

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 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 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.