

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Autoreferát dizertační práce

**Mechanismy přenosu signálu muskarinovými
receptory**

Mechanisms of signal transduction via the muscarinic
receptors

Eva Dolejší

Praha, 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie živočichů

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.
oddělení Neurochemie

Autor: Mgr. Eva Dolejší

Školitel: MUDr. Vladimír Doležal, DrSc.

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

OBSAH

Abstrakt	4
Abstract	5
1 Úvod.....	7
2 Cíle práce	8
3 Materiál a metody	9
4 Výsledky	13
5 Diskuse.....	19
6 Závěr	22
7 Seznam literatury	24
8 Seznam publikací.....	26
Curriculum vitae	27

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 vaječnicků 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 xanomelinem v koncentraci 0,1–10 μM 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 μM 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 karbacholem 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 afinitu 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 ovšem 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 M_1 to M_5 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 M_1 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 M_1 and M_4 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 M_2 and M_4 receptors were transiently transfected with the promiscuous $G\alpha_{16}$ 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 M_1 and M_4 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 M_1 , M_3 and M_4 receptors. Increased calcium level at M_1 and M_4 receptors showed oscillations and subsequent stimulation with the classical agonist carbachol after 1h washing did not induce any additional response at the M_1 subtype. Wash-resistantly bound xanomeline behaved as a long-lasting antagonist at M_5 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 M_1 – M_4 receptors. Withdrawal of NMS resulted in reappearance of calcium response at M_1 and M_4 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 M_1 and M_4 receptors. This conclusion is foremost based on the higher efficacy of xanomeline to induce the primary fast calcium response at M_1 and M_4 than at other subtypes. The ability of xanomeline to induce fully developed oscillating calcium response in a long-term scale only at M_1 and M_4 receptors also supports this notion.

1 ÚVOD

Muskarinové receptory patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Existují v pěti podtypech, které se označují jako M_1 až M_5 . 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. Ortosterické vazebné místo mAChR leží hluboko v kapsovitě prohlubni, jejíž stěny tvoří transmembránové úseky proteinové struktury receptoru. Tyto úseky jsou oblastmi s velice vysokou mírou homologie mezi jednotlivými podtypy mAChR, což značně ztěžuje vývoj podtypově selektivních agonistů. Všechny podtypy mAChR disponují kromě ortosterického vazebného místa pro acetylcholin ještě alosterickými vazebnými místy, která jsou daleko méně strukturně zakonzervovaná. Současná vazba ortosterického a alosterického ligandu se projevuje vzájemným ovlivněním afinit receptoru pro oba ligandy. Navíc se ukázalo, že vazba alosterických ligandů může receptor přímo aktivovat (Jakubík et al., 1996). Pro mAChR je charakteristické, že aktivace alosterickými agonisty je funkčně téměř nerozlišitelná od aktivace klasickým agonistou karbacholem (CBC, nehydrolyzovatelný analog acetylcholinu), tedy tím, který se váže do ortosterického vazebného místa. Platí to jak pro liché, tak pro sudé podtypy.

Muskarinové receptory se v různém podtypovém zastoupení nacházejí jak v centrálním nervovém systému, tak na periférii. Zatímco v centrálním nervovém systému se nejhojněji vyskytují M_1 , M_2 a M_4 podtypy mAChR, v periferních tkáních jsou nejrozšířenější a funkčně nejdůležitější M_2 a M_3 (Levey et al., 1991). Muskarinové receptory hrají důležitou roli v mnoha specifických fyziologických funkcích. Za všechny jmenujme paměť a učení (M_1 ; Anagnostaras et al., 2003), kontrolu srdeční frekvence (M_2 ; Caulfield, 1993), kontrakce hladké svaloviny (M_3 ; Matsui

et al., 2000), kontrolu pohybu (M_4 ; Gomeza et al., 1999) či dilatace mozkových tepen (M_5 ; Yamada et al., 2001).

Narušení přenosu přes mAChR se vyskytuje u závažných neurodegenerativních a psychiatrických onemocnění jako jsou Alzheimerova choroba, schizofrenie či Parkinsonova choroba. Všechny provází úpadek kognitivních funkcí, který významně souvisí s narušením aktivace M_1 receptorů v mozku. Jak již bylo zmíněno, 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 (Bymaster et al., 1998; Shannon et al., 2000). 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 (Jakubík et al., 2002). Zatím nevíme, co je podstatou funkční selektivity xanomelinu. Je však zřejmé, že pro základní výzkum xanomelin představuje prototyp látky, která může sloužit jako nástroj pro studium mechanismů, které se uplatňují při selektivní aktivaci muskarinových receptorů.

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

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

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Buněčná kultura a přechodná transfekce

Ke všem pokusům jsme použili fibroblasty z vaječníků čínského křečka (CHO buňky) stabilně exprimující jednotlivé podtypy lidských mAChR (Missouri S&T cDNA Resource Center), které jsme pěstovali v médiu DMEM (Sigma) obohaceném 10% fetálním telecím sérem (Biochrom) a 0,005% geneticinem (G418, TOKU-E B.V.).

Za účelem přechodného vnesení dodatečné genetické informace do CHO buněk jsme využili tzv. lipofekci (Felgner et al., 1987). Pro transfekci CHO buněk cDNA pro α -podjednotku lidského G-proteinu G₁₆ jsme vždy zvlášť rozpustili příslušná množství cDNA a Lipofectaminu v médiu OptiMEM® (Invitrogen). Po 5 minutách jsme spojili oba roztoky, promíchali a inkubovali 20 minut při pokojové teplotě za občasného míchání. Poté jsme do každé jamky k buňkám omytým PBS přidali směs cDNA a Lipofectaminu a inkubovali 6 hodin při 37 °C. Po dalších 48 hodinách v DMEM byly buňky připravené na pokus.

3.2 Stanovení koncentrace nitrobuněčného vápníku rychlou mikrofluorimetrií

Koncentraci nitrobuněčných vápenatých iontů v CHO buňkách jsme měřili pomocí fluorescenční sondy Fura 2 (Grynkiewicz et al., 1985). Zvyšování poměru intenzity fluorescence naměřené při 510 nm po excitaci při 340 nm ku intenzitě naměřené po excitaci při 380 nm odráží zvyšování koncentrace volného vápníku v buňce a naopak. Mikrofluorimetrická měření jsme prováděli na CHO buňkách trvale exprimujících jednotlivé podtypy mAChR. Abychom docílili dobře měřitelných vápníkových odpovědí i u M₂ a M₄ receptorů, transfekovali jsme buňky trvale exprimující sudé podtypy muskarinových receptorů cDNA pro α -podjednotku

lidského G-proteinu G₁₆, jak již bylo popsáno. Před pokusem jsme buňky 2x omyli modifikovaným Krebsovým roztokem (KHB; obsahuje 20 mM Hepes místo bikarbonátu) a potom předznačovali 5μM Furou 2-AM (membránou procházející formou Fury 2) v KHB s 1mM Pluronic P68 (Sigma) po dobu 1 hodiny při 37 °C.

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. Schéma vypadalo následovně: 1.: kontrolní 5s stimulace 300nM karbacholem (CBC), 2.: 3 minuty promývání KHB, 4.: stimulace 10μM xanomelinem (xano), a to 1, 3 nebo 10 minut, 5.: promývání KHB 1 hodinu, 6.: 300nM CBC na 5 s.

Druhé měřicí schéma mělo za cíl studovat účinky klasického antagonisty N-metylskopolaminu (NMS) na opožděnou odpověď receptorů na (neodmyvatelně navázaný) xano. Postup byl následující: 1. kontrolní 5s stimulace 300nM CBC, 2.: 5 minut promývání KHB, 3.: 20 s stimulace 10μM xano, 4.: 2 minuty promývání KHB, 5.: 2 minuty aplikace 10μM NMS a 4 minuty promývání KHB.

Třetí schéma bylo zaměřené na účinky NMS na okamžitou odpověď receptorů na xano a na aktivaci receptorů neodmyvatelně navázaným xano. Postupovali jsme takto (M₁–M₄): 1. 10s stimulace 300nM CBC, 2.: 5 minut promývání KHB, 3. aplikace 10μM NMS po dobu 3 minut (během druhé minuty aplikace NMS jsme do média přidali navíc na 1 minutu 10μM xano), 4.: promývání KHB 3 minuty. V případě buněk exprimujících M₅ receptory jsme použili modifikovanou verzi tohoto schématu, protože se xanomelin na M₅ receptorech chová výrazně odlišným způsobem: 1. kontrolní 5s stimulace 300nM CBC, 2.: promývání KHB 5 minut, 3.: aplikace 10μM NMS na 1 minutu, potom 10 minut současně s NMS

ještě 10 μ M xano a nakonec opět pouze 10 μ M NMS na 1 minutu, 4.: promývání KHB 1 hodinu, 5.: stimulace 300nM CBC na 5 s.

3.3 Stanovení hustoty a vazebných vlastností muskarinových receptorů v membránách

Změny počtu muskarinových receptorů v buněčných membránách vyvolané působením xano 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.

Příprava buněk pro vazebné pokusy napodobovala podmínky mikrofluorimetrických měření. V den pokusu jsme buňky nejprve uvolnili z jednotlivých jamek, přidali k nim KHB a poté inkubovali buď v KHB obsahujícím 10 μ M xano (1, 3 nebo 10 minut při teplotě místnosti) nebo v KHB obsahujícím 1 μ M CBC, 1 μ M oxotremorin či 3 μ M pilokarpin (10 minut taktéž při teplotě místnosti). Kontrolní buňky jsme inkubovali pouze v KHB. Poté jsme buňky stočili, odstranili supernatant a opláchli vychlazeným KHB. Následně jsme buňky inkubovali 10 minut nebo 1 hodinu v čistém KHB při teplotě místnosti. Poté jsme buňky zchladili na ledu a připravili z nich membrány. Buňky jsme smíchali s homogenizačním médiem a homogenizovali na ledu. Homogenáty jsme poté centrifugovali, supernatant odstranili, peletu znovu resuspendovali a opakovali centrifugaci. Membrány jsme inkubovali 1 hodinu s [³H]NMS při 30 °C. Nespecifickou vazbu jsme stanovovali v přítomnosti neznačeného NMS. Inkubaci jsme ukončili rychlou filtrací na přístroji Brandel přes

filtr se skelnými vlákny Whatman GF/C. Suché filtry jsme zalili do pevného scintilátoru Meltilex A (Perkin Elmer). Následně jsme měřili zachycenou radioaktivitu pomocí scintilačního počítače Microbeta 1450 (Wallac). Maximální vazbu (B_{MAX}) jsme korigovali vzhledem k obsahu proteinů ve vzorcích.

3.4 Vyhodnocení výsledků

Výsledky mikrofluorimetrických měření jsme zpracovávali v programu Grace (Weizmann Institute of Science). Výsledky vazebných pokusů jsme nejprve analyzovali v programu OpenOffice Calc a poté dále zpracovávali prostřednictvím GraphPad Prism. Statistickou analýzu jsme vypracovali s pomocí statistického balíčku R.

3.4.1 Mikrofluorimetrická měření

Při vyhodnocování mikrofluorimetrických měření jsme pro další posouzení vybírali pouze ty buňky, které odpověděly na první (kontrolní) stimulaci CBC. Z každého pokusu jsme volili 8–12 buněk s nejlepší odpovědí. 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. 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 polovinu maximálního účinku.

3.4.2 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 tohoto 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} agonista - 1) / (E_{MAX} 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

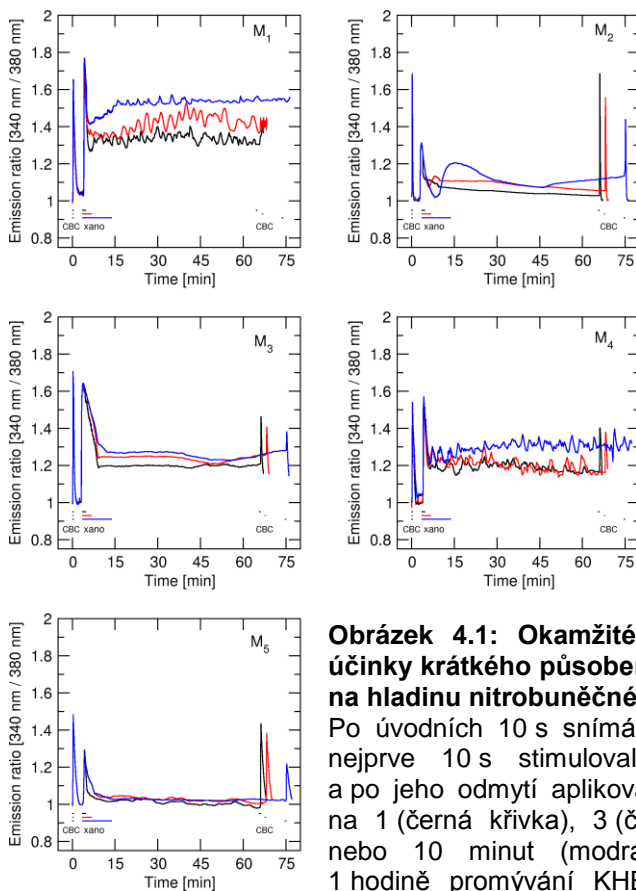
První (kontrolní) stimulace 300nM CBC přinesla okamžité uvolnění vápenatých iontů z intracelulárních zásob u všech podtypů mAChR včetně buněk exprimujících M_2 a M_4 receptory, transfekovaných podjednotkou $G\alpha_{16}$. Během 3 minut promývání se hladina vápníku vždy vrátila na původní úroveň. Čas potřebný k dosažení maximální odpovědi vyvolané CBC byl srovnatelný u všech podtypů.

Stimulace $10\mu\text{M}$ xano trvající 1, 3 nebo 10 minut vedla k rychlému zvýšení hladiny nitrobuněčného vápníku na všech podtypech mAChR. Na rozdíl od první (kontrolní) stimulace CBC se však rychlost vzestupu hladiny vápníku i hodnota maximální vápníkové odpovědi lišily mezi jednotlivými podtypy mAChR. Odpověď na xano byla nejrychlejší na M_1 receptoru a nejpomalejší na M_5 podtypu. Nejvýrazněji na xano reagoval M_1 receptor. V případě M_3 a M_4 receptoru dosáhla vápníková odpověď na xano přibližně stejného maxima jako na CBC. Naproti tomu na M_2 a M_5 receptorech vyvolal xano jen asi poloviční odpověď ve srovnání s CBC (Obr. 4.1)

Poté, co hladina vápníku dosáhla svého vrcholu, začala okamžitě klesat navzdory tomu, že xano byl stále přítomen v promývacím médiu. Buňky exprimující M_1 , M_3 a M_4 receptory vykazovaly po 1, 3 i 10minutovém působení xano zvýšenou intracelulární hladinu vápníku i po následném 60minutovém promývání KHB. V případě M_2 receptorů byla pouze 10minutová stimulace xano dostačující k tomu, aby hladina nitrobuněčného vápníku zůstala zvýšená i po následujícím hodinovém promývání. Co se týče M_5 receptorů, zde se hladina vápníku vrátila na původní hodnotu, ať byla stimulace xano 1, 3 či 10minutová. Zvýšená hladina vápenatých iontů po stimulaci M_1 a M_4 receptorů se vyznačovala výraznými oscilacemi, které se nevyskytovaly u M_2 či M_3 (Obr. 4.1).

Druhá kontrolní aplikace 300nM CBC trvající 10 s provedená po stimulaci buněk xano a následném promývání pufrem i tak vedla k rychlé mobilizaci vápenatých iontů u všech podtypů mAChR s výjimkou M_1 (po 1, 3 i 10minutové stimulaci xano) a M_4 (pouze po 10minutové stimulaci xanomelinem). V těchto případech zůstala hladina vápníku po aplikaci xano výrazně zvýšená a vykazovala spontánní oscilace. Působení xano i přes následovné odmytí volného

xano zpomalilo vápníkovou mobilizaci a vedlo k poklesu vápníkového signálu vyvolaného aplikací CBC (Obr. 4.1).



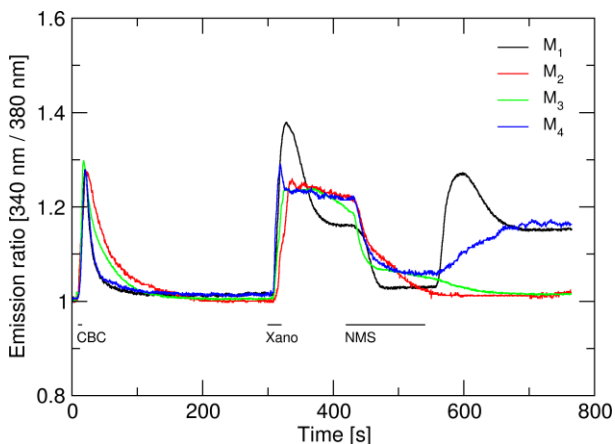
Obrázek 4.1: Okamžité a opožděné účinky krátkého působení xanomelinu na hladinu nitrobuněčného vápníku

Po úvodních 10 s snímání jsme buňky nejprve 10 s stimulovali 300nM CBC a po jeho odmytí aplikovali 10 μ M xano na 1 (černá křivka), 3 (červená křivka) nebo 10 minut (modrá křivka). Po 1 hodině promývání KHB jsme buňky opět stimulovali 300nM CBC. Průběh změn koncentrace nitrobuněčného vápníku (osa y) je zobrazen jako změna poměru intenzit fluorescence při 340/380 nm.

4.2 Účinek blokády ortosterického místa mACHR na hladinu vápníku zvýšenou působením xanomelinu

Abychom zjistili, jak zablokování ortosterického vazebného místa ovlivní účinky už utvořené neodmyvatelné

vazby xanomelinu na jednotlivé podtypy mAChR, použili jsme ortosterického antagonistu NMS (Obr. 4.2). Po aplikaci 10 μ M NMS klesla hladina nitrobenčného vápníku, která byla zvýšená po stimulaci xano (a následném promývání), na bazální úroveň u všech čtyř studovaných podtypů mAChR (M_5 podtyp jsme nesledovali, neboť u tohoto podtypu docházelo po aplikaci xano k návratu k bazálním hodnotám, Obr. 4.1). Poté, co jsme NMS z média odstranili, hladina vápníku opět vzrostla v případě M_1 a M_4 receptorů, ale ne u M_2 a M_3 receptorů. U M_1 receptorů bylo možné pozorovat "přestřelení" vápníkového signálu (Obr. 4.2) a čas potřebný k dosažení maxima po odmytí NMS byl u M_1 několikanásobně kratší než u M_4 (Obr. 4.2).



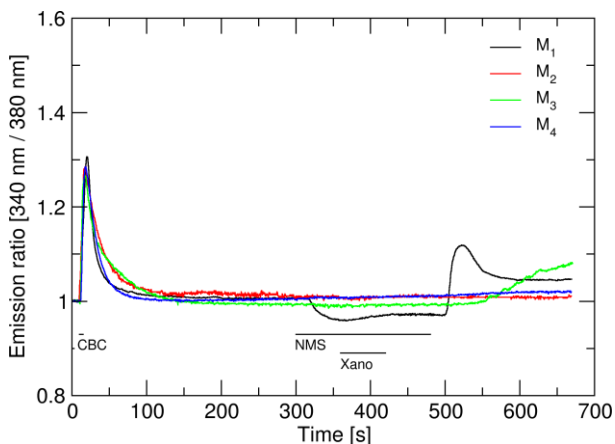
Obrázek 4.2: Účinek blokády ortosterického místa mAChR na hladinu vápníku zvýšenou působením xanomelinu

Po 10 s snímání jsme buňky 5 s stimulovali 300nM CBC a poté 5 minut promývali KHB. Následně jsme 20 s aplikovali 10 μ M xano a po jeho odmytí jsme na 2 minuty přidali 10 μ M NMS. Poté jsme buňky ještě 4 minuty promývali KHB.

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 xano vyžaduje interakci xano s ortosterickým místem. NMS snížil bazální hladinu vápníkového signálu v buňkách exprimujících M_1 receptory o 4,5 % (Obr. 4.3), ale u ostatních podtypů mAChR k podobné změně nedošlo. Xano aplikovaný současně s NMS se nevyznačoval žádným okamžitým účinkem na hladinu vápníku v buňkách u žádného z podtypů. Ovšem odmytí NMS vedlo ke vzrůstu hladiny vápníku v buňkách exprimujících M_1 a M_3 receptory. 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 xano. NMS tedy bránil xanomelinu aktivovat M_2 a M_4 receptory neodmyvatelnou vazbou, ale nečinil tak u M_1 ani M_3 podtypů.



Obrázek 4.3: Vliv NMS na vznik neodmyvatelné vazby xanomelinu

Po 10 s snímání jsme provedli kontrolní stimulaci 300nM CBC 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 xano. Poté jsme buňky ještě 3 minuty promývali KHB.

4.5 Vliv xanomelinu na počet membránových receptorů

Počet membránových receptorů jsme měřili pomocí saturačních vazebných pokusů s využitím radioaktivně značeného antagonisty muskarinových receptorů [³H]NMS.

Působení xano vedlo ke snížení afinity [³H]NMS ke všem podtypům mAChR za všech námi vytvořených podmínek. Xanomelinem vyvolaný pokles afinity [³H]NMS byl nejzrozsáhlejší na M₄ receptoru a nejmenší na M₂ receptoru. Naproti tomu 10minutové působení 1μM karcholu, 1μM oxotremorinu či 3μM pilokarpinu se nevyznačovalo žádným účinkem na afinitu [³H]NMS u žádného z podtypů mAChR, ale snížilo počet membránových receptorů. Agonisté oxotremorin a pilokarpin měli daleko menší účinek co do schopnosti svým působením snižovat počet membránových mAChR než CBC.

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 karcholu zapříčinila snížení počtu všech podtypů membránových mAChR stejnou měrou s výjimkou M₁ receptoru, kde se po prodloužení promývání pokles zmenšil. 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 karcholu, oxotremorinu či pilokarpinu nemělo žádný vliv na afinitu [³H]NMS k receptorům.

Snížení afinity [^3H]NMS po 10minutovém působení xanomelinu v případě M_4 receptorů bylo stejné jak po 10minutovém, tak i hodinovém následném promývání. Pokles afinity [^3H]NMS po aplikaci xanomelinu na M_4 receptory trvající 1 či 3 minuty se zvýraznil během hodinového promývání. Na M_3 receptorech se rovněž afinita [^3H]NMS v důsledku působení xanomelinu snížila větší měrou během hodinového promývání pufrům. Naproti tomu afinita [^3H]NMS se u zbývajících podtypů mAChR v průběhu hodinového promývání snížila méně než během promývání trvajícího pouze 10 minut.

5 DISKUSE

5.1 Rozdíly v okamžitých a dlouhodobých účincích xanomelinu na jednotlivé podtypy mAChR

V případě M_1 , M_3 a M_4 podtypů mAChR vedla 1minutová aplikace xano k výraznému vzestupu hladiny nitrobuněčného vápníku, který přetrval po dobu více než 1 hodiny po odmytí xano (Obr. 4.1, 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 dává tušit, 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 xano 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 CBC byly blokovány působením neodmyvatelné vazby xanomelinu u M_1 , M_4 a M_5 receptorů. Zatímco na

M₁ a M₄ receptorech se neodmyvatelně navázaný xano choval jako kompetitivní agonista, na M₅ receptorech se jeho působeníjevilo jako neutrální či kompetitivně antagonistické. Tyto výsledky jsou ve shodě s již známou funkční selektivitou xano pro M₁ a M₄ receptory (Bymaster et al., 1998; Shannon et al., 2000), s opožděnými účinky neodmyvatelné vazby xano na M₂ receptorech (Jakubík et al., 2006; Machová et al., 2007) a antagonistickým působením neodmyvatelné vazby na M₅ receptorech (Grant et al., 2005).

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

I různé způsoby interakce xano s receptorem, interakce s rozličnými receptorovými doménami nebo rozdílné způsoby aktivace receptoru by mohly vysvětlovat funkční selektivitu tohoto agonisty. Proto jsme se snažili zjistit, jestli aktivace receptoru neodmyvatelně navázaným xano může být zablokována ortosterickým antagonistou NMS (Obr. 4.2) a zda proces vzniku aktivace receptoru neodmyvatelně navázaným xano (Obr. 4.3) či agonistické účinky neodmyvatelně vázaného xanomelinu mohou být zablokovány NMS.

Jak je vidět na Obr. 4.2, zvýšená hladina vápníku v přítomnosti xano poklesla v důsledku aplikace NMS u všech podtypů mAChR. Zatímco hladina nitrobuněčného vápníku opětovně stoupá po odmytí NMS u M₁ a M₄ receptorů, v případě M₂ a M₃ receptorů zůstává na bazální hodnotě (Obr. 4.2). V rámci těchto čtyř podtypů má NMS nejpomalejší vazebnou kinetiku na M₃ receptoru a nejrychlejší na M₂ receptoru (Jakubík et al., 1995). Ačkoli by pomalá kinetika NMS na M₃ 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 nitrobenzylidenu po odmytí NMS nemůžeme vysvětlit vazebnou kinetikou NMS (disociace NMS z M_2 receptoru je rychlejší než z M_1 či M_4 receptoru).

Když jsme xano 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. 4.3 (černé a zelené křivky) a Obr. 4.1 (černé křivky). Naproti tomu M_2 a M_4 receptory xano za těchto podmínek nedokázal aktivovat neodmyvatelnou vazbou vůbec (Obr. 4.3, červené a modré křivky). Dá se tedy říci, že NMS zpomaluje nástup aktivace receptoru prostřednictvím neodmyvatelné vazby xano 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 xano je o mnoho pomalejší než je tomu u M_1 receptoru (Jakubík et al., 2006) a mělo se za to, že rozdíly v kinetice neodmyvatelné vazby a následné aktivaci receptoru by mohly být jedním z důvodů, proč se xano pyšní funkční selektivitou právě pro M_1 receptory. Kinetika neodmyvatelné vazby xano však nekoreluje s funkční selektivitou xano pro M_1 a M_4 receptory. Ačkoli je kinetika neodmyvatelné vazby xano 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 xano hovořit nedá. Účinky neodmyvatelné vazby xano se dále vyvíjejí během hodinového promývání buněk. Inhibice vazby NMS během hodinového promývání na M_1 receptoru slábne, na M_3 receptoru naopak zesiluje. Nezbyvá než konstatovat, že

rozdíly v kinetice neodmyvatelné vazby xano a následné aktivace receptoru nevysvětlují pozorovanou funkční selektivitu xano pro M_1 a M_4 receptory.

Podíváme-li se na výsledky z nedávné doby, není úplně nereálné se na základě nich domnívat, že funkční selektivita xano by mohla souviset s různou regulací jednotlivých podtypů muskarinových receptorů (Grant et al., 2010; Noetzel et al., 2009). Je pravděpodobné, že slabší nebo pomalejší downregulace signalizace konkrétního podtypu mAChR, která nastává v důsledku stimulace xano, by mohla naopak vést k posílení signalizace tohoto podtypu na dlouhý časový úsek. Naše výsledky ale ukazují, že xano (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 karchacholu a částečných agonistech pilokarpinu a oxotremorinu. Tudíž za přetrvávající zvýšenou hladinou vápníku objevující se pouze po stimulaci M_1 a M_4 receptorů xanomelinem nemůže stát různá míra internalizace receptorů ani obnova receptorů. Trvale zvýšená hladina nitrobuněčného vápníku vyskytující se pouze následkem stimulace neodmyvatelně navázaným xano 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 karchachol 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 M_1 and M_4 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 M_1 and M_4 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 LITERATURY

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.

Bymaster FP, Carter PA, Peters SC, Zhang W, Ward JS, Mitch CH, Calligaro DO, Whitesitt CA, DeLapp N, Shannon HE, Rimvall 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.

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

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.

Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J. 1999. 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.

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, Jakubik 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.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260: 3440-50.

- 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, 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, 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.
- 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.
- 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.
- Machová E, Jakubík J, El-Fakahany EE, Doležal V. 2007. Wash-resistantly bound xanomeline inhibits acetylcholine release by persistent activation of presynaptic M(2) and M(4) muscarinic receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 322: 316-23.
- 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.
- 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.
- 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.

8 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).

CURRICULUM VITAE

Datum narození: 1. leden 1985

E-mail: santruckova@biomed.cas.cz

Studium

od r. 2009: PřF UK v Praze, doktorský program Fyziologie živočichů

dizertační práce: Mechanismy přenosu signálu muskarinovými receptory

2007–2009: PřF UK v Praze, magisterský obor Fyziologie živočichů (zaměření Neurobiologie)

diplomová práce: Mobilizace nitrobuněčného vápníku receptory pro acetylcholin muskarinového typu

2004–2007: PřF UK v Praze, bakalářský obor Biologie

bakalářská práce: Cholinergní mechanismy v patogenezi Alzheimerovy nemoci

Odborné kurzy

2010: mikroskopický kurz Advanced Techniques in Fluorescence Microscopy v ÚMG AV ČR, v. v. i.

Dosavadní praxe

od r. 2006: oddělení Neurochemie, Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.

odborné zaměření: studium aktivace a vazebných vlastností muskarinových receptorů

Pedagogická činnost:

od r. 2012: výuka pregraduálních studentů v rámci kurzů pořádaných Centrem biomedicínského výzkumu ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v. v. i.

Charles University in Prague

Faculty of Science



Summary of the Ph.D. Thesis

**Mechanisms of signal transduction via
the muscarinic receptors**

Mechanismy přenosu signálu muskarinovými
receptory

Eva Dolejší

Praha, 2014

Doctoral Study Programmes in Biomedicine

*Charles University in Prague
and Academy of Sciences of the Czech Republic*

Branch: Animal Physiology

Chairperson of
Subject Area Board: Doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.

Workplace: Institute of Physiology AS CR, v. v. i.
Department of Neurochemistry

Author: Mgr. Eva Dolejší

Supervisor: MUDr. Vladimír Doležal, DrSc.

The PhD. thesis is accessible in the dean's office of the Faculty of Science, Charles University in Prague.

CONTENTS

Abstract	4
Abstrakt.....	5
1 Introduction.....	7
2 Aims of the study.....	8
3 Material and methods.....	9
4 Results.....	13
5 Discussion.....	19
6 Summary.....	22
7 References.....	23
8 List of publications.....	25
Curriculum vitae	26

ABSTRACT

Muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) belong to the family of G-protein coupled receptors. There are five subtypes of mAChR denoted M_1 to M_5 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 M_1 receptor signalling 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 M_1 and M_4 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 M_2 and M_4 receptors were transiently transfected with the promiscuous $G\alpha_{16}$ 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 μM xanomeline resulted in a fast increase in intracellular calcium level at all mAChR subtypes that was most pronounced at M_1 and M_4 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 μM xanomeline calcium level did not return to its resting level even after 1h washing at M_1 , M_3 and M_4 receptors. Increased calcium level at M_1 and M_4 receptors showed oscillations and subsequent stimulation with the classical agonist carbachol after 1h washing did not induce any additional response at the M_1 subtype. Wash-resistantly bound xanomeline behaved as a long-lasting antagonist at M_5 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 M_1 – M_4 receptors. Withdrawal of NMS resulted in reappearance of calcium response at M_1 and M_4 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 M_1 and M_4 receptors. This conclusion is foremost based on the higher efficacy of xanomeline to induce the primary fast calcium response at M_1 and M_4 than at other subtypes. The ability of xanomeline to induce fully developed oscillating calcium response in a long-term scale only at M_1 and M_4 receptors also supports this notion.

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 vaječnicků 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 xanomelinem v koncentraci 0,1–10 μM 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 μM 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 karbacholem 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 afinitu 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 ovšem 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.

1 INTRODUCTION

Muscarinic acetylcholine receptors belong to the family of G-protein coupled receptors. There are five subtypes of mAChR denoted M_1 to M_5 . Odd numbered subtypes (M_1 , M_3 , M_5) preferentially couple with $G_{q/11}$ G-proteins whereas even numbered subtypes (M_2 , M_4) transmit the signal across the plasma membrane mainly via the $G_{i/o}$ G-proteins. The orthosteric binding site of the mAChR is situated within a deep binding pocket whose boundaries are formed by the transmembrane helices of the receptor protein structure. These regions show a very high degree of homology among individual subtypes of mAChR, which makes it extremely difficult to produce subtype-selective agonists that bind to this receptor domain. Apart from the orthosteric binding site all mAChR subtypes contain allosteric binding sites that are much less structurally conserved. Concurrent binding of an orthosteric and allosteric ligand reciprocally influences the affinity of the receptor for both ligands. Moreover, it was shown that allosteric ligands could directly activate the receptor (Jakubík et al., 1996). It is a distinct feature of mAChR that receptor activation by allosteric agonists is functionally indistinguishable from activation by the classical agonist carbachol (CBC, non-hydrolysable acetylcholine analog) that binds to the orthosteric binding site. This applies for both odd and even subtypes.

Muscarinic receptors are widely and differentially distributed in both the central nervous system and periphery. While in the central nervous system M_1 , M_2 a M_4 subtypes are the most abundant, M_2 a M_3 subtypes are the most widespread and functionally most important in the periphery (Levey et al., 1991). Muscarinic receptors play an important role in many specific physiological functions, for instance learning and memory (M_1 ; Anagnostaras et al., 2003), control of the heart rate (M_2 ; Caulfield, 1993), smooth muscle contractions (M_3 ;

Matsui et al., 2000), control of locomotion (M_4 ; Gomeza et al., 1999) or dilatation of cerebral arteries (M_5 ; Yamada et al., 2001).

Impairment of neurotransmission via the mAChR occurs in serious neurodegenerative and psychiatric disorders such as Alzheimer's disease, schizophrenia or Parkinson's disease. All of them are accompanied by deterioration of cognitive functions that notably relates to impairment of M_1 receptor activation in the brain. It was already mentioned that the high degree of orthosteric binding site homology makes it difficult to obtain subtype selective mAChR agonists. One of the few known selective agonists is xanomeline that preferentially activates mainly M_1 and M_4 subtypes (Bymaster et al., 1998; Shannon et al., 2000). Xanomeline exerts unique interactions with muscarinic receptors comprising reversible binding to the orthosteric domain, and wash-resistant allosteric interaction with a secondary binding site (Jakubík et al., 2002). The basis of xanomeline functional selectivity remains largely unknown. However, it is evident that it is a prototypical compound in basic research that can serve as a tool for us to study mechanisms that underlie selective activation of muscarinic receptors.

2 AIMS OF THE STUDY

1. To find out the differences in immediate and long-term effects of xanomeline at individual subtypes of mAChR.
2. To elucidate how the orthosteric antagonist NMS influences formation of xanomeline wash-resistant binding and how it affects the action of wash-resistant bound xanomeline.
3. To compare kinetics of formation of xanomeline wash-resistant binding at individual subtypes of mAChR and the effects of xanomeline wash-resistant binding on the number of membrane receptors.

3 MATERIAL AND METHODS

3.1 Cell culture and transient transfection

We used fibroblasts from Chinese hamster ovaries (CHO cells) stably expressing individual subtypes of muscarinic receptors (Missouri S&T cDNA Resource Centre) for all experiments. We maintained the cells in DMEM (Sigma) containing 10% fetal bovine serum (Biochrom) and 0,005% geneticin (G418, TOKU-E B.V.).

We transiently transfected CHO cells using the lipofection protocol (Felgner et al., 1987). To transfect CHO cells with the cDNA encoding the α -subunit of the human G₁₆ G-protein we always diluted the appropriate amount of cDNA and Lipofectamine in the OptiMEM® medium (Invitrogen). After 5 min we mixed both solutions, stirred and incubated 20 min at room temperature with occasional stirring. Then we washed the cells in each well with PBS, added the mixture of cDNA and Lipofectamine and incubated for 6 hours at 37 °C. After another 48 hours cells were ready for the experiments.

3.2 Assessment of intracellular calcium concentration by fast microfluorimetry

We measured intracellular calcium concentration in CHO cells by means of the fluorescent dye Fura 2 (Grynkiewicz et al., 1985). Fura 2 is excited at 340 nm and 380 nm of light, and the ratio of emissions at those wavelengths reflects the amount of intracellular calcium. Fura 2 emits at 510 nm of light which is independent on the calcium concentration. We made microfluorimetry measurements in CHO cells stably expressing individual subtypes of human mAChR. To enable achieving effective calcium mobilization at M₂ and M₄ receptors, we transiently transfected cells containing one or the other of these two subtypes with cDNA encoding the α -subunit of the human

G₁₆ G-protein. Before each experiment we washed the cells twice with the modified Krebs' buffer (KHB; containing 20 mM HEPES instead of bicarbonate) and then pre-labelled the cells with 5 μM Fura 2-AM (the membrane permeable form of Fura 2) in KHB with 1 mM Pluronic P68 (Sigma) for 1 hour at 37 °C.

In our experiments we used three schemes of intracellular calcium level measurements. The first scheme focused on differences in long-term effects of xanomeline after brief exposure of individual mAChR subtypes to this agonist. This scheme was as follows: 1.: control stimulation with 300 nM carbachol (CBC), 2.: washing with KHB lasting 3 min, 3.: stimulation with 10 μM xanomeline (xano) for 1, 3 or 10 min, 4.: washing with KHB for 1 hour, 5.: stimulation with 300 nM CBC lasting 5 s.

The second scheme aimed to investigate effects of the classical antagonist N-methylscopolamine (NMS) on delayed response of the receptors on (wash-resistantly) bound xano. The procedure was as follows: 1.: control stimulation with 300 nM CBC for 5 s, 2.: washing with KHB for 5 min, 3.: stimulation with 10 μM xano for 20 s, 4.: washing with KHB for 2 min, 5.: application of 10 μM NMS for 2 min and washing with KHB for 4 min.

The third scheme focused on effects of NMS on activation with wash-resistantly bound xano. The scheme was as follows (M₁–M₄): 1.: control stimulation with 300 nM CBC for 5s, 2.: washing with KHB for 5 min, 3.: application of 10 μM NMS for 3 min (during the second minute of treatment with NMS we concurrently applied xanomeline for 1 min), 4.: washing with KHB for 3 min. In case of cells expressing M₅ receptors we used a modified version of this scheme because xanomeline interacts with M₅ receptors in a markedly different way, being mainly a weak partial agonist: 1.: control stimulation with 300 nM CBC for 5 s, 2.: washing with KHB

for 5 min, 3.: application of 10 μM NMS for 12 min (from the second to the eleventh minute of treatment with NMS we concurrently applied 10 μM xano for 10 min), 4.: washing with KHB for 1 hour, 5.: stimulation with 300 nM CBC for 5 s.

3.3 Density and binding characteristics of muscarinic receptors in membranes

We assessed changes in muscarinic receptor density and their binding characteristics evoked by xanomeline in saturation binding experiments using the radioactively labelled antagonist of muscarinic receptors [^3H]-NMS. Saturation binding experiments made it possible to quantitate the number of binding sites in the membrane (maximal binding, B_{MAX}) and affinity of the labelled ligand to the receptor (equilibrium dissociation constant K_{D}) whose changes can occur due to interactions of the orthosteric binding site with wash-resistant bound xanomeline.

Preparation of cells for binding experiments mimicked the conditions of the microfluorimetric measurements. On the day of the experiment we detached the cells from the bottom of the wells, added KHB and then incubated either in KHB containing 10 μM xano (1, 3 or 10 min at room temperature) or in KHB containing 1 μM CBC, 1 μM oxotremorine or 3 μM pilocarpine (10 min at room temperature as well). We incubated control cells in agonist-free KHB. Afterwards we centrifuged the cells, aspirated the supernatant and washed them with cold KHB. Then we incubated the cells for an additional 10 min or 1 hour in fresh KHB at room temperature. Consequently we cooled the cells down and prepared membranes. We mixed the cells with the homogenization medium and homogenized on ice. Then we centrifuged the homogenates, aspirated the supernatant, resuspended the pellet and repeated the centrifugation. We incubated the membranes with [^3H]NMS for 1 hour at 30 $^{\circ}\text{C}$. We assessed non-specific

binding in the presence of unlabelled NMS. We finished the incubation with fast filtration on Brandel cell harvester using Whatman GF/C filters with glass fibers. We melted solid scintillator Meltilex A (Perkin Elmer) on dry filters. Then we counted the filters using the scintillation counter Microbeta 1450 (Wallac). We corrected the B_{MAX} with respect to the amount of proteins in the samples.

3.4 Data Analysis

We analyzed the results of microfluorimetric measurements by Grace (Weizmann Institute of Science). We pre-processed the results of binding experiments in Open Office Calc and further analyzed using GraphPad Prism and statistic package R.

3.4.1 Microfluorimetric measurements

We chose for analysis those cells that responded to the first (control) stimulation with CBC. From each experiment we chose 8–12 cells showing the best response. We averaged calcium responses from chosen cells and normalized to basal calcium level. We considered the average value of calcium signal from the initial 10-second-sequence as basal. We evaluated the responses to agonists according to following equation:

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

where y is stimulation with agonist concentration x , E_{MAX} is the maximal response and EC_{50} is the concentration of agonist causing the half maximal effect.

3.4.2 Binding experiments

From the relationship of the amount of specifically bound [3H]NMS (calculated as a difference between measured [3H]NMS total binding and [3H]NMS binding in the presence of excessive amount of unlabelled NMS) and its concentration we calculated B_{MAX} a K_D using following equation:

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

where y is the specific binding of [³H]NMS at a concentration x of free [³H]NMS.

We measured the added radioactivity in every experiment using liquid scintillation and estimated the initial radioligand concentration on the basis of specific radioactivity and final volume. We calculated the concentration of free ligand by subtracting the concentration of bound radioligand from the concentration of added radioligand.

We used the affinity K_G of G-protein for the receptor-ligand complex as a measure of agonist signalling efficacy that is independent on the measure of receptor expression. We used the following equation (Lu and Hulme, 1999):

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

where $E_{MAX FR}$ is maximal response calculated according to the equation (1) and expressed as a part of E_{MAX} of carbachol ($(E_{MAX \text{ agonist}} - 1) / (E_{MAX \text{ carbachol}} - 1)$) derived from the calcium level measurements. B_{MAX} is the maximal binding estimated according to the equation (2).

4 RESULTS

4.1 Immediate and delayed effects of brief exposure to xanomeline on intracellular calcium level

First (control) stimulation with 300 nM CBC caused an immediate calcium mobilization from intracellular stores at all mAChR subtypes including cells expressing M_2 a M_4 subtypes transfected with α -subunit of $G\alpha_{16}$ G-protein. During 3 min of washing calcium level always returned to its basal value. Time needed to reach maximal response evoked by CBC was comparable at all subtypes.

Stimulation with 10 μ M xano lasting 1, 3 or 10 min led to fast increase of intracellular calcium concentration at all mAChR subtypes. In contrast with the first (control) stimulation with CBC the rate of calcium level increase as well as the maximal calcium response differed among individual mAChR subtypes. Response to xano was fastest at M₁ and slowest at M₅ receptors. Xano evoked the most marked response at M₁ receptors. In case of M₃ and M₄ calcium response to xano reached the same maximal value as to CBC. On the other hand, xanomeline evoked only about half maximal response in comparison with CBC at M₂ and M₅ subtypes (Fig. 4.1).

After calcium level reached its maximum it immediately decreased despite the fact that xano was still present in the washing buffer. Cells expressing M₁, M₃ and M₄ receptors showed an increased calcium level after 1, 3 as well as 10 min xano treatment that also persisted during subsequent 60 min washing. In case of M₂ receptors only 10 min stimulation with xano was sufficient to induce increased calcium level in a long-term scale. Regarding M₅ receptors, calcium level always returned to its basal value. Elevated calcium level after stimulation of M₁ and M₄ subtypes showed distinctive oscillations that did not occur at M₂ or M₃ (Fig. 4.1).

Second (control) application of 300 nM CBC lasting 10 s done after stimulation with xano and washing with buffer still led to fast mobilization of calcium ions at all mAChR subtypes except M₁ (after 1, 3 as well as 10 min stimulation with xano) and M₄ (only after 10 min stimulation with xano). In these cases calcium level stayed markedly elevated after application of xanomeline and showed spontaneous oscillations. Xanomeline treatment slowed down calcium mobilization and led to a decrease of calcium signal evoked by CBC despite washing of free xano (Fig. 4.1).

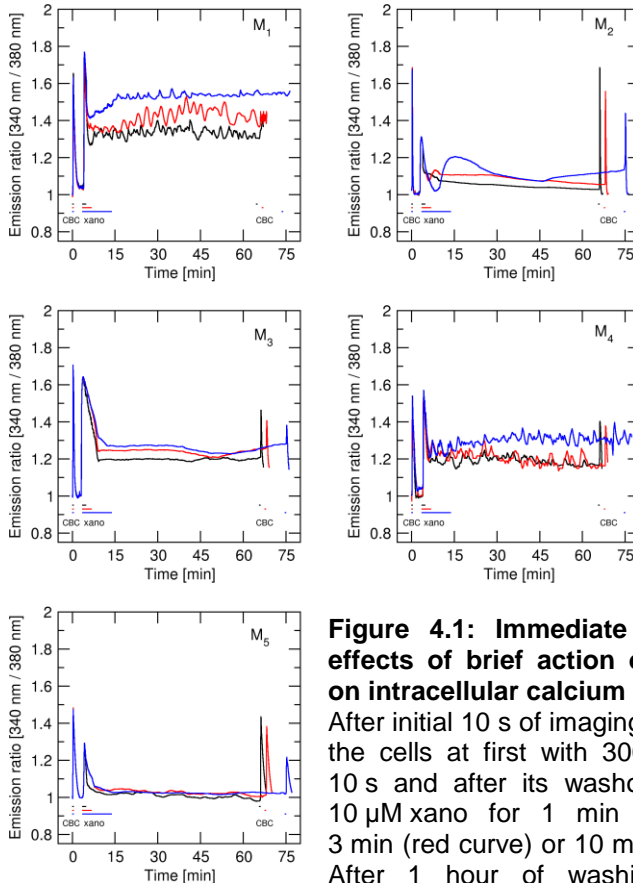


Figure 4.1: Immediate and delayed effects of brief action of xanomeline on intracellular calcium level

After initial 10 s of imaging we stimulated the cells at first with 300 nM CBC for 10 s and after its washout we applied 10 μM xano for 1 min (black curve), 3 min (red curve) or 10 min (blue curve).

After 1 hour of washing with KHB we stimulated the cells again with 300 nM CBC. The course of intracellular calcium level changes (y axis) is delineated as a change in fluorescence ratio at 340/380 nm.

4.2 Effects of transient blockade of the orthosteric binding site of mAChR on calcium level elevated by xanomeline

We used the orthosteric antagonist NMS to elucidate how blockade of the orthosteric binding site influences the effects of wash-resistant bound xano at individual mAChR subtypes (Fig. 4.2). Intracellular calcium level, which was elevated after

stimulation with xano and subsequent washing, decreased to its basal level at all mAChR subtypes after the application of 10 μ M NMS (we did not assess the M₅ subtype because increased calcium level returned to its basal value after application of xano; Fig. 4.1). After we eliminated NMS from the washing buffer calcium level rebound at the M₁ and M₄ subtypes but not at the M₂ and M₃ subtypes. There was an "overshoot" of calcium signal at the M₁ subtype (Fig. 4.2) and time to reach the maximum was several fold shorter at M₁ than at M₄ receptors (Fig. 4.2).

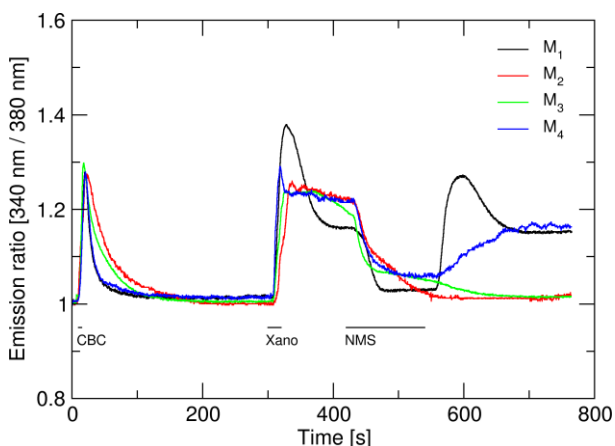


Figure 4.2: Effects of blockade of the orthosteric binding site of mAChR on calcium level elevated by xanomeline

After 10 s of imaging we stimulated the cells with 300 nM CBC for 5 s and then washed with KHB for 5 min. Subsequently we applied 10 μ M xano for 20 s and after its washout we applied 10 μ M NMS for 2 min. Then we washed the cells with KHB for 4 min.

4.3 Effects of NMS on the formation of xanomeline wash-resistant binding

In another group of microfluorimetric measurements we assessed whether the formation of wash-resistant binding and subsequent receptor activation by xanomeline require the interaction of xanomeline with the orthosteric binding site.

NMS decreased the basal calcium level in cells expressing M_1 receptors by 4,5 % (Fig. 4.3) but such decrease did not occur at other subtypes. Xano applied concurrently with NMS did not show any immediate effect on intracellular calcium level at any subtype. However, NMS washout led to an increase of calcium level in cells expressing M_1 and M_3 receptors. The same procedure used with cells expressing M_2 and M_4 receptors showed that these subtypes did not show any activation by wash-resistant bound xano. NMS prevented xano from activating M_2 and M_4 subtypes but did not do so at M_1 and M_3 receptors.

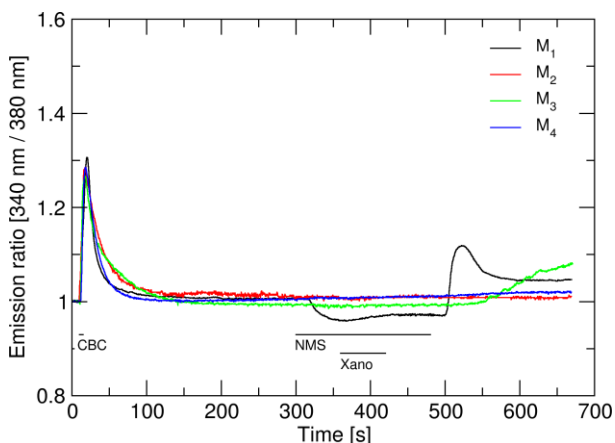


Figure 4.3: Effects of NMS on the formation of xanomeline wash-resistant binding

After 10 s of imaging we stimulated the cells with 300 nM CBC for 5 s and then washed with KHB for 5 min. Then we blocked the receptors with 10 μ M NMS for 3 min. During the second minute of the application of NMS we concurrently stimulated the receptors with 10 μ M xano. Afterwards we washed the cells with KHB for 3 min.

4.5 Effect of xanomeline on the number of membrane receptors

We measured the membrane receptor number using saturation binding experiments with [³H]NMS, a radioactively labelled antagonist of muscarinic receptors.

Xano treatment led to a decrease in the affinity of [³H]NMS at all mAChR subtypes and under all test conditions. Xano-induced decrease of [³H]NMS affinity was largest at M₄ receptors and smallest at M₂ receptors. In contrast, 10 min treatment of 1 μM CBC, 1 μM oxotremorine or 3 μM pilocarpine did not show any effect on [³H]NMS affinity but decreased the number of membrane receptors. The agonists oxotremorine and pilocarpine influenced membrane receptor number to a much lesser extent than CBC.

Extension of the washing period from 10 min to 1 hour caused a decrease in membrane receptor number also under control conditions (with no agonist). We did not record any change in membrane receptor number arisen as a result of xano treatment and 1 hour washing. Application of CBC brought a decrease in all subtypes of membrane mAChR to the same extent except for M₁, the number of which increased after longer washing. Similarly the relative number of membrane receptors (with respect to appropriate control cells) after oxotremorine treatment and 1 hour washing was smaller than after 10 min washing. No decrease in membrane receptor number occurred after pilocarpine treatment followed by 1 hour washing with KHB.

One-hour washing after CBC, oxotremorine and pilocarpine treatment had no effect on the affinity of [³H]NMS to mAChR. The decrease in affinity of [³H]NMS after 10 min xano treatment was the same after 10 min as well as 1 hour of subsequent washing. The decrease in [³H]NMS affinity after xano treatment at M₄ receptors was the same after 10 min and 1 hour of washing. The decrease in [³H]NMS affinity to M₄

receptors after xano treatment (lasting 1 or 3 min) amplified during 1 hour washing. At M_3 receptors the affinity of [3H]NMS also decreased to a larger extent after 1 hour of washing. In contrast, the affinity of [3H]NMS decreased to a lesser extent after 1 hour of washing than after 10 min of washing at the other subtypes.

5 DISCUSSION

5.1 Differences in immediate and long-term effects of xanomeline at individual subtypes of mAChR

In case of M_1 , M_3 and M_4 subtypes of mAChR 1 min stimulation with xano led to a marked increase of intracellular calcium level that persisted for more than 1 hour after washout of xano (Fig. 4.1, black curves). As for M_1 and M_4 subtypes, elevated calcium level clearly oscillated. Oscillating level of intracellular calcium on higher than resting level implicates that the receptors are in an active conformation whose effects on calcium mobilization outweigh cellular mechanisms responsible for sequestering free calcium ions. The fact that calcium level does not decrease even after a long period of time suggest absence of receptor desensitization. Treatment with xano for more than 1 min was necessary to induce a permanent increase of intracellular calcium at M_2 receptors. At M_5 receptors xano application only transiently increased intracellular calcium level that depended on the duration of treatment. The effects of the second application of CBC were blocked by the action of xano wash-resistant binding at M_1 , M_4 and M_5 receptors. Whereas at M_1 and M_4 subtypes wash-resistant bound xano behaved as a competitive agonist, its effects on M_5 subtypes were competitively antagonistic. These results are in agreement with the known functional selectivity of xano for M_1 and M_4 subtypes (Bymaster et al., 1998; Shannon et al., 2000), with delayed effects of the

wash-resistant binding at M_2 receptors (Jakubík et al., 2006; Machová et al., 2007) and with the antagonistic effects of the xano wash-resistant binding at M_5 subtypes (Grant et al., 2005).

5.2 Effects of NMS on the formation of xanomeline wash resistant binding and activation by wash-resistently bound xanomeline

Different ways of interaction of xano with the receptors, interaction with various receptor domains or distinct modes of receptor activation could also explain its functional selectivity. Therefore we aimed to find out whether receptor activation by wash-resistant bound xano could be blocked by the orthosteric antagonist NMS (Fig. 4.2) and whether formation of xano wash-resistant activation (Fig. 4.3) could be blocked by NMS.

Fig. 4.2 shows that elevated calcium level in the presence of xano decreased as a result of NMS application at all mAChR subtypes. Whereas calcium level increases again at M_1 and M_4 subtypes after NMS washout, it stays at its basal value at M_2 and M_3 subtypes (Fig. 4.2). Among these four subtypes NMS has slowest binding kinetics at M_3 and fastest at M_2 receptors (Jakubík et al., 1995). Although slow kinetics of NMS at M_3 receptors could explain that calcium level did not return to the elevated state after NMS washout, it is in conflict with the fact that decrease of calcium signal after application of NMS is faster at this subtype than at other subtypes, especially M_2 , at which the kinetics of NMS is fastest. We cannot explain the lack of increase of intracellular calcium level after NMS washout at M_2 receptors by the binding kinetics of NMS (dissociation of NMS from M_2 subtype is faster than from M_1 or M_4 subtype).

When we applied xano on receptors whose classical binding site was blocked by NMS the ability of xano to activate the receptor was reduced at M_1 and M_3 subtypes

(Fig. 4.3, black and green trace vs. Fig. 4.1, black traces). In contrast, xano was not able to activate M_2 and M_4 receptors under these conditions (Fig. 4.3, red and blue trace). We can say that NMS slows down the formation of wash-resistant activation by xano at all subtypes but to a different extent.

5.3 Kinetics of xanomeline wash-resistant binding and the effects of xanomeline wash-resistant binding on the number of membrane receptors

Our previous experiments showed that kinetics of xano wash-resistant activation is much slower at M_2 receptors than at M_1 receptors (Jakubík et al., 2006) and it was thought that differences in kinetics of wash-resistant binding and subsequent receptor activation could underlie the functional selectivity of xano for M_1 subtypes. However, kinetics of xano wash-resistant binding does not correlate with xano functional selectivity for M_1 and M_4 subtypes. Although kinetics of xano wash-resistant binding is very fast at functionally preferred M_1 and M_4 receptors, it is equally fast at M_5 subtype that belongs by no means to the functionally preferred subtypes. Effects of wash-resistantly bound xano further develop during 1 hour washing. Inhibition of NMS binding weakens at M_1 receptors during 1 hour washing whereas it strengthens at M_3 subtypes. To conclude, differences in kinetics of xano wash-resistant binding do not explain the observed functional selectivity for M_1 and M_4 subtypes.

Recent results suggest that functional selectivity of xano could relate to different regulation of individual subtypes of mAChR (Grant et al., 2010; Noetzel et al., 2009). Presumably, weaker or slower down-regulation of a particular mAChR subtype occurring as a result of xano wash-resistant binding could strengthen signalling via this subtype for a long period of time. However, our results show that while xano (under our experimental conditions) forms its wash-resistant binding and

allosterically decreases the affinity of NMS it causes no internalization of any mAChR subtype. This is in contrast with effects of the full agonist CBC and partial agonists oxotremorine and pilocarpine. Thus neither different measure of receptor internalization nor receptor renewal can explain the persistent elevation of intracellular calcium occurring only after stimulation of M₁ and M₄ subtypes. Permanently increased calcium level as a result of stimulation with xano only at M₁ and M₄ subtypes cannot stem from higher rate of M₂ and M₃ receptor desensitization because these two subtypes respond better to the full agonist CBC than M₁ and M₄ subtypes.

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 the 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 REFERENCES

- 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.
- Bymaster FP, Carter PA, Peters SC, Zhang W, Ward JS, Mitch CH, Calligaro DO, Whitesitt CA, DeLapp N, Shannon HE, Rimvall 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.
- Caulfield MP. 1993. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58: 319-79.
- 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.
- Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J. 1999. 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.
- 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.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260: 3440-50.
- 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, 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, 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.
- 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.
- 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.
- Machová E, Jakubík J, El-Fakahany EE, Doležal V. 2007. Wash-resistantly bound xanomeline inhibits acetylcholine release by persistent activation of presynaptic M(2) and M(4) muscarinic receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 322: 316-23.
- 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.
- 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.
- 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.

8 LIST OF PUBLICATIONS

Publications with impact factor

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).

Publications without impact factor

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.

Publications not related to the topic of the Ph.D. Thesis

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).

CURRICULUM VITAE

Date of birth: 1st January 1985

E-mail: santruckova@biomed.cas.cz

Education

since 2009: Charles University in Prague, Faculty of Science,
Ph.D. study programme Animal Physiology
Ph.D. Thesis: Mechanisms of signal transduction
via muscarinic acetylcholine receptors

2007–2009: Charles University in Prague, Faculty of Science,
Master's degree study programme Animal
Physiology (branch: Neurobiology)
Master's thesis: Mobilization of intracellular
calcium via muscarinic acetylcholine receptors

2004–2007: Charles University in Prague, Faculty of Science,
Bachelor's degree study programme Biology
Bachelor's thesis: Cholinergic mechanisms in
pathogenesis of Alzheimer's disease

Scientific courses

2010: microscopy course Advanced Techniques in
Fluorescence Microscopy (IMG CAS, v. v. i.)

Research experience

since 2006: Department of Neurochemistry, Institute of
Physiology CAS, v. v. i.
Research topic: activation mechanisms and
binding characteristics of muscarinic receptors

Pedagogical activities:

since 2012: participation in courses for pregradual students
held by the Centre for Biomedical Research in the
Institute of Physiology CAS, v. v. i.