

ABSTRAKT - CZ

Muskarinový acetylcholinový M_2 receptor, který byl prvotně identifikován jako hlavní podtyp muskarinového receptoru v srdci se také hojně nachází v centrálním nervovém systému. Přenos signálu receptorem je realizován jednak prostřednictvím α_i podjednotky heterotrimérního G-proteinu, který inhibuje syntézu cAMP a jednak uvolněnými $\beta\gamma$ podjednotkami, které aktivují draselný a inhibují vápníkový kanál. Nicméně, muskarinové M_2 receptory exprimované v CHO buňkách (CHO- M_2) přímo aktivují signální dráhy všech tří hlavních podtypů G-proteinů, tzn. preferenčních $G_{i/o}$ proteinů a v koncentracích agonisty vyšších než je potřebná k inhibici syntézy cAMP aktivují také G_s a $G_{q/11}$ podtypy, které vyvolávají stimulaci syntézy cAMP a akumulaci inositolfosfátů. V našich pokusech jsme zkoumali vliv membránového cholesterolu na aktivaci těchto tří podtypů G-proteinů v CHO- M_2 buňkách nehydrolyzovatelným analogem acetylcholinu karbacholem. Inkubace buněk v přítomnosti methyl- β -cyclodextrinu snížila obsah cholesterolu v celých buňkách o 74% a v membránách připravených z těchto buněk o 39%. Opracování buněk methyl- β -cyclodextrinem saturovaným cholesterolem zvýšilo obsah cholesterolu o 169 % v buňkách a o 137% v membránách. Úbytek obsahu cholesterolu snížil afinitu M_2 receptorů pro radioaktivně značeného antagonistu [3 H]-N-methylscopolaminu a zvýšil množství receptorů v intaktních buňkách i v membránách zatímco zvýšení obsahu cholesterolu nemělo žádné účinky. Membrány z CHO- M_2 buněk vykazovaly vysoko a nízko afinitní vazebná místa pro agonistu karbachol a snížení obsahu cholesterolu zdvojnásobilo počet vysokoafinitních vazebných míst. V celých buňkách úbytek cholesterolu zpomalil a snížil rozsah receptorové internalizace vyvolané karbacholem. Zvýšení membránového cholesterolu potlačilo inhibici syntézy cAMP ($G_{i/o}$), stimulaci syntézy cAMP (G_s) a nemělo vliv na akumulaci inositolfosfátů ($G_{q/11}$) vyvolané karbacholem. Na druhé straně snížení membránového cholesterolu zvýšilo maximum inhibice i stimulace syntézy cAMP karbacholem, bez změny efektivní koncentraci EC_{50} pro karbachol. V případě akumulace inositolfosfátů došlo k snížení maxima akumulace i hodnoty EC_{50} pro karbachol. Změny obsahu membránového cholesterolu neovlivnily permeabilitu membrány, oxidativní aktivitu a relativní zastoupení G_s , $G_{i/o}$ a $G_{q/11}$ alfa podjednotek. Naše výsledky ukazují na významnou úlohu membránových lipidů v přenosu signálu muskarinovým receptorem.