strukturu M_3 receptoru s barevným zdůrazněním sekvenčně zakonzervovaných úseků mezi muskarinovými receptory (tmavě modrá barva). Málo zakonzervované úseky mají na schématu větší průměr. Ortosterické a alosterické místo jsou označeny světle modrým, resp. růžovým oválem a kuličky uprostřed jsou stejný antagonist jako vlevo. Převzato z Kruse et al., 2012 a upraveno.

1.2.2.1 Ortosterické vazebné místo

Již dlouho se ví, že klasičtí (ortosteričtí) agonisté muskarinových receptorů musí nést pozitivní náboj, aby se mohli na receptor navázat a aktivovat jej (Burgen, 1965). Z toho vyplývá potřeba komplementárního záporného náboje ve vazebném místě receptoru (Ehlert a Delen, 1990). Nositelem tohoto klíčového záporného náboje je karboxylová skupina na vysoce konzervovaném aspartátu (v pozici 105 v případě

lidského M₁ mAChR) ve třetím TM úseku (Curtis et al., 1989). Záměna Asp v pozici 105 za Asn v M₁ receptoru znemožní vazbu agonisty a jeho aktivaci (Fraser et al., 1989).

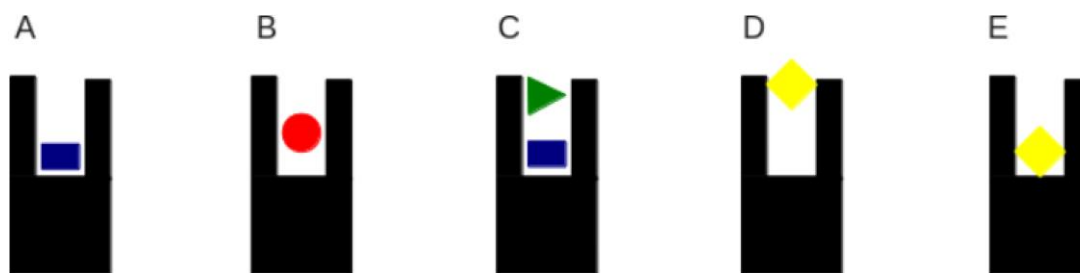
Ortosterické vazebné místo mAChR leží hluboko v kapsovitě prohlubni, jejíž stěny tvoří transmembránové úseky proteinové struktury receptoru. Agonisté se váží na receptor z extracelulární strany. Na vazbě acetylcholinu se podílejí vnitřní strany TM4 a TM7 obsahující aromatické aminokyseliny. Ty společně s TM3 a TM6 zformují jakousi „klec“ okolo pozitivně nabitého ACh. To pravděpodobně vede k pootočení a posunu TM3, TM6 a TM7 a aktivaci receptoru. Důležitou dvojroli při změně stavu z inaktivního na aktivní má zřejmě silně konzervovaný aminokyselinový motiv NSXXNPXXY v transmembránovém segmentu 7. Tyto aminokyseliny nejspíš prostřednictvím intramolekulárních kontaktů stabilizují receptor v inaktivní formě. Po navázání agonisty dochází k narušení těchto interakcí a vytvoření nových, které jsou klíčové pro udržení receptoru v aktivovaném stavu a také pro vazbu G-proteinu (Hulme et al., 2003; Lu et al., 2001). Vzhledem k faktu, že transmembránové úseky jsou v rámci mAChR nejvíce evolučně konzervované, neexistuje v současné době prakticky žádný selektivní ortosterický agonista mAChR.

Také druhá extracelulární klička se podílí na vazbě agonistů v tom smyslu, že vytváří kryt vazebné kapsy. Ukázalo se, že změna sekvence aminokyselin v této části M₂ receptoru výrazně brání acetylcholinu ve vazbě na receptor (Avlani et al., 2007). Další úloha extracelulárních oblastí receptoru spočívá například v tom, že tvoří místo prvotního kontaktu agonisty s receptorem. U M₁ receptoru bylo prokázáno, že ortosterické vazebné místo M₁ receptoru má dvě za sebou uspořádané části – jednu okrajovou a jednu centrální. Agonista se nejprve váže do okrajové části a následně se přesouvá do centrální části, na kterou se váže s vyšší afinitou než na okrajovou část (Jakubík et al., 2000).

1.2.2.2 Alosterická vazebná místa, alosteričtí a atypičtí agonisté muskarinových receptorů

Všechny podtypy mAChR disponují kromě ortosterického vazebného místa pro acetylcholin ještě alosterickými vazebnými místy pro alosterické ligandy. Vzhledem k tomu, že tato místa jsou strukturně daleko variabilnější než místo ortosterické, představují nadějný cíl budoucích léčiv, zejména z hlediska zajištění tolik potřebné selektivity. Alosterické ligandy mohou modulovat funkci receptorů různými

mechanismy. Současná vazba ortosterického a alosterického ligandu se projevuje vzájemným ovlivněním afinit receptoru pro oba ligandy. Vazba alosterického ligandu může afinitu pro ortosterický ligand zvyšovat (pozitivní kooperativita), snižovat (negativní kooperativita) nebo neovlivňovat (neutrální kooperativita). Alosteričtí agonisté se vážou do alosterického místa a přímo aktivují receptor. Pozitivní alosterické modulátory se také vážou do alosterického místa, ale samy o sobě nemají žádný účinek. Dokáží však zvyšovat afinitu a/nebo účinnost endogenních agonistů. Přesně opačný účinek mají negativní alosterické modulátory. Některé alosterické modulátory mohou receptor přímo aktivovat i bez přítomnosti agonisty (Jakubík et al., 1996). Pro muskarinové receptory je charakteristické, že aktivace alosterickými agonisty je funkčně téměř nerozlišitelná od aktivace klasickým agonistou karcholem, tedy tím, který se váže do ortosterického vazebného místa. Platí to jak pro liché, tak pro sudé podtypy. Kromě toho existuje ještě speciální kategorie tzv. bitopických ligandů, které jsou schopné interagovat s dvěma různými vazebnými místy jednoho receptoru, např. s alosterickým i ortosterickým vazebným místem. Ektopické ligandy se chovají jako alosterické, ale jejich vazba na receptor brání vazbě ortosterických ligandů, ačkoli se do ortosterického místa neváží. Příklady různých ligandů jsou uvedeny v Tabulce 1.1 a Obrázek 1.2 schématicky znázorňuje mechanismy jejich obecného působení na receptor.



Obrázek 1.2: Různé mechanismy vazby klasických, alosterických, ektopických a bitopických ligandů muskarinových receptorů

- A:** Ortosterický ligand (modrý obdélník) se váže do ortosterického místa receptoru.
- B:** Ektopický ligand (červené kolečko) se váže do ektopického místa, které je odlišné od ortosterického místa, ale brání vazbě ortosterických ligandů.
- C:** Alosterický ligand (zelený trojúhelník) se váže do alosterického místa současně s ortosterickým ligandem.
- D, E:** Bitopický ligand (žlutý kosočtverec) se může vázat jak do alosterického (D), tak i ortosterického místa (E). Převzato z Jakubík et al., 2014.

Na M_1 podtypu mAChR, jehož selektivní stimulaci se díky jejímu terapeutickému potenciálu věnuje celá řada výzkumných týmů, byla nalezena a charakterizována dvě alosterická místa. Jako první bylo nalezeno extracelulární alosterické vazebné místo, které je tvořeno částmi druhé a třetí extracelulární kličky a přiléhajících TM segmentů 5, 6 a 7 (Ellis, 1997). Lokalizace tohoto vazebného místa v rámci receptoru je u všech podtypů mAChR totožná, proto se někdy označuje jako „společné“ (Wess, 2005). V jeho bezprostředním okolí se nachází mnohé nezakonzervované zbytky aminokyselin, které stojí za selektivitou alosterických agonistů nejen k M_1 , ale i dalším podtypům mAChR. U tohoto „společného“ alosterického místa jsou v případě M_1 receptoru pro vazbu ligandu podstatně záporně nabitě zbytky aminokyselin Ser, Asp a Glu ve třetí extracelulární kličce a dále dva zbytky Trp v transmembránové oblasti (Gnagey et al., 1999).

Kromě „společného“ alosterického místa se na muskarinových receptorech nalézá ještě další alosterické místo (Lazareno et al., 2000). Předpokládá se, že v případě M_1 receptoru je lokalizováno na intracelulárním povrchu receptoru blízko oblasti, kde dochází ke spřáhování s G-proteiny. Tvoří ho aminokyselinové zbytky uvnitř TM helixů 2, 3 a 7 a třetí intracelulární kličky (Espinoza-Fonseca a Trujillo-Ferrara, 2006).

M_1 receptory se navíc vyznačují ektopickým aktivačním místem, které se u ostatních mAChR nevyskytuje. Na jeho fungování se podílí N-konec receptoru a svrchní část TM1 ve spolupráci s EL3 a svrchní částí TM7. Míra variability zbytků aminokyselin v oblasti N-konce a TM1 je u muskarinových receptorů poměrně vysoká, což může vysvětlovat jedinečné vlastnosti tohoto místa (Spalding et al., 2002).

Tabulka 1.1: Příklady ortosterických, alosterických a atypických ligandů muskarinových receptorů

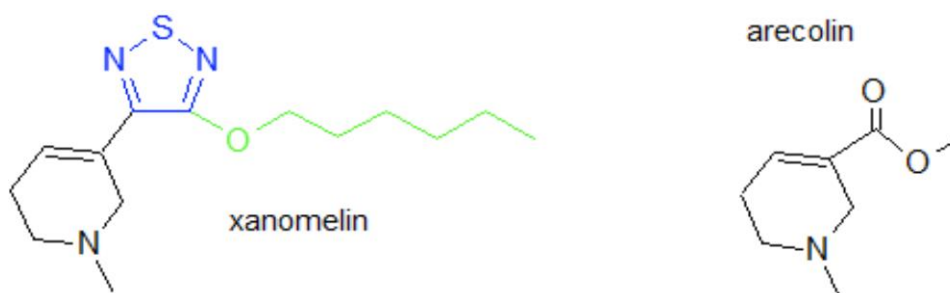
Ortosterické ligandy			
<i>Agonisté</i>			
<i>název</i>	<i>afinita (μM)</i>	<i>účinnost</i>	<i>selektivita (podle vazby)</i>
acetylcholin	M ₁ -M ₄ : 29-48	plný	ne
karbachol	M ₁ -M ₄ : 35-65	plný	ne
oxotremorin	M ₁ -M ₄ : 3-9	částečný	ne
pilokarpin	M ₁ -M ₄ : 6-12	částečný	ne
<i>Antagonisté</i>			
<i>název</i>	<i>afinita (nM)</i>	<i>účinnost</i>	<i>selektivita (podle vazby)</i>
N-metylskopolamin	M ₁ -M ₄ : 0,11-0,15		ne
quinuklidinylbenzilát	M ₁ -M ₄ : 0,02-0,06		ne
pirenzepin	M ₁ a M ₄ : 17		M ₁ =M ₄ >M ₃ >M ₂ =M ₅
MT7 (mamba toxin)	M ₁ : 0,16		M ₁
Alosterické ligandy			
<i>název</i>	<i>afinita (μM)</i>	<i>selektivita (podle vazby)</i>	<i>kooperativita (+/-) s ACh</i>
alcuronium	0,7-9,8	M ₂ =M ₃ =M ₄ >M ₁	+ M ₁ , M ₂ , M ₃ , M ₄
brucin	1-104	M ₄ >M ₁ >M ₂ >M ₃	+ M ₂ , - M ₁ a M ₄
thiochrom	36-120	M ₁ =M ₂ =M ₃ =M ₄	+ M ₄
Ektopické ligandy			
<i>název</i>	<i>účinek</i>	<i>afinita (μM)</i>	<i>selektivita (podle vazby)</i>
AC-42	agonista	M ₁ : 0,72	M ₁
N-desmetylklozapin	agonista	M ₁ : 0,04	M ₁
Bitopické ligandy			
<i>název</i>	<i>účinek</i>	<i>selektivita (podle vazby)</i>	<i>selektivita (funkční)</i>
77-LH-28-1	agonista	M ₁ >>M ₃	M ₁
xanomelin	ortosterický agonista	Ne	M ₁ , M ₄
	alosterický modulátor	ne	různé opožděné účinky

Shrnutí dle: Alexander et al., 2011; Caulfield a Birdsall, 1998; Jakubík et al., 1997; Lazareno et al., 2004; Lebon et al., 2009.

1.3 Xanomelin – prototyp funkčně selektivního agonisty M₁/M₄ receptorů

Xanomelin, systematickým názvem 3-(3-hexyloxy-1,2,5-thiadiazol-4-yl)-1,2,5,6-tetrahydro-1-methylpyridin, byl syntetizován a následně podroben farmakologickým testům zjišťujícím jeho afinitu k muskarinovým receptorům na začátku 90. let minulého století (Sauerberg et al., 1992). Již v prvních *in vitro* pokusech se ukázalo, že xanomelin vykazuje funkční selektivitu pro M₁ (ale také pro M₄) podtypy muskarinových receptorů, což byl slibný předpoklad pro budoucí využití xanomelinu k léčbě Alzheimerovy nemoci (Bymaster et al., 1994; Shannon et al., 1994).

Xanomelin má jedinečné vlastnosti týkající se jeho vazby na receptor. Přestože se váže na všechny podtypy mAChR, na rozdíl od většiny známých ortosterických agonistů se vyznačuje funkční selektivitou hlavně pro M₁ podtypy (Bymaster et al., 1994; Shannon et al., 1994). Funkční selektivita vychází z chemické struktury xanomelinu, která je odvozena od rostlinného alkaloidu arecolinu (Obr. 1.3). Xanomelin a arecolin se odlišují alifatickým řetězcem na třetím atomu uhlíku pyridinového cyklu a v případě xanomelinu se jako nejlepší co do zajištění selektivity pro M₁ mAChR ukázal být 1,2,5-thiadiazol. Nezastupitelnou roli hraje též nerozvětvený čtyř- až sedmiuhlíkatý řetězec v pozici tři v thiadiazolovém cyklu, který přináší xanomelinu nejvyšší afinitu a účinnost aktivace M₁ podtypů ze zkoušených arecolinových derivátů a minimální pro M₂ a M₃ mAChR (Sauerberg et al., 1992).



Obrázek 1.3: Struktura xanomelinu a arecolinu

Xanomelin (vlevo) se od arecolinu liší přítomností 1,2,5-thiadiazolu na atomu uhlíku v pozici tři pyridinového cyklu (modře). Nezastupitelnou roli co do selektivity pro M₁ receptory a také v tvorbě neodmyvatelné vazby hraje zeleně znázorněný čtyř- až sedmiuhlíkatý řetězec v pozici tři v thiadiazolovém cyklu.

Pokusy provedené během posledních 15 let přinesly zjištění, že xanomelin se váže na M₁ receptor velmi zvláštním způsobem. Existují totiž dva zcela rozdílné mechanismy jeho vazby. Prvním z nich je okamžitá vratná vazba do ortosterického vazebného místa. Druhým typem je neodmyvatelná vazba, která se ale netvoří v ortosterickém vazebném místě, ale v jiné oblasti receptoru, a umožňuje xanomelinu

dlouhodobě aktivovat M₁ mAChR (Christopoulos et al., 1998, Jakubík et al., 2002; 2008). Neodmyvatelná vazba na receptoru vzniká velmi rychle s řádově mikromolární afinitou a trvá velice dlouhou dobu – poločas rozpadu je delší než 30 hodin (Jakubík et al., 2002).

Ve funkčních pokusech aktivuje xanomelin hlavně M₁ muskarinové receptory. V pokusech měřících aktivaci hydrolýzy membránových fosfoinositidů (Christopoulos et al., 1998) a aktivaci neuronální NO syntázy (Christopoulos et al., 1998; Christopoulos a El-Fakahany, 1997) disponuje xanomelin při vazbě na M₁ receptory srovnatelnou účinností jako plný agonista mAChR karbachol. Vazba xanomelinu na M₁ podtypy mAChR má za následek lepší spřáhování receptorů s preferenčními G-proteiny než vazba karbacholu a neodmyvatelně navázaný xanomelin na M₁ receptoru rovněž vylepšuje aktivaci preferenčních G-proteinů (Jakubík et al. 2006). Je až zarážející, že se xanomelin navzdory své M₁ funkční selektivitě váže ke všem pěti podtypům mAChR se srovnatelnou afinitou (Jakubík et al., 2008; Watson et al., 1998; Wood et al., 1999). Molekulární mechanismus stojící za tímto fenoménem nebyl do dnešní doby odhalen.

Už jednodominutové vystavení M₁ receptorů xanomelinu má na receptor dlouhodobé účinky, které jsou dobře patrné i po 24 hodinách inkubace buněk v médiu. Během této doby se z jednofázové vazebné křivky neodmyvatelně vázaného xanomelinu stane křivka dvoufázová, na které se objevuje vysokoafinní složka vazby. V této fázi se afinita xanomelinu jeví skoro třikrát vyšší, než když je xanomelin přidán přímo do média ke kontrolním buňkám (De Lorme et al., 2007; Grant et al., 2010). Dvoufázový charakter vazebné křivky objevující se po dlouhodobém působení xanomelinu na receptor naznačuje, že nízké a vysoké koncentrace xanomelinu mají za následek různé formy regulace receptoru. Přinejmenším v případě nízkých koncentrací xanomelinu se zdá být převládajícím mechanismem down-regulace receptoru (Grant et al., 2010).

Neodmyvatelná vazba se vyznačuje i dalšími zajímavými a poměrně neobvyklými vlastnostmi. Vystavíme-li receptory nejprve xanomelinu (tím vznikne neodmyvatelná vazba) a po promytí přidáme atropin (kompetitivního antagonistu muskarinových receptorů), je trvalá aktivace receptoru xanomelinem výrazně inhibována. Po odstranění atropinu z média se však aktivace obnoví (Christopoulos, 2001). Na druhou stranu, provedeme-li nejprve preinkubaci receptorů s atropinem a poté přidáme xanomelin, atropin navázaný do ortosterického vazebného místa jen slabě brání vytvoření neodmyvatelné vazby. Toto pozorování podporuje představu, že

se xanomelin váže jinam než do ortosterického místa receptoru. Je zajímavé zmínit, že funkční receptor (tj. receptor schopný aktivace) není nezbytný k tomu, aby se vytvořila neodmyvatelná vazba. Avšak možnost aktivace receptoru je zásadním předpokladem k tomu, aby byl xanomelin schopen dlouhodobě ovlivňovat funkci receptoru (Grant et al., 2010). Kromě toho neodmyvatelně navázaný xanomelin rovněž zpomaluje asociaci receptoru s kompetitivním antagonistou NMS a výrazně urychluje jeho disociaci. Je tedy velmi pravděpodobné, že xanomelin vážící se do svého specifického místa na receptoru (jiného než ortosterického) alostericky moduluje vazbu ligandů do ortosterického místa. Funkci xanomelinu coby alosterického modulatoru naznačuje i vliv jeho neodmyvatelné vazby na down-regulaci receptorů (Grant et al., 2010; Jakubík et al., 2002).

Neodmyvatelná vazba je úzce spjata s délkou postranního alifatického řetězce v molekule xanomelinu. Pokud není alespoň čtyřuhlíkatý, neodmyvatelná vazba nevzniká. Pro vznik neodmyvatelné vazby je také rozhodující prostředí, ve kterém se receptor nachází – nezbytným předpokladem k jejímu vytvoření jsou membránové lipidy obklopující receptor, do nichž se zasouvá postranní alifatický řetězec molekuly xanomelinu. Na purifikovaných receptorech není možné tento fenomén pozorovat. Znovu se však vyskytne, pokud jsou purifikované receptory inkorporovány do umělé membrány (Jakubík et al., 2004).

Neodmyvatelná vazba však nemůže vysvětlit funkční selektivitu xanomelinu, protože bylo prokázáno, že vzniká i na dalších podtypech mAChR (Grant a El-Fakahany, 2005; Jakubík et al., 2006; 2008; Machová et al., 2007; Noetzel et al., 2009). Na M_2 receptorech se neodmyvatelná vazba tvoří oproti M_1 receptorům výrazně pomaleji (Jakubík et al., 2006). Téměř všechny pokusy popsané výše byly provedeny na mAChR exprimovaných v membránách fibroblastů pocházejících z vaječníků čínského křečka. Bylo ovšem ověřeno, že neodmyvatelná vazba vzniká i na M_2 a M_4 receptorech přirozeně se vyskytujících v tkáních, to znamená v jejich přirozeném prostředí. Akutní aplikace xanomelinu nijak neovlivňuje elektrickou stimulací vyvolaný výlev ACh z mozkové kůry ani ze striata potkana (to je v souladu s funkční selektivitou xanomelinu pro M_1 receptory). Na druhou stranu krátká preinkubace tkáně s xanomelinem následovaná promýváním vyvolává trvalou inhibici výlevu acetylcholinu prostřednictvím dlouhodobé aktivace M_2 a M_4 receptorů (Machová et al., 2007). I na M_3 receptory je xanomelin schopen se vázat neodmyvatelně, a to s velmi podobnými parametry jako na M_1 receptor. Stejně jako na M_1 podtypu můžeme i na

M₃ podtypu pozorovat velmi rychlou tvorbu neodmyvatelné vazby. Rovněž zde můžeme po krátké (minutové) expozici xanomelinu a velice dlouhém promývání sledovat vznik dvoufázové křivky. I zde se má za to, že v důsledku dlouhotrvajícího působení neodmyvatelné vazby může docházet k desenzitizaci a také internalizaci receptorů (Noetzel et al, 2009). Xanomelin je schopen se vázat neodmyvatelnou vazbou i na poslední typ muskarinových receptorů, tedy M₅. Zde jsou však důsledky působení neodmyvatelné vazby zásadně odlišné, než je tomu např. na M₁ podtypu mAChR – na rozdíl od trvale agonistického účinku na M₁ mAChR působí neodmyvatelně vázaný xanomelin na M₅ podtyp jako trvalý antagonist (Grant a El-Fakahany, 2005).

Z výše uvedeného je poměrně jasně vidět, že se xanomelin vyznačuje širokým spektrem účinků, často i protichůdných v tom smyslu, že na některém z podtypů mAChR (např. M₁) vyvolává trvale agonistické účinky, zatímco na jiném podtypu – v tomto případě M₅ – se po počátečním agonistickém účinku chová jako trvalý antagonist. Jak již bylo předznamenáno, pro posílení kognitivních funkcí se užití xanomelinu jeví jako takřka ideální. V procesech učení a paměti hrají velmi významnou úlohu M₁ muskarinové receptory, na které se xanomelin váže velmi rychle, rychle je i aktivuje a je k nim do značné míry funkčně selektivní. Pokusy na zvířatech přinesly nadějně výsledky, protože xanomelin u myši a potkanů efektivně stimuluje hydrolýzu fosfoinositidů v mozkové kůře, neostriatu a obzvláště v hipokampu, kde jsou hojně zastoupeny M₁ receptory (Bymaster et al., 1998). Kromě možnosti využívat xanomelin v budoucnu k terapii onemocnění postihujících kognitivní funkce se též xanomelin zdá být slibný, co se týče léčby různých forem psychotických poruch. Tento předpoklad vychází z poznatku, že agonisté muskarinových receptorů mají podobné účinky jako atypická antipsychotika (Bymaster et al., 1999; Shannon et al., 1999). Ukázalo se, že xanomelin u myši účinně tlumí amfetaminem vyvolanou hyperaktivitu a zmírňuje tendenci zvířat zaujímat vertikální pozici (tzv. šplhací chování) v důsledku podání apomorfínu. U myši s vyřazenými M₄ receptory se tyto účinky neprojevují (Dencker et al., 2011; Woolley et al., 2009). Antipsychotické účinky xanomelinu byly zaznamenány i u potkanů, kde xanomelin odvrací apomorfinem vyvolané deficity v prepulzní inhibici úlekové reakce a z podání amfetaminu pramenící hyperlokomoci. Svým spektrem účinků se xanomelin velice podobá atypickému antipsychotiku klozapinu, jehož hlavní metabolit N-desmetylklozapin se chová jako alosterický agonista M₁ receptorů (Burstein et al., 2005; Davies et al., 2005; Weiner et al., 2004). Rovněž bylo pozorováno okamžité zvýšení exprese raných genů po aplikaci xanomelinu těmto

zvířatům (Perry et al., 2001; Shannon et al., 2000; Stanhope et al., 2001). Xanomelin rovněž potlačuje amfetaminem a apomorfinem vyvolané psychotické chování u opic malp hnědých, u kterých se ale na rozdíl od hlodavců vyskytují negativní vedlejší účinky po podání větších dávek xanomelinu (Andersen et al., 2003). Kromě výše uvedeného působí xanomelin analgeticky u myších a potkaních modelů chronické zánětlivé a neuropatické bolesti, kde účinně odvrací taktilní alodynii a tepelnou hyperalgezi. Zdá se, že za těmito účinky stojí hlavně M_1 a v menší míře též M_4 receptory (Martino et al., 2011). V neposlední řadě akutní i chronické podávání xanomelinu potkanům zvyklým na kokain zmírňuje posilující účinky kokainu, což se projeví tak, že zvíře místo dávky kokainu dá přednost normální potravě (Thomsen et al., 2013).

Klinické studie však přinesly značné zklamání z hlediska budoucího využití xanomelinu z důvodu jeho vedlejších účinků. U některých osob sice xanomelin přivodil zlepšení kognitivních funkcí, jeho celkový efekt byl ale dost rozporuplný, protože si lidé stěžovali na velké množství negativních vedlejších periferních účinků, které u zvířat s výjimkou opic nebyly pozorovány. U nezanedbatelného procenta pokusných osob se vyskytla nevolnost, zvracení či nadměrná produkce slin. Velká skupina lidí poukazovala též na zvýšené pocení, u některých lidí docházelo ke krátkodobé ztrátě vědomí (Bodick et al., 1997a, b; Bymaster et al., 1997). Konečným důsledkem bylo, že klinické zkoušky xanomelinu byly v pokročilé fázi zastaveny.

I přes tento neúspěch by xanomelin mohl být nemocným AD ku prospěchu. Výsledky získané při jeho experimentální a (neúspěšné) klinické charakterizaci ukázaly, že tento poměrně selektivní agonista M_1 receptoru pozitivně ovlivňuje množství negativních jevů s nemocí spojených, mezi něž patří mimo jiné tvorba β -amyloidových plaků. Xanomelin je totiž *in vitro* schopen zvyšovat sekreci solubilní α formy proteinu prekurzoru amyloidu, který vzniká štěpením uvnitř β -amyloidové sekvence (Eckols et al., 1995). Podobně u buněk transfekovaných lidskou mutovanou formou genu pro protein prekurzor amyloidu (jedná se o tzv. švédskou mutaci typickou pro jednu z familiálních forem AD) byla po stimulaci xanomelinem pozorována snížená sekrece $A\beta$ (DeLapp et al., 1998). Alzheimerova choroba ovšem nemocnému zdaleka nepřináší jenom zhoršení kognitivních funkcí. Je spojena rovněž s mnoha problémy neuropsychiatrického charakteru komplikujícími život nejen postiženému člověku, ale i jeho okolí (Levy et al., 1999). Proto by se mohlo jevit jako nadějně, že xanomelin dokáže u lidí tyto projevy nemoci tlumit. Po podání xanomelinu se u lidí nemocných

AD snížil výskyt náhlých hlasitých výkřiků, nemocní byli méně podezřívaví vůči svému okolí, poklesl výskyt halucinací a přeludů, nedocházelo tak často k prudkým změnám nálady, méně často se objevovalo nutkavé jednání a méně bloudili na známých místech (Bymaster et al., 1997). Podobně jako u lidí postižených AD by xanomelin mohl být prospěšný i pro osoby trpící schizofrenií. Naznačují to nejen výsledky četných pokusů s potkaními modely psychotického chování uvedené výše, ale i výsledky klinické studie, kde ve srovnání se skupinou dostávající placebo dosahovali pacienti se schizofrenií po podání xanomelinu statisticky významně lepších výsledků na škále pozitivních a negativních příznaků schizofrenie, krátké psychiatrické hodnotící škále i škále pozitivního klinického dojmu. Ovšem stejně jako u pacientů s Alzheimerovou chorobou i zde se vyskytovaly nežádoucí vedlejší účinky, především spojené s trávicí soustavou (Shekhar et al., 2008).

Na příkladu xanomelinu je vidět, že ač v pokusech *in vitro* vykazuje funkční selektivitu k určitému podtypu mAChR, podání lidskému organismu má za následek četné negativní vedlejší účinky, které vznikají v důsledku interakce xanomelinu i s dalšími podtypy muskarinových receptorů. Na druhou stranu to ale nemusí být tak překvapivý jev vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že xanomelin je schopen vázat se na všechny podtypy mAChR neodmyvatelnou vazbou a většinu z nich i dlouhodobě aktivovat. Pro základní výzkum xanomelin představuje prototyp látky, která může sloužit jako nástroj pro studium mechanismů, které se uplatňují při selektivní aktivaci muskarinových receptorů. Navíc jeho komplexní a unikátní vlastnosti naznačují, že xanomelin na poli výzkumu selektivních ligandů muskarinových receptorů ještě neřekl poslední slovo.

1.4 Lokalizace, signalizace a funkce muskarinových receptorů

1.4.1 Lokalizace muskarinových receptorů

Acetylcholin je velice významným neurotransmiterem v celém mozku a tamtéž hrají podstatnou roli i muskarinové receptory. ACh zároveň také představuje neuropřenašeč s velice širokou působností v periferním nervovém systému, a to v obou jeho součástech – somatickém i viscerálním nervovém systému. Acetylcholin je výhradním neurotransmiterem na nervosvalové ploténce a také pregangliovým neuropřenašečem sympatiku a parasympatiku (kde ovšem působí přes nikotinové acetylcholinové receptory). Parasympatikus dokonce obsahuje pouze cholinergní vlákna. Není proto příliš překvapující, že mAChR můžeme nalézt v celé řadě tkání a orgánů.

1.4.1.1 Lokalizace muskarinových receptorů na periférii

Muskarinové receptory se na periférii vyskytují v různém orgánově specifickém podtypovém zastoupení. V srdci byly identifikovány všechny podtypy mAChR kromě M_4 s tím, že M_2 receptorů je zde nejvíce ze všech podtypů mAChR (Caulfield, 1993; Wang et al., 2001). Detruzor, hladká svalovina, která má podíl na vypuzování moči při močení, obsahuje všechny podtypy mAChR, ale M_2 a M_3 převládají s tím, že prvně jmenovaných je trojnásobně více (Wang et al., 1995). Není bez zajímavosti, že na kontrakci tohoto svalu se hlavně podílejí řídkěji zastoupené M_3 receptory (Chess-Williams et al., 2001). Vazba acetylcholinu na M_3 mAChR má rovněž za následek kontrakci hladké svaloviny dýchací trubice (Fryer a Jacoby, 1998) a svaloviny dělohy (Choppin et al., 1999). Muskarinové receptory v různém podtypovém zastoupení se též nacházejí v chámovodech, Sertoliho buňkách varlat, prostatě a dalších součástech mužského pohlavního ústrojí (Avellar et al., 2009). Parasympatický nervový systém hraje klíčovou roli v produkci slin tím, že stimuluje buňky acinů slinných žláz. V podčelistních a podjazykových žlázách nalezneme M_1 a M_3 receptory, zatímco v příušních slinných žlázách se vyskytuje hlavně M_3 (Culp et al., 1996, Watson et al., 1996). M_2 a M_3 podtypy mAChR jsou rovněž považovány za funkčně nejdůležitější v gastrointestinálním traktu. A opět M_2 převažují nad M_3 , tentokrát ještě výrazněji (Gómez et al., 1992). A stejně jako ve slinných žlázách, i ve střevě zřejmě M_3 receptory zajišťují více funkčních odpovědí (Chiba et al., 2002). Všech pět podtypů

muskarinových receptorů (s převahou M_3) se nachází v lidském oku (Gil et al., 1997). Převažující M_3 receptor se nachází v musculus sphincter pupillae, což je sval zodpovědný mimo jiné za zornicový reflex. Myši bez funkčního M_3 receptoru mají v klidu větší průměr rohovky než normální myši, což podporuje představu, že M_3 se podílí na kontrole kontrakce musculus sphincter pupillae. Zřejmě M_2 a M_3 receptory jsou dvěma nejdůležitějšími mAChR zajišťujícími funkční odpovědi parasymptiku (Bymaster et al., 2003). I lymfocyty mají svůj cholinergní systém. Acetylcholin uvolňovaný z T-lymfocytů se váže mj. na muskarinové receptory na monocytech, makrofázích či dendritických buňkách, čímž moduluje produkci cytokinů v těchto důležitých buňkách imunitního systému (Kawashima et al., 2012).

1.4.1.2 Lokalizace muskarinových receptorů v centrální nervové soustavě

Muskarinové receptory jsou významnou součástí různorodé receptorové palety centrálního nervového systému. Zatímco v periferních tkáních představují M_2 a M_3 nejrozšířenější a funkčně nejdůležitější podtypy, v CNS se nejhojněji vyskytují M_1 , M_2 a M_4 (Levey et al., 1991). Podtypy M_3 a M_5 se tu nacházejí také, ale v menší míře. Lokalizaci jednotlivých podtypů mAChR v mozku (společně s jejich funkcemi) shrnuje Tab. 1.2.

M_1 receptory tvoří velkou část celkového množství muskarinových receptorů ve frontální části mozku (v kůře, hipokampu či striatu až kolem 50 %). Naopak zastoupení M_1 se výrazně snižuje v kaudálním směru – v talamu a hypotalamu jich je okolo jedné čtvrtiny a ve Varolově mostu, mozečku a prodloužené míše ještě několikrát méně (Wall et al., 1991). M_1 receptory se vyskytují v pyramidálních buňkách všech vrstev kůry mozku, zejména ve vrstvách II, III a VI. Objevují se na tělech neuronů a dendritech, což odpovídá roli M_1 jako hlavního muskarinového postsynaptického receptoru (Levey et al., 1991). Rovněž v hipokampu nalezneme M_1 receptory hlavně na postsynaptických membránách, je tomu tak v granulárních buňkách gyrus dentatus synapticky spojených s entorhinální kůrou (Rouse et al., 1998) i v cornu Ammonis, zejména v oblasti CA1 (Levey et al., 1995). Ukázalo se, že jak v mozkové kůře, tak v hipokampu hustota M_1 receptorů výrazně převyšuje hustotu rozmístění cholinergních zakončení „en passant“, což podporuje představu, že tyto receptory odpovídají i na acetylcholin uvolněný ze vzdálených nervových zakončení a tím zvyšují vzrušivost pyramidálních buněk (Yamasaki et al., 2010). I ve striatu jsou M_1 mAChR lokalizované velkou měrou

postynapticky a mohou se zde nacházet také mimo synapse, což jim umožňuje modulovat funkci jiných neuropřenaškových systémů (Alcantara et al., 2001; Hersch et al., 1994).

Také M_2 receptory jsou velice hojné v CNS. Jejich hustota v rámci celého mozku se zdá být přibližně konstantní. V poměru k ostatním muskarinovým receptorům je nejvíce M_2 receptorů v kaudálnějších částech mozku jako jsou mozeček, prodloužená mícha, Varolův most, ale také v mezimozku – hypotalamu a talamu. Naproti tomu struktury předního mozku obsahují relativně méně M_2 receptorů (Li et al., 1991). Na rozdíl od M_1 receptorů slouží M_2 receptory do značné míry jako autoreceptory cholinergních neuronů. Takové autoreceptory se nacházejí např. v hipokampu. V hipokampu jsou M_2 receptory lokalizovány též na zakončeních GABAergních interneuronů jako presynaptické heteroreceptory (Rouse et al., 1997; 2000). I entorhinální kůra, která patří mezi oblasti mozku časně zasažené Alzheimerovou chorobou, obsahuje populaci M_2 receptorů (Chaudhuri et al., 2005). V mozkové kůře byly M_2 receptory jako presynaptické nalezeny kupříkladu v její zrkové oblasti, kam přicházejí axony vybíhající z nucleus geniculatus lateralis (Mrzljak et al., 1996).

V porovnání s předchozími dvěma podtypy mAChR je míra výskytu M_3 v CNS znatelně nižší a tvoří přibližně 5–10 % veškerých receptorů. M_3 receptory jsou roztroušeny po celém mozku, ale v malých a oddělených neuronálních subpopulacích. Najdeme je např. v korových oblastech limbického systému, striatu, hipokampu, předních jádrech talamu či jádrech Varolova mostu (Levey et al., 1994). Co se týče lokalizace M_3 receptorů v předních jádrech talamu, jde zejména o anteroventrální talamické jádro, které se vyznačuje bohatou cholinergní inervací z tegmentální oblasti (Oda et al., 2001).

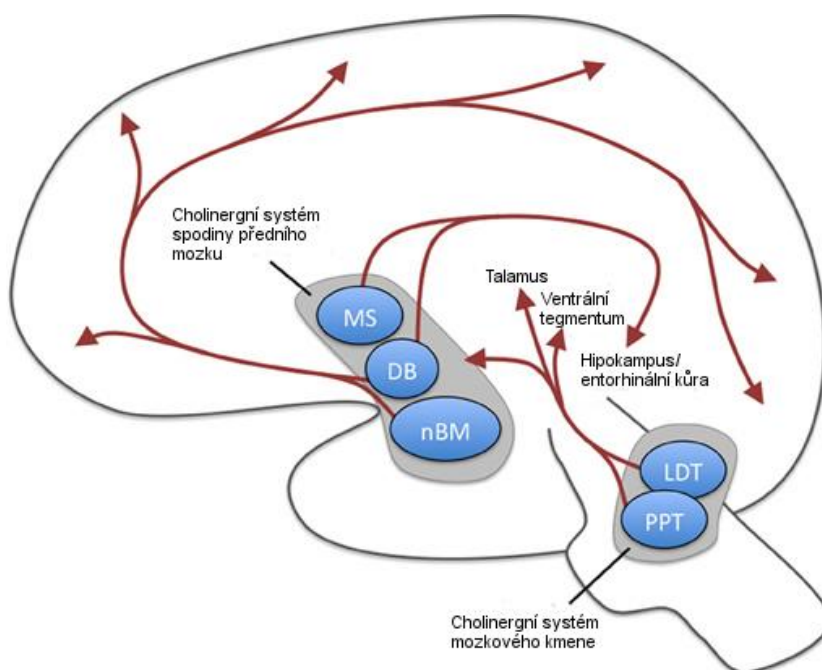
M_4 naopak patří mezi hojnější podtypy mAChR. Ve velkém počtu se nacházejí v mozkové kůře a v mnoha jejích částech se místa výskytu M_4 překrývají s M_1 . Rovněž v hipokampu se M_4 receptory objevují stejně jako M_1 podtypy hojně v oblasti CA1 a také v gyrus dentatus (Levey et al., 1995). Velmi mnoho M_4 receptorů se nalézá v okcipitální kůře, která představuje primární zrkovou oblast. Z podkorových částí mozku je nejvíce M_4 receptorů v nucleus caudatus a putamen a také v globus pallidus. V souladu s vysokou hustotou M_4 receptorů v primární zrkové kůře se M_4 ve velké míře vyskytují v jádrech, přes které prochází zrková dráha – v nucleus geniculatus lateralis a colliculus superior (Ferrari-Dileo et al., 1994). Stejně jako M_2 slouží i M_4

jako presynaptické autoreceptory, a to hlavně ve striatu, zatímco M_2 zastávají tuto funkci hlavně v hipokampu a mozkové kůře (Zhang et al., 2002a).

Rozmístění M_5 je charakteristické tím, že je nej hustší v nejkrajovějších částech mozkové kůry a také v nucleus caudatus a putamen. Také v substantia nigra a ventrosegmentální oblasti se nacházejí M_5 receptory. Konkrétně ve ventrosegmentální oblasti nalezneme M_5 receptory hlavně na tělech a dendritech neuronů, jen asi 10 % se jich vyskytuje na zakončeních axonů, z nichž některé jsou součástí dopaminergických synapsí (Garzón et al., 2013). V hipokampu se M_5 nacházejí v malých oddělených subpopulacích nervových buněk. Téměř žádné M_5 nenajdeme v mozkovém kmeni (Reever et al., 1997).

1.4.1.3 Cholinergní systém v mozku

Acetylcholin se uvolňuje ze zakončení neuronů projikujících do celé řady korových a podkorových oblastí. Tyto cholinergní dráhy dělíme na dvě skupiny (Obr. 1.4): cholinergní systém spodiny předního mozku (dále členěný na čtyři oblasti označované jako Ch1–Ch4) a cholinergní systém mozkového kmene (ten obsahuje oblasti Ch5 a Ch6; Everitt a Robbins, 1997; Mesulam et al., 1983).



Obrázek 1.4: Cholinergní systém v mozku

Obrázek schématicky znázorňuje uložení šest cholinergních oblastí a z nich vyvíjejících cholinergních projekčních drah. MS je mediální jádro septa (Ch1), DB zastupuje horizontální a vertikální svazek diagonálního Brocova pásu (Ch2 a Ch3), nBM znázorňuje bazální magnocelulární jádro (bazální Meynertovo jádro; Ch4), PPT je pedunkulopontinní jádro (Ch5) a LDT zastupuje laterodorzální tegmentum (Ch6). Upraveno dle Newmana et al., 2012.

Cholinergní systém spodiny předního mozku zahrnuje mediální jádro septa (Ch1), horizontální a vertikální svazek diagonálního Brocova pásu (Ch2 a Ch3) a bazální magnocelulární jádro (zvané též bazální Meynertovo jádro; Ch4). Všechny tyto struktury vysílají cholinergní projekce do neokortexu a limbického systému. Jmenujme například cingulární a entorhinální kůru, hipokampus, amygdalu nebo čichový bulbus. Entorhinální kůra má jednu z vůbec nejrozsáhlejších cholinergních inervací ze všech korových struktur. Cholinergní vlákna v kůře obsahují mnoho axonálních varikozit, které přímo nesousedí s postsynaptickými membránami jiných neuronů, což podporuje představu, že uvolněný acetylcholin může difundovat do okolního prostředí a modulovat funkce okolních neuronů tzv. objemovým přenosem (Descarries et al., 1997).

Cholinergní systém mozkového kmene se skládá z pedunkulopontinního jádra (Ch5) a laterodorzálního tegmenta (Ch6). Neurony vybíhající z těchto dvou struktur inervují zejména talamus a bazální ganglia, ale také spodinu předního mozku. Jenom málo se podílejí na cholinergní inervaci korových oblastí. Tab. 1.2 shrnuje uložení všech složek cholinergního systému mozku a oblasti, které cholinergní systém inervuje.

Všechny cholinergní projekce významně ovlivňují funkci těch částí mozku, kam směřují. Vzhledem k tomu, že cholinergní dráhy prostupují celou mozkovou kůrou, mají vliv na všechny stránky chování a vědomí. Kromě toho propojení cholinergních drah s retikulárním aktivačním systémem naznačuje, že tyto dráhy mají velký význam pro udržování pozornosti. Vztah k paměti vyplývá z vysoké četnosti cholinergních zakončení v hipokampu, entorhinální kůře a amygdale (Mesulam, 2004).

Tabulka 1.2: Přehled cholinergních oblastí mozku a z nich vybíhajících projekčních drah

Cholinergní systém	Oblast	Lokalizace	Cílová struktura
Spodina předního mozku	Ch1	jádro mediálního septa	hipokampus
	Ch2	horizontální svazek diagonálního Brocova pásu	hipokampus
	Ch3	vertikální svazek diagonálního Brocova pásu	čichový bulbus
	Ch4	bazální magnocelulární jádro (bazální Meynertovo jádro)	mozková kůra, bazolaterální amygdala
Mozkový kmen	Ch5	pedunkulopontinní jádro	talamus, bazální ganglia
	Ch6	laterodorzální tegmentum	talamus, bazální

1.4.2 Signalizace muskarinových receptorů

1.4.2.1 Obecný mechanismus signalizace receptorů spřažených s G-proteiny

Ač je rodina receptorů spřažených s heterotrimerními G-proteiny nesmírně rozsáhlá a různorodá, veškeré jejich funkce zprostředkovává relativně malý počet G-proteinů. U člověka je to 21 $G\alpha$ G-proteinů, 6 $G\beta$ G-proteinů a 12 $G\gamma$ G-proteinů. Heterotrimerní G-proteiny dělíme na základě sekvenční homologie α podjednotky do čtyř tříd: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ a $G\alpha_{12}$. V klidovém stavu jsou heterotrimerní G-proteiny tvořeny třemi podjednotkami: α (s navázaným guanosindifosfátem neboli GDP), β a γ . Vazba agonisty na receptor způsobí jeho konformační změnu, která zapříčiní vazbu G-proteinu a uvolnění GDP z α podjednotky. Místo něj se na α podjednotku naváže guanosintrifosfát (GTP) a následně se α podjednotka oddělí od komplexu $\beta\gamma$. Jak α podjednotka, tak $\beta\gamma$ komplex mohou poté ovlivňovat funkci dalších efektorových proteinů. Přenos signálu končí hydrolýzou GTP na GDP (α podjednotka má GTPázovou aktivitu), která může být ovlivňována regulátorem G-proteinové signalizace, a opětovným spojením s $\beta\gamma$ komplexem (Oldham a Hamm, 2008; Pierce et al., 2002).

Muskarinové receptory se tradičně dělí na dvě skupiny. Jak již bylo zmíněno na začátku tohoto literárního přehledu, liché podtypy (M_1 , M_3 , M_5) se preferenčně spřahují s G-proteiny třídy $G_{q/11}$, zatímco sudé podtypy (M_2 , M_4) přenášejí signál do buňky hlavně přes $G_{i/o}$ G-proteiny. Ukázalo se též, že se muskarinové receptory mohou s G-proteiny „předspřáhnout“ neboli utvořit s nimi komplex ještě před vazbou agonisty. Zatímco M_1 a M_3 tak mohou činit jak s preferenčními ($G_{q/11}$), tak i nepreferenčními ($G_{i/o}$) typy G-proteinů, u M_2 a M_4 receptorů se tak může dít jen s preferenčními ($G_{i/o}$) G-proteiny (Jakubík et al., 2011).

1.4.2.2 Spřahování s G-proteiny a příklady signálních drah aktivovaných M_1 receptory

Jako ostatní liché podtypy mAChR se i M_1 receptor přednostně spřahuje s G-proteiny třídy $G_{q/11}$, které aktivují fosfolipázu C (PLC; Felder, 1995). S aktivací PLC (a s tím související mobilizací vápenatých iontů) může být též spojená aktivace neuronální NO syntázy (Wang et al., 1996). Aktivace M_1 (a také ostatních lichých podtypů mAChR) může vést i ke stimulaci fosfolipázy A_2 , jak je tomu například v A9L

buňkách (Conklin et al., 1988). Bylo rovněž zjištěno, že M_1 receptor je schopen aktivovat i další buněčné signální dráhy, a to díky interakci s dalšími typy G-proteinů, jako např. G_i (Offermanns et al., 1994) nebo G_s (Burford a Nahorski, 1996; Dittman et al., 1994). Všechny podtypy muskarinových receptorů hrají také roli v regulaci mitogenem aktivovaných proteinových (MAP) kináz a zdá se, že M_1 receptory mají v některých buňkách a tkáních v tomto ohledu převládající roli, co se týče aktivace extracelulárním signálem regulovaných kináz 1 a 2 (Ebihara a Saffen, 1997). V neposlední řadě se M_1 receptory účastní kontroly funkce iontových kanálů – např. karchol svou vazbou na M_1 receptor umocňuje velikost proudu vyvolaného aktivací NMDA receptoru (Marino et al., 1998).

1.4.2.3 Spřahování s G-proteiny a příklady signálních drah aktivovaných M_2 receptory

Sudé podtypy mAChR, mezi něž patří i M_2 receptor se preferenčně spřahují s jinými typy G-proteinů, než je tomu u lichých podtypů, a to s $G_{i/o}$ G-proteiny, které inhibují adenylátcyklázu a snižují koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v buňce (Caulfield, 1993). Při vyšších koncentracích agonisty (u karcholu desítky μM) jsou M_2 receptory schopny koncentraci cAMP zvyšovat prostřednictvím G_s G-proteinů. Preinkubují-li se buňky před stimulací agonistou s pertussis toxinem, který inaktivuje $G_{i/o}$ G-proteiny, je nárůst koncentrace cAMP ještě větší (Jakubík et al., 1996; Michal et al., 2001). Stimulační účinek karcholu na aktivitu adenylátcyklázy je daleko více ovlivněn desenzitizací receptorů a během dlouhodobé aktivace receptoru odezní rychleji než inhibiční účinek. Tento účinek karcholu je rovněž podmíněn dostatečnou hustotou receptorů, díky které se receptor začne spřahovat s méně preferovanými typy G-proteinů, což vede k výše popsané aktivaci adenylátcyklázy (Tuček et al., 2001). Krom G_s G-proteinů se M_2 receptory mohou spřahovat i s G_q , a tím stimulovat hydrolýzu fosfoinositidů (Michal et al., 2007). U M_2 receptoru byla též popsána jeho role jako součást dráhy vedoucí k aktivaci endoteliální NO syntázy v myocytech srdečních síní a komor. V tomto případě se zdá být též velmi pravděpodobné, že zde hraje důležitou roli uspořádání receptorů a dalších signalizačních molekul do tzv. kaveol, což jsou na lipidy bohaté membránové domény (Feron et al., 1999). I M_2 receptory fungují coby regulátory aktivace iontových kanálů, dobře je popsána např. aktivace dovnitř usměřujícího draslíkového kanálu

v myocytech síní prostřednictvím $\beta\gamma$ podjednotky $G_{i/o}$ G-proteinu spřaženého s M_2 receptorem (Breitwieser a Szabo, 1985).

1.4.2.4 Spřahování s G-proteiny a příklady signálních drah aktivovaných M_3 receptory

M_3 receptory, stejně jako ostatní liché podtypy mAChR, se preferenčně spřahují s $G_{q/11}$ G-proteiny (Bräuner-Osborne a Brann, 1996). Přes diacylglycerol aktivovaná proteinkináza C může poté aktivovat fosfolipázu D, děje se tak např. v průdušnici u prasat (Mamoon et al., 1999). Ale stejně jako dva předchozí podtypy jsou M_3 receptory schopny aktivovat i další signální kaskády. Po vazbě karcholu se může odehrát růst koncentrace cAMP, čemuž předchází aktivace G_s G-proteinů (Burford et al., 1995). Karchol může ovšem vyvolat i inhibici adenylátcyklázy prostřednictvím aktivace G_i G-proteinů (Offermanns et al., 1994). Rovněž M_3 receptory hrají roli v aktivaci NO syntázy ve slinných žlázách a oxidem dusným zprostředkovanou sekreci amylázy (Rosignoli a Pérez Leirós, 2002).

1.4.2.5 Spřahování s G-proteiny a příklady signálních drah aktivovaných M_4 receptory

Jako druhý zástupce sudých podtypů mAChR se i M_4 receptor přednostně spřahuje s G-proteiny třídy $G_{i/o}$, čímž dochází k inhibici adenylátcyklázy (Caulfield, 1993). Existují rozdíly ve specifitě spřahování M_2 a M_4 s $G_{i/o}$ G-proteiny – zatímco M_2 mAChR se dovede spřahovat s $G_{\alpha_{i-1}}$, $G_{\alpha_{i-2}}$, $G_{\alpha_{i-3}}$ a G_{α_o} , M_4 receptor přenáší signál do buňky přednostně přes $G_{\alpha_{i-2}}$ a G_{α_o} . Je zřejmé, že tyto dva receptory inhibují adenylátcyklázu rozdílnou sestavou G-proteinů (Migeon et al., 1995). Podobně jako M_2 receptory, i M_4 podtyp se za určitých podmínek může spřahovat s G_s G-proteiny a stimulovat adenylátcyklázu. Závisí to hlavně na hustotě receptorů a koncentraci agonisty (Dittman et al., 1994). M_4 receptory mohou taktéž aktivovat PLC a děje se tak spíše přes podjednotku $\beta\gamma$ než přes $G_{\alpha_{q/11}}$ (Katz et al., 1992).

1.4.2.6 Spřahování s G-proteiny a příklady signálních drah aktivovaných M_5 receptory

I M_5 receptor se jako jeden z lichých podtypů mAChR preferenčně spřahuje s G-proteiny třídy $G_{q/11}$ (Caulfield a Birdsall, 1998). Ovšem ani u tohoto podtypu neplatí absolutní specifita spřahování. Ukázalo se, že v buňkách označovaných jako A2058

(pocházejících z lidského melanomu) vyvolává aktivace endogenních M_5 receptorů inhibicí adenylátcyklázy, zatímco hydrolyza membránových fosfolipidů prostřednictvím PLC není téměř měřitelná (Kohn et al., 1996). Kromě toho je M_5 receptor rovněž schopen aktivovat adenylátcyklázu díky spřažení s G_s G-proteiny, ovšem děje se tak s mnohem menší účinností než na M_1 nebo M_3 receptoru (Burford et al., 1995; Jones et al., 1991).

1.4.3 Funkce muskarinových receptorů

1.4.3.1 Funkce M_1 receptorů

Vzhledem ke své hojné lokalizaci v CNS, která zahrnuje hlavně mozkovou kůru a hipokampus (Levey et al., 1991), není překvapující, že M_1 muskarinové receptory hrají důležitou roli v procesech učení a paměti. Ukázaly to jak pokusy s antagonisty muskarinových receptorů, které způsobovaly kognitivní poruchy u testovaných zvířat (Pazzagli a Pepeu, 1965), tak i studie používající transgenní myši s chybějícími M_1 receptory. Tyto myši vykazují poruchy v ukládání do dlouhodobé paměti, ačkoli ve srovnání s účinky cholinergních antagonistů nemá absence M_1 receptorů tak zásadní dopad na kognitivní procesy. Proto se má za to, že M_1 receptory nejsou zásadní pro vznik nových paměťových stop v hipokampu, ale spíše pro udržování interakcí mezi mozkovou kůrou a hipokampem (Anagnostaras et al., 2003). Miyakawa a spolupracovníci (2001) zaznamenali u myši bez funkčních M_1 receptorů prvky hyperaktivity, ale překvapivě nepozorovali vážné nedostatky v procesech učení a paměti spojenými s hipokampem. Myši, které neexprimují M_1 receptory pouze v předním mozku včetně hipokampu, hyperaktivitou netrpí (Kamsler et al., 2010). M_1 receptory v hipokampu jsou rovněž nezbytné pro vznik oscilací na γ frekvenci, které úzce souvisí s depolarizací hipokampálních pyramidálních neuronů v CA3 oblasti. Oscilace na γ frekvenci se vyskytují v mnoha částech mozku mimo jiné při provádění úloh zaměřených na kognitivní funkce (Fisahn et al., 2002). Jak už bylo zmíněno v kapitole o signalizaci muskarinových receptorů, spočívá funkce M_1 receptorů i v aktivaci MAP kinázové dráhy a právě ta byla prakticky nepřítomná u myši neexprimujících M_1 receptory (konkrétně v mozkové kůře a pyramidálních neuronech CA1 oblasti hipokampu; Berkeley et al., 2001; Hamilton a Nathanson, 2001). MAP kinázy jsou známé tím, že hrají zásadní roli v regulaci synaptické plasticity (Orban et al., 1999).

Předpokladem synaptické plasticity je dlouhodobá potenciace (LTP). Acetylcholin dokáže svou vazbou na M_1 mAChR posilovat LTP na excitačních synapsích v myším hipokampu. U myši bez funkčního M_1 receptoru je sice LTP jako taková nenarušena, ale posilující efekt acetylcholinu se nedostavuje (Shinoe et al., 2005). Pro výše popsané vlastnosti jsou muskarinové M_1 receptory považovány za vhodný terapeutický cíl u kognitivních poruch.

1.4.3.2 Funkce M_2 receptorů

Muskarinové M_2 receptory patří k těm podtypům mAChR, které jsou hojně zastoupeny na periférii, zejména v srdci a hladké svalovině. Uvolnění acetylcholinu ze zakončení bloudivého nervu vede ke zpomalení srdeční frekvence díky zpomalení draslíkové vodivosti (Caulfield, 1993). Pokusy provedené *in vitro* na izolovaných síních ze srdcí myši neexprimujících M_2 receptory ukázaly, že karbachol není schopen vyvolat snížení frekvence jejich tlukotu (Stengel et al., 2000). Stejná výzkumná skupina ukázala, že se M_2 receptory též podílejí na kontrakci hladké svaloviny, když její členové zjistili, že na izolovaných svalových preparátech (pocházejících z klenby žaludku, močového měchýře a průdušnice) z myši bez funkčních M_2 receptorů je karbachol dvakrát méně účinný co do schopnosti vyvolat kontraktilní odpověď ve srovnání s kontrolní tkání.

I v CNS zastávají M_2 muskarinové receptory důležité regulační funkce. Za normálních okolností působí agonista muskarinových receptorů oxotremorin třes celého těla, ztrátu pohyblivosti, výrazný pokles tělesné teploty a snížení vnímání bolesti. Myši neexprimující M_2 receptory však nevykazovaly po podání oxotremorinu třes ani ztrátu pohyblivosti, zatímco vliv na tělesnou teplotu a analgetické účinky oxotremorinu nebyly tak výrazné (Gomez et al., 1999a). Stejně jako M_1 receptory hrají i M_2 receptory roli v regulaci procesů učení a paměti. Ovšem studie provedené za účelem objasnění této funkce M_2 receptorů vedly k protichůdným závěrům. Na jednu stranu zablokování M_2 receptorů selektivním antagonistou SCH 57790 může následným zvýšením uvolňováním acetylcholinu zlepšovat kognitivní funkce u laboratorních hlodavců i primátů (Carey et al., 2001). Na druhou stranu se ale myši postrádající M_2 receptory vyznačují podstatně horšími výsledky v behaviorálních testech, což naznačuje, že nesprávná kontrola hladiny acetylcholinu přispívá ke kognitivním poruchám způsobeným absencí M_2 receptorů (Tzavara et al., 2003). Rovněž se zdá, že vyřazení

všech M₂ receptorů z funkce vede ke zhoršení pracovní paměti a také hipokampální synaptické plasticity spojené s deficitem v krátkodobé a dlouhodobé potenciaci (Seeger et al., 2004). Muskarinové M₂ receptory slouží v CNS hlavně jako presynaptické autoreceptory, které regulují výlev acetylcholinu, a to hlavně v mozkové kůře a hipokampu (Zhang et al., 2002a). Muskarinové M₂ receptory se též patrně účastní odpovědi na stresové situace, protože myši bez funkčních M₂ receptorů nevykazují zvýšený výlev kortikosteronu v reakci na podání agonisty mAChR (Hemrick-Luecke et al., 2002).

1.4.3.3 Funkce M₃ receptorů

M₃ podtypy muskarinových receptorů se v CNS nacházejí v menším počtu než předchozí dva podtypy a jde převážně o malé rozptýlené populace (Levey et al., 1994). Pokusy na myších, které neexprimují M₃ receptory, naznačují, že hypotalamické M₃ receptory se účastní regulace příjmu potravy. Tyto myši vykazují její snížený příjem a také nižší hmotnost než divoké typy myší. Mají ale normální pohybovou aktivitu a rychlost metabolismu, což vede k domněnce, že snížený příjem potravy je hlavní příčinou jejich nízké hmotnosti projevující se např. výrazně malými tukovými zásobami (Yamada et al., 2001a). Kromě toho se však absence M₃ receptorů u myší projevuje i sníženou produkcí slin (Matsui et al., 2000), takže v otázce M₃ receptorů a příjmu potravy půjde zřejmě i o tento periferní příspěvek. Zdá se, že M₃ receptory jsou nezbytně důležité pro správnou regulaci spánku, přesněji řečeno jeho REM fáze (Goutagny et al., 2005; Sakai a Onoe, 1997). U myší bez funkčních M₃ receptorů dochází ke zkrácení celkové doby trvání REM spánku a navíc se u nich objevují poruchy v theta rytmu (maxima dosahují nižších hodnot). Vypadá to, že M₃ receptory exprimované v CNS hrají též roli v regulaci růstu, protože myši se selektivní absencí M₃ receptorů v mozku vykazují trpasličí vzrůst a sníženou hladinu růstového hormonu v séru (Gautam et al., 2009).

Kromě již zmíněné funkce muskarinových M₃ receptorů coby regulátora produkce slin se tyto podtypy na periférii vyznačují dalšími důležitými funkcemi. Jde kupříkladu o acetylcholinem zprostředkovanou kontrakci hladké svaloviny. *In vitro* pokusy ukázaly, že hladká svalová tkáň odebraná z myší bez M₃ receptorů (např. z močového měchýře, průdušnice či žlučníku) se vyznačuje menší kontraktilní odpovědí na karbachol než kontrolní tkáň. Je ovšem důležité doplnit, že acetylcholin vyvolává

kontrakce hladké svaloviny i současným působením na M₂ receptory. *In vivo* jsou u myši bez M₃ receptorů patrné rozšířené zornice, což podporuje předchozí pozorování, že tonus svěrače zornice je udržován tonickou aktivací M₃ receptorů (Matsui et al., 2000). M₃ receptory v β buňkách slinivky břišní hrají důležitou roli v udržování normální hladiny glukózy v krvi, protože myši bez funkčních M₃ receptorů (pouze v β buňkách slinivky) mají nápadně zhoršenou toleranci glukózy a vylučování inzulínu (Gautam et al., 2006). Tyto podtypy mAChR se rovněž účastní acetylcholinem stimulované sekrece HCl v parietálních buňkách žaludku vzhledem k tomu, že u myši neexprimujících M₃ receptory je regulace této sekrece významně narušená (Aihara et al., 2005). V neposlední řadě bylo ukázáno, že M₃ receptory rovněž stojí za modulační roli acetylcholinu v regulaci migrace keratinocytů a hojení ran (Chernyavsky et al., 2004).

1.4.3.4 Funkce M₄ receptorů

Ve srovnání s M₂ receptory mají M₄ receptory velkou hustotu výskytu v CNS. Podobně jako M₂ receptory se i M₄ podtypy mAChR uplatňují při snížení vnímání bolestivých podnětů, ačkoli role M₂ receptorů je v tomto ohledu dominantní (Duttaroy et al., 2002). Značnou část M₄ receptorů, podobně jako u M₂ receptorů, představují presynaptické autoreceptory účastnící se kontroly výlevu acetylcholinu z cholinergních zakončení. Na rozdíl od M₂ receptorů zastávají tuto regulační úlohu především ve striatu (Doležal a Tuček, 1998; Lazareno et al., 2004; Zhang et al., 2002a). Rovnováha mezi cholinergní a dopaminergní neurotransmisí ve striatu je nezbytným předpokladem pro správnou koordinaci pohybu a aktivace striatálních muskarinových receptorů napomáhá uvolňování dopaminu ve striatu, protože ve srovnání s kontrolními zvířaty není u transgenických myši bez M₄ receptorů patrný výlev dopaminu po aplikaci oxotremorinu (Zhang et al., 2002b). Jak již bylo zmíněno, M₄ receptory jsou zapojené do kontroly lokomoce. Myši bez funkčních M₄ receptorů vykazují statisticky významný nárůst bazální pohybové aktivity a navíc po podání agonisty D₁ dopaminergních receptorů je nárůst pohybové aktivity ještě výrazně posílen. Tyto poznatky podporují představu, že striatální M₄ receptory mají inhibiční účinek na D₁ receptory stimulovanou pohybovou aktivitu (Gomez et al., 1999b). V nucleus accumbens, které je součástí striata, se u myši vlivem absence M₄ receptorů zvyšuje bazální hladina dopaminu. Také se u těchto zvířat projevuje zvýšená citlivost na psychostimulační látky

(např. amfetamin), jejichž podání posiluje výlev dopaminu mnohem více než u kontrolních zvířat (Tzavara et al., 2004). U myši neexprimujících M_4 receptory není antagonist mACHR skopolamin schopen tlumit haloperidolem vyvolanou strnulost (Karasawa et al., 2003), což se považuje za nadějně z pohledu antagonistů M_4 mACHR jako léčiv na Parkinsonovu chorobu. Rovněž se má za to, že se M_4 receptory účastní kontroly antipsychotického chování, protože myši bez funkčních M_4 receptorů vykazují vyšší citlivost na psychomimetikum fencyklidin (Felder et al., 2001).

1.4.3.5 Funkce M_5 receptorů

M_5 receptor je posledním z muskarinových receptorů, který byl naklonován, a jeho fyziologická funkce zůstávala poměrně dlouho nejasná (Bonner et al., 1988). Je známo, že aktivace centrálních cholinergních neuronů hraje důležitou roli v regulaci relaxace a kontrakce cév a také průtoku krve v různých částech mozku (Hamel, 2004; Sato et al., 2004). A tedy, že narušená signalizace jak prostřednictvím neuronálních, tak i cévních mACHR může přispívat ke zhoršování paměti spojené s progresí Alzheimerovy choroby. Má se za to, že pro správnou funkci cév jsou velice podstatné právě M_5 receptory. Svědčí pro to jednak jejich výskyt v endotelu i svalovině mozkových cév (Tayebati et al., 2003), ale také výsledky pokusů s myši neexprimujícími tyto receptory. V mozcích těchto myši ztrácí acetylcholin schopnost roztahovat mozkové tepny a tepénky. Tento efekt je specifický pro cévní řečiště v mozku, protože dilatace cév mimo mozek prostřednictvím acetylcholinu zůstává neporušená (Yamada et al., 2001b). Užitím *in vivo* magnetické rezonanční angiografie bylo zjištěno, že se tyto myši vyznačují trvalou konstrikcí cerebrálních tepen. Dále lze u nich pozorovat omezený průtok krve v mozkové kůře, hipokampu, bazálních gangliích či talamu. V hipokampálních pyramidových neuronech je tato dysfunkce dále spojená se sníženým počtem dendritických trnů, dendritickou atrofií a poklesem spontánní excitační aktivity. Navíc jsou u těchto myši narušené paměťové procesy spojené s hipokampem (Araya et al., 2006). Kromě toho se M_5 receptory nacházejí v pars compacta černé substance, ze které vychází dopaminergní inervace striata a která je zdrojem striatálního dopaminu. Ztráta M_5 mACHR vede ke snížení výlevu dopaminu vyvolaného stimulací tkáně muskarinovým agonistou. Maximální výlev dopaminu ovšem zůstává nenarušen, což naznačuje, že se na posilování uvolňování dopaminu podílejí i další podtypy mACHR (Yamada et al., 2001b). Díky tomu, že jsou M_5

receptory schopny modulovat výlev dopaminu, má jejich funkce také vliv na projevy chování (pocit uspokojení) vyvolané podáním opiátů i dalších drog způsobujících závislost. „Uspokojující“ efekt morfinu je výrazně nižší u myši bez funkčních M₅ receptorů. Kromě toho jsou u těchto myši výrazně redukovány i abstinenci příznaky indukované podáním naloxonu, což je kompetitivní antagonist μ -opioidních receptorů. Naproti tomu analgetické účinky morfinu zůstávají u těchto myši nezměněny (Basile et al., 2002). Ani kokain nemá tak silné povzbuzující účinky na myši neexprimující M₅ receptory a abstinenci příznaky po jeho vysazení jsou u těchto myši méně závažné, než je tomu u divokých typů myši (Fink-Jensen et al., 2003).

Tabulka 1.3: Přehled převažující lokalizace muskarinových receptorů společně s funkcemi, které jednotlivé podtypy mAChR v mozku zastávají

Podtyp	Lokalizace v mozku	Funkce
M₁	mozková kůra, hipokampus, striatum	procesy učení a paměti (kognitivní funkce), dlouhodobá potenciace v hipokampu
M₂	mozeček, prodloužená mícha, Varolův most, hypotalamus, talamus, hipokampus	autoreceptory regulující výlev ACh (hlavně v mozkové kůře a hipokampu), paměť, regulace tělesné teploty, vnímání bolesti
M₃	limbický systém, striatum, hipokampus, přední jádra talamu, Varolův most	regulace příjmu potravy, správný průběh REM fáze spánku, tělesný růst
M₄	mozková kůra, hipokampus, striatum	autoreceptory regulující výlev ACh (hlavně ve striatu), vnímání bolesti, kontrola lokomoce
M₅	striatum, černá substance, ventrotegmentální oblast	regulace průtoku krve mozkovými cévami, pocity uspokojení po požití drog a abstinenci projevy po vysazení

1.5 Farmakologie muskarinových receptorů a lidská onemocnění

Velkou překážkou pro nalezení jakýchkoli selektivních ligandů muskarinových receptorů vhodných do klinické praxe je vysoký stupeň homologie ortosterického vazebného místa mezi jednotlivými podtypy mAChR. Alternativní přístup spočívá v zaměření se na alosterická či ektopická místa, která jsou daleko méně strukturně konzervovaná. Tyto více či méně selektivní alosterické a bitopické ligandy značně rozšiřují budoucí terapeutické možnosti, které dávají naději kupříkladu pacientům postiženým závažnými neurodegenerativními či psychiatrickými onemocněními, které jsou v současnosti léčitelné jen velmi omezeně. Tabulka 1.4 poskytuje přehled možností ovlivnění funkce muskarinových receptorů.

Tabulka 1.4: Příklady terapeutických možností ovlivnění funkce muskarinových receptorů.

Označení	Mechanismus působení	Cíl (podtyp receptoru)	Indikace
<i>inhibitory AChE</i>	inhibice acetylcholinesterázy štěpící Ach → vyšší koncentrace ACh v synaptické štěrbině	nespecifické působení	Alzheimerova choroba (s memantinem jediná zatím schválená terapeutika), zelený zákal, Myastenia gravis, Parkinsonova choroba, poruchy spánku a další
<i>selektivní agonisté (nebo pozitivní alosterické modulátory)</i>	stimulace (nebo pozitivní alosterická modulace) jednoho nebo více podtypů mAChR s žádným nebo minimálním ovlivněním ostatních podtypů	M ₁	Alzheimerova choroba, Sjögrenův syndrom
		M ₄	schizofrenie, snížení vnímání bolesti
<i>neselektivní antagonisté</i>	nespecifické blokování muskarinových receptorů	nespecifické působení	otravy (např. muskarinem nebo organofosfáty), zelený zákal, kinetóza
<i>selektivní antagonisté</i>	blokování jednoho nebo více podtypů mAChR s žádným nebo minimálním ovlivněním ostatních podtypů	M ₁	snížení sekrece HCl v žaludku
		M ₂	Alzheimerova choroba, schizofrenie, srdeční arytmie
		M ₃	hyperaktivní močový měchýř, chronická obstrukční plicní choroba (schváleno pro klinické použití), syndrom dráždivého tračníku
		M ₄	Parkinsonova choroba
		M ₅	ischemie v mozku, drogová závislost

Upraveno dle: Eglen et al., 2005.

1.5.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění projevující se celou řadou kognitivních poruch včetně postupně se zhoršujících paměťových schopností. Jedná se o nejběžněji diagnostikovaný typ demence a v současnosti postihuje přibližně 44 milionů lidí na celém světě (Prince et al., 2014). Kromě neduhů spjatých se zhoršujícími se kognitivními funkcemi trpí lidé s AD rovněž poruchami chování zahrnujícími úzkosti, deprese a psychózy (Grossberg, 2003). Pokročilý věk je hlavním rizikovým faktorem rozvoje této choroby, neboť se obvykle projevuje až po 60. roce života jedince. S ohledem na neustále rostoucí průměrný věk lidské populace zejména v rozvinutých zemích se očekává, že v horizontu 15 let se počet nemocných AD zdvojnásobí (Prince et al., 2014). Alzheimerova nemoc v pokročilé fázi představuje nejen naprostý rozklad osobnosti postiženého člověka, ale také značné emocionální (a v neposlední řadě i finanční) břemeno pro rodinu a další pečující osoby.

Charakteristickými známkami onemocnění jsou neuritické plaky vznikající shlukováním peptidu amyloidu β ($A\beta$) a neurofibrilární klubíčka tvořená hyperfosforylovaným proteinem tau (Hardy a Higgins, 1992; Selkoe, 1991). Na základě nálezů neuritických plaků v mozcích lidí nemocných AD byla zformulována hypotéza amyloidové kaskády, která předpokládá, že postupná tvorba $A\beta$ plaků vede k zánětlivým procesům v mozku a z nich pramenící dysfunkci a odumírání neuronů. K nejhůře zasaženým částem mozku patří mozková kůra a hipokampus, tedy oblasti zapojené do kognitivních procesů (Braak a Braak, 1991). Panuje všeobecná shoda v tom, že narušení cholinergní neurotransmise je do značné míry zodpovědné jak za kognitivní poruchy, tak i za poruchy chování vyskytující se u pacientů s AD (Woolf, 1996). Mozky nemocných AD se vyznačují rozsáhlou degenerací cholinergních axonů předního mozku včetně těch, které inervují mozkovou kůru a hipokampus, což se stalo podkladem pro vytvoření cholinergní hypotézy AD (Bartus et al., 1982; Davies a Maloney, 1976; Whitehouse et al., 1982). Kromě toho podání neselektivních antagonistů muskarinových receptorů způsobuje nebo prohlubuje kognitivní potíže u laboratorních zvířat (Pazzagli a Pepeu, 1965), lidí trpících AD a stejně tak u zdravých mladých i starých kontrolních osob (Rusted a Warburton, 1988; Sunderland et al., 1987), což také podporuje důležitou roli mAChR v kognitivních procesech.

Mezi prvořadá léčiva zaměřená na zmírnění příznaků AD patří v současnosti inhibitory acetylcholinesterázy, které svým účinkem zpomalují rozklad acetylcholinu, a tím posilují cholinergní neurotransmisi (Muñoz-Torrero, 2008). Ač jsou hojně používána, mají celou řadu vedlejších účinků pramenících z neselektivní stimulace cholinergního přenosu, mezi něž patří např. průjem, nadměrná produkce slin nebo bradykardie. Tyto funkční nedostatky inhibitorů acetylcholinesterázy nejsou překvapivé, když vezmeme v úvahu, že účinkují na synapsích všech cholinergních zakončení kterékoli tělní tkáň. Navíc se ukázalo, že léčba inhibitory acetylcholinesterázy vykazuje poměrně nízkou (nebo dokonce žádnou) účinnost u 75 % pacientů s AD (Giacobini, 2000), což je pravděpodobně způsobeno rozsáhlou degenerací axonů cholinergních neuronů v mozku, která je jedním z palčivých projevů progresse onemocnění.

Posílení kognitivních funkcí bez negativních vedlejších účinků by bylo možné docílit selektivní aktivací M_1 muskarinových receptorů, které jsou, jak již bylo uvedeno v této i předchozích kapitolách, nezbytné pro správný chod učení a paměti. Naznačily to již zmíněné pokusy s transgenními myšmi s vyřazenými M_1 receptory (Anagnostaras et al., 2003; Miyakawa et al., 2001), u nichž byly narušené kognitivní funkce či dlouhodobá potenciace v hipokampu. Navíc u myši vyznačujících se $A\beta$ plaky vedlo vyřazení M_1 receptorů ke zrychlení tvorby $A\beta$, což dává tušit, že by jejich selektivní agonista mohl nemocným prospět i co do zpomalení tvorby neuritických plaků (Davis et al., 2010). Kromě toho zůstávají tyto receptory poměrně dobře zachovány i v pozdních fázích nemoci, i když jejich schopnost aktivace se zhoršuje s tím, jak nemoc postupuje (Janíčková et al., 2013; Machová et al., 2008; 2010; Tsang et al., 2006).

Bylo již nalezeno několik M_1 selektivních agonistů, které byly následně podrobeny jak *in vitro*, tak *in vivo* testům zjišťujícím jejich potenciální použitelnost zejména co se týče posílení kognitivních funkcí (Caccamo et al., 2006; Fisher, 2012; Shannon et al., 1994). Co do klinických zkoušek se nejdále dostal xanomelin, který byl podáván pacientům s AD, u kterých bylo zaznamenáno jak zlepšení kognitivních funkcí, tak i úbytek poruch chování charakteristických pro AD. Na druhou stranu si pacienti stěžovali na četné vedlejší účinky, které vedly k tomu, že xanomelin nemohl být vpuštěn do praxe jako léčivo (Bodick et al., 1997a, b). Xanomelin, kterému se věnuje třetí kapitola literárního přehledu a téměř celá experimentální část této dizertační práce, vykazuje funkční selektivitu hlavně pro M_1 , ale také pro M_4 podtypy mAChR. Řadí se mezi bitopické ligandy muskarinových receptorů a je unikátní díky

své schopnosti vázat se na všechny podtypy mAChR tzv. neodmyvatelnou vazbou (Christopoulos et al., 1998; Jakubík et al., 2002; 2006). Bitopickým mechanismem účinku se vyznačuje i další agonista funkčně selektivní pro M₁ receptory, a to 77-LH-28-1 (1-[3-(4-butyl-1-piperidinyl)propyl]-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone), který u zvířat působí antipsychoticky a posiluje kognitivní funkce (Langmead et al., 2008; Tab. 1.1). I alosterický agonista TBPB (1-(1'-2-methylbenzyl)-1,4'-bipiperidin-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-one) je selektivní pro M₁ receptory a v preklinických studiích podobně jako 77-LH-28-1 vykazoval antipsychotické účinky. V pokusech *in vitro* na buněčných kulturách bylo zaznamenáno, že TBPB rovněž snižuje produkci β-amyloidu (Jones et al., 2008). Co se týče specifické aktivace M₁ receptorů, studují se i pozitivní alosterické modulátory, jako např. BQCA (benzyl quinolone carboxylic acid). Pro BQCA je charakteristická vysoká selektivita pro M₁ a žádný účinek na M₂ až M₅ podtypy mAChR. U myšího modelu AD dokáže BQCA zvrátit skopolaminem vyvolané nedostatky v kontextuálním strachovém podmiňování či přeučování závislém na prefrontální kůře (Ma et al., 2009; Shirey et al., 2009).

1.5.2 Schizofrenie

Schizofrenie je závažné psychiatrické onemocnění charakteristické celou škálou pozitivních a negativních symptomů a také narušením kognitivních funkcí. Trpí jím přibližně 1 % populace (Bhugra, 2005). Nástup symptomů se obvykle odehrává již v poměrně mladém věku, tedy v období ohraničeném dospíváním a mladší dospělostí (obvykle před dosažením 30 let). Existují značné rozdíly v charakteru příznaků u jednotlivých pacientů se schizofrenií a neurobiologie onemocnění je značně spletitá. Typickými psychotickými známkami onemocnění jsou pozitivní symptomy zahrnující sluchové halucinace, přeludy či zmatené myšlení a řeč. Schizofrenici také trpí negativními symptomy jako ztrátou schopnosti prožívat radost či obtížemi v navazování sociálních vztahů, jakož i kognitivními poruchami v oblasti pracovní paměti nebo pozornosti. Navíc mohou být uvedené příznaky doprovázeny poruchami nálady a závislostí na psychoaktivních látkách, které postihují 40–80 % lidí trpících schizofrenií (Tollefson et al., 1998; Westermeyer, 2006).

Příčiny schizofrenie zůstávají prozatím neobjasněné. Má se však za to, že výraznou roli hraje narušení dopaminergní neurotransmise. Z tohoto poznatku vychází dopaminergní hypotéza rozvoje onemocnění, která přičítá pozitivní symptomy

zvýšenému dopaminergnímu přenosu ve striatu a mezolimbické dráze, zatímco negativní symptomy připisuje sníženému dopaminergnímu přenosu v prefrontální kůře a mezokortikální dráze (Davis et al., 1991). Dopaminergní neurotransmise není jediná, která v mozku schizofreniků nefunguje správně. Svůj podíl zde patrně má i dysfunkce cholinergního přenosu. M₁ receptory jsou zásadně důležité pro správnou funkci paměti i učení (Anagnostaras et al., 2003; Miyakawa et al., 2001) a M₄ receptory se v mozku mimo jiné účastní kontroly hladiny dopaminu (Tzavara et al., 2004).

Léčba schizofrenie spočívá v současnosti v podávání typických a atypických antipsychotik, která působí na dopaminergní systém, a to hlavně na D₂ receptory. Tyto terapeutické postupy částečně potlačují pozitivní symptomy schizofrenie (Sawa a Snyder, 2003), ale jsou jen částečně účinné (nebo úplně bez účinku) co do zmírnění negativních symptomů a kognitivních nedostatků, které mohou postižené osoby vyřadit ze společenského dění (Hill et al., 2010; Murphy et al., 2006).

Zdá se, že M₄ receptory by mohly představovat nadějný cíl nové generace antipsychotik. Podporují to např. výsledky klinických studií s xanomelinem, selektivním agonistou M₁ a M₄ muskarinových receptorů. Podání xanomelinu pacientům se schizofrenií tlumí jejich psychotické symptomy onemocnění (Shekhar et al., 2008). U zvířat s vyřazenou subpopulací M₄ receptorů (na neuronech exprimujících dopaminergní D₁ receptory) xanomelin antipsychoticky nepůsobí (Dencker et al., 2011). Také selektivní alosterické modulátory M₄ receptorů by se za tímto účelem mohly uplatnit. Naznačují to např. pokusy se sloučeninami nazývanými VU0152100 (3-amino-N-(4-methoxybenzyl)-4,6-dimethylthieno[2,3-b]pyridine carboxamide) a VU0152099 neboli (3-amino-N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-4,6-dimethylthieno[2,3-b]pyridine carboxamide). Obě tyto látky dokáží u zvířecích modelů účinně zvrátit amfetaminem vyvolanou hyperlokomoci, což je bráno jako známka antipsychotického působení (Brady et al., 2008). I další alosterický modulátor, LY2033298, neboli 3-amino-5-chloro-6-methoxy-4-methyl-thieno(2,3-b)pyridine-2-carboxylic acid cyclopropylamide), vykazuje dobrou účinnost u preklinických modelů psychóz, jedná se kupříkladu o apomorfínem vyvolané narušení prepulzní inhibice úlekové reakce (Leach et al., 2010).

1.5.3 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD) je neurodegenerativní onemocnění, které postihuje přibližně 1 % populace starší 60 let (de Lau a Breteler, 2006). Projevuje se hlavně klidovým třesem, celkovým zpomalením pohybů, ztuhlostí a poruchami chůze. Mezi další typické příznaky patří také poruchy chování (např. apatie) a narušení kognitivních funkcí (Chaudhuri a Schapira, 2009).

Podobně jako u schizofrenie, také u PD hraje narušení dopaminergní neurotransmise výraznou roli v patogenezi onemocnění. Konkrétně dochází k odumírání dopaminergních neuronů v pars compacta černé substance a hromadění Lewyho tělísek (neuronálních inkluzí obsahujících amorfni hmotu a proteiny cytoskeletu) uvnitř neuronů. Vzhledem k tomu, že hladina dopaminu ve striatu je při onemocnění PD značně snižena, současná farmakoterapie je zaměřena hlavně na posílení dopaminergního přenosu (Meissner et al., 2011). Podávání prekursoru dopaminu zvaného levodopa je standardním léčebným opatřením u pacientů s PD, ale v dlouhodobém měřítku má vedlejší účinky spočívající v kolísání stavu hybnosti a mimovolních pohybech, což mimo jiné souvisí s krátkým poločasem života levodopy (Fox a Lang, 2008; Olanow et al., 2009).

K patogenezi PD výrazně přispívá i degenerace cholinergních neuronů v mozku. Dokonce bylo pozorováno, že může být ještě většího rozsahu než u Alzheimerovy choroby (Bohnen et al., 2003). Narušení cholinergní neurotransmise má u nemocných PD četné následky, ke kterým kromě jiného patří kognitivní nedostatky, neboť u přibližně třech čtvrtin pacientů, kteří žijí s touto nemocí déle než 10 let, se rozvinou příznaky demence (Aarsland a Kurz, 2010). Je rovněž dobře známo, že dopaminergní a cholinergní systémy v mozku spolu úzce funkčně souvisí. Ztráta dopaminergní inervace striata vede ke zvýšení hladiny acetylcholinu v této části mozku, což přispívá k rozvoji problémů s motorikou (Barbeau, 1962).

Cholinomimetiky vyvolaný třes čelistí u hlodavců se využívá jako model klidového třesu typického pro PD. Myši s vyřazenými M_4 receptory vykazují výrazně menší třes čelistí (Salamone et al., 2001). Kromě toho tropicamid, antagonist muskarinových receptorů do jisté míry selektivní pro M_4 podtypy inhibuje třesavé pohyby čelistí u hlodavců (Betz et al., 2007). Zdá se tedy, že antagonisté nebo negativní alosterické modulátory M_4 receptorů by se mohli potenciálně využívat pro zmírnění třesu u lidí s PD. A agonisté M_1 receptorů by zase mohli přispět ke zmírnění

kognitivních nedostatků, které Parkinsonovu chorobu rovněž provází. Důležitost selektivního ovlivnění muskarinových receptorů potvrzuje i zjištění, že dlouhodobé podávání muskarinových antagonistů pro snížení motorických symptomů při léčení PD způsobuje výrazný nárůst amyloidových plaků a neurofibrilárních klubíček, které jsou typické pro AD (Perry et al., 2003).

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

1. Zjistit, jaké jsou rozdíly v okamžitých a dlouhodobých účincích xanomelinu na jednotlivé podtypy muskarinových receptorů.
2. Objasnit, jak ortosterický antagonist NMS ovlivňuje vznik neodmyvatelné vazby xanomelinu na muskarinové receptory a jaký vliv má na účinky neodmyvatelně navázaného xanomelinu.
3. Porovnat kinetiku tvorby neodmyvatelné vazby xanomelinu na jednotlivých podtypech muskarinových receptorů a účinky neodmyvatelné vazby xanomelinu na počet receptorů v membráně.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Buněčná kultura

Fibroblasty z vaječnicků zlatého křečka (CHO cells; Chinese hamster ovary cells) stabilně exprimující jednotlivé podtypy lidských mAChR jsme získali z Missouri S&T cDNA Resource Center (Rolla, MO, USA). Buňky jsme pěstovali v médiu dle Eagla v Dulbeccově modifikaci (DMEM; Dulbecco's modified Eagle medium; Sigma-Aldrich, Česká republika) obohaceném 10% fetálním telecím sérem (Biochrom GmbH, Berlín, Německo) a 0,005% selekčním antibiotikem geneticinem (G418, TOKU-E B.V., Rotterdam, Nizozemí). Na mikrofluorimetrické pokusy jsme nasadili přibližně 250 000 buněk na mikroskopická sklíčka s průměrem 24 mm (Karl Hecht KG, Sondheim, Německo) v 30mm Petriho miskách (Corning, Baria s.r.o., Česká republika) obsahujících 3 ml DMEM a nechali růst 3 dny. Pro vazebné pokusy jsme nasadili do šestijamkových destiček (průměr jamky 34 mm) 100 000 buněk do každé jamky, přidali 3 ml DMEM a nechali růst 4 dny.

3.2 Chemikálie

Plazmid obsahující cDNA pro lidský G-protein G_{16} potřebný na přechodnou transfekci byl od společnosti Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Ostatní látky na přechodnou transfekci (OptiMEM® a Lipofectamine) jsme zakoupili u GibcoBRL (Gaithersburgh, MD, USA). Fura 2-AM na mikrofluorimetrická měření byla od firmy Molecular Probes-Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Fura 2-AM jsme rozpustili v dimetylsulfoxidu (DMSO; Sigma, St. Louis, MO, USA) na koncentraci 2 mM a smíchali v poměru 1:1 s 20% detergentem Pluronic P68 (Sigma-Aldrich, Česká republika). Modifikovaný Krebsův roztok (Krebsův HEPES pufr, KHB; konečné koncentrace v mM: NaCl 138; KCl 4; CaCl₂ 1,3; MgCl₂ 1; NaH₂PO₄ 1,2; HEPES 20; glukóza 10; pH 7,4) s 1mM probenecidem nebo bez probenecidu (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Německo) jsme používali na promývání buněk. Ligandy muskarinových receptorů karchol a N-metylskopolamin jsme zakoupili u společnosti Sigma (St. Louis, MO, USA) a xanomelin u Eli Lilly & Company (Indianapolis, IN, USA). Radioaktivně značený antagonist a metyl[³H]skopolamin ([³H]NMS) byl od firmy Amersham (Little Chalfont, Buckinghamshire, Spojené království). Tyto ligandy jsme rozpouštěli přímo v KHB, pokud není uvedeno jinak.

3.3 Přejchodná transfekce

Za účelem přechodného vnesení dodatečné genetické informace do CHO buněk jsme využili tzv. lipofekci (Felgner et al., 1987). Spočívá v zavedení genetického materiálu do buňky prostřednictvím liposomů neboli váčků, které snadno splývají s plazmatickou membránou cílové buňky. Použili jsme kationtový lipid Lipofectamine, který nukleové kyselině umožňuje prostoupit plazmatickou membránou do cytoplazmy.

Pro transfekci CHO buněk cDNA pro α -podjednotku lidského G-proteinu G₁₆ jsme (při použití šestijamkové destičky) rozpustili 5 μ g cDNA v 2,5 ml OptiMEM® a současně jsme rozpustili 50 μ l Lipofectaminu ve 2,5 ml OptiMEM®. Po 5 minutách občasného promíchávání jsme spojili oba roztoky dohromady (konečná koncentrace byla 1 μ g cDNA a 10 μ l Lipofectaminu na 1 ml roztoku), promíchali a inkubovali 20 minut při pokojové teplotě za občasného míchání. Mezitím jsme z jamek s buňkami odsáli DMEM a omyli buňky sterilním PBS (izotonický roztok NaCl s fosfátovým pufrém; Phosphate Buffered Saline). Poté jsme do každé jamky k buňkám přidali 0,8 ml směsi cDNA a Lipofectaminu. Následovala šestihodinová inkubace při 37 °C a po uplynutí této doby jsme do všech jamek napipetovali 2 ml ohřátého DMEM. Po 48 hodinách byly buňky připravené na pokus.

3.4 Stanovení koncentrace nitrobuněčného vápníku rychlou mikrofluorimetrií

Koncentraci nitrobuněčných vápenatých iontů v živých buňkách lze měřit pomocí fluorescenčních sond, mezi něž patří i Fura 2 (Grynkiewicz et al., 1985) použitá i v mé dizertační práci. Vlastní měření je založeno na schopnosti sondy měnit excitační spektrum v závislosti na tom, je-li volná nebo váže vápenaté ionty. Vzorek je střídavě excitován světlem o vlnové délce 340 nm, při které má maximum excitace Fura 2 vázající vápenaté ionty, a světlem o vlnové délce 380 nm, při které má maximum excitace volná Fura 2. Zvyšování poměru intenzity fluorescence naměřené při 510 nm po excitaci při 340 nm ku intenzitě naměřené po excitaci při 380 nm tak odráží zvyšování koncentrace volného vápníku v buňce a naopak.

Fura 2 je nabitá molekula, což s sebou nese fakt, že téměř neprostupuje plazmatickou membránou. Z tohoto důvodu byla vytvořena neutrální forma, která dokáže membránou projít. Označuje se jako Fura 2-AM (acetoxymetyléster), lze ji přidat přímo do média a tím obarvit velké množství buněk najednou.

Mikrofluorimetrická měření jsme prováděli na CHO buňkách trvale exprimujících jednotlivé podtypy muskarinových receptorů, a to 3 nebo 4 dny po nasazení na sklíčka. Abychom docílili dobře měřitelných vápníkových odpovědí i u M_2 a M_4 receptorů, transfekovali jsme buňky trvale exprimující sudé podtypy muskarinových receptorů cDNA pro α -podjednotku lidského G-proteinu G_{16} , jak již bylo popsáno výše. V den pokusu jsme buňky dvakrát omyli KHB a potom předznačovali 5 μ M Furou 2-AM v KHB s přidavkem 1mM Pluronic P68 po dobu 1 hodiny při 37 °C. Po předznačení jsme buňky opět dvakrát omyli KHB a vložili do promývací komůrky připevněné ke stolku invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX-90. Trubičku aplikačního systému pro superfusi médiem, který umožňuje rychlou výměnu médií (Dittert et al., 2006), jsme umístili na okraj zorného pole a odsávací trubičku na jeho protilehlý okraj. Měření jsme prováděli při teplotě místnosti klimatizované na 27 °C. Mikroskop byl propojen přes CCD kameru k počítači vybavenému softwarem Metafluor 2.0 (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Německo) určenému ke snímání obrazu a jeho analýze. Pro snímání jsme používali kostku s excitačním filtrem s úzkým pásmem propustnosti (330–385 nm) a širokopásmovým (≥ 420 nm) emisním filtrem. Excitační vlnové délky na monochromátoru jsme nastavili na 340 nm a 380 nm. Každou dvojici (pár) obrázků (po excitaci 340 nm a 380 nm) jsme snímali celkem 200 ms s frekvencí 2 párů obrázků za sekundu, pokud není uvedeno jinak. Vždy jsme uložili obraz celého zorného pole a analyzovali jednotlivé buňky až po skončení měření. Nejtmaší oblast neobsahující žádné buňky jsme brali jako pozadí fluorescence a odečetli ho od všech naměřených hodnot.

V našich pokusech jsme použili celkem tři schémata měření hladiny nitrobuněčného vápníku. První schéma mělo za cíl ukázat rozdíly v dlouhodobých účincích xanomelinu po krátkém vystavení jednotlivých podtypů mAChR tomuto agonistovi. Nejprve jsme provedli kontrolní stimulaci 300nM karcholem trvajícím 5 s. Po 3 minutách promývání KHB jsme buňky stimulovali 10 μ M xanomelinem, a to 1, 3 nebo 10 minut. Následně jsme sledovali změny hladiny nitrobuněčného vápníku v nepřítomnosti xanomelinu po dobu 1 hodiny. Na samotném konci měření jsme ještě jednou aplikovali 300nM karchol na 5 s. Kontrolní pokusy s lehce pozměněným schématem jsme provedli, abychom zjistili rozdíly v účincích neodmyvatelně vázaného xanomelinu a klasických agonistů karcholu, oxotremorinu a pilokarpinu. V těchto měřeních jsme nejprve stimulovali receptory 300nM karcholem a poté buňky 3 minuty promývali KHB. Poté jsme 1 hodinu aplikovali 1 μ M karchol,

1 μ M oxotremorin nebo 3 μ M pilokarpin a následně jsme buňky promývali 30 minut samotným KHB. Krátce před koncem pokusu jsme opět provedli kontrolní 10s stimulaci 300nM karbacholem.

Druhé měřicí schéma mělo za cíl studovat účinky antagonisty NMS na opožděnou odpověď receptorů na (neodmyvatelně navázaný) xanomelin. Po kontrolní 5s stimulaci 300nM karbacholem jsme buňky 5 minut promývali KHB a potom je 20 s stimulovali 10 μ M xanomelinem. Po opětovném dvouminutovém promývání KHB jsme buňky na 2 minuty vystavili 10 μ M NMS a následně ještě 4 minuty promývali KHB.

Třetí schéma bylo zaměřené na účinky antagonisty NMS na okamžitou odpověď receptorů na xanomelin a na aktivaci receptorů neodmyvatelně navázaným xanomelinem. Po počáteční kontrolní stimulaci 300nM karbacholem (10 s) jsme buňky exprimující M₁–M₄ receptory promývali 5 minut KHB a poté na ně aplikovali 10 μ M NMS po dobu 3 minut. Během druhé minuty aplikace NMS jsme do média přidali navíc na 1 minutu 10 μ M xanomelin. Nakonec jsme buňky 3 minuty promývali samotným KHB. V případě buněk exprimujících M₅ receptory jsme použili modifikovanou verzi tohoto schématu, protože se xanomelin na M₅ receptorech chová výrazně odlišným způsobem. Nejprve jsme provedli kontrolní 5s stimulaci 300nM karbacholem. Po kontrolní stimulaci jsme buňky 5 minut promývali KHB, poté jsme aplikovali 10 μ M NMS na 1 minutu, potom 10 minut současně s NMS ještě 10 μ M xanomelin a nakonec opět pouze 10 μ M NMS na 1 minutu. Nakonec jsme buňky promývali samotným KHB po dobu 1 hodiny a potom ještě aplikovali 300nM karbachol na 5 s.

3.5 Stanovení hustoty a vazebných vlastností muskarinových receptorů v membránách

Změny počtu muskarinových receptorů v buněčných membránách vyvolané působením xanomelinu jsme zjišťovali v saturačních vazebných pokusech pomocí radioaktivně značeného antagonisty muskarinových receptorů [³H]-NMS. Saturační vazebné pokusy umožňují určit počet vazebných míst v membráně (maximální vazbu, B_{MAX}) a afinitu značeného ligandu k receptoru (rovnovážnou disociační konstantu, K_D), jejichž změny mohou nastávat následkem interakcí ortosterického vazebného místa s neodmyvatelně navázaným xanomelinem.

Pro vazebné pokusy jsme nasadili 100 000 buněk exprimujících jednotlivé podtypy muskarinových receptorů do všech jamek v šestijamkové destičce s 3 ml DMEM. Čtvrtý den po nasazení jsme buňky uvolnili z jednotlivých jamek trypsinizací, přidali k nim 1 ml KHB a poté inkubovali buď v KHB obsahujícím 10 μM xanomelin (1, 3 nebo 10 minut při teplotě místnosti) nebo v KHB obsahujícím 1 μM karbachol, 1 μM oxotremorin či 3 μM pilokarpin (10 minut taktéž při teplotě místnosti). Kontrolní buňky jsme inkubovali pouze v KHB, bez agonistů. Po uplynutí doby inkubace jsme buňky stočili (5 minut při 200 g a 4 °C v chlazené mikrocetřifuze) a odstranili supernatant. Poté jsme je ještě třikrát opláchli vychlazeným KHB za stejných podmínek, abychom dobře odmyli agonisty předtím přítomné v médiu. Následně jsme buňky inkubovali 10 minut nebo 1 hodinu v čistém KHB při teplotě místnosti. Po této inkubaci jsme buňky zchladili na ledu a připravili z nich membrány. Buňky jsme smíchali s 1 ml ledově vychlazeného homogenizačního média (100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM EDTA, 20mM Na-HEPES, pH 7,4) a homogenizovali na ledu pomocí homogenizátoru Ultra-Thurrax (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen, Německo) dvěma 30sekundovými pulzy s 30sekundovou pauzou při maximální rychlosti. Homogenáty jsme centrifugovali 5 minut při 1000 g a 4 °C, abychom odstranili jádra. Výsledný supernatant jsme centrifugovali 30 minut při 30 000 g a 4 °C. Supernatant jsme odstranili, peletu jsme znovu resuspendovali v 1 ml KHB a opakovali centrifugaci za stejných podmínek. Membrány (50 μg proteinů na vzorek) jsme inkubovali 1 hodinu s [³H]NMS v konečné koncentraci 60 pM až 4 nM při 30 °C v destičkách s 96 hlubokými jamkami. Konečný objem byl 0,8 ml. Nespecifickou vazbu jsme stanovovali v přítomnosti 10 μM nezačteného NMS. Inkubaci jsme ukončili rychlou filtrací na přístroji Brandel (Gaithersburgh, MD, USA) přes filtr se skelnými vlákny Whatman GF/C (Little Chalfont, Buckinghamshire, Spojené království). Filtry jsme potom usušili a s použitím topné destičky zahřáté na 105 °C zalili do pevného scintilátoru (scintilačního vosku) Meltilex A (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Zalité filtry jsme nechali vychladnout a následně měřili zachycenou radioaktivitu pomocí scintilačního počítače Microbeta 1450 (Wallac, Turku, Finsko). Maximální vazbu (B_{MAX}) jsme korigovali vzhledem k obsahu proteinů ve vzorcích.

3.6 Stanovení proteinů

Obsah proteinů ve vzorcích jsme stanovovali spektrofotometricky Lowryho metodou (Lowry et al., 1951) upravenou Petersonem (Peterson, 1977) při 690 nm pomocí čtečky destiček Victor X2 (Wallac, Turku, Finsko).

3.7 Vyhodnocení výsledků

Výsledky mikrofluorimetrických měření jsme zpracovávali v programu Grace (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Izrael; <http://plasmagate.weizmann.ac.il/Grace/>). Výsledky vazebných pokusů jsme nejprve analyzovali v programu OpenOffice Calc (www.openoffice.org) a poté dále zpracovávali prostřednictvím GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistickou analýzu jsme vypracovali s pomocí statistického balíčku R (www.r-project.org).

3.7.1 Mikrofluorimetrická měření

Při vyhodnocování mikrofluorimetrických měření jsme pro další posouzení vybírali pouze ty buňky, které odpověděly na první (kontrolní) stimulaci karbacholem. Z každého pokusu jsme volili 8–12 buněk s nejlepší odpovědí na první stimulaci (vyloučili jsme slabě či pomalu odpovídající buňky nebo buňky s neobvykle dlouho trvající odpovědí). Odlehlé maximální hodnoty odpovědí, hodnoty časů na dosažení maxima odpovědi a časů klesání na původní úroveň jsme posuzovali prostřednictvím mezikvartilového rozpětí (IQR; interquartile range) tak, že hodnoty nižší než $Q1 - 1,5 * IQR$ a vyšší než $Q3 + 1,5 * IQR$ jsme vyloučili jako odlehlé. Vápníkové odpovědi u vybraných buněk jsme zprůměrovali a normalizovali na bazální hladinu vápníku. Průměrnou hodnotu vápníkového signálu z úvodní 10sekundové sekvence před stimulací agonistou jsme brali jako bazální. Dále jsme výsledky vyhodnocovali pomocí programu Grace.

Odpovědi na agonisty jsme hodnotili podle následujícího vztahu:

$$y = 1 + \frac{(E_{MAX} - 1) * x}{EC_{50} + x} \quad (1)$$

kde y je stimulace agonistou při koncentraci x , E_{MAX} je maximální odpověď a EC_{50} je koncentrace agonisty, při které má agonista poloviční účinek.

3.7.2 Vazebné pokusy

Ze závislosti množství specificky navázaného [3H]NMS (vypočítaného jako rozdíl mezi změřenou celkovou vazbou [3H]NMS a vazbou [3H]NMS v přítomnosti nadbytku neznačeného NMS) na jeho koncentraci v médiu jsme pomocí následující rovnice odečetli B_{MAX} a K_D :

$$y = 1 + \frac{B_{MAX} * x}{K_D + x} \quad (2)$$

kde y je specifická vazba [3H]NMS při koncentraci volného [3H]NMS ve výši x .

Přidanou radioaktivitu jsme měřili pro každý pokus pomocí kapalné scintilace a počáteční koncentraci radioligandu jsme stanovili na základě specifické radioaktivity a konečného objemu. Koncentraci volného radioligandu jsme spočítali odečtením koncentrace vázaného radioligandu od koncentrace přidaného radioligandu.

Jako měřítko účinnosti signalizace agonisty, které nezávisí na míře exprese příslušného receptoru, se dá využít afinita G-proteinu pro komplex agonista-receptor označovaná jako K_G . Vycházeli jsme z následujícího vztahu (Lu a Hulme, 1999):

$$K_G = E_{MAX FR} / (1 - E_{MAX FR}) / B_{MAX} \quad (3)$$

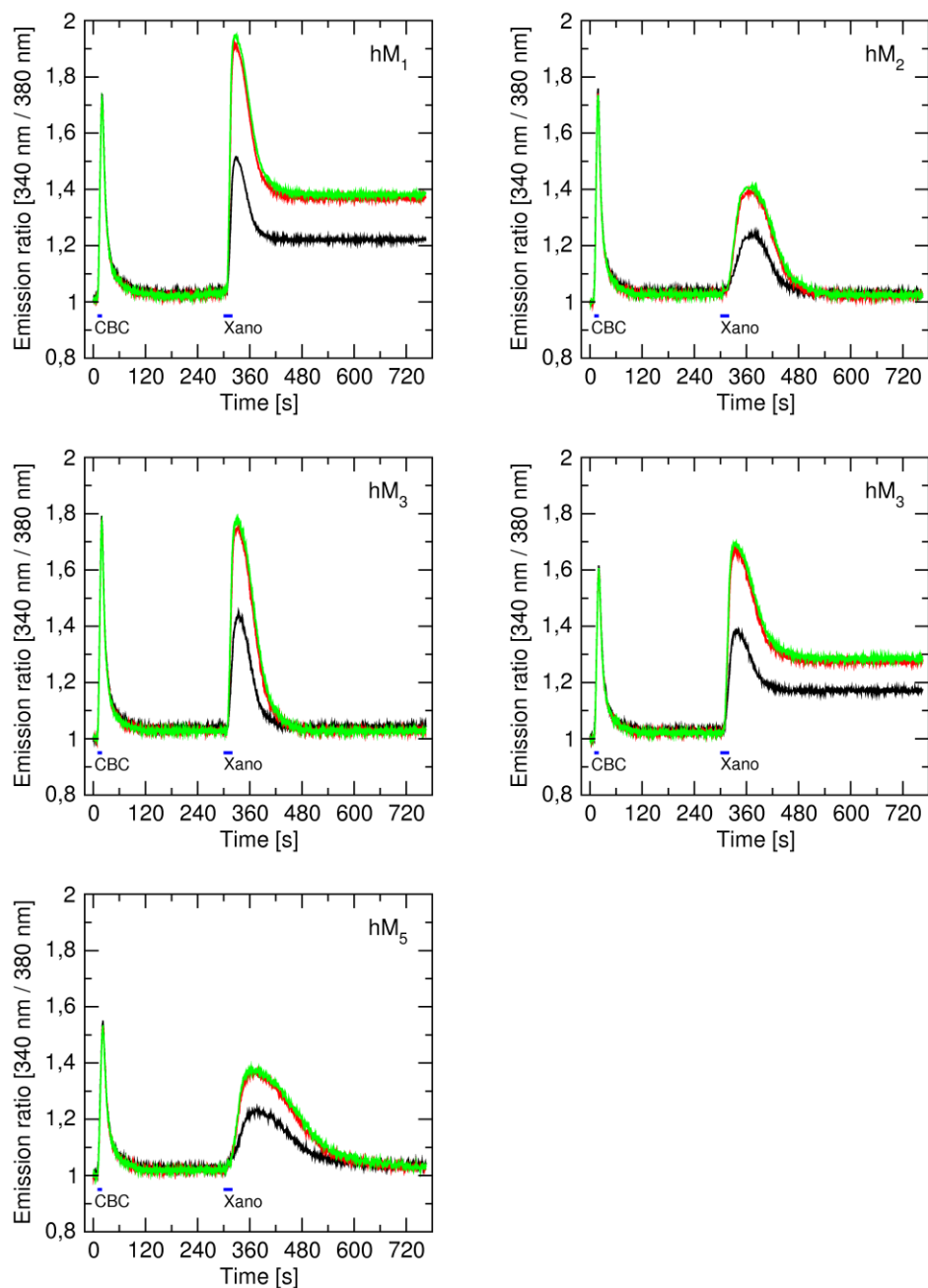
kde $E_{MAX FR}$ je maximální odpověď vypočítaná dle rovnice (1) a vyjádřená jako část E_{MAX} karbacholu ($(E_{MAX \text{ agonista}} - 1) / (E_{MAX \text{ karbachol}} - 1)$) vycházející z měření koncentrace vápníku. B_{MAX} je maximální vazba stanovená pomocí rovnice (2).

4 VÝSLEDKY

4.1 Okamžité a opožděné účinky krátkého působení xanomelinu na hladinu nitrobuňčného vápníku

Abychom mohli studovat krátko- i dlouhodobé účinky xanomelinu na hladinu nitrobuňčného vápníku vyvolané jeho krátkým působením na receptor, provedli jsme sérii mikrofluorimetrických měření na CHO buňkách, které jednotlivě exprimují různé podtypy muskarinového receptoru. Jak již bylo uvedeno, podtypy M_1 , M_3 a M_5 se přednostně spřahují s $G_{q/11}$ G-proteiny, které aktivují fosfolipázu C specifickou pro fosfatidylinositol. Její aktivace vede prostřednictvím uvolněných inositolfosfátů k mobilizaci a vzestupu koncentrace volného nitrobuňčného vápníku. Protože se podtypy M_2 a M_4 preferenčně spřahují s $G_{i/o}$ G-proteiny, které neaktivují signální dráhu fosfolipázy C, transfekovali jsme tyto buňky jeden den před měřením plasmidem kódujícím α -podjednotku G-proteinu G_{16} . Ten je neselektivní co se týče receptorů, se kterými se dokáže spřahovat, a aktivuje stejnou signální dráhu jako $G_{q/11}$ G-proteiny.

Jak xanomelin bezprostředně ovlivňuje hladinu vápníku uvnitř buňky a s jakou potencí a účinností vyvolává vápníkovou odpověď u podtypů muskarinových receptorů, jsme zjišťovali tak, že jsme CHO buňky jednotlivě exprimující všech pět podtypů muskarinových receptorů 20 s stimulovali $10\mu\text{M}$ xanomelinem (a pro kontrolu ještě $0,1\mu\text{M}$ a $1\mu\text{M}$ xanomelinem) a poté promývali KHB. Jako kontrolní jsme použili 5sekundovou stimulaci 300nM karchacholem. Vystavení buněk xanomelinu na 20 s vedlo k přechodnému zvýšení hladiny nitrobuňčného vápníku (Obr. 4.1). V případě M_2 , M_3 a M_5 podtypů se hladina vápníku vrátila na původní úroveň, zatímco po stimulaci M_1 a M_4 podtypů zůstala zvýšená (Obr. 4.1). Xanomelin se vyznačoval shodnou potencí u všech podtypů mAChR (Tab. 4.1), ale výrazně odlišnou výší maximální odpovědi. Maximální odpověď byla nejvyšší u M_1 a nejnižší u M_5 receptorů (Tab. 4.1). Seřadíme-li maximální odpovědi na xanomelin vyjádřené procentuálně vzhledem k maximální odpovědi na plného agonistu karchachol od největší po nejmenší, je pořadí následující: maximální odpověď na xanomelin na podtypu $M_1 > M_4 = M_3 > M_5 > M_2$ (Tab. 4.1). Pořadí afinitních konstant K_G pro komplex xanomelin-receptor vypočtených dle vztahu (3) uvedeného v metodické části bylo: K_G pro $M_1 > M_4 > M_3 > M_5 > M_2$ (Tab. 4.1). V tabulce jsou pro porovnání též uvedeny uvedeny výsledky analogických pokusů, ve kterých byly použity místo xanomelinu agonisté oxotremorin a pilokarpin.



Obrázek 4.1: Vápníková odpověď na akutní působení xanomelinu na jednotlivých podtypech muskarinových receptorů

Po úvodních 10 sekundách snímání jsme buňky 5 s stimulovali 300nM karcholelem (CBC), 5 minut promývali KHB a poté 20 s stimulovali 0,1 (černá křivka), 1 (červená křivka) či 10 μ M xanomelinem (xano; zelená křivka) a následně 7 minut promývali KHB. Průběh změny koncentrace nitrobuňčného vápníku (osa y) je zobrazen jako změna poměru intenzit fluorescence při 340/380 nm. Grafy znázorňují průměrné hodnoty signálu ze 4 nezávislých měření získané z 10–12 buněk.

Mikrofluorimetrická měření vedoucí k objasnění dlouhodobých účinků krátkého působení xanomelinu na hladinu nitrobuňčného vápníku vypadala tak, že jsme CHO buňky exprimující jednotlivé podtypy mAChR vystavili 10 μ M xanomelinu na 1, 3 nebo 10 minut a hladinu vápníku uvnitř buněk jsme poté sledovali po dobu 1 hodiny za

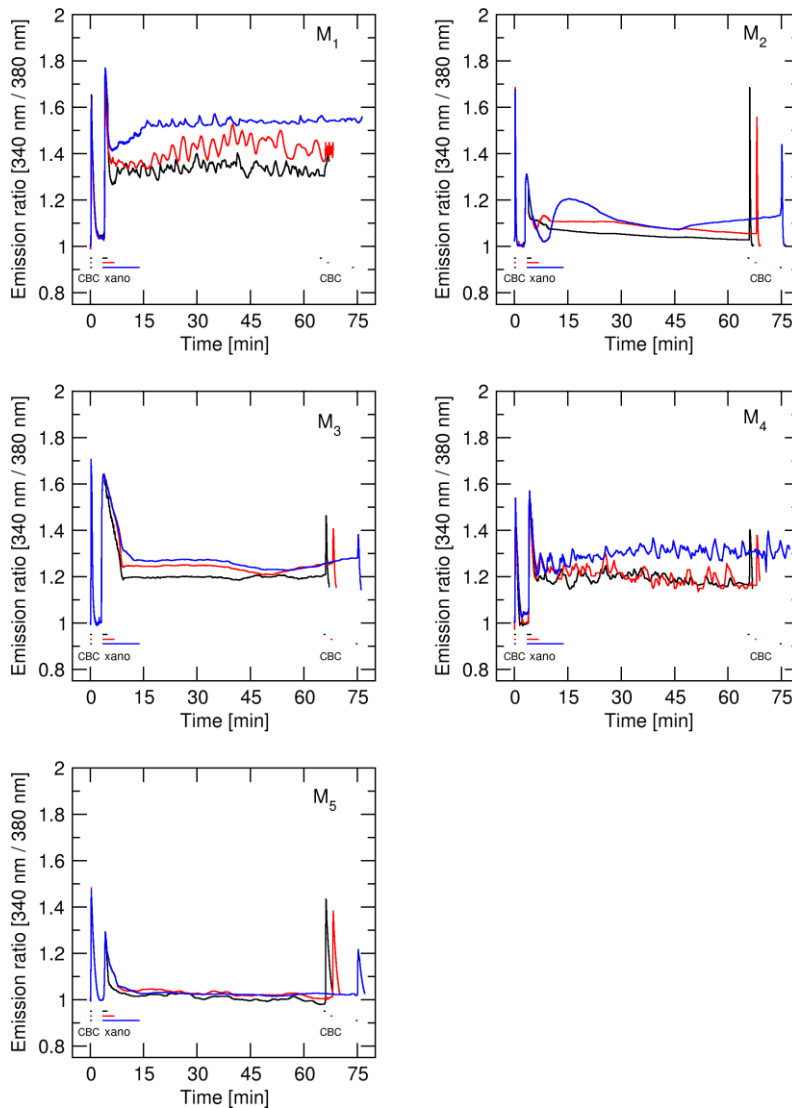
nepřetržitého promývání KHB, aby se dokonale odstranil nenavázaný (volný) xanomelin. Před stimulací xanomelinem a těsně před ukončením měření jsme provedli kontrolní 10sekundové stimulační 300nM karbacholem (Obr. 4.2). Tyto stimulační karbacholem sloužily k označení buněk, které dávají jasnou odpověď, a stanovení schopnosti buněk odpovídat i po aplikaci xanomelinu.

	karbachol		xanomelin		oxotremorin		pilokarpin	
	pEC ₅₀	E _{MAX} [poměr emisí]	pEC ₅₀	E _{MAX} [poměr emisí]	pEC ₅₀	E _{MAX} [poměr emisí]	pEC ₅₀	E _{MAX} [poměr emisí]
M₁	6,92±0,07	2,04±0,08	7,1±0,1	1,94±0,08	7,33±0,06	1,65±0,05	7,02±0,05	1,65±0,05
M₂	6,71±0,05	2,26±0,09	7,1±0,1	1,42±0,04	7,19±0,05	1,71±0,06	6,95±0,07	0,66±0,05
M₃	6,80±0,06	2,20±0,09	7,1±0,1	1,78±0,06	7,33±0,05	1,68±0,06	6,97±0,05	1,68±0,06
M₄	6,65±0,07	2,06±0,08	7,1±0,1	1,70±0,06	7,17±0,06	1,64±0,05	7,15±0,07	1,60±0,05
M₅	6,81±0,05	1,85±0,07	7,1±0,1	1,37±0,04	7,29±0,05	1,62±0,05	7,00±0,05	1,56±0,05
			% E _{MAX} karbacholu [Účinnost]	K _G [Účinnost]	% E _{MAX} karbacholu [Účinnost]	K _G [Účinnost]	% E _{MAX} karbacholu [Účinnost]	K _G [Účinnost]
M₁			90	5,22	63	0,93	63	0,93
M₂			33	0,69	56	1,00	52	0,85
M₃			65	1,06	57	0,75	57	0,74
M₄			66	2,09	60	1,64	57	1,41
M₅			44	0,77	73	2,7	66	1,93

Tabulka 4.1: Potence a účinnost, s jakými agonisté karbachol, xanomelin, oxotremorin a pilokarpin vyvolávají vápníkovou odpověď

Potence je vyjádřena jako záporný logaritmus poloviční účinné koncentrace (pEC₅₀). Maximální hodnota odpovědi E_{MAX} je vyjádřena jako poměr intenzit fluorescence při střídaném buzení vzorku při 340 a 380 nm. Účinnost je vyjádřena procentuálně vzhledem k maximální odpovědi na karbachol a jako konstanta afinity G-proteinu (K_G). Jednotlivé parametry jsme získali dosazením hodnot signálu z jednotlivých pokusů na obr. 1 do rovnice (1) a následně i do rovnice (3) s použitím hodnot z vazebných pokusů (Tab. 4.5). Údaje v tabulce jsou průměrné hodnoty ± S.E.M. (střední chyba průměru; standard error of the mean) ze 3 nezávislých měření.

Podobně jako v předchozí sérii pokusů přinesla první (kontrolní) stimulační 300nM karbacholem okamžité uvolnění vápenatých iontů z intracelulárních zásob u všech podtypů mAChR včetně buněk exprimujících M₂ a M₄ receptory, transfekovaných podjednotkou Gα₁₆. U netransfekovaných M₂ a M₄ buněk byla vápníková odpověď velmi slabá a pomalá (data nejsou součástí výsledků této dizertační práce). Během 3 minut promývání se hladina vápníku vždy vrátila na původní úroveň.



Obrázek 4.2: Průběh změn koncentrace nitrobuňčného vápníku následkem krátkodobého působení xanomelinu na M₁–M₅ podtypy muskarinových receptorů

Po úvodních 10 s snímání (sloužících k zaznamenání klidové koncentrace vápníku) jsme buňky nejprve 10 s stimulovali 300nM karcholem a po jeho odmytí aplikovali 10μM xanomelin na 1 (černá křivka), 3 (červená křivka) nebo 10 minut (modrá křivka). Po 1 hodině promývání KHB jsme buňky opět stimulovali 300nM karcholem. Průběh změn koncentrace nitrobuňčného vápníku (osa y) je zobrazen jako změna poměru intenzit fluorescence při 340/380 nm. Grafy znázorňují průměrné hodnoty signálu z 1 měření (potvrzeného dalšími 5 nezávislými měřeními) získané z 8–12 buněk s nejlepší odpovědí. Charakteristika vápníkových odpovědí je uvedena v tab. 4.2.

Čas potřebný k dosažení maximální odpovědi vyvolané karcholem byl srovnatelný u všech podtypů. Pohyboval se v rozmezí od $6,2 \pm 0,3$ s (M₂ receptor) do $7,9 \pm 0,7$ s (M₅ receptor; Tab. 4.2). Rovněž maximální odpověď se mezi podtypy významně nelišila. Zvýšení hladiny vápníku se pohybovalo v rozmezí $1,47 \pm 0,04$ (v případě M₅ receptoru) až $1,68 \pm 0,09$ násobku (v případě M₃ receptor) bazální úrovně (Obr. 4.2, Tab. 4.2).

Stimulace 10 μ M xanomelinem trvající 1, 3 nebo 10 minut vedla k rychlému zvýšení hladiny nitrobuňčného vápníku na všech podtypech mAChR. Na rozdíl od první (kontrolní) stimulace karchacholem se však rychlost vzestupu hladiny vápníku i hodnota maximální vápníkové odpovědi lišily mezi jednotlivými podtypy mAChR. Odpověď na xanomelin byla nejrychlejší na M₁ receptoru (zvýšení hladiny Ca²⁺ dosáhlo maxima za 9,6 \pm 1,7 s) a nejpomalejší na M₅ podtypu (maxima bylo v tomto případě dosaženo za 39 \pm 6 s). Nejvýrazněji na xanomelin reagoval M₁ receptor, po jehož stimulaci se hladina vápníku zvýšila na 118 \pm 3 % první kontrolní stimulace karchacholem. V případě M₃ a M₄ receptoru dosáhla vápníková odpověď na xanomelin přibližně stejného maxima jako na karchachol (103 \pm 5 %, resp. 92 \pm 6 %). Naproti tomu na M₂ a M₅ receptorech vyvolal xanomelin jen asi poloviční vápníkovou odpověď ve srovnání s karchacholem (Obr. 4.2, Tab. 4.2)

Poté, co hladina vápníku dosáhla svého vrcholu, začala okamžitě klesat navzdory tomu, že xanomelin byl stále přítomen v promývacím médiu. Buňky exprimující M₁, M₃ a M₄ receptory vykazovaly po 1, 3 i 10minutovém působení xanomelinu zvýšenou intracelulární hladinu vápníku i po následném 60minutovém promývání KHB. V případě M₂ receptorů byla pouze 10minutová stimulace xanomelinem dostačující k tomu, aby hladina nitrobuňčného vápníku zůstala zvýšená i po následujícím hodinovém promývání. Co se týče M₅ receptorů, zde se hladina vápníku vrátila na původní hodnotu, ať byla stimulace xanomelinem 1, 3 či 10minutová. Zvýšená hladina vápenatých iontů po stimulaci M₁ a M₄ receptorů se vyznačovala výraznými oscilacemi, které se nevyskytovaly u M₂ či M₃ podtypů (Obr. 4.2).

Druhá kontrolní aplikace 300nM karchacholu trvající 10 s provedená po stimulaci buněk xanomelinem a následném promývání puřrem i tak vedla k rychlé mobilizaci vápenatých iontů u všech podtypů mAChR s výjimkou M₁ (po 1, 3 i 10minutové stimulaci xanomelinem) a M₄ (pouze po 10minutové stimulaci xanomelinem). V těchto případech zůstala hladina vápníku po aplikaci xanomelinu výrazně zvýšená a vykazovala spontánní oscilace. Působení xanomelinu i přes následovné odmytí volného xanomelinu zpomalilo vápníkovou mobilizaci a vedlo k poklesu vápníkového signálu (maximální odpovědi) vyvolaného aplikací karchacholu (Obr. 4.2). Tyto účinky se nejvýrazněji projevovaly u M₃ receptoru, kde čas na dosažení vrcholu odpovědi byl více než dvojnásobný a velikost odpovědi byla přibližně poloviční v porovnání s první stimulací karchacholem.

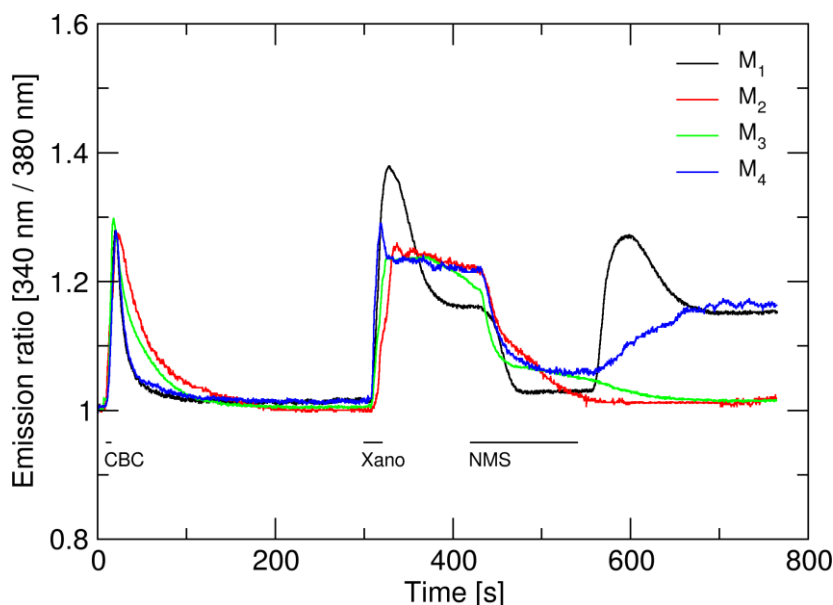
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
první stimulace (300nM CBC)					
čas na dosažení maxima [s]	6,8 ± 0,7	6,2 ± 0,3	6,3 ± 0,7	6,9 ± 0,6	7,9 ± 0,7
maximum [max ₁ ; poměr emisí]	1,64 ± 0,05	1,67 ± 0,07	1,68 ± 0,09	1,53 ± 0,05	1,47 ± 0,04
druhá stimulace (10μM xano)					
čas, na dosažení maxima [s]	9,6 ± 1,7	29 ± 6	13 ± 6	17 ± 3	39 ± 3
maximum [% max ₁]	118 ± 3	45 ± 2	92 ± 6	103 ± 5	58 ± 4
průměrná hodnota klidového signálu v čase 30–60 min. [poměr emisí]					
po 1 min. xano	1,34 ± 0,06*	1,04 ± 0,03	1,20 ± 0,06*	1,18 ± 0,06*	1,01 ± 0,03
po 3 min. xano	1,44 ± 0,12*	1,08 ± 0,05	1,16 ± 0,07*	1,19 ± 0,08*	1,02 ± 0,03
po 10 min. xano	1,53 ± 0,09*	1,09 ± 0,05*	1,18 ± 0,05*	1,31 ± 0,13*	1,03 ± 0,03
třetí stimulace (300nM CBC)					
čas na dosažení maxima [s]					
po 1 min. xano	NA	6,4 ± 0,3	14 ± 1 ^a	7,1 ± 0,6	13 ± 1 ^a
po 3 min. xano	NA	7,4 ± 1,0	14 ± 1 ^a	8,6 ± 0,9	13 ± 1 ^a
po 10 min. xano	NA	7,6 ± 0,3	15 ± 1 ^a	NA	16 ± 1 ^a
maximum [% max ₁]					
po 1 min. xano	NA	99 ± 5	65 ± 4 ^a	74 ± 3 ^a	89 ± 5 ^a
po 3 min. xano	NA	79 ± 4 ^a	59 ± 4 ^a	70 ± 3 ^a	79 ± 4 ^a
po 10 min. xano	NA	61 ± 3 ^a	55 ± 3 ^a	NA	43 ± 2 ^a

Tabulka 4.2: Charakteristika změn koncentrace nitroboněčného vápníku následkem krátkodobého působení xanomelinu na jednotlivé podtypy muskarinových receptorů
Hodnoty v tabulce charakterizují dlouhodobé účinky xanomelinu na hladinu nitroboněčného vápníku po stimulaci jednotlivých podtypů muskarinových receptorů xanomelinem. NA znamená, že jsme nezaznamenali příslušnou odpověď, symbolem * jsou označeny statisticky významné rozdíly oproti bazální hladině vápníku, symbolem ^a jsou označeny statisticky významné rozdíly druhé a první kontrolní stimulace karbacholem (p<0,05, Dunnettův test). Hodnoty vápníkového signálu jsou vyjádřeny jako poměr emisí při střídavém buzení vzorku při 340/380 nm. Hodnoty v tabulce jsou průměry ± S.E.M ze 6 nezávislých měření.

4.2 Účinek blokády ortosterického vazebného místa muskarinových receptorů na hladinu vápenatých iontů zvýšenou působením xanomelinu

Abychom zjistili, jak zablokování klasického (ortosterického) vazebného místa ovlivní účinky už utvořené neodmyvatelné vazby xanomelinu na jednotlivé podtypy muskarinových receptorů, použili jsme ortosterického antagonistu NMS. Před samotným měřením účinků NMS na hladinu vápníku zvýšenou neodmyvatelně

navázaným xanomelinem (Obr. 4.3) jsme provedli kontrolní stimulaci 300nM karchacholem trvající 5 s. Po 5 minutách promývání KHB jsme buňky 20 s stimulovali 10 μ M xanomelinem a ten potom 2 minuty odmyvali KHB. Poté jsme na 2 minuty přidali do média 10 μ M NMS a opět odmyli samotným pufrem, abychom viděli účinky xanomelinu již navázaného na jednotlivé podtypy mAChR neodmyvatelnou vazbou.



Obrázek 4.3: Účinky NMS na opožděný vzestup hladiny nitrobuněčného vápníku vyvolaný krátkým působením xanomelinu na M₁–M₄ muskarinové receptory

Po úvodních 10 s snímání jsme provedli kontrolní stimulaci 300nM karchacholem trvající 5 s a poté buňky 5 minut promývali KHB. Následně jsme 20 s aplikovali 10 μ M xanomelin a po jeho odmytí (tj. po 2 minutách od ukončení jeho aplikace) jsme do média na 2 minuty přidali 10 μ M NMS. Poté jsme buňky ještě 4 minuty promývali KHB. Průběh změn koncentrace nitrobuněčného vápníku (osa y) je zobrazen jako změna poměru intenzit fluorescence při 340/380 nm. Graf znázorňuje průměrné hodnoty signálu z 1 měření (potvrzeného dalšími 5 nezávislými měřeními) získané z 8–12 buněk s nejlepší odpovědí. Charakteristika vápníkových odpovědí je uvedena v Tab. 4.3.

Po aplikaci 10 μ M NMS klesla hladina nitrobuněčného vápníku, která byla zvýšená po stimulaci xanomelinem (a následném promývání), na bazální úroveň u všech čtyř studovaných podtypů mAChR (M₅ podtyp jsme nesledovali, neboť u tohoto podtypu docházelo po aplikaci xanomelinu k návratu k bazálním hodnotám, Obr. 4.2). Poté, co jsme NMS z média odstranili, hladina vápníku opět vzrostla v případě M₁ a M₄ receptorů, ale ne u M₂ a M₃ receptorů. U M₁ receptorů bylo možné pozorovat "přestřelení" vápníkového signálu (Obr. 4.3) a čas potřebný k dosažení maxima po odmytí NMS byl u M₁ podtypu několikanásobně kratší než u M₄ podtypu (Obr. 4.3, Tab. 4.3).

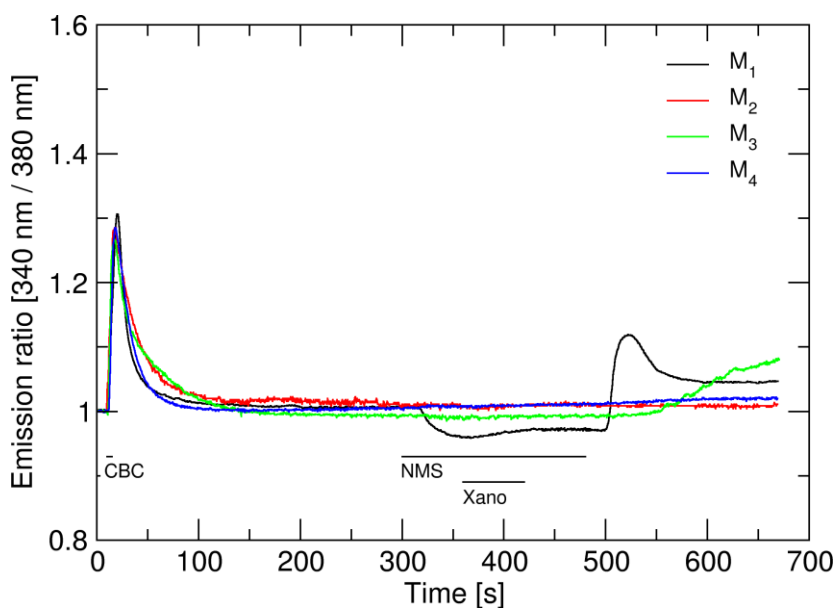
	M₁	M₂	M₃	M₄
první stimulace (300nM CBC)				
čas na dosažení maxima [s]	4,4 ± 1,1	6,2 ± 0,8	4,0 ± 1,1	5,8 ± 0,9
maximum [max ₁ ; poměr emisí]	1,28 ± 0,05	1,27 ± 0,07	1,29 ± 0,05	1,27 ± 0,12
druhá stimulace (10μM xano)				
čas na dosažení maxima [s]	14 ± 5	29 ± 7	15 ± 6	14 ± 3
maximum [% max ₁]	128 ± 9	98 ± 2	99 ± 3	96 ± 6
aplikace 10μM NMS				
inhibiční účinek NMS (%)	98 ± 2	99 ± 1	100 ± 3	92 ± 3
čas na dosažení maxima po odstranění NMS [s]	46 ± 8	NA	NA	136 ± 7
maximum [max ₂ ; poměr emisí]	1,24 ± 0,05*	1,05 ± 0,06	1,00 ± 0,02	1,12 ± 0,02*

Tabulka 4.3: Charakteristika změn hladiny nitrobuňčného vápníku vyvolaných stimulací M₁–M₄ muskarinových receptorů xanomelinem a účinků antagonisty NMS na jejich opožděnou aktivaci

Hodnoty v tabulce charakterizují změny hladiny nitrobuňčného vápníku vyvolané xanomelinem v buňkách exprimujících M₁–M₄ muskarinové receptory a účinky antagonisty NMS na jejich opožděnou aktivaci. NA znamená, že jsme nezaznamenali vzestup hladiny nitrobuňčného vápníku po odstranění NMS, symbolem * jsou označeny statisticky významné rozdíly oproti bazální hladině vápníku ($p < 0,05$, t-test, hodnoty z jednotlivých měření jsou spárované). Hodnoty vápníkového signálu jsou vyjádřeny jako poměr emisí při střídavém buzení vzorku při 340/380 nm. Hodnoty v tabulce jsou průměry ± S.E.M ze 6 nezávislých měření.

4.3 Vliv NMS na vznik neodmyvatelné vazby xanomelinu

V další skupině mikrofluorimetrických měření jsme zjišťovali, zda vznik neodmyvatelné vazby a následná aktivace receptoru neodmyvatelně navázaným xanomelinem vyžaduje interakci xanomelinu s ortosterickým vazebným místem. Po 5minutovém promývání následujícím po 5sekundové stimulaci 300nM karcholem jsme buňky promývali 10μM NMS po dobu 3 minut. Během druhé minuty aplikace NMS jsme do média přidali 10μM xanomelin na 1 minutu, takže doba jeho působení na buňky společně s NMS (k zabránění interakce xanomelinu s ortosterickým vazebným místem) byla 1 minuta (Obr. 4.4, Tab. 4.4).



Obrázek 4.4: Účinky NMS na nástup aktivace M_1 – M_4 muskarinových receptorů neodmyvatelně navázaným xanomelinem

Po úvodních 10 s snímání jsme provedli kontrolní stimulaci 300nM karbacholem trvající 5 s a poté buňky 5 minut promývali KHB. Následně jsme celkem 3 minuty blokovali receptory 10 μ M NMS s tím, že během druhé minuty aplikace NMS jsme receptory současně stimulovali 10 μ M xanomelinem. Poté jsme buňky ještě 3 minuty promývali KHB. Průběh změn koncentrace nitrobuňčného vápníku (osa y) je zobrazen jako změna poměru intenzit fluorescence při 340/380 nm. Graf ukazuje průměrné hodnoty signálu z 1 měření (potvrzeného ještě 5 až 7 nezávislými měřeními) získané z 8–12 buněk s nejlepší odpovědí. Charakteristika vápníkových odpovědí je uvedena v Tab. 4.4.

NMS snížil bazální hladinu vápníkového signálu v buňkách exprimujících M_1 receptory o 4,5 % (Obr. 4.4), ale u ostatních podtypů mAChR k podobné změně nedošlo. Xanomelin aplikovaný současně s NMS se nevyznačoval žádným okamžitým účinkem na hladinu vápníku v buňkách u žádného z podtypů. Ovšem odmytí NMS (buňky byly po ukončení aplikace NMS promývány už jen samotným KHB; Obr. 4.4) vedlo ke vzrůstu hladiny vápníku v buňkách exprimujících M_1 a M_3 receptory. Dá se tedy říci, že NMS nezabránil vzniku neodmyvatelné vazby xanomelinu na těchto dvou podtypech a odstranění NMS z média odhalilo, že je receptor aktivován neodmyvatelně navázaným xanomelinem. Stejný postup použitý na buňky exprimující M_2 , resp. M_4 receptory ukázal, že se u těchto podtypů po odmytí NMS neobjevuje ani náznak možné aktivace neodmyvatelně navázaným xanomelinem. NMS tedy bránil xanomelinu aktivovat M_2 a M_4 receptory neodmyvatelnou vazbou, ale nečinil tak u M_1 ani M_3 podtypů.

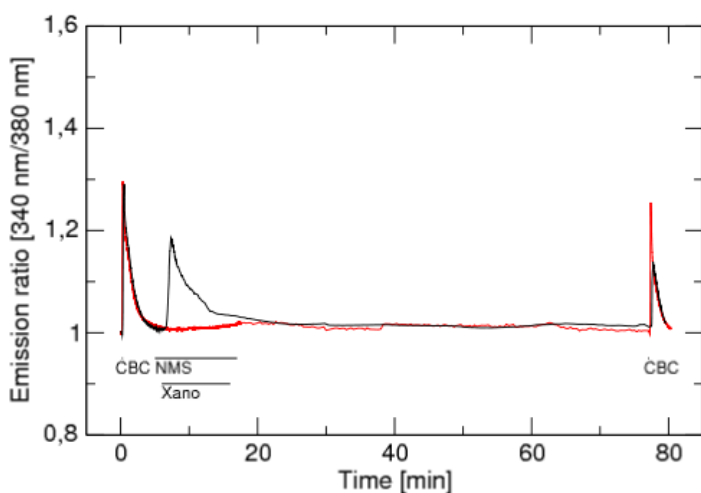
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
první stimulace (300nM CBC)				
čas na dosažení maxima [s]	4,4 ± 0,3	5,6 ± 1,1	4,5 ± 0,6	5,8 ± 1,3
maximum [max ₁ ; poměr emisí]	1,29 ± 0,05	1,28 ± 0,07	1,29 ± 0,09	1,34 ± 0,09
druhá stimulace (10μM xano + 10μM NMS)				
inhibiční účinek NMS [s]	4,5 ± 0,3*	NA	NA	NA
čas na dosažení maxima po odstranění NMS [s]	27 ± 3	NA	240 ± 38	NA
maximum [max ₂ ; poměr emisí]	1,12 ± 0,03*	1,03 ± 0,01	1,09 ± 0,02*	1,04 ± 0,02

Tabulka 4.4: Charakteristika změn hladiny nitrobuněčného vápníku vyvolaných stimulací M₁–M₄ muskarinových receptorů xanomelinem v přítomnosti antagonisty NMS

Hodnoty v tabulce charakterizují účinky NMS na tvorbu neodmyvatelné vazby na M₁–M₄ podtypech muskarinových receptorů. NA znamená, že jsme nezaznamenali pokles hladiny vápníku po aplikaci NMS nebo její vzestup po odstranění NMS, symbolem * jsou označeny statisticky významné rozdíly oproti bazální hladině vápníku ($p < 0,05$, Dunnettův test). Hodnoty vápníkového signálu jsou vyjádřeny jako poměr emisí při střídavém buzení vzorku při 340/380 nm. Hodnoty v tabulce jsou průměry ± S.E.M. ze 6–8 nezávislých měření.

4.4 Vliv NMS na tvorbu a účinky neodmyvatelné vazby xanomelinu na M₅ receptoru

Účinků antagonisty NMS na xanomelin navázaný neodmyvatelně na M₅ receptoru se týkala zvláštní skupina pokusů, protože působení xanomelinu nevedlo u M₅ receptoru k dlouhodobému zvýšení hladiny nitrobuněčného vápníku za žádné z použitých podmínek. Po kontrolní stimulaci 300nM karbacholem trvající 5 s a 5 minutách promývání KHB jsme k buňkám přidali NMS a xanomelin stejným způsobem jako v předchozí skupině pokusů až na to, že společná přítomnost xanomelinu a NMS byla prodloužena na 10 minut. Buňky jsme poté promývali KHB po dobu 1 hodiny a stimulovali 300nM karbacholem 5 s (Obr. 4.5). Druhá stimulace karbacholem přinesla lehce menší a pomalejší odpověď ve srovnání s odpovědí na kontrolní (první) stimulaci karbacholem. Vzhledem k tomu, že neodmyvatelná vazba xanomelinu má na M₅ receptor v nepřítomnosti NMS výrazné antagonistické účinky se zdá, že NMS brání xanomelinu v tomto působení na M₅ receptor.



Obrázek 4.5: Účinky NMS na působení neodmyvatelně vázaného xanomelinu na M_5 podtypu muskarinových receptorů

Červenou barvu má vlastní měření, kdy jsme nejprve po úvodních 10 s snímání provedli kontrolní stimulaci 300nM karchacholem trvající 5 s a poté buňky 5 minut promývali KHB. Následně jsme celkem 13 minut blokovali receptory 10 μ M NMS s tím, že během 2.–12. minuty aplikace NMS jsme receptory současně stimulovali 10 μ M xanomelinem. Poté jsme buňky 60 minut promývali KHB a nakonec provedli kontrolní stimulaci 300nM karchacholem. Černou barvou je vyobrazeno kontrolní měření se stejným průběhem s výjimkou aplikace NMS. Průběh změn koncentrace nitrobuněčného vápníku (osa y) je zobrazen jako změna poměru intenzit fluorescence při 340/380 nm. Graf znázorňuje průměrné hodnoty signálu z 1 měření (potvrzeného dalšími 5 nezávislými měřeními) získané z 8–12 buněk s nejlepší odpovědí.

4.5 Vliv xanomelinu na počet membránových receptorů

Počet membránových receptorů jsme měřili pomocí saturačních vazebných pokusů s využitím radioaktivně značeného antagonisty muskarinových receptorů [3 H]NMS. Parametry získané v těchto pokusech (maximální vazba B_{MAX} a rovnovážná disociační konstanta K_D) jsou uvedeny v Tab. 4.5 a 4.6. Vazbu [3 H]NMS jsme měřili opět na jednotlivých podtypech mAChR v membránách připravených z CHO buněk, které byly vystaveny xanomelinu 1, 3 nebo 10 minut. Abychom dosáhli podmínek podobných těm z mikrofluorimetrických měření, inkubovali jsme buňky v KHB ještě 10 minut, resp. 1 hodinu po skončení aplikace xanomelinu.

Působení xanomelinu vedlo ke snížení afinity [3 H]NMS ke všem podtypům mAChR za všech námi vytvořených podmínek (Tab. 4.6). Xanomelinem vyvolaný pokles afinity [3 H]NMS byl nejrozsáhlejší na M_4 receptoru (25násobný pokles po 10minutovém působení xanomelinu) a nejmenší na M_2 receptoru (2,5násobné snížení). Naproti tomu 10minutové působení 1 μ M karchacholu, 1 μ M oxotremorinu či 3 μ M pilokarpinu se nevyznačovalo žádným účinkem na afinitu [3 H]NMS u žádného z podtypů mAChR (Tab. 4.6), ale snížilo počet membránových receptorů (Tab. 4.5). Karchachol způsobil pokles počtu membránových receptorů o 20 % v případě buněk

exprimujících M₅ podtypy, o 25 % u buněk obsahujících M₁, resp. M₃ receptory a dokonce o 40 % v případě buněk exprimujících M₂ a M₄ podtypy.

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
10minutové promývání					
bez agonisty	1,80±0,03	1,29±0,03	1,75±0,03	0,928±0,023	0,998±0,021
xano (1 min.)	1,73±0,12	1,29±0,03	1,78±0,05	0,890±0,023	0,969±0,005
xano (3 min.)	1,86±0,12	1,34±0,02	1,79±0,09	0,898±0,097	0,973±0,035
xano (10 min.)	1,76±0,09	1,29±0,03	1,69±0,05	0,979±0,055	0,966±0,047
karbachol	1,34±0,02*	0,746±0,036*	1,34±0,01*	0,561±0,016*	0,802±0,012*
oxotremorin	1,54±0,12*	0,631±0,029*	1,46±0,02*	0,672±0,038*	0,833±0,035*
pilokarpin	1,64±0,02*	1,11±0,03*	1,62±0,02*	0,815±0,035*	0,941±0,013*
1hodinové promývání					
bez agonisty	1,58±0,03 ^b	1,22±0,02 ^b	1,55±0,03 ^b	0,775±0,021 ^b	0,857±0,012 ^b
xano (1 min.)	1,58±0,07 ^b	1,23±0,05 ^b	1,60±0,03 ^b	0,818±0,033	0,866±0,014 ^b
xano (3 min.)	1,64±0,05 ^b	1,22±0,05 ^b	1,46±0,07 ^b	0,760±0,057 ^b	0,843±0,040 ^b
xano (10 min.)	1,54±0,03 ^b	1,20±0,05 ^b	1,61±0,03 ^b	0,766±0,009 ^b	0,862±0,012 ^b
karbachol	1,31±0,02*	0,696±0,009 ^{*b}	1,21±0,02 ^{*b}	0,460±0,007 ^{*b}	0,661±0,007 ^{*b}
oxotremorin	1,54±0,09	1,11±0,05 ^{*b}	1,36±0,12*	0,722±0,039	0,827±0,021
pilokarpin	1,60±0,09	1,16±0,03 ^{*b}	1,58±0,07	0,761±0,029	0,838±0,035

Tabulka 4.5: Maximální vazba radioaktivně značeného antagonisty [³H]NMS na M₁–M₅ receptory vystavené působení agonistů xanomelinu, karbacholu, oxotremorinu či pilokarpinu

Hodnoty v tabulce udávají maximální specifickou vazbu [³H]NMS (B_{MAX} v pmol/mg proteinu) na M₁–M₅ receptory jednotlivě exprimované v CHO buňkách, které jsme jako intaktní vystavili 10μM xanomelinu (na 1, 3 nebo 10 minut) nebo na 10 minut 1μM karbacholu, 1μM oxotremorinu či 3μM pilokarpinu. Na kontrolní buňky jsme neaplikovali žádného agonistu. Po aplikaci agonistů (nebo KHB v případě kontrolních buněk) jsme z buněk připravili membrány. Symbolem * jsou označeny rozdíly oproti kontrolním buňkám, ^b značí odlišnost vzhledem k 10minutovému promývání, P<0,05, ANOVA a Tukey-Kramerův test. Hodnoty v tabulce jsou průměry ± S.E.M. ze 3 nezávislých měření provedených v triplicátech.

Agonisté oxotremorin a pilokarpin měli daleko menší účinek co do schopnosti svým působením snižovat počet membránových mAChR. Prodloužení promývání pufrem z 10 minut na 1 hodinu mělo za následek pokles počtu membránových receptorů i za kontrolních podmínek (bez působení agonisty). Nezaznamenali jsme žádnou změnu v počtu kteréhokoli z podtypů mAChR v membráně vzniknuvší následkem působení xanomelinu následovaného hodinovým promýváním. Aplikace karbacholu zapříčinila snížení počtu všech podtypů membránových mAChR stejnou měrou s výjimkou M₁ receptoru, kde se po prodloužení promývání z 26% poklesu (10minutové promývání) stal 17% (hodinové promývání). Podobně byl relativní počet

membránových receptorů (vzhledem k odpovídajícím kontrolním buňkám) po aplikaci oxotremorinu a hodinovém promývání menší než po 10minutovém. Nenastal žádný pokles počtu membránových receptorů následkem působení pilokarpinu následovaného hodinovým promýváním pufrem. Hodinové promývání po aplikaci karbacholu, oxotremorinu či pilokarpinu nemělo žádný vliv na afinitu [³H]NMS k receptorům.

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
10minutové promývání					
bez agonisty	0,264±0,010	0,356±0,014	0,239±0,004	0,229±0,008	0,302±0,003
xano (1 min.)	2,110±0,10*	0,551±0,001*	0,717±0,021*	2,640±0,05*	1,440±0,02*
xano (3 min.)	2,440±0,18*	0,575±0,013*	0,863±0,037 ^{ab}	3,670±0,36 ^{ab}	1,790±0,04 ^{ab}
xano (10 min.)	2,590±0,10*	0,894±0,030 ^{ab}	0,899±0,017*	5,74±0,020 ^{ab}	2,580±0,13 ^{ab}
karbachol	0,255±0,006	0,348±0,015	0,226±0,003	0,235±0,004	0,294±0,008
oxotremorin	0,261±0,007	0,359±0,011	0,234±0,003	0,216±0,005	0,295±0,004
pilokarpin	0,248±0,006	0,384±0,014	0,236±0,004	0,217±0,004	0,288±0,011
1hodinové promývání					
bez agonisty	0,248±0,006	0,367±0,009	0,232±0,003	0,220±0,011	0,312±0,006
xano (1 min.)	0,821±0,004 ^{ab}	0,579±0,026 ^b	1,340±0,01 ^{ab}	3,450±0,15 ^{ab}	1,080±0,01 ^{ab}
xano (3 min.)	0,863±0,015 ^{ab}	0,589±0,019 ^a	1,320±0,03 ^{ab}	4,610±0,30 ^{ab}	1,450±0,02 ^{ab}
xano (10 min.)	0,915±0,014 ^{ab}	0,68±0,003 ^{ab}	1,670±0,09 ^{ab}	5,810±0,17 ^{ab}	1,840±0,02 ^{ab}
karbachol	0,239±0,006	0,360±0,003	0,231±0,003	0,228±0,006	0,301±0,006
oxotremorin	0,241±0,004	0,365±0,007	0,226±0,009	0,227±0,005	0,297±0,009
pilokarpin	0,242±0,003	0,355±0,003	0,246±0,011	0,224±0,007	0,321±0,015

Tabulka 4.6: Rovnovážné disociační konstanty vazby radioaktivně značeného antagonisty [³H]NMS na M₁–M₅ receptory vystavené působení agonistů xanomelinu, karbacholu, oxotremorinu či pilokarpinu

Hodnoty v tabulce udávají rovnovážnou disociační konstantu specifické vazby [³H]NMS (K_D, nM) na M₁–M₅ receptory jednotlivě exprimované v CHO buňkách, které jsme jako intaktní vystavili 10μM xanomelinu (na 1, 3 nebo 10 minut) nebo na 10 minut 1μM karbacholu, 1μM oxotremorinu či 3μM pilokarpinu. Na kontrolní buňky jsme neaplikovali žádného agonistu. Po aplikaci agonistů (nebo KHB v případě kontrolních buněk) jsme z buněk připravili membrány. Symbolem * jsou označeny rozdíly oproti kontrolním buňkám, ^a znamená rozdíl ve srovnání s kratším působením xanomelinu, ^b značí odlišnost vzhledem k 10minutovému promývání, P<0,05, ANOVA a Tukey-Kramerův test. Hodnoty v tabulce jsou průměry ± S.E.M. ze 3 nezávislých měření provedených v triplicátech.

Snížení afinity [³H]NMS po 10minutovém působení xanomelinu v případě M₄ receptorů bylo stejné jak po 10minutovém, tak i hodinovém následném promývání. Pokles afinity [³H]NMS po aplikaci xanomelinu na M₄ receptory trvajících 1 či 3 minuty se zvýraznil během hodinového promývání. Na M₃ receptorech se rovněž afinita [³H]NMS v důsledku působení xanomelinu snížila větší měrou během hodinového

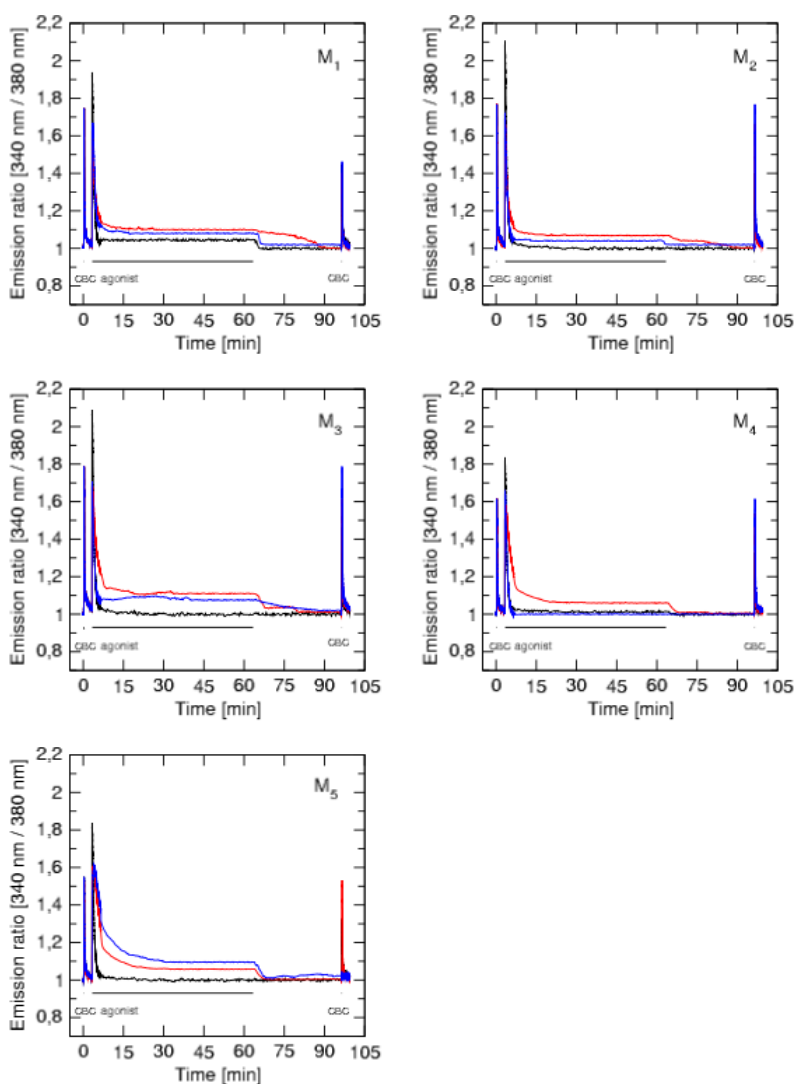
promývání puřrem. Naproti tomu afinita [³H]NMS se u zbývajících podtypů mAChR v průběhu hodinového promývání snížila méně než během promývání trvajících pouze 10 minut.

4.6 Vliv dlouhodobého působení ortosterických agonistů karbacholu, oxotremorinu a pilokarpinu na hladinu nitrobuněčného vápníku

V kontrolních pokusech měřících vliv dlouhé expozice agonistům karbacholu, oxotremorinu a pilokarpinu na hladinu vnitrobuněčného vápníku jsme CHO buňky exprimující jednotlivé podtypy mAChR na 1 hodinu vystavili 1μM karbacholu, 1μM oxotremorinu či 3μM pilokarpinu. Po úvodní kontrolní stimulaci 300nM karbacholem jsme hladinu vápenatých iontů měřili během celého hodinového trvání aplikace výše zmíněné trojice agonistů a ještě následujících 30 minut, během kterých jsme buňky promývali samotným KHB. Kontrolní 10sekundovou stimulaci 300nM karbacholem jsme provedli též na konci měření (Obr. 4.6, Tab. 4.7).

První (kontrolní) stimulace 300nM karbacholem přinesla, podobně jako v předchozích pokusech, okamžitý vzestup koncentrace nitrobuněčného vápníku u všech sledovaných podtypů muskarinových receptorů (Tab. 4.7).

Hodinová stimulace 1μM karbacholem, 1μM oxotremorinem či 3μM pilokarpinem vedla k rychlému přechodnému zvýšení hladiny nitrobuněčného vápníku. Při hodinové stimulaci karbacholem (Obr. 4.6, černé křivky) se hladina vápníku přechodně zvýšila přibližně na 3 minuty a poté se vrátila na původní úroveň u všech podtypů s výjimkou M₁, kde zůstala lehce zvýšená až do konce stimulace karbacholem. Co se týče hodinové aplikace oxotremorinu (Obr. 4.6, červené křivky), tento agonista opět přinesl přechodný vzestup hladiny nitrobuněčného vápníku, a to přibližně na 4 minuty (M₁ a M₂ receptory), 5 minut (M₃) nebo 15 minut (M₄ a M₅ receptory). Po tomto dočasném vzestupu zůstala hladina vápníku zvýšená oproti bazální úrovni (od 8% přírůstku u M₅ receptoru až po 16% u M₁ receptoru) až do konce stimulace agonistou. Během stimulace pilokarpinem (Obr. 4.6, modré křivky) se rovněž objevil přechodný vzestup hladiny nitrobuněčného vápníku. Ta se přibližně po 3 minutách vrátila na původní úroveň (M₂ a M₄ podtypy) nebo se zastavila na mírně zvýšené hodnotě (M₁ a M₃ podtypy), která představovala 10 %, resp. 14 % maxima signálu vzniklého stimulací agonistou. V případě M₅ receptorů byl přechodný vzestup a návrat (opět na mírně zvýšenou úroveň oproti bazální vápníkové hladině představující tentokrát 16 % úvodního maxima signálu) velice pomalý a trval asi 30 minut.



Obrázek 4.6: Průběh změn koncentrace nitrobuněčného vápníku následkem dlouhodobého působení karcholu, oxotremorinu a pilokarpinu na M₁–M₅ podtypy muskarinových receptorů

Po úvodních 10 s snímání (sloužících k zaznamenání klidové koncentrace vápníku) jsme buňky nejprve 10 s stimulovali 300nM karcholem a po jeho odmytí aplikovali 1 μ M karchol (černá křivka), 1 μ M oxotremorin (červená křivka) nebo 3 μ M pilokarpin (modrá křivka) po dobu 1 hodiny. Po dalších 30 minutách promývání KHB jsme buňky opět 10 s stimulovali 300nM karcholem. Průběh změn koncentrace nitrobuněčného vápníku (osa y) je zobrazen jako změna poměru intenzit fluorescence při 340/380 nm. Grafy znázorňují průměrné hodnoty signálu z 1 měření (potvrzeného dalšími 2 nezávislými měřeními) získané z 12–16 buněk s nejlepší odpovědí. Charakteristika vápníkových odpovědí je uvedena v Tab. 4.7.

Bezprostředně po hodinovém působení agonistů karcholu, oxotremorinu i pilokarpinu buňky neodpovídaly na 300nM karchol (data nejsou součástí zde prezentovaných výsledků). Maximální hodnota odpovědi na třetí (kontrolní) stimulaci (300nM karcholem) provedenou po 30minutovém promývání KHB (to následovalo po hodinové aplikaci agonistů) byla menší po předcházejícím působení karcholu u všech podtypů mAChR (Obr. 4.6, Tab. 4.7). Maximum odpovědi na třetí stimulaci

bylo též nižší v případě M₁ receptorů po předchozím působení oxotremorinu a pilokarpinu. U M₅ receptorů nedošlo k žádné odpovědi na třetí stimulaci 300nM karbacholem po hodinovém působení pilokarpinu.

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
první stimulace (300nM CBC)					
čas na dosažení maxima [s]	6,4 ± 0,6	5,3 ± 0,5	5,5 ± 0,7	5,7 ± 0,6	5,9 ± 0,7
maximum [poměr emisí]	1,73 ± 0,05	1,75 ± 0,07	1,77 ± 0,06	1,59 ± 0,05	1,53 ± 0,05
druhá stimulace					
čas na dosažení maxima [s]					
karbachol	6,4 ± 0,5	5,4 ± 0,5	5,6 ± 0,6	5,9 ± 0,6	6,0 ± 0,6
oxotremorin	12 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	10 ± 1	11 ± 1
pilokarpin	16 ± 1	12 ± 1	15 ± 1	13 ± 1	15 ± 2
maximum [poměr emisí]					
karbachol	1,92 ± 0,06	2,09 ± 0,05	2,08 ± 0,05	1,84 ± 0,05	1,82 ± 0,05
oxotremorin	1,65 ± 0,04	1,69 ± 0,03	1,68 ± 0,04	1,57 ± 0,04	1,60 ± 0,04
pilokarpin	1,66 ± 0,04	1,68 ± 0,04	1,69 ± 0,04	1,64 ± 0,04	1,61 ± 0,05
průměrná hodnota klidového signálu v čase 30–60 min. [poměr emisí]					
karbachol	1,04 ± 0,01*	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,01 ± 0,01	1,00 ± 0,01
oxotremorin	1,08 ± 0,02*	1,06 ± 0,01*	1,11 ± 0,02*	1,06 ± 0,02*	1,05 ± 0,02*
pilokarpin	1,07 ± 0,02*	1,04 ± 0,01*	1,07 ± 0,03*	0,99 ± 0,01	1,09 ± 0,02*
třetí stimulace (300nM CBC)					
čas na dosažení maxima [s]					
po karbacholu	9,2 ± 0,5 ^a	7,5 ± 0,5 ^a	6,1 ± 0,5	8,3 ± 0,5 ^a	8,5 ± 0,5 ^a
po oxotremorinu	9,3 ± 0,5 ^a	5,8 ± 0,5	5,8 ± 0,5	6,2 ± 0,5	6,3 ± 0,5
po pilokarpinu	8,5 ± 0,5 ^a	6,0 ± 0,5	5,6 ± 0,5	5,9 ± 0,5	NA ^a
maximum [poměr emisí]					
po karbacholu	1,43 ± 0,03 ^a	1,39 ± 0,04 ^a	1,45 ± 0,03 ^a	1,31 ± 0,03 ^a	1,32 ± 0,03 ^a
po oxotremorinu	1,39 ± 0,03 ^a	1,64 ± 0,03	1,60 ± 0,04	1,53 ± 0,04	1,52 ± 0,04
po pilokarpinu	1,45 ± 0,04 ^a	1,72 ± 0,05	1,76 ± 0,05	1,61 ± 0,04	1,01 ± 0,01 ^a

Tabulka 4.7: Charakteristika změn koncentrace nitroboněčného vápníku následkem dlouhodobého působení karbacholu, oxotremorinu a pilokarpinu na jednotlivé mAChR

Hodnoty v tabulce charakterizují dlouhodobé účinky karbacholu, oxotremorinu a pilokarpinu na hladinu nitroboněčného vápníku po stimulaci jednotlivých podtypů muskarinových receptorů těmito agonisty. NA znamená, že jsme nezaznamenali příslušnou odpověď, symbolem * jsou označeny statisticky významné rozdíly oproti bazální hladině vápníku, symbolem ^a jsou označeny statisticky významné rozdíly oproti první kontrolní stimulaci karbacholem (P<0,05, Dunnettův test). Hodnoty vápníkového signálu jsou vyjádřeny jako poměr emisí při střídavém buzení vzorku při 340/380 nm. Hodnoty v tabulce jsou průměry ± S.E.M ze 3 nezávislých měření

5 DISKUSE

5.1 Rozdíly v okamžitých a dlouhodobých účincích xanomelinu na jednotlivé podtypy muskarinových receptorů

Vlastním měřením okamžitých a dlouhodobých účinků xanomelinu na muskarinové receptory předcházet jeden nezbytný krok. Vzhledem k tomu, že sudé podtypy mAChR se preferenčně spřahují s G-proteiny třídy $G_{i/o}$, a tím zprostředkovávají inhibici tvorby cAMP, je jejich vápníková odpověď pomalá a slabá (Doležal et al., 1997). Proto jsme provedli transfekci buněk exprimujících M_2 a M_4 receptory α podjednotkou lidského G_{16} G-proteinu, který umožňuje mnoha typům receptorů spřažených s G-proteiny efektivně aktivovat fosfolipázu $C\beta$ (Milligan et al., 1996). Transfekce proběhla úspěšně, jak je vidět na příkladu rychlé vápníkové odpovědi M_2 a M_4 receptorů na karchol, jejíž parametry jsou srovnatelné s odpovědí lichých podtypů (Obr. 4.1, Tab. 4.2).

Velmi krátké vystavení buněk xanomelinu na 20 s vyvolalo přechodnou vápníkovou odpověď (Obr. 4.1). Xanomelin vyvolal tuto odpověď s podobnou potencí na všech podtypech (Tab. 4.1), což je v souladu se zjištěním, že afinita xanomelinu je téměř shodná pro všechny mAChR (Jakubík et al., 2008). Maximální odpověď (účinnost, s jakou xanomelin vyvolává vápníkovou odpověď) se však podtypově lišila. Porovnáním maximálních odpovědí na xanomelin vyjádřených v procentech velikosti maximální odpovědi na plného agonistu karchol zjistíme, že hodnoty zaujmou pořadí, které souhlasí s předpokládanou M_1/M_4 funkční selektivitou xanomelinu. V našich měřeních má xanomelin největší odpověď na M_1 receptoru, o trochu menší pak na M_4 a M_3 receptorech a nejmenší na M_5 a M_2 podtypech (Tab. 4.1). Vezmeme-li v úvahu ještě afinitu G-proteinu pro komplex xanomelin-receptor (K_G), pak jsou rozdíly v účinnosti spřahování ještě více zřejmé. Kromě toho, že největší maximální odpověď na xanomelin nastala stimulací M_1 a M_4 podtypů mAChR, byl rovněž vápníkový signál těchto receptorů delšího trvání v porovnání s ostatními podtypy (Obr. 4.1). Podtypové rozdíly v účinnosti spřahování by tedy mohly tvořit základ funkční selektivity xanomelinu. Účinnost částečných ortosterických agonistů oxotremorinu a pilokarpinu co do schopnosti vyvolat vápníkovou odpověď je podtypově odlišná od xanomelinu, neboť je nejvyšší na M_5 a nejnižší na M_3 receptoru (Tab. 4.1). To vylučuje možnost, že by spřažení M_1 a M_4 muskarinových receptorů s vápníkovou odpovědí (jak

prostřednictvím přirozeného $G_{q/11}$, tak uměle vloženého G_{16} G-proteinu) bylo všeobecně lepší nehledě na použitého agonistu.

V případě M_1 , M_3 a M_4 podtypů mAChR vedla 1minutová aplikace xanomelinu k výraznému vzestupu hladiny nitrobuněčného vápníku, který přetrval po dobu více než 1 hodiny po odmytí xanomelinu (Obr. 4.2, černé křivky). Co se týče M_1 a M_4 receptorů, zvýšená hladina vápníku zřetelně oscilovala. Dlouhodobě oscilující hladina vápníku na vyšší hodnotě než klidové svědčí o tom, že tyto receptory zaujímají aktivní konformaci, která svým účinkem na mobilizaci vápníku překonává buněčné mechanismy zodpovědné za vychytávání volných vápenatých iontů. Vzhledem k tomu, že hladina vápníku se nesnižuje ani po dlouhé době, nedochází zřejmě u těchto receptorů k desenzitizaci. Delší než 1minutové působení xanomelinu bylo nutné k tomu, aby se trvale zvýšila hladina vápníku v případě M_2 receptorů. U M_5 receptorů vedla aplikace xanomelinu jen k přechodnému vzestupu hladiny nitrobuněčného vápníku, který závisel na délce aplikace tohoto agonisty. Účinky druhé aplikace karbacholu byly blokovány působením neodmyvatelné vazby xanomelinu u M_1 , M_4 a M_5 receptorů. Zatímco na M_1 a M_4 receptorech se neodmyvatelně navázaný xanomelin choval jako kompetitivní agonista (nedošlo k poklesu zvýšené hladiny vápníku, kterou však bylo možné zablokovat antagonistou), na M_5 receptorech se jeho působení jevílo jako neutrální či kompetitivně antagonistické (nedocházelo k vzestupu bazální hladiny vápníku, avšak ortosterický agonista karbachol vyvolával odpověď). Tyto výsledky jsou ve shodě s již známou funkční selektivitou xanomelinu pro M_1 a M_4 receptory (Bymaster et al., 1998; Shannon et al., 2000), s opožděnými účinky neodmyvatelné vazby xanomelinu na M_2 receptorech (Jakubík et al., 2006; Machová et al., 2007) a antagonistickým působením neodmyvatelné vazby na M_5 receptorech (Grant et al., 2005).

5.2 Vliv ortosterického antagonisty NMS na tvorbu neodmyvatelné vazby xanomelinu a aktivovaný receptor neodmyvatelně navázaným xanomelinem

I různé způsoby interakce xanomelinu s receptorem, interakce s rozličnými receptorovými doménami nebo rozdílné způsoby aktivace receptoru xanomelinem by mohly vysvětlovat funkční selektivitu tohoto agonisty. Proto jsme se snažili zjistit, jestli aktivace receptoru neodmyvatelně navázaným xanomelinem může být zablokována ortosterickým antagonistou NMS (Obr. 4.3) a zda proces vzniku aktivace receptoru neodmyvatelně navázaným xanomelinem (Obr. 4.4) či antagonistické účinky neodmyvatelně vázaného xanomelinu (Obr. 4.5) mohou být zablokovány NMS. Jak je vidět na Obr. 4.3, zvýšená hladina vápníku v přítomnosti xanomelinu poklesla v důsledku aplikace NMS u všech podtypů mAChR. Zatímco hladina nitrobuněčného vápníku opětovně stoupá po odmytí NMS u M_1 a M_4 receptorů, v případě M_2 a M_3 receptorů zůstává na bazální hodnotě (Obr. 4.3, Tab. 4.3). V rámci těchto čtyř podtypů má NMS nejpomalejší vazebnou kinetiku na M_3 receptoru a nejrychlejší na M_2 receptoru (Jakubík et al., 1995). Ačkoli by pomalá kinetika NMS na M_3 receptoru mohla vysvětlovat to, že se zde po odstranění NMS hladina vápníku nevrátila na zvýšenou úroveň, je naproti tomu v rozporu s tím, že je pokles vápníkového signálu u tohoto receptoru po aplikaci NMS rychlejší než u ostatních podtypů, zejména M_2 , kde má NMS naopak kinetiku nejrychlejší. Fakt, že u M_2 receptoru nenásledoval vzestup hladiny nitrobuněčného vápníku po odmytí NMS nemůžeme vysvětlit vazebnou kinetikou NMS (disociace NMS z M_2 receptoru je rychlejší než z M_1 či M_4 receptoru). Zároveň nepřítomnost vzestupu hladiny vápníku po odmytí NMS v souladu s Obr. 4.1 a 4.2 dokazuje, že 20sekundové vystavení M_2 receptorů $10\mu\text{M}$ xanomelinu není dostačující pro to, aby xanomelin dokázal receptor aktivovat neodmyvatelnou vazbou.

Když jsme xanomelin aplikovali na receptory, jejichž klasické vazebné místo bylo zablokováno NMS, byla jeho schopnost aktivovat receptor svou neodmyvatelnou vazbou snížena u M_1 a M_3 receptorů, jak je vidět porovnáním Obr. 4.4 (černé a zelené křivky) a Obr. 4.2 (černé křivky), resp. Tab. 4.4 a 4.2. Naproti tomu M_2 a M_4 receptory xanomelin za těchto podmínek nedokázal aktivovat neodmyvatelnou vazbou vůbec (Obr. 4.4, červené a modré křivky). U M_5 receptoru se zmírnily antagonistické účinky neodmyvatelné vazby xanomelinu na aktivaci karbacholem (Obr. 4.5). Dá se tedy říci, že NMS zpomaluje nástup aktivace receptoru prostřednictvím neodmyvatelné vazby xanomelinu u všech podtypů mAChR, akorát různou měrou.

5.3 Kinetika tvorby neodmyvatelné vazby a působení neodmyvatelné vazby xanomelinu na počet membránových receptorů

Předchozí pokusy provedené u nás ukázaly, že kinetika aktivace M_2 receptoru neodmyvatelně vázaným xanomelinem je o mnoho pomalejší než je tomu u M_1 receptoru a mělo se za to, že rozdíly v kinetice neodmyvatelné vazby a následné aktivaci receptoru by mohly být jedním z důvodů, proč se xanomelin vyznačuje funkční selektivitou právě pro M_1 receptory. Kinetika neodmyvatelné vazby xanomelinu ovšem nekoreluje s funkční selektivitou xanomelinu pro M_1 a M_4 receptory. Ačkoli je kinetika neodmyvatelné vazby xanomelinu velmi rychlá na funkčně upřednostňovaných M_1 a M_4 receptorech, je stejně rychlá také na M_5 receptoru, u kterého se o žádné funkční selektivitě xanomelinu hovořit nedá (Tab. 4.6). Účinky neodmyvatelné vazby xanomelinu se dále vyvíjejí během hodinového promývání buněk (Tab. 4.6). Inhibice vazby NMS během hodinového promývání na M_1 receptoru slábne, na M_3 receptoru naopak zesiluje (Tab. 4.5). Z našich pokusů vyplývá, že rozdíly v kinetice neodmyvatelné vazby xanomelinu a následné aktivace receptoru tedy nevysvětlují pozorovanou funkční selektivitu xanomelinu pro M_1 a M_4 receptory.

Výsledky z nedávné doby naznačují, že funkční selektivita xanomelinu by mohla souviset s různou regulací jednotlivých podtypů muskarinových receptorů (Grant et al., 2010; Noetzel et al., 2009). Opakovaně se ukazovalo, že regulace jednotlivých podtypů receptorů se liší (Koenig a Edwardson, 1996; Krudewig et al., 2000; Shockley et al., 1999) a je závislá na použitém agonistovi (Davis et al., 2009). Je pravděpodobné, že slabší nebo pomalejší downregulace signalizace konkrétního podtypu mAChR, která nastává v důsledku stimulace xanomelinem, by mohla naopak vést k posílení signalizace tohoto podtypu na dlouhý časový úsek. Naše výsledky ale ukazují, že xanomelin (za našich pokusných podmínek) tvoří neodmyvatelnou vazbu a alostericky snižuje afinitu NMS, ale nezpůsobuje internalizaci žádného z podtypů muskarinových receptorů. To se naproti tomu nedá říci o plném agonistovi karcholu a částečných agonistech pilokarpinu a oxotremorinu (Tab. 4.5 a 4.6). Tudíž za přetrvávající zvýšenou hladinou vápníku objevující se pouze po stimulaci M_1 a M_4 receptorů xanomelinem nemůže stát různá míra internalizace receptorů (aby došlo k poklesu signálu xanomelinu) ani obnova receptorů (pro zvýšení citlivosti na karchol). Trvale zvýšená hladina nitrobuněčného vápníku vyskytující se pouze následkem stimulace neodmyvatelně navázaným xanomelinem u M_1 a M_4 receptorů nemůže též vycházet

z vyšší míry desenzitizace M_2 a M_3 receptorů, neboť tyto dva podtypy odpovídají na plného agonistu karchol lépe než M_1 a M_4 receptory.

6 ZÁVĚR

Naše výsledky ukazují, že xanomelin vyvolává mobilizaci nitrobuněčného vápníku prostřednictvím všech podtypů muskarinových receptorů se stejnou potencí. Naproti tomu se v našich pokusech ukázalo, že se xanomelin vyznačuje větší účinností co do vyvolání a delším trváním vápníkové odpovědi na M_1 a M_4 receptorech v porovnání s ostatními podtypy. Porovnávali jsme okamžité i dlouhodobé účinky xanomelinu na jednotlivých podtypech muskarinových receptorů. Nalezli jsme rozdíly v kinetice dějů, které xanomelin svou vazbou na receptor vyvolá i odlišnosti v jeho interakci s kompetitivním antagonistou muskarinových receptorů. Ovšem žádný z těchto rozdílů nekoreluje s funkční selektivitou xanomelinu pro M_1 a M_4 podtypy muskarinových receptorů, a tedy nemůže být podkladem funkční selektivity xanomelinu.

Funkční selektivita xanomelinu se tedy zakládá hlavně na odlišnostech v účinnosti a dlouhodobé aktivaci podtypů receptorů a ne na rozdílné regulaci receptorů na úrovni buněk či farmakokinetice na systémové úrovni. Bude ještě potřeba provést další měření, ve kterých se budeme snažit odhalit molekulární mechanismy, které stojí za funkční selektivitou xanomelinu. Mohly by vycházet ze vzájemné interakce jednotlivých částí receptoru a konformačních změn, které agonista svou vazbou na receptor vyvolá.

6 SUMMARY

Our results show that xanomeline induces mobilization of intracellular calcium via all subtypes of muscarinic receptors with similar potency. In contrast, our experiments revealed that xanomeline evoked calcium response with higher efficacy and the response lasted longer at M₁ and M₄ receptors in comparison with other subtypes. We compared immediate as well as long-term effects of xanomeline at individual subtypes of muscarinic receptors. There were dissimilarities in kinetics of xanomeline-induced actions evoked by its binding to the receptors, and interaction with competitive receptor antagonists. However, none of these differences correlated with observed functional preference of xanomeline for M₁ and M₄ subtypes of muscarinic receptors and thus they cannot constitute the basis of xanomeline selectivity.

Therefore, the functional selectivity of xanomeline is based mostly on differences in efficacy and long-term activation of muscarinic receptor subtypes and not on different receptor regulation on the cellular level or pharmacokinetics on the system level. Nevertheless, further measurements are needed to fully elucidate the molecular mechanisms involved in functional selectivity of xanomeline, particularly the potential role of interactions of receptor domains or conformational changes induced by agonist binding.

7 SEZNAM PUBLIKACÍ

Impaktované publikace

Jakubík J, Šantrůčková E, Randáková A, Janíčková H, Zimčík P, Rudajev V, Michal P, El-Fakahany EE, Doležal V. 2014. Outline of therapeutic interventions with muscarinic receptor-mediated transmission. *Physiol Res*. 63 Suppl: S177-89. IF = 1,487 (2013).

Šantrůčková E, Doležal V, El-Fakahany EE, Jakubík J. 2014. Long-term activation upon brief exposure to xanomeline is unique to M1 and M4 subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *PLoS One* 9: e88910. IF = 3,534 (2013).

Neimpaktované publikace

Jakubík J, Doležal V, El-Fakahany EE, Janíčková H, Randáková A, Šantrůčková E. Perspectives for design of selective muscarinic agonists. In: *New frontiers in molecular mechanisms in neurological and psychiatric disorders*. Martin: Jessenius Faculty of Medicine, 2011, s. 154-168. ISBN 978-80-88866-99-2.

Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce

Kučerová L, Brož V, Fleischmannová J, Šantrůčková E, Sidorov R, Doležal V, Žurovec M. 2012. Characterization of the *Drosophila* adenosine receptor: the effect of adenosine analogs on cAMP signaling in *Drosophila* cells and their utility for in vivo experiments. *J Neurochem*. 121: 383-95. IF = 3,973 (2012).

8 SEZNAM LITERATURY

Aarsland D, Kurz MW. 2010. The epidemiology of dementia associated with Parkinson disease. *J Neurol Sci.* 289: 18-22.

Aihara T, Nakamura Y, Taketo MM, Matsui M, Okabe S. 2005. Cholinergically stimulated gastric acid secretion is mediated by M(3) and M(5) but not M(1) muscarinic acetylcholine receptors in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288: G1199-207.

Alcantara AA, Mrzljak L, Jakab RL, Levey AI, Hersch SM, Goldman-Rakic PS. 2001. Muscarinic m1 and m2 receptor proteins in local circuit and projection neurons of the primate striatum: anatomical evidence for cholinergic modulation of glutamatergic prefronto-striatal pathways. *J Comp Neurol.* 434: 445-60.

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. 2011. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edn. *Br J Pharmacol* 164 Suppl. 1: S1-S324.

Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnama NP, Nathanson NM, Silva AJ. 2003. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci.* 6: 51-8.

Andersen MB, Fink-Jensen A, Peacock L, Gerlach J, Bymaster F, Lundbaek JA, Werge T. 2003. The muscarinic M1/M4 receptor agonist xanomeline exhibits antipsychotic-like activity in *Cebus apella* monkeys. *Neuropsychopharmacology* 28: 1168-75.

Araya R, Noguchi T, Yuhki M, Kitamura N, Higuchi M, Saido TC, Seki K, Itohara S, Kawano M, Tanemura K, Takashima A, Yamada K, Kondoh Y, Kanno I, Wess J, Yamada M. 2006. Loss of M5 muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice. *Neurobiol Dis.* 24: 334-44.

Avellar MC, Lázari MF, Porto CS. 2009. Expression and function of G-protein-coupled receptors in the male reproductive tract. *An Acad Bras Cienc.* 81: 321-44.

Avlani VA, Gregory KJ, Morton CJ, Parker MW, Sexton PM, Christopoulos A. 2007. Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *J Biol Chem.* 282: 25677-86.

Barbeau A. 1962. The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can. Med. Assoc. J.* 87: 802-7.

Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-14.

Basile AS, Fedorova I, Zapata A, Liu X, Shippenberg T, Duttaroy A, Yamada M, Wess J. 2002. Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 11452-7.

Berkeley JL, Gomeza J, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, Levey AI. 2001. M1 muscarinic acetylcholine receptors activate extracellular signal-regulated kinase in CA1 pyramidal neurons in mouse hippocampal slices. *Mol Cell Neurosci*. 18: 512-24.

Betz AJ, McLaughlin PJ, Burgos M, Weber SM, Salamone JD. 2007. The muscarinic receptor antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M4 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 194: 347-59.

Bhugra D. 2005. The global prevalence of schizophrenia. *PLoS Med*. 2:e151; quiz e175.

Bodick NC, Offen WW, Levey AI, Cutler NR, Gauthier SG, Satlin A, Shannon HE, Tollefson GD, Rasmussen K, Bymaster FP, Hurley DJ, Potter WZ, Paul SM. 1997a. Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 54: 465-73.

Bodick NC, Offen WW, Shannon HE, Satterwhite J, Lucas R, van Lier R, Paul SM. 1997b. The selective muscarinic agonist xanomeline improves both the cognitive deficits and behavioral symptoms of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 11 Suppl 4: S16-22.

Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanco LS, Lopresti B, Koeppe RA, Davis JG, Mathis CA, Moore RY, DeKosky ST. 2003. Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo positron emission tomographic study. *Arch Neurol*. 60: 1745-48.

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. 1987. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237: 527-532.

Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ. 1988. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1: 403-10.

Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 82: 239-59.

Brady AE, Jones CK, Bridges TM, Kennedy JP, Thompson AD, Heiman JU, Breininger ML, Gentry PR, Yin H, Jadhav SB, Shirey JK, Conn PJ, Lindsley CW. 2008. Centrally active allosteric potentiators of the M4 muscarinic acetylcholine receptor reverse amphetamine-induced hyperlocomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 327: 941-53.

Bräuner-Osborne H, Brann MR. 1996. Pharmacology of muscarinic acetylcholine receptor subtypes (m1-m5): high throughput assays in mammalian cells. *Eur J Pharmacol* 295: 93-102.

Breitwieser GE, Szabo G. 1985 Uncoupling of cardiac muscarinic and beta-adrenergic receptors from ion channels by a guanine nucleotide analogue. *Nature* 317: 538-40.

Burford NT, Nahorski SR. 1996. Muscarinic m1 receptor-stimulated adenylate cyclase activity in Chinese hamster ovary cells is mediated by Gs alpha and is not a consequence of phosphoinositidase C activation. *Biochem J* 315: 883-8.

Burford NT, Tobin AB, Nahorski SR. 1995. Differential coupling of m1, m2 and m3 muscarinic receptor subtypes to inositol 1,4,5-trisphosphate and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate accumulation in Chinese hamster ovary cells. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 134-42.

Burgen AS. 1965. The role of ionic interaction at the muscarinic receptor. *Br J Pharmacol Chemother.* 25: 4-17.

Burstein ES, Ma J, Wong S, Gao Y, Pham E, Knapp AE, Nash NR, Olsson R, Davis RE, Hacksell U, Weiner DM, Brann MR. 2005. Intrinsic efficacy of antipsychotics at human D2, D3, and D4 dopamine receptors: identification of the clozapine metabolite N-desmethylozapine as a D2/D3 partial agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 315: 1278-87.

Bymaster FP, Carter PA, Peters SC, Zhang W, Ward JS, Mitch CH, Calligaro DO, Whitesitt CA, DeLapp N, Shannon HE, Rinvall K, Jeppesen L, Sheardown MJ, Fink-Jensen A, Sauerberg P. 1998. Xanomeline compared to other muscarinic agents on stimulation of phosphoinositide hydrolysis in vivo and other cholinomimetic effects. *Brain Res.* 795: 179-90.

Bymaster FP, Carter PA, Yamada M, Gomeza J, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, McKinzie DL, Felder CC. 2003. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *Eur J Neurosci* 17: 1403-10.

Bymaster FP, Shannon HE, Rasmussen K, DeLapp NW, Ward JS, Calligaro DO, Mitch CH, Whitesitt C, Ludvigsen TS, Sheardown M, Swedberg M, Rasmussen T, Olesen PH, Jeppesen L, Sauerberg P, Fink-Jensen A. 1999. Potential role of muscarinic receptors in schizophrenia. *Life Sci.* 64: 527-34.

Bymaster FP, Whitesitt CA, Shannon HE, DeLapp N, Ward JS, Calligaro DO, Shipley LA, Buelke-Sam JL, Bodick NC, Farde L, Sheardown MJ, Olesen PH, Hansen KT, Suzdak PD, Swedberg MDB, Sauerberg P, Mitch CH. 1997. Xanomeline: a selective muscarinic agonist for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Dev Res.* 40: 158-70.

Bymaster FP, Wong DT, Mitch CH, Ward JS, Calligaro DO, Schoepp DD, Shannon HE, Sheardown MJ, Olesen PH, Suzdak PD, Swedberg MDB, Sauerberg P. 1994. Neurochemical effects of the M1 muscarinic agonist xanomeline (LY246708/NNC11-0232). *J Pharmacol Exp Ther.* 269: 282-9.

Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla FM. 2006. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron.* 49: 671-82.

Carey GJ, Billard W, Binch H 3rd, Cohen-Williams M, Crosby G, Grzelak M, Guzik H, Kozlowski JA, Lowe DB, Pond AJ, Tedesco RP, Watkins RW, Coffin VL. 2001. SCH 57790, a selective muscarinic M(2) receptor antagonist, releases acetylcholine and produces cognitive enhancement in laboratory animals. *Eur J Pharmacol.* 431: 189-200.

Caulfield MP. 1993. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58: 319-79.

Caulfield MP, Birdsall NJ. 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50: 279-90.

Conklin BR, Brann MR, Buckley NJ, Ma AL, Bonner TI, Axelrod J. 1988. Stimulation of arachidonic acid release and inhibition of mitogenesis by cloned genes for muscarinic receptor subtypes stably expressed in A9 L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 8698-702.

Culp DJ, Luo W, Richardson LA, Watson GE, Latchney LR. 1996. Both M1 and M3 receptors regulate exocrine secretion by mucous acini. *Am J Physiol* 271: C1963-72.

Curtis CA, Wheatley M, Bansal S, Birdsall NJ, Eveleigh P, Pedder EK, Poyner D, Hulme EC. 1989. Propylbenzilylcholine mustard labels an acidic residue in transmembrane helix 3 of the muscarinic receptor. *J Biol Chem.* 264: 489-95.

Davies MA, Compton-Toth BA, Hufeisen SJ, Meltzer HY, Roth BL. 2005. The highly efficacious actions of N-desmethylclozapine at muscarinic receptors are unique and not a common property of either typical or atypical antipsychotic drugs: is M1 agonism a pre-requisite for mimicking clozapine's actions? *Psychopharmacology (Berl)* 178: 451-60.

Davies P, Maloney AJ. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2: 1403.

Davis AA, Fritz JJ, Wess J, Lah JJ, Levey AI. 2010. Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo. *J Neurosci.* 30: 4190-6.

Davis CN, Bradley SR, Schiffer HH, Friberg M, Koch K, Tolf BR, Bonhaus DW, Lameh J. 2009. Differential regulation of muscarinic M1 receptors by orthosteric and allosteric ligands. *BMC Pharmacol.* 9: 14.

Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. 1991. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148: 1474-86.

DeLapp N, Wu S, Belagaje R, Johnstone E, Little S, Shannon H, Bymaster F, Calligaro D, Mitch C, Whitesitt C, Ward J, Sheardown M, Fink-Jensen A, Jeppesen L, Thomsen C, Sauerberg P. 1998. Effects of the M1 agonist xanomeline on processing of human beta-amyloid precursor protein (FAD, Swedish mutant) transfected into Chinese hamster ovary-m1 cells. *Biochem Bio-phys Res Commun.* 244: 156-60.

de Lau L, Breteler M. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5: 525-35.

De Lorme KC, Grant MK, Noetzel MJ, Polson SB, El-Fakahany EE. 2007. Long-term changes in the muscarinic M1 receptor induced by instantaneous formation of wash-resistant xanomeline-receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther.* 323: 868-76.

Dencker D, Wörtwein G, Weikop P, Jeon J, Thomsen M, Sager TN, Mørk A, Woldbye DP, Wess J, Fink-Jensen A. 2011. Involvement of a subpopulation of neuronal M4 muscarinic acetylcholine receptors in the antipsychotic-like effects of the M1/M4 preferring muscarinic receptor agonist xanomeline. *J Neurosci.* 31: 5905-8.

Descarries L, Gisiger V, Steriade M. 1997. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol.* 53: 603-25.

Dittert I, Benedikt J, Vyklický L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachová V. 2006. Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods.* 151: 178-85.

Dittman AH, Weber JP, Hinds TR, Choi EJ, Migeon JC, Nathanson NM, Storm DR. 1994. A novel mechanism for coupling of m4 muscarinic acetylcholine receptors to calmodulin-sensitive adenylyl cyclases: crossover from G protein-coupled inhibition to stimulation. *Biochemistry* 33: 943-51.

Doležal V, Lisá V, Tuček S. 1997. Differential effects of the M1-M5 muscarinic acetylcholine receptor subtypes on intracellular calcium and on the incorporation of choline into membrane lipids in genetically modified Chinese hamster ovary cell lines. *Brain Res Bull.* 42: 71-8.

Doležal V, Tuček S. 1998. The effects of brucine and alcuronium on the inhibition of [3H]acetylcholine release from rat striatum by muscarinic receptor agonists. *Br J Pharmacol.* 124: 1213-8.

Donnerer J, Lembeck F. The Chemical Languages of the nervous system: history of scientists and substances. Basel: Karger Medical and Scientific Publishers, 2006. ISBN 978-3805580045.

Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, Smith PL, Felder CC, Levey AI, Wess J. 2002. Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol.* 62: 1084-93.

Ebihara T, Saffen D. 1997. Muscarinic acetylcholine receptor-mediated induction of zif268 mRNA in PC12D cells requires protein kinase C and the influx of extracellular calcium. *J Neurochem.* 68: 1001-10.

Eckols K, Bymaster FP, Mitch CH, Shannon HE, Ward JS, DeLapp NW. 1995. The muscarinic M1 agonist xanomeline increases soluble amyloid precursor protein release from Chinese hamster ovary-m1 cells. *Life Sci.* 57: 1183-90.

- Eglen RM. 2005. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem.* 43: 105-36.
- Ehlert FJ, Delen FM. 1990. Influence of pH on the binding of scopolamine and N-methylscopolamine to muscarinic receptors in the corpus striatum and heart of rats. *Mol Pharmacol.* 38: 143-7.
- Ellis J. 1997. Allosteric Binding Sites on Muscarinic Receptors. *Drug Dev. Res.* 40: 193-204.
- Espinoza-Fonseca LM, Trujillo-Ferrara JG. 2006. The existence of a second allosteric site on the M1 muscarinic acetylcholine receptor and its implications for drug design. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 1217-20.
- Everitt BJ, Robbins TW. 1997. Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol.* 48: 649-84.
- Felder CC. 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9: 619-25.
- Felder CC, Porter AC, Skillman TL, Zhang L, Bymaster FP, Nathanson NM, Hamilton SE, Gomeza J, Wess J, McKinzie DL. 2001. Elucidating the role of muscarinic receptors in psychosis. *Life Sci.* 68: 2605-13.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7413-7.
- Feron O, Han X, Kelly RA. 1999. Muscarinic cholinergic signaling in cardiac myocytes: dynamic targeting of M2AChR to sarcolemmal caveolae and eNOS activation. *Life Sci.* 64: 471-7.
- Ferrari-Dileo G, Waelbroeck M, Mash DC, Flynn DD. 1994. Selective labeling and localization of the M4 (m4) muscarinic receptor subtype. *Mol Pharmacol* 46: 1028-35.
- Fink-Jensen A, Fedorova I, Wörtwein G, Woldbye DP, Rasmussen T, Thomsen M, Bolwig TG, Knitowski KM, McKinzie DL, Yamada M, Wess J, Basile A. 2003. Role for M5 muscarinic acetylcholine receptors in cocaine addiction. *J Neurosci Res.* 74: 91-6.
- Fisahn A, Yamada M, Duttaroy A, Gan JW, Deng CX, McBain CJ, Wess J. 2002. Muscarinic induction of hippocampal gamma oscillations requires coupling of the M1 receptor to two mixed cation currents. *Neuron* 33: 615-24.
- Fisher A. 2012. Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 120 Suppl 1: 22-33.
- Fox S, Lang A. 2008. 1-Dopa-related motor complications- phenomenology. *Mov Disord.* 23 Suppl 3: S509–14.

- Fraser CM, Wang CD, Robinson DA, Gocayne JD, Venter JC. 1989. Site-directed mutagenesis of m1 muscarinic acetylcholine receptors: conserved aspartic acids play important roles in receptor function. *Mol Pharmacol.* 36: 840-7.
- Fryer AD, Jacoby DB. 1998. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 158: S154-60.
- Garzón M, Pickel VM. 2013. Somatodendritic targeting of M5 muscarinic receptor in the rat ventral tegmental area: implications for mesolimbic dopamine transmission. *J Comp Neurol.* 521: 2927-46.
- Gautam D, Han SJ, Hamdan FF, Jeon J, Li B, Li JH, Cui Y, Mears D, Lu H, Deng C, Heard T, Wess J. 2006. A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell Metab.* 3: 449-61.
- Gautam D, Jeon J, Starost MF, Han SJ, Hamdan FF, Cui Y, Parlow AF, Gavrillova O, Szalayova I, Mezey E, Wess J. 2009. Neuronal M3 muscarinic acetylcholine receptors are essential for somatotroph proliferation and normal somatic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 6398-403.
- Giacobini E. 2000. Cholinesterase Inhibitors Stabilize Alzheimer's Disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 920: 321-7.
- Gil DW, Krauss HA, Bogardus AM, WoldeMussie E. 1997. Muscarinic receptor subtypes in human iris-ciliary body measured by immunoprecipitation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 1434-42.
- Gnagey AL, Seidenberg M, Ellis J. 1999. Site-Directed Mutagenesis Reveals Two Epitopes Involved in the Subtype Selectivity of the Allosteric Interactions of Gallamine at Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Mol. Pharmacol.* 56: 1245-53.
- Gómez A, Martos F, Bellido I, Marquez E, Garcia AJ, Pavia J, Sanchez de la Cuesta F. 1992. Muscarinic receptor subtypes in human and rat colon smooth muscle. *Biochem Pharmacol* 43: 2413-9.
- Gomez J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, Wess J. 1999a. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 1692-7.
- Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J. 1999b. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 10483-8.
- Goutagny R, Comte JC, Salvert D, Gomez J, Yamada M, Wess J, Luppi PH, Fort P. 2005. Paradoxical sleep in mice lacking M3 and M2/M4 muscarinic receptors. *Neuropsychobiology* 52: 140-6.

- Grant MK, El-Fakahany EE. 2005. Persistent binding and functional antagonism by xanomeline at the muscarinic M5 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 315: 313-9.
- Grant MK, Noetzel MJ, De Lorme KC, Jakubík J, Doležal V, El-Fakahany EE. 2010. Pharmacological evaluation of the long-term effects of xanomeline on the M(1) muscarinic acetylcholine receptor. *PLoS One* 5: e15722.
- Grossberg GT. 2003. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 64 Suppl 9: 3-6.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260: 3440-50.
- Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T. 2012. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482: 547-51.
- Hamel E. 2004. Cholinergic modulation of the cortical microvascular bed. *Prog Brain Res.* 145: 171-8.
- Hamilton SE, Nathanson NM. 2001. The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* 276: 15850-3.
- Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184-5.
- Hemrick-Luecke SK, Bymaster FP, Evans DC, Wess J, Felder CC. 2002. Muscarinic agonist-mediated increases in serum corticosterone levels are abolished in m(2) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 303: 99-103.
- Hersch SM, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Levey AI. 1994. Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J Neurosci.* 14: 3351-63.
- Hill SK, Bishop JR, Palumbo D, Sweeney JA. 2010. Effect of second-generation antipsychotics on cognition: current issues and future challenges. *Expert Rev Neurother.* 10: 43-57.
- Hulme EC, Lu ZL, Bee MS. 2003. Scanning mutagenesis studies of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Receptors Channels* 9: 215-28.
- Chatonnet A, Lockridge O. 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 260: 625-34.
- Chaudhuri JD, Hiltunen M, Nykänen M, Ylä-Herttuala S, Soininen H, Miettinen R. 2005. Localization of M2 muscarinic receptor protein in parvalbumin and calretinin containing cells of the adult rat entorhinal cortex using two complementary methods. *Neuroscience* 131: 557-66.

Chaudhuri R, Schapira A. 2009. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol.* 8: 464-74.

Chernyavsky AI, Arredondo J, Wess J, Karlsson E, Grando SA. 2004. Novel signaling pathways mediating reciprocal control of keratinocyte migration and wound epithelialization through M3 and M4 muscarinic receptors. *J Cell Biol.* 166: 261-72.

Chess-Williams R, Chapple CR, Yamanishi T, Yasuda K, Sellers DJ. 2001. The minor population of M3-receptors mediate contraction of human detrusor muscle in vitro. *J Auton Pharmacol* 21: 243-8

Chiba T, Bharucha AE, Thomforde GM, Kost LJ, Phillips SF. 2002. Model of rapid gastrointestinal transit in dogs: effects of muscarinic antagonists and a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurogastroenterol Motil* 14: 535-41.

Choppin A, Stepan GJ, Loury DN, Watson N, Eglen RM. 1999. Characterization of the muscarinic receptor in isolated uterus of sham operated and ovariectomized rats. *Br J Pharmacol* 127: 1551-8.

Christopoulos A. 2001. From 'captive' agonism to insurmountable antagonism: demonstrating the power of analytical pharmacology. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 28: 223-9.

Christopoulos A, El-Fakahany EE. 1997. Novel persistent activation of muscarinic M1 receptors by xanomeline. *Eur J Pharmacol.* 334: R3-4.

Christopoulos A, Pierce TL, Sorman JL, El-Fakahany EE. 1998. On the unique binding and activating properties of xanomeline at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* 53: 1120-30.

Jakubík J, Bačáková L, el-Fakahany EE, Tuček S. 1995. Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M1-M5 muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 274: 1077-83.

Jakubík J, Bačáková L, El-Fakahany EE, Tuček S. 1997. Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 52: 172-9.

Jakubík J, Bačáková L, Lisá V, el-Fakahany EE, Tuček S. 1996. Activation of muscarinic acetylcholine receptors via their allosteric binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8705-9.

Jakubík J, El-Fakahany EE, Doležal V. 2006. Differences in kinetics of xanomeline binding and selectivity of activation of G proteins at M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 70: 656-66.

Jakubík J, El-Fakahany EE, Tuček S. 2000. Evidence for a tandem two-site model of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 275: 18836-44.

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

Jakubík J, Michal P, Machová E, Doležal V. 2008. Importance and prospects for design of selective muscarinic agonists. *Physiol Res.* 57 Suppl 3: S39-47.

Jakubík J, Šantrůčková E, Randáková A, Janíčková H, Zimčík P, Rudajev V, Michal P, El-Fakahany EE, Doležal V. 2014. Outline of therapeutic interventions with muscarinic receptor-mediated transmission. *Physiol Res.* 63 Suppl 1: S177-89.

Jakubík J, Tuček S, El-Fakahany EE. 2002. Allosteric modulation by persistent binding of xanomeline of the interaction of competitive ligands with the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 301: 1033-41.

Jakubík J, Tuček S, El-Fakahany EE. 2004. Role of receptor protein and membrane lipids in xanomeline wash-resistant binding to muscarinic M1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 308: 105-10.

Janíčková H, Rudajev V, Zimčík P, Jakubík J, Tanila H, El-Fakahany EE, Doležal V. 2013. Uncoupling of M1 muscarinic receptor/G-protein interaction by amyloid $\beta(1-42)$. *Neuropharmacology* 67: 272-83.

Jones CK, Brady AE, Davis AA, Xiang Z, Bubser M, Tantawy MN, Kane AS, Bridges TM, Kennedy JP, Bradley SR, Peterson TE, Ansari MS, Baldwin RM, Kessler RM, Deutch AY, Lah JJ, Levey AI, Lindsley CW, Conn PJ. 2008. Novel selective allosteric activator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor regulates amyloid processing and produces antipsychotic-like activity in rats. *J Neurosci.* 28: 10422-33.

Jones SV, Heilman CJ, Brann MR. 1991. Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol* 40: 242-7.

Kamsler A, McHugh TJ, Gerber D, Huang SY, Tonegawa S. 2010. Presynaptic m1 muscarinic receptors are necessary for mGluR long-term depression in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 1618-23.

Karasawa H, Taketo MM, Matsui M. 2003. Loss of anti-cataleptic effect of scopolamine in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor subtype 4. *Eur J Pharmacol.* 468: 15-9.

Karczmar AG, Chauhan N, Whittaker VP, Christopoulos A, Lindstrom J, Siegel GJ. Exploring the Vertebrate Central Cholinergic Nervous System. Springer Science & Business Media, 2007. ISBN 9780387465265.

Katz A, Wu D, Simon MI. 1992. Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360: 686-9.

Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H. 2012. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci.* 91: 1027-32.

Koenig JA, Edwardson JM. 1996. Intracellular trafficking of the muscarinic acetylcholine receptor: importance of subtype and cell type. *Mol Pharmacol.* 49: 351-9.

Kohn EC, Alessandro R, Probst J, Jacobs W, Brilley E, Felder CC. 1996. Identification and molecular characterization of a m5 muscarinic receptor in A2058 human melanoma cells. Coupling to inhibition of adenylyl cyclase and stimulation of phospholipase A2. *J Biol Chem* 271: 17476-84.

Krudewig R, Langer B, Vögler O, Marksches N, Erl M, Jakobs KH, van Koppen CJ. 2000. Distinct internalization of M2 muscarinic acetylcholine receptors confers selective and long-lasting desensitization of signaling to phospholipase C. *J Neurochem.* 74: 1721-30.

Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J, Kobilka BK. 2012. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482: 552-6.

Langmead CJ, Austin NE, Branch CL, Brown JT, Buchanan KA, Davies CH, Forbes IT, Fry VA, Hagan JJ, Herdon HJ, Jones GA, Jeggo R, Kew JN, Mazzali A, Melarange R, Patel N, Pardoe J, Randall AD, Roberts C, Roopun A, Starr KR, Teriakidis A, Wood MD, Whittington M, Wu Z, Watson J. 2008. Characterization of a CNS penetrant, selective M1 muscarinic receptor agonist, 77-LH-28-1. *Br J Pharmacol.* 154: 1104-15.

Lazareno S, Doležal V, Popham A, Birdsall NJ. 2004. Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M4 receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity. *Mol Pharmacol.* 65: 257-66.

Lazareno S, Popham A, Birdsall NJ. 2000. Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with N-[methyl-(3)H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site. *Mol Pharmacol.* 58: 194-207.

Leach K, Loiacono RE, Felder CC, McKinzie DL, Mogg A, Shaw DB, Sexton PM, Christopoulos A. 2010. Molecular mechanisms of action and in vivo validation of an M4 muscarinic acetylcholine receptor allosteric modulator with potential antipsychotic properties. *Neuropsychopharmacology* 35: 855-69.

Lebon G, Langmead CL, Tehan BG, Hulme EC. 2009. Mutagenic Mapping Suggests a Novel Binding Mode for Selective Agonists of M1 Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol.* 75: 331-41.

Levey AI, Edmunds SM, Heilman CJ, Desmond TJ, Frey KA. 1994. Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neuroscience* 63: 207-21.

Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ. 1995. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci.* 15: 4077-92

- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. 1991. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci.* 11: 3218-26.
- Levy MJ, Cummings JL, Kahn-Rose R. 1999. Neuropsychiatric symptoms and cholinergic therapy for Alzheimer's disease. *Gerontology* 45 (Suppl 1): 15-22.
- Li M, Yasuda RP, Wall SJ, Wellstein A, Wolfe BB. 1991. Distribution of m2 muscarinic receptors in rat brain using antisera selective for m2 receptors. *Mol Pharmacol.* 40: 28-35.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-75.
- Lu ZL, Hulme EC. 1999. The functional topography of transmembrane domain 3 of the M1 muscarinic acetylcholine receptor, revealed by scanning mutagenesis. *J Biol Chem.* 274: 7309-15.
- Lu ZL, Saldanha JW, Hulme EC. 2001. Transmembrane domains 4 and 7 of the M(1) muscarinic acetylcholine receptor are critical for ligand binding and the receptor activation switch. *J Biol Chem.* 276: 34098-104.
- Ma L, Seager MA, Wittmann M, Jacobson M, Bickel D, Burno M, Jones K, Graufelds VK, Xu G, Pearson M, McCampbell A, Gaspar R, Shughrue P, Danziger A, Regan C, Flick R, Pascarella D, Garson S, Doran S, Kreatsoulas C, Veng L, Lindsley CW, Shipe W, Kuduk S, Sur C, Kinney G, Seabrook GR, Ray WJ. 2009. Selective activation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 15950-5.
- Machová E, Jakubík J, El-Fakahany EE, Dolezal V. 2007. Wash-resistently bound xanomeline inhibits acetylcholine release by persistent activation of presynaptic M(2) and M(4) muscarinic receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 322: 316-23.
- Machová E, Jakubík J, Michal P, Oksman M, Iivonen H, Tanila H, Doležal V. 2008. Impairment of muscarinic transmission in transgenic APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiol Aging.* 29: 368-78.
- Machová E, Rudajev V, Smyčková H, Koivisto H, Tanila H, Doležal V. 2010. Functional cholinergic damage develops with amyloid accumulation in young adult APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 38: 27-35.
- Mamoon AM, Smith J, Baker RC, Farley JM. 1999. Activation of muscarinic receptors in porcine airway smooth muscle elicits a transient increase in phospholipase D activity. *J Biomed Sci.* 6: 97-105.
- Marino MJ, Rouse ST, Levey AI, Potter LT, Conn PJ. 1998. Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11465-70.

Martino G, Puma C, Yu XH, Gilbert AK, Coupal M, Markoglou N, McIntosh FS, Perkins MN, Laird JM. 2011. The M1/M4 preferring agonist xanomeline is analgesic in rodent models of chronic inflammatory and neuropathic pain via central site of action. *Pain* 152: 2852-60.

Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, Takahashi S, Taketo MM. 2000. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 9579-84.

Meissner WG, Frasier M, Gasser T, Goetz CG, Lozano A, Piccini P, Obeso JA, Rascol O, Schapira A, Voon V, Weiner DM, Tison F, Bezard E. 2011. Priorities in Parkinson's disease research. *Nat Rev Drug Discov*. 10: 377-93.

Mesulam M. 2004. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem*. 11: 43-9.

Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI. 1983. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10: 1185-201.

Migeon JC, Thomas SL, Nathanson NM. 1995. Differential coupling of m2 and m4 muscarinic receptors to inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha and G(o)alpha subunits. *J Biol Chem* 270: 16070-4.

Michal P, El-Fakahany EE, Doležal V. 2007. Muscarinic M2 receptors directly activate Gq/11 and Gs G-proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 607-14.

Michal P, Lysíková M, Tuček S. 2001. Dual effects of muscarinic M(2) acetylcholine receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: dependence on time, receptor density and receptor agonists. *Br J Pharmacol* 132: 1217-28.

Milligan G, Marshall F, Rees S. 1996. G16 as a universal G protein adapter: implications for agonist screening strategies. *Trends Pharmacol Sci*. 17: 235-7.

Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J. 2001. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* 21: 5239-50.

Mrzljak L, Levey AI, Rakic P. 1996. Selective expression of m2 muscarinic receptor in the parvocellular channel of the primate visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 7337-40.

Muñoz-Torrero D. 2008. Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*. 15: 2433-55.

Murphy BP, Chung YC, Park TW, McGorry PD. 2006. Pharmacological treatment of primary negative symptoms in schizophrenia: a systematic review. *Schizophr Res*. 88: 5-25.

- Newman EL, Gupta K, Climer JR, Monaghan CK, Hasselmo ME. 2012. Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Front Behav Neurosci.* 6: 24.
- Noetzel MJ, Grant MK, El-Fakahany EE. Immediate and Delayed Consequences of Xanomeline Wash-Resistant Binding at the M3 Muscarinic Receptor. 2009. *Neurochem Res.* 34: 1138-49.
- Oda S, Kuroda M, Kakuta S, Kishi K. 2001. Differential immunolocalization of m2 and m3 muscarinic receptors in the anteroventral and anterodorsal thalamic nuclei of the rat. *Brain Res.* 894: 109-20.
- Offermanns S, Wieland T, Homann D, Sandmann J, Bombien E, Spicher K, Schultz G, Jakobs KH. 1994. Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11. *Mol Pharmacol* 45: 890-8.
- Olanow C, Stern M, Sethi K. 2009. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology* 72 Suppl 4: S1-136.
- Oldham WM, Hamm HE. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 60-71.
- Orban PC, Chapman PF, Brambilla R. 1999. Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term memory formation? *Trends Neurosci.* 22: 38-44.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289: 739-45.
- Pazzagli A, Pepeu G. 1965. Amnesic properties of scopolamine and brain acetylcholine in the rat. *Int J Neuropharmacol.* 4: 291-9.
- Perry EK, Kilford L, Lees AJ, Burn DJ, Perry RH. 2003. Increased Alzheimer pathology in Parkinson's disease related to antimuscarinic drugs. *Ann Neurol.* 54: 235-8.
- Perry KW, Nisenbaum LK, George CA, Shannon HE, Felder CC, Bymaster FP. 2001. The muscarinic agonist xanomeline increases monoamine release and immediate early gene expression in the rat prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 49: 716-25.
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 83: 346-56.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 639-650.
- Prince M, Albanese E, Guerchet M, Prina M. 2014. World Alzheimer Report 2014: Dementia and Risk Reduction. London: Alzheimer's Disease International (<http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2014.pdf>).
- Reever CM, Ferrari-DiLeo G, Flynn DD. 1997. The M5 (m5) receptor subtype: fact or fiction? *Life Sci.* 60: 1105-12.

Rosignoli F, Pérez Leirós C. 2002. Activation of nitric oxide synthase through muscarinic receptors in rat parotid gland. *Eur J Pharmacol.* 439: 27-33.

Rouse ST, Edmunds SM, Yi H, Gilmor ML, Levey AI. 2000. Localization of M(2) muscarinic acetylcholine receptor protein in cholinergic and non-cholinergic terminals in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 284: 182-6.

Rouse ST, Gilmor ML, Levey AI. 1998. Differential presynaptic and postsynaptic expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptors at the perforant pathway/granule cell synapse. *Neuroscience* 86: 221-32.

Rouse ST, Thomas TM, Levey AI. 1997. Muscarinic acetylcholine receptor subtype, m2: diverse functional implications of differential synaptic localization. *Life Sci.* 60: 1031-8.

Rusted JM, Warburton DM. 1988. The effects of scopolamine on working memory in healthy young volunteers. *Psychopharmacology (Berl).* 96: 145-52.

Sakai K, Onoe H. 1997. Critical role for M3 muscarinic receptors in paradoxical sleep generation in the cat. *Eur J Neurosci.* 9: 415-23.

Salamone JD, Correa M, Carlson BB, Wisniecki A, Mayorga AJ, Nisenbaum E, Nisenbaum L, Felder C. 2001. Neostriatal muscarinic receptor subtypes involved in the generation of tremulous jaw movements in rodents implications for cholinergic involvement in parkinsonism. *Life Sci.* 68: 2579-84.

Sato A, Sato Y, Uchida S. 2004. Activation of the intracerebral cholinergic nerve fibers originating in the basal forebrain increases regional cerebral blood flow in the rat's cortex and hippocampus. *Neurosci Lett.* 361: 90-3.

Sauerberg P, Olesen PH, Nielsen S, Treppendahl S, Sheardown MJ, Honoré T, Mitch CH, Ward JS, Pike AJ, Bymaster FP, et al. 1992. Novel functional M1 selective muscarinic agonists. Synthesis and structure-activity relationships of 3-(1,2,5-thiadiazolyl)-1,2,5,6-tetrahydro-1-methylpyridines. *J Med Chem.* 35: 2274-83

Sawa A, Snyder SH. 2003. Schizophrenia: neural mechanisms for novel therapies. *Mol Med.* 9: 3-9.

Seeger T, Fedorova I, Zheng F, Miyakawa T, Koustova E, Gomeza J, Basile AS, Alzheimer C, Wess J. 2004. M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *J Neurosci.* 24: 10117-27.

Selkoe DJ. 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6: 487-98.

Shannon HE, Bymaster FP, Calligaro DO, Greenwood B, Mitch CH, Sawyer BD, Ward JS, Wong DT, Olesen PH, Sheardown MJ, Swedberg MDB, Suzdak PD, Sauerberg P. 1994. Xanomeline: a novel muscarinic receptor agonist with functional selectivity for M1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 269: 271-81.

Shannon HE, Hart JC, Bymaster FP, Calligaro DO, DeLapp NW, Mitch CH, Ward JS, Fink-Jensen A, Sauerberg P, Jeppesen L, Sheardown MJ, Swedberg MD. 1999. Muscarinic receptor agonists, like dopamine receptor antagonist antipsychotics, inhibit conditioned avoidance response in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 290: 901-7.

Shannon HE, Rasmussen K, Bymaster FP, Hart JC, Peters SC, Swedberg MD, Jeppesen L, Sheardown MJ, Sauerberg P, Fink-Jensen A. 2000. Xanomeline, an M(1)/M(4) preferring muscarinic cholinergic receptor agonist, produces antipsychotic-like activity in rats and mice. *Schizophr Res.* 42: 249-59.

Shekhar A, Potter WZ, Lightfoot J, Lienemann J, Dubé S, Mallinckrodt C, Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC. 2008. Selective muscarinic receptor agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 165: 1033-9.

Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T. 2005. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* 25: 11194-200.

Shirey JK, Brady AE, Jones PJ, Davis AA, Bridges TM, Kennedy JP, Jadhav SB, Menon UN, Xiang Z, Watson ML, Christian EP, Doherty JJ, Quirk MC, Snyder DH, Lah JJ, Levey AI, Nicolle MM, Lindsley CW, Conn PJ. 2009. A selective allosteric potentiator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor increases activity of medial prefrontal cortical neurons and restores impairments in reversal learning. *J Neurosci.* 29: 14271-86.

Shockley MS, Tolbert LM, Tobin AB, Nahorski SR, Sadée W, Lameh J. 1999. Differential regulation of muscarinic M1 and M3 receptors by a putative phosphorylation domain. *Eur J Pharmacol.* 377: 137-46.

Spalding TA, Trotter C, Skjaerbaek N, Messier TL, Currier EA, Burstein ES, Li D, Hacksell U, Brann MR. 2002. Discovery of an ectopic activation site on the M(1) muscarinic receptor. *Mol Pharmacol.* 61: 1297-302.

Stanhope KJ, Mirza NR, Bickerdike MJ, Bright JL, Harrington NR, Hesselink MB, Kennett GA, Lightowler S, Sheardown MJ, Syed R, Upton RL, Wadsworth G, Weiss SM, Wyatt A. 2001. The muscarinic receptor agonist xanomeline has an antipsychotic-like profile in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 299: 782-92.

Stengel PW, Gomeza J, Wess J, Cohen ML. 2000. M(2) and M(4) receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 292: 877-85.

Sunderland T, Tariot PN, Cohen RM, Weingartner H, Mueller EA 3rd, Murphy DL. 1987. Anticholinergic sensitivity in patients with dementia of the Alzheimer type and age-matched controls. A dose-response study. *Arch Gen Psychiatry* 44: 418-26.

Tayebati SK, Di Tullio MA, Tomassoni D, Amenta F. 2003. Localization of the m5 muscarinic cholinergic receptor in rat circle of Willis and pial arteries. *Neuroscience* 122: 205-11.

- Thomsen M, Fulton BS, Caine SB. 2013. Acute and chronic effects of the M1/M4 preferring muscarinic agonist xanomeline on cocaine vs. food choice in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 231: 469-79.
- Tollefson GD, Sanger TM, Lu Y, Thieme ME. 1998. Depressive signs and symptoms in schizophrenia: a prospective blinded trial of olanzapine and haloperidol. *Arch Gen Psychiatry* 55: 250-8.
- Tsang SW, Lai MK, Kirvell S, Francis PT, Esiri MM, Hope T, Chen CP, Wong PT. 2006. Impaired coupling of muscarinic M1 receptors to G-proteins in the neocortex is associated with severity of dementia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27: 1216-23.
- Tuček S. 1983. Acetylcoenzyme A and the synthesis of acetylcholine in neurones: review of recent progress. *Gen Physiol Biophys.* 2: 313-24.
- Tuček S, Michal P, Vlachová V. 2001. Dual effects of muscarinic M2 receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: background and model. *Life Sci* 68: 2501-10.
- Tzavara ET, Bymaster FP, Davis RJ, Wade MR, Perry KW, Wess J, McKinzie DL, Felder C, Nomikos GG. 2004. M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related CNS pathologies. *FASEB J.* 18: 1410-2.
- Tzavara ET, Bymaster FP, Felder CC, Wade M, Gomeza J, Wess J, McKinzie DL, Nomikos GG. 2003. Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice. *Mol Psychiatry* 8: 673-9.
- Wall SJ, Yasuda RP, Hory F, Flagg S, Martin BM, Ginns EI, Wolfe BB. 1991. Production of antisera selective for m1 muscarinic receptors using fusion proteins: distribution of m1 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol.* 39: 643-9.
- Wang H, Han H, Zhang L, Shi H, Schram G, Nattel S, Wang Z. 2001. Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. *Mol Pharmacol.* 59: 1029-36.
- Wang P, Luthin GR, Ruggieri MR. 1995. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther.* 273: 959-66.
- Wang SZ, Lee SY, Zhu SZ, el-Fakahany EE. 1996. Differential coupling of m1, m3, and m5 muscarinic receptors to activation of neuronal nitric oxide synthase. *Pharmacology.* 53: 271-80.
- Watson EL, Abel PW, DiJulio D, Zeng W, Makoid M, Jacobson KL, Potter LT, Dowd FJ. 1996. Identification of muscarinic receptor subtypes in mouse parotid gland. *Am J Physiol.* 271: C905-13.

Watson J, Brough S, Coldwell MC, Gager T, Ho M, Hunter AJ, Jerman J, Middlemiss DN, Riley GJ, Brown AM. 1998. Functional effects of the muscarinic receptor agonist, xanomeline, at 5-HT1 and 5-HT2 receptors. *Br J Pharmacol.* 125: 1413-20.

Weiner DM, Meltzer HY, Veinbergs I, Donohue EM, Spalding TA, Smith TT, Mohell N, Harvey SC, Lamah J, Nash N, Vanover KE, Olsson R, Jayathilake K, Lee M, Levey AI, Hacksell U, Burstein ES, Davis RE, Brann MR. 2004. The role of M1 muscarinic receptor agonism of N-desmethylozapine in the unique clinical effects of clozapine. *Psychopharmacology (Berl).* 177: 207-16.

Wess J. 2005. Allosteric Binding Sites on Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Mol. Pharmacol.* 68: 1506-9.

Westermeyer J. 2006. Comorbid schizophrenia and substance abuse: a review of epidemiology and course. *Am J Addict.* 15: 345-55.

Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215: 1237-9.

Wood MD, Murkitt KL, Ho M, Watson JM, Brown F, Hunter AJ, Middlemiss DN. 1999. Functional comparison of muscarinic partial agonists at muscarinic receptor subtypes hM1, hM2, hM3, hM4 and hM5 using microphysiometry. *Br J Pharmacol* 126: 1620-4.

Woolf NJ. 1996. The critical role of cholinergic basal forebrain neurons in morphological change and memory encoding: a hypothesis. *Neurobiol Learn Mem.* 66: 258-66.

Woolley ML, Carter HJ, Gartlon JE, Watson JM, Dawson LA. 2009. Attenuation of amphetamine-induced activity by the non-selective muscarinic receptor agonist, xanomeline, is absent in muscarinic M4 receptor knockout mice and attenuated in muscarinic M1 receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol.* 603: 147-9.

Yamada M, Lamping KG, Duttaroy A, Zhang W, Cui Y, Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC, Deng CX, Faraci FM, Wess J. 2001b. Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 14096-101.

Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX, Wess J. 2001a. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 410: 207-12.

Yamasaki M, Matsui M, Watanabe M. 2010. Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission. *J Neurosci.* 30: 4408-18.

Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J. 2002a. Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 22: 1709-17.

Zhang W, Yamada M, Gomeza J, Basile AS, Wess J. 2002b. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 22: 6347-52.

9 PŘÍLOHY