

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Monika Křížová

Úloha M₄ muskarinových receptorů v centrální nervové soustavě

Role of M₄ muscarinic receptors in the central nervous system

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D.

Praha, 2020

Čestné prohlášení:

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

V Praze, 27. 5. 2020

Podpis:

Poděkování:

Mnohokrát děkuji panu prof. MUDr. Jaromírovi Myslivečkovi, Ph.D. za jeho ochotu, vstřícnost, odborné vedení a čas, který mi při psaní bakalářské práce věnoval. Dále děkuji paní doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za její cenné rady a vřelý přístup.

Mé poděkování také patří mé rodině za neutuchající podporu během celého studia.

Abstrakt

Muskarinové receptory typu 4 jsou jedním z pěti podtypů muskarinových receptorů, které patří spolu s receptory nikotinového typu mezi tzv. cholinergní receptory. Po aktivaci receptoru vyvolané vazbou acetylcholinu dochází k přenosu signálu do buňky prostřednictvím G-proteinů umístěných na plazmatické membráně, kdy muskarinové receptory typu 4 jsou spřaženy s $G_{i/o}$ proteiny. Receptory M_4 se stejně jako ostatní podtypy muskarinových receptorů vyskytují v centrální i periferní nervové soustavě. V centrální nervové soustavě je jejich výskyt nejvýraznější v oblasti striata a hipokampu. M_4 receptory mají celou řadu regulačních funkcí, z nichž nejvýznamnější je pravděpodobně jejich vliv na lokomoci skrze dopaminergní systém ve striatu. Muskarinové receptory typu 4 se účastní i celé řady behaviorálních a kognitivních dějů, díky čemuž jsou zkoumány jako potenciální cíl pro léčbu duševních onemocnění.

Klíčová slova: muskarinové receptory, M_4 muskarinové receptory, GPCRs, cholinergní systém, centrální nervová soustava

Abstract

Muscarinic receptors type 4 are one of the five subtypes of muscarinic receptors, that are members of cholinergic receptors family, together with nicotinic receptors. An acetylcholine binding on the receptor triggers the receptor activation and the signal transmission into the cell by G-proteins located on plasmatic membrane, in the case of muscarinic receptors type 4 by $G_{i/o}$ proteins. The M_4 receptors are, just like other subtypes on muscarinic receptors, located in central and peripheral nervous system. In the central nervous system, they are mostly located in striatum and hippocampus. The M_4 receptors have a whole range of regulative functions, the most significant one is most likely the regulation of a locomotion in striatum by the dopaminergic system. The muscarinic receptors type 4 are involved in many behavioural and cognitive processes and are therefore studied as potential drug target for the treatment of mental disorders.

Key words: muscarinic receptors, M_4 muscarinic receptors, GPCRs, cholinergic system, central nervous system

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	adenylátcykláza (<u>a</u> denyl <u>l</u> <u>c</u> yclase)
ACh	acetylcholin (<u>a</u> cetyl <u>ch</u> oline)
AChE	acetylcholinesteráza (<u>a</u> cetyl <u>ch</u> olin <u>e</u> sterase)
AD	Alzheimerova choroba (<u>A</u> lzheimer's <u>d</u> isease)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát (<u>c</u> yclic <u>a</u> denosine <u>m</u> onophosphate)
CNS	centrální nervová soustava (<u>c</u> entral <u>n</u> ervous <u>s</u> ystem)
DAG	diacylglycerol (<u>d</u> iacyl <u>g</u> lycerol)
D ₁	dopaminové receptory typu 1 (<u>d</u> opamine receptors <u>1</u>)
D ₁ -like	dopaminové receptory podobné D ₁ , zahrnující receptory D ₁ a D ₅ (<u>D</u> ₁ - <u>l</u> ike receptors)
D ₂	dopaminové receptory typu 2 (<u>d</u> opamine receptors <u>2</u>)
D ₂ -like	dopaminové receptory podobné D ₂ , zahrnující receptory D ₂ , D ₃ a D ₄ (<u>D</u> ₂ - <u>l</u> ike receptors)
ECL	extracelulární smyčka (<u>e</u> xtrac <u>e</u> llular <u>l</u> oop)
GABA	gamma – aminomáselná kyselina (gamma – <u>a</u> minob <u>u</u> tyric <u>a</u> cid)
GDP	guanosindifosfát (<u>g</u> uanosine <u>d</u> iphosphate)
GEF	faktor zajišťující výměnu GDP za GTP (<u>g</u> uanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor)
GIRK	s G-proteiny spřažené dovnitř usměřující draslíkové kanály (<u>G</u> -protein-coupled <u>i</u> nwardly- <u>r</u> ectifying potassium (<u>K</u>) channel)
GPCRs	receptory spřažené s G-proteiny (<u>G</u> - <u>p</u> rotein <u>c</u> oupled <u>r</u> eceptors)
GTP	guanosintrifosfát (<u>g</u> uanosine <u>t</u> riphosphate)
ICL	intracelulární smyčka (<u>i</u> ntrac <u>e</u> llular <u>l</u> oop)
IP ₃	inositol-1,4,5-trisfosfát (<u>i</u> nositol-1,4,5- <u>t</u> risphosphate)
LID	dyskineze vyvolaná účinkem L-DOPA (<u>L</u> -DOPA- <u>i</u> nduced <u>d</u> yskinesia)

MAPK	proteinkinázy aktivované mitogenem (<u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inases)
MCI	mírná kognitivní porucha (<u>m</u> ild <u>c</u> ognitive <u>i</u> mpairment)
MR	muskarinové receptory (<u>m</u> uscarinic <u>r</u> eceptors)
MSN	střední ostnaté neurony (<u>m</u> edium <u>s</u> piny <u>n</u> eurons)
MT3	toxin izolovaný z <i>Dendroaspis angusticeps</i> , antagonist muskarinových receptorů (<u>m</u> uscarinic <u>t</u> oxin <u>3</u>)
MT7	toxin izolovaný z <i>Dendroaspis angusticeps</i> , antagonist muskarinových receptorů (<u>m</u> uscarinic <u>t</u> oxin <u>7</u>)
M ₄ MR	muskarinové receptory typu 4 (<u>m</u> uscarinic <u>r</u> eceptors)
M ₄ KO	organismus s inaktivovaným genem pro muskarinové receptory typu 4 (<u>M</u> ₄ <u>k</u> nock <u>o</u> ut)
NAD ⁺	nikotinamidadenin dinukleotid (<u>n</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotide)
PD	Parkinsonova choroba (<u>P</u> arkinson's <u>d</u> isease)
PKA	proteinkináza A (<u>p</u> rotein <u>k</u> inase <u>A</u>)
PLC	fosfolipáza C (<u>p</u> hosphol <u>i</u> pase <u>C</u>)
PNS	periferní nervová soustava (<u>p</u> eripheral <u>n</u> ervous <u>s</u> ystem)
PPI	prepulzní inhibice únikové reakce (<u>p</u> repulse <u>i</u> nhibition)
PRiMA	na prolin bohatá membránová kotva (<u>p</u> roline- <u>r</u> ich <u>m</u> embrane <u>a</u> nchor)
PTX	toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i> (<u>p</u> ertussis <u>t</u> ox <u>i</u> n)
SCN	suprachiasmatická jádra (<u>s</u> uprachiasmatic <u>n</u> uclei)
TM	transmembránová doména (<u>t</u> rans <u>m</u> embrane <u>d</u> omain)

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. MOLEKULÁRNÍ A BIOCHEMICKÁ PODSTATA MUSKARINOVÝCH RECEPTORŮ.....	2
2.1. Struktura a hlavní komponenty.....	2
2.2. Aktivace a přenos vzruchu	3
3. MUSKARINOVÉ RECEPTORY TYPU 4.....	5
4. DALŠÍ TYPY MUSKARINOVÝCH RECEPTORŮ.....	7
4.1. M ₂ receptory	7
4.2. M ₁ receptory	8
4.3. M ₃ receptory	8
4.4. M ₅ receptory	8
5. VÝSKYT A FUNKCE M ₄ RECEPTORŮ.....	9
5.1. Cholinergní systém v CNS	9
5.2. Výskyt muskarinových receptorů typu 4 v CNS.....	11
5.2.1. Striatum.....	12
5.2.2. Hipokampus	13
5.3. Výskyt muskarinových receptorů typu 4 v PNS	13
5.4. Vliv M ₄ receptorů na behaviorální a kognitivní funkce	14
5.5. Vliv M ₄ receptorů na cirkadiánní rytmy.....	14
6. PATOFYZIOLOGIE.....	15
6.1. Alzheimerova choroba.....	15
6.2. Schizofrenie	16
6.3. Parkinsonova choroba.....	17
6.4. Potenciál M ₄ receptorů v léčbě.....	18
7. ZÁVĚR.....	19
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	20

1. ÚVOD

Receptory centrální nervové soustavy jsou děleny do jednotlivých skupin na základě jejich schopnosti vázat určitý druh neurotransmiteru. Neurotransmitery jsou chemické látky, které vazbou na receptor příslušného typu zprostředkovávají přenos vzruchu mezi buňkami. Jedním z těchto neurotransmiterů je acetylcholin, který slouží jako agonista pro cholinergní receptory. Tyto cholinergní receptory lze dále dělit na metabotropní muskarinové receptory (viz dále) a ionotropní nikotinové receptory, tj. ligandem řízené iontové kanály (Caulfield & Birdsall, 1998).

Muskarinové receptory patří do skupiny metabotropních receptorů, což jsou receptory, které reagují na navázání neurotransmiteru aktivací tzv. G-proteinů. Muskarinové receptory, jenž díky své asociaci s těmito druhy proteinů patří mezi receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs), lze rozdělit do pěti podtypů ($M_1 - M_5$) (Hammer et al., 1980; Bonner et al., 1987). Sudé podtypy M_2 a M_4 preferenčně aktivují $G_{i/o}$ proteiny, kdežto liché podtypy M_1 , M_3 a M_5 aktivují $G_{q/11}$ proteiny (Jakubík et al., 2011; Kow & Nathanson, 2012). Všechny podtypy jsou schopné interagovat s G_s proteiny, což má za následek aktivaci adenylátcyklázy (AC) (Migeon & Nathanson, 1994).

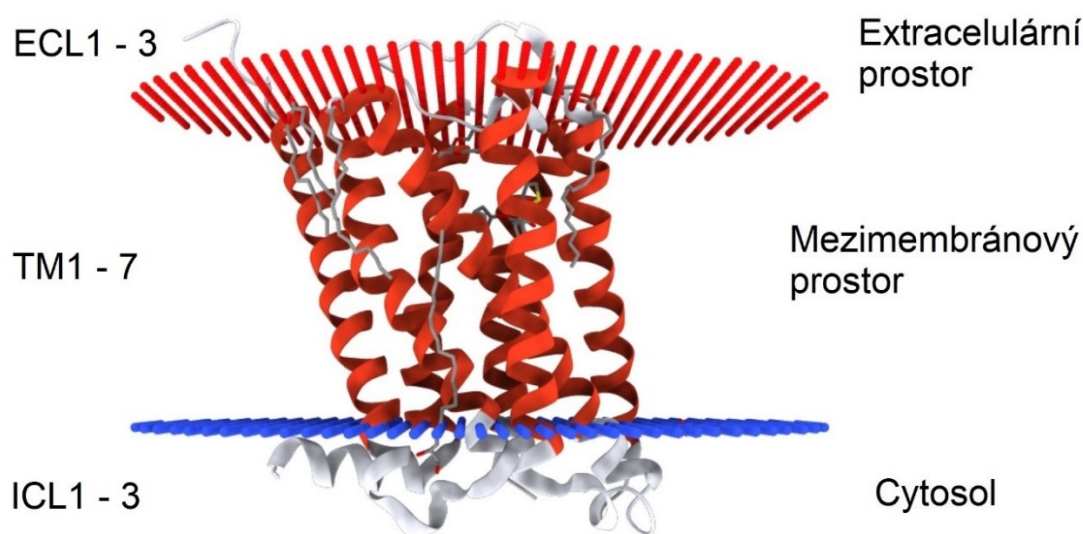
Muskarinové receptory (MR) se hojně vyskytují jak v centrální (CNS), tak i v periferní nervové soustavě (PNS). MR jsou v CNS lokalizovány převážně post-synapticky, ovšem receptory podtypu M_2 a M_4 byly nalezeny také i v pre-synaptických zakončeních (Raiteri et al., 1990). Muskarinové receptory mají v CNS vliv na značné množství fyziologických procesů, jako jsou například procesy behaviorální, kognitivní (Anagnostaras et al., 1995), termoregulační (Sanford et al., 2006) a lokomoční (Sipos et al., 1999). Tento vliv se velmi často liší specificky dle podtypu MR, i když pro některé fyziologické procesy je nezbytná kooperace více muskarinových podtypů. Právě kvůli jejich účasti na těchto procesech jsou jejich dysfunkce často spojovány s různými druhy onemocnění, mezi něž patří Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, demence, deprese či schizofrenie (Aubert et al., 1992; Koshimizu et al., 2012). Z tohoto důvodu bývají některá léčiva proti zmíněným onemocněním zacílena právě na tyto receptory.

V poslední době narůstá počet studií, které jsou věnovány výzkumu muskarinových receptorů typu 4 (M_4MR). Postupně se ukazuje, že M_4 receptory patří k velmi významným receptorům centrální nervové soustavy, a to právě díky jejich vlivu na velké množství ostatních systémů v mozku.

2. MOLEKULÁRNÍ A BIOCHEMICKÁ PODSTATA MUSKARINOVÝCH RECEPTORŮ

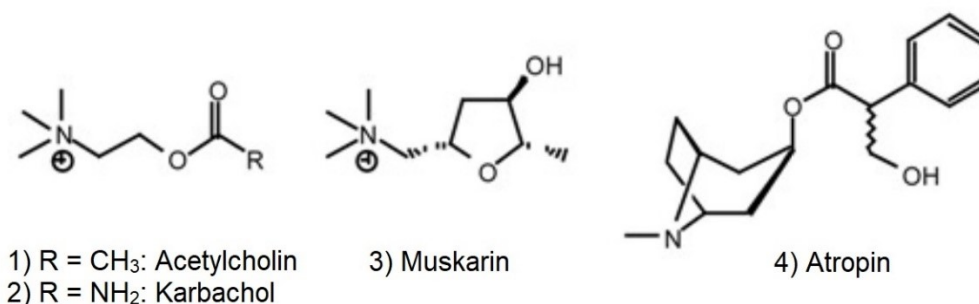
2.1. Struktura a hlavní komponenty

Muskarinové receptory patří do první skupiny GPCRs tzv. rhodopsin-like GPCRs (rhodopsinu podobné receptory). Tato skupina GPCRs je charakteristická svou mezi organismy konzervovanou strukturou (obr. 1), tvořenou sedmi α -helixovými transmembránovými doménami (TM1 – 7). TM jsou navzájem spojeny třemi intracelulárními (ICL1 – 3) a třemi extracelulárními (ECL1 – 3) smyčkami (Haga et al., 2012). Vzdálenost jednotlivých domén se liší v závislosti na podtypu MR, což způsobuje odlišnosti jejich alosterických vazebných míst. Orthostatické místo, do kterého se váže agonista, má velmi podobné pořadí aminokyselin mezi jednotlivým MR podtypy a je umístěno v oblasti transmembránových segmentů receptoru (Kruse et al., 2012). Odlišností alosterických vazebných míst se využívá při vývoji léčiv proti již zmíněným poruchám CNS, jelikož je možné zajistit podtypovou specifitu léčiva a zabránit nežádoucím účinkům, které hrozí při zacílení proti orthostatickému konzervovanému vazebnému místu (Digby et al., 2010).



Obr. 1 Schéma muskarinového receptoru: Muskarinový receptor patří mezi receptory se sedmi transmembránovými doménami (červeně). Jednotlivé transmembránové domény (TM1 – 7) jsou navzájem propojeny třemi extracelulárními (ECL1 – 3) a třemi intracelulárními (ICL1 – 3) smyčkami (bíle). Počáteční N konec řetězce receptoru na TM1 se nachází v extracelulárním prostoru, C konec TM7 zase uvnitř buňky v cytosolu. (Převzato a upraveno z Thal et al., 2016)

Agonisté jsou látky, které se váží do orthostatického vazebného místa a způsobují tak aktivaci příslušného receptoru (obr. 2). Tyto látky si bývají z hlediska chemické struktury navzájem velice podobné. Mimo acetylcholin tak dochází k aktivaci MR pomocí muskarinu (alkaloidu hub druhu *Amanita muscaria* (muchomůrka červená), po kterém jsou receptory pojmenovány), oxotremorinu, karchacholu, či pilokarpinu (Hammer et al., 1980). Antagonisté jsou naopak látky s inhibiční účinky, které mohou i kompetovat s agonisty o vazbu do orthostatického místa. Za hlavní antagonisty MR se dají považovat především skopolamin, atropin, pirenzepin (Martos et al., 1987) a toxiny MT3 či MT7, což jsou toxiny vysoce selektivní pro M₄MR (a částečně i M₁MR v případě MT3) a M₁MR (v případě MT7), jenž byly izolovány z jedu mamby zelené, *Dendroaspis angusticeps* (Jolkkonen et al., 1994; Kukkonen et al., 2004). Také antagonistům byla věnována nemalá pozornost v případě léčby patologií CNS, jako je například již zmíněná Parkinsonova choroba (Digby et al., 2010; Ztaou et al., 2016).



Obr. 2 Přehled hlavních ligandů muskarinových receptorů: Hlavním agonistou muskarinových receptorů je acetylcholin (1), který se váže do orthostatického místa a způsobuje tak aktivaci receptorů vedoucí k jejich spřažení s G-proteiny. Karbachol (2) je strukturně velice podobný acetylcholinu a je tudíž také schopen aktivovat cholinergní receptory (muskarinové i nikotinové). Muskarinové receptory byly pojmenovány podle jejich schopnosti vázat neselektivního agonistu muskarin (3). Atropin (4) je neselektivní muskarinový a nikotinový antagonist, který kompetuje s acetylcholinem o orthostatické vazebné místo. Po vazbě atropinu dochází k inaktivaci receptorů, které pak nemohou aktivovat signální kaskádu. (Převzato a upraveno z Broadley & Kelly, 2001)

2.2. Aktivace a přenos vzruchu

K aktivaci muskarinových receptorů dochází po navázání agonisty do vazebného místa, které tvoří kapsu z transmembránových segmentů v hydrofobní části molekuly. Tyto hydrofobní části obsahují konkrétní aminokyselinové zbytky, které prostřednictvím nevazebných interakcí

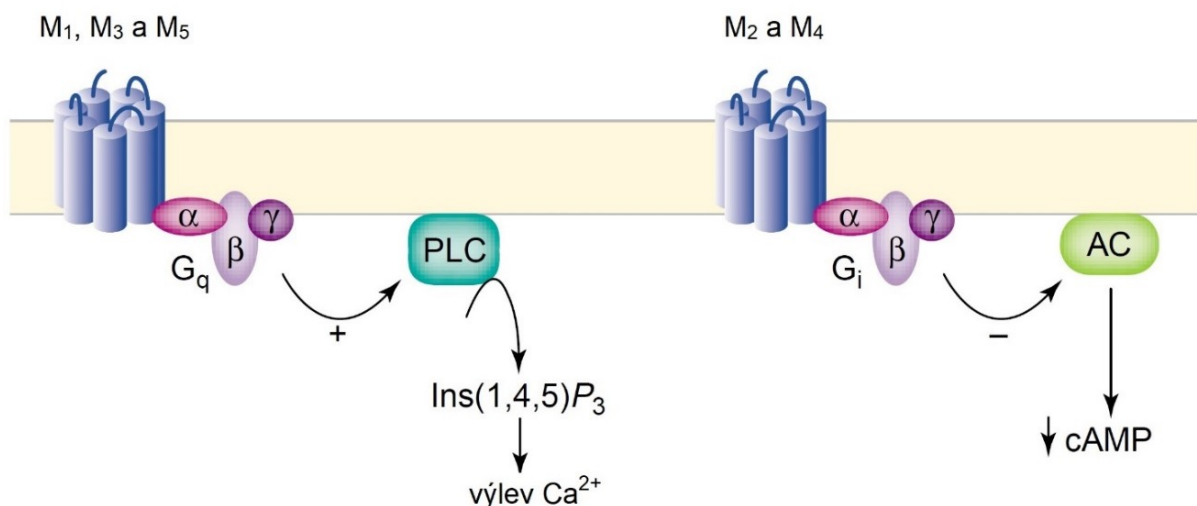
s funkčními skupinami agonisty zajišťují vazebnou specifitu (Schütz & Freissmuth, 1992). Hlavní složkou ligandů (agonistů i antagonistů) MR je atom dusíku spojený s uhlovodíkovými zbytky, který je schopen tvorby nevazebných interakcí (nejčastěji vodíkových můstků) s aminokyselinami hydrofobního vazebného místa receptoru.

Muskarinové receptory patří do skupiny GPCRs. Tyto receptory jsou v intracelulárním prostoru svým C-terminálním koncem v těsné blízkosti s G-proteiny, které mají schopnost štěpit guanosintrifosfát (GTP). G-proteiny se skládají ze tří podjednotek – α , β a γ . V inaktivním stavu jsou všechny tři tyto podjednotky spojeny a pomocí lipidových kotev napojeny na plazmatickou membránu ze strany cytosolu. Po navázání agonisty a aktivaci receptoru dochází ke změně konformace, která vyvolává sled reakcí, při kterých nastává spojení receptoru s G-proteinem. Na faktoru zajišťujícím výměnu guaninových nukleotidů (GEF) α podjednotky tehdy dochází k výměně guanosindifosfátu (GDP) za GTP. Komplex $\beta\gamma$ podjednotek se oddělí od α podjednotky a aktivuje příslušné efektory, tzv. druhé posly. Alfa podjednotka se vyznačuje GTPázovou aktivitou, kdy dochází k odštěpení fosfátu z GTP za vzniku GDP. Dochází tedy k opětovné inaktivaci a spojení všech tří podjednotek G-proteinu. Efekторы aktivované $\beta\gamma$ dimerem se liší na základě typu G-proteinu (Kanaho et al., 1985; Pierce et al., 2002; Tomankova & Mysliveček, 2011).

G-proteiny jsou heterotrimerní signál zprostředkující proteiny, které charakterizuje schopnost vázat guaninové nukleotidy. G-proteiny jsou nejčastěji rozděleny do čtyř hlavních skupin na základě podobnosti sekvence aminokyselin α podjednotky. Tyto čtyři skupiny (označované jako G_s , G_i , G_q a G_{12}) bývají dále děleny dle sekvenční homologie do dalších podskupin, jako jsou například $G_{i/o}$, či $G_{q/11}$ proteiny (Simon et al., 1991). G-proteiny lze ovšem rozdělit i podle β a γ podjednotek. Celkem je u člověka možné rozlišit 21 α podjednotek (kódovaných 16 geny), 6 β a 12 γ podjednotek (Downes & Gautam, 1999). Mimo strukturu charakterizuje jednotlivé skupiny G-proteinů hlavně mechanismus, kterým po aktivaci GPCRs zprostředkovávají přenos signálu skrze interakce s dalšími enzymy, a změny, které v buňce tyto signální kaskády vyvolávají (viz dále).

3. MUSKARINOVÉ RECEPTORY TYPU 4

Muskarinové receptory typu 4 jsou po aktivaci spřaženy s $G_{i/o}$ proteiny (obr. 3). Alfa podjednotka $G_{i/o}$ proteinu po navázání GTP inhibuje funkci adenylátcyklázy (Olianas et al., 1996). Adenylátcykláza je enzym, který přeměňuje ATP na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), který slouží jako druhý posel, jenž přes proteinkinázu A iniciuje otevření kanálů pro vápenaté ionty. Komplex $\beta\gamma$ podjednotek, který se po aktivaci oddělil od inhibující α podjednotky, ovšem mezitím aktivuje tzv. s G-proteiny spřažené dovnitř usměřující draslíkové kanály (GIRK), které se následně stanou propustné pro draselné ionty (Brown & Adams, 1980). Změna koncentrace draslíkových iontů poté navozuje hyperpolarizaci buněčné membrány. Muskarinové receptory typu 2 a 4 se spřaženými $G_{i/o}$ proteiny dále také pomocí komplexu $\beta\gamma$ podjednotek snižují propustnost napěťově ovládaných Ca^{2+} kanálů N a P typu pro vápenaté ionty (Yan & Surmeier, 1996).

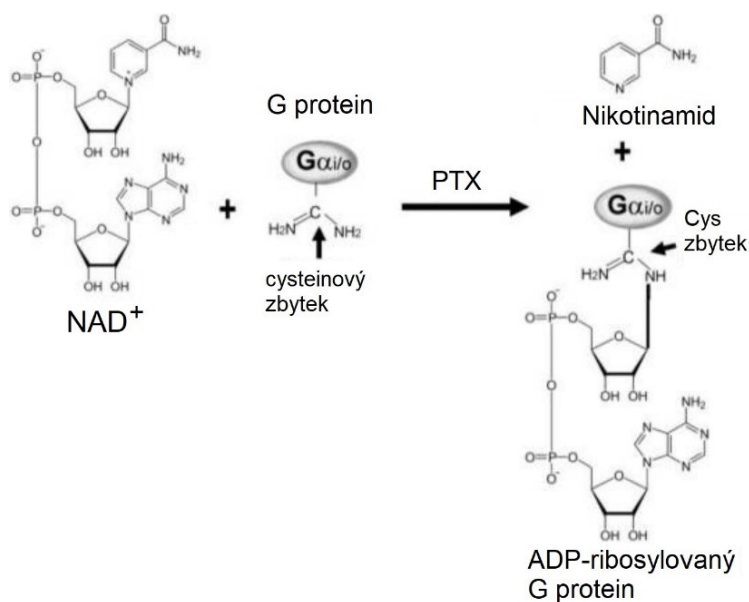


Obr. 3 Schéma signalizace muskarinových receptorů: Receptory M₁, M₃ a M₅ (vlevo) jsou spřaženy s $G_{q/11}$ proteiny, kdy po vazbě acetylcholinu dojde k interakci receptoru a G-proteinů, které následně aktivují fosfolipázu C (PLC). Fosfolipáza C je hydrolytický enzym, který po aktivaci štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na dva druhé posly a vzniká tak inositol-1,4,5-trisfosfát (Ins(1,4,5)P₃, neboli IP₃) a 1,2-diacylglycerol (DAG). IP₃ jakožto druhý posel poté dál šíří signalizaci pomocí otevření Ca^{2+} kanálu a výlevu vápenatých iontů do cytosolu. Muskarinové receptory typu 2 a 4 (vpravo) jsou místo toho po aktivaci acetylcholinem spřaženy s proteiny $G_{i/o}$. Ty následně asociují s adenylátcyklázou (AC), díky které dochází ke snížení cyklického AMP (cAMP). (Převzato a upraveno z Eglen et al., 2001)

Spolu s GIRK jsou M₄MR také spojeny s funkcí tzv. M kanálů. Tyto časově a napětově řízené draslíkové kanály získaly svůj název právě pro jejich vztah k muskarinovým receptorům, kdy aktivované MR způsobují inhibici a uzavření M kanálů. Po jejich uzavření dochází k depolarizaci buněčné membrány (Brown & Adams, 1980).

Pre-synapticky se vyskytující M₄ receptory lze spolu s M₂ receptory považovat za takzvané cholinergní autoreceptory, a to díky jejich schopnosti regulovat množství exkrece acetylcholinu vylitého buňkou, na které se vyskytují (Hersch & Levey, 1995). Muskarinové receptory typu 4 jsou taktéž spojeny s výlevem i ostatních neurotransmiterů. Příkladem je jejich úzký vztah s dopaminergním systémem, konkrétně s dopaminovým receptorem typu D₁. Dopaminergní neurony M₄ receptory ovlivňují i regulaci výlevu GABA transmiteru ze zakončení neuronů v jejich okolí (Kayadjanian et al., 1994). Díky tomu, že jsou M₄ receptory, které jsou pre-synapticky umístěné na jiných než cholinergních systémech, schopny regulovat výlev ostatních neurotransmiterů jako je gama – aminomáselná kyselina (GABA) nebo i glutamát, lze M₄MR řadit mezi tzv. heteroreceptory (Hersch et al., 1994).

Muskarinové receptory typu 2 a 4 jsou, jakožto receptory spřažené s G_{i/o} proteiny, citlivé na různé toxiny, jako je například toxin bakterie *Bordetella pertussis*. Toxin (PTX) této gramnegativní bakterie působí na cysteinové zbytky α podjednotky G_{i/o} proteinového typu, působí tedy na G α_i , G α_o a G α_t a receptory s nimi spřažené. Toxin je složen z domény A, která zprostředkovává přenos ADP-ribózy na α podjednotku, a z oligomeru B, který slouží k rozpoznávání a navázání na buněčnou membránu. PTX ovlivňuje GPCRs přenesením ADP-ribózy na α podjednotku (obr. 4). Tím je alfa podjednotka blokována v inaktivním stavu (Kurose et al., 1983; West et al., 1985). Podjednotka poté již není schopná inhibice adenylátcyklázy, dochází k nekontrolovatelnému navýšení koncentrace cAMP v cytosolu a narušení signálních drah v buňce. Na zvýšenou koncentraci cyklického monofosfátu reaguje proteinkináza A (PKA), která se vazbou dvou molekul cAMP na své dvě domény (celkem 4 cAMP) zaktivuje. Proteinkináza po aktivaci fosforyluje serinové a threoninové zbytky skupiny transkripčních faktorů závislých na koncentraci cAMP (Montminy, 1986; Arias et al., 1994).



Obr. 4 Schéma přenosu ADP-ribózy: Účinkem PTX dochází k odštěpení nikotinamidu z nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+) rozrušením vazby mezi uhlíkem ribózy a dusíkem nikotinamidu. Následně dochází k přenosu ADP-ribózy na cysteinový (Cys) zbytek alfa podjednotky $\text{G}_{i/o}$ proteinu. (Převzato a upraveno z Mangmool & Kurose, 2011)

4. DALŠÍ TYPY MUSKARINOVÝCH RECEPTORŮ

4.1. M_2 receptory

M_2MR patří stejně jako M_4 mezi sudé podtypy a jsou tedy aktivovány $\text{G}_{i/o}$ proteiny. Muskarinové receptory typu 2 se vyskytují v centrální nervové soustavě i na periférii. V CNS se vyskytují na mnoha tkáních, ovšem nikde tak výrazně jako např. M_1 . Oproti ostatním MR typům jsou exprimovány spíše v oblasti zadního mozku, mozkového kmene, mozečku a Varolova mostu. V menší míře jsou lokalizovány i v hipokampu, kůře a striatu (Levey et al., 1991; Li et al., 1991). Receptory M_2 jsou spojovány s termoregulací, třes, nebo s analgetickými účinky, které mají muskarinové agonisté (Gomez et al., 1999; Duttaroy et al., 2002). Kromě fyziologických odpovědí hrají muskarinové receptory typu 2 roli i v kognitivních funkcích a jsou spojovány se stavy deprese v případě bipolární poruchy (Cannon et al., 2006).

V periferní nervové soustavě jsou M_2MR nejvíce zastoupeným typem MR v srdci a jsou hlavními MR, které jsou zodpovědné za snížení srdeční kontraktility vyvolané acetylcholinem (Li et al., 1991; Stengel et al., 2000). Spolu s muskarinovými receptory typu 3 ovládají kontraktilitu hladké svaloviny, a to hlavně svalovinu fundu žaludku, močových cest a průdušnice (Stengel et al., 2000).

4.2. M₁ receptory

Muskarinové receptory typu 1 patří mezi liché podtypy MR spřažené s G_{q/11} proteiny. Tyto receptory jsou v centrální nervové soustavě hojně zastoupeny a jsou také exprimovány (i když oproti CNS v mnohem menších počtech) na periférii. M₁MR jsou nejvíce rozšířené v oblasti mozkové kůry, hipokampu a striata (Levey et al., 1991). Muskarinové receptory typu 1 hrají zásadní roli v kognitivních dějích, jako je učení a paměť (Felder et al., 2001).

Muskarinové receptory spojené s G_{q/11} proteiny po své aktivaci spustí kaskádu vedoucí přes PLC až k výlevu vápenatých iontů. Vápenaté ionty dále aktivují další komponenty signální dráhy, jako jsou například MAP kinázy (MAPK). Tyto proteinkinázy ovšem nejsou aktivovány pouze lichými podtypy receptorů, ale pomocí βγ podjednotky G-proteinu i M₂ a M₄. MAP kinázy jsou enzymy, které ovlivňují celou řadu buněčných pochodů včetně diferenciací. Muskarinové receptory typu 1 se ukázaly jakožto hlavní typ MR aktivující MAPK dráhy, jenž se v mozku účastní na neuronální plasticitě, která je nezbytná pro dlouhodobou paměť (English & Sweatt, 1997; Hamilton & Nathanson, 2001).

4.3. M₃ receptory

M₃ muskarinové receptory patří spolu s M₂MR mezi hlavní receptory periférie. V centrální nervové soustavě se vyskytují ve velkém množství různých struktur, ale na rozdíl od ostatních typů muskarinových receptorů v poměrně malém množství. Za nejvýraznější oblast exprese receptorů typu 3 v mozku se dá považovat oblast hypotalamu (Levey et al., 1991; Poulin et al., 2010).

Nehledě na jejich nízké zastoupení v CNS jsou M₃MR na periférii nepostradatelné. Jejich hlavní funkcí je zajištění kontraktility hladkého svalstva. Ve vysokých koncentracích se vyskytují ve svalovině gastrointestinální a močové soustavy. Ukazuje se, že M₃ receptory by mohly být vhodným cílem pro léčbu poruch močového traktu, či dysfunkcí střevní motility (Abrams et al., 2006; Peretto et al., 2009). Mimo jejich vliv na hladkou svalovinu se M₃ receptory podílejí také na procesech příjmu potravy (Yamada et al., 2001a).

4.4. M₅ receptory

Lichý typ muskarinových typů M₅ je nejvíce rozšířen v centrální nervové soustavě v oblasti hipokampu, hypotalamu a středního mozku. Charakteristická je jeho koexprese s dopaminovými receptory D₂ v oblasti pars compacta substantia nigra. Stejně jako

muskarinový receptor typu 4 je tedy i M₅MR schopen regulace výlevu dopaminu (Weiner et al., 1990). Kromě regulace dopaminergního systému je receptor typu 5 spojován i se systémem odměn a hraje zásadní roli při závislostech. V současné době je M₅MR předmětem výzkumu pro potenciální léčbu závislosti na opioidních látkách (Basile et al., 2002; Fink-Jensen et al., 2003; Thomsen et al., 2005).

Dalším důležitým rysem M₅ receptoru je jeho výskyt v endotelu a svalovině cév, kde zajišťuje regulaci průtoku krve, a to nejen u cévního řečiště na periférii, ale i v mozku. Předpokládá se, že by M₅MR mohly být vhodným cílem léčby cerebrovaskulárních onemocnění (Yamada et al., 2001b; Tayebati et al., 2003).

Tab. 1 Přehled základních informací o muskarinových receptorech (M₁₋₅)

Typ	G-protein	Nejvýraznější lokace	Hlavní funkce
M ₁	G _{q/11} , G _s	kortex, hipokampus, striatum	kognitivní děje (paměť a učení)
M ₂	G _{i/o} , G _s	srdce, hladká svalovina žaludku, močového měchýře, průdušnice	kontraktilita hladkého svalstva, termoregulace, bolest
M ₃	G _{q/11} , G _s	GI trakt, exokrinní žlázy, močová soustava, oko	kontraktilita hladkého svalstva
M ₄	G _{i/o} , G _s	kortex, hipokampus, striatum, talamus	kognitivní děje, lokomoce, vliv na dopaminergní systém
M ₅	G _{q/11} , G _s	hipokampus, striatum, substantia nigra	závislost, mechanismus odměny, vliv na dopaminergní systém

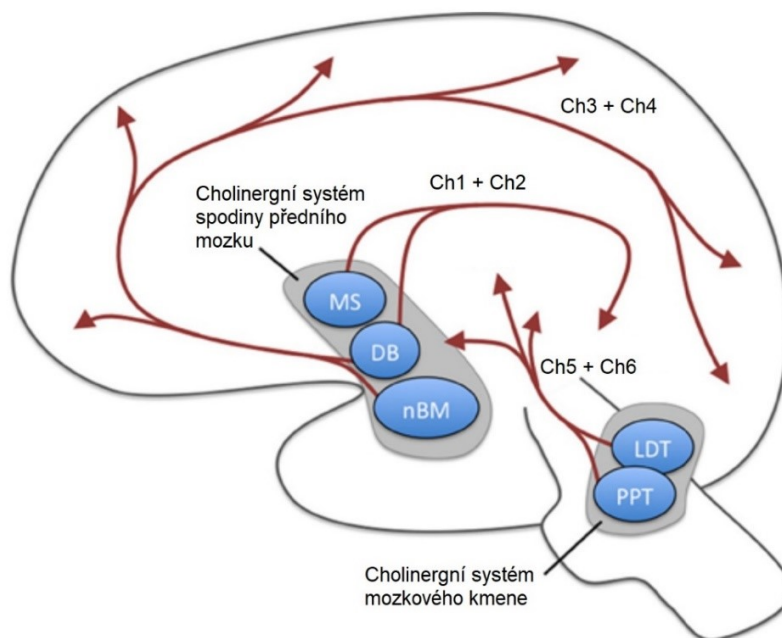
5. VÝSKYT A FUNKCE M₄ RECEPTORŮ

5.1. Cholinergní systém v CNS

Acetylcholin (ACh) je prvním objeveným neurotransmiterem, který se vyskytuje v mnoha tkáních, v centrální i periferní nervové soustavě. Jedná se o ester kyseliny octové a cholinu, který je syntetizován v nervových zakončeních pomocí enzymatické aktivity cholinacetyltransferázy z cholinu a acetylkoenzymu A. Acetylcholin je hydrolyzován na cholin a acetát acetylcholinesterázou (AChE), která je napojena na pre-synaptickou membránu

nervového zakončení skrže na prolin bohatou PRiMA kotvu (proline-rich membrane anchor). Rozkladem acetylcholinu AChE na pre-synaptické membráně je tedy regulováno potřebné množství uvolněného neurotransmiteru, které dodifunduje až k cholinergním receptorům na membráně post-synaptické (Perrier et al., 2002; Farar et al., 2012). Acetylcholin plní v CNS celou řadu funkcí, z nichž nejvýznamnější z pohledu současného výzkumu je jeho vliv na kognitivní děje, konkrétně na procesy učení a paměti (Maurer & Williams, 2017).

Cholinergní systém mozku (obr. 5) lze rozdělit na dvě hlavní cholinergní projekční dráhy, a sice na dráhy vedoucí ze spodiny předního mozku, které lze dále dělit do čtyř dalších cholinergních sektorů (Ch1 – Ch4), a na dráhy vybíhající z mozkového kmene, které lze dělit na sektory dva (Ch5 a 6). Dráhy Ch1 vycházejí ze spodiny předního mozku z oblasti mediálního jádra septa a spolu s dráhami Ch2, které vybíhají z vertikálního svazku diagonálního Brocova pásu, směřují do hipokampu. Z oblasti horizontálního svazku diagonálního Brocova pásu pak vycházejí dráhy Ch3, jenž směřují spolu s dráhami Ch4 z bazálního magnocelulárního jádra do oblasti neokortexu, bazolaterální amygdaly a čichového laloku. Cholinergní sektory z mozkového kmene směřují hlavně do oblasti talamu, a to z pedunkulopontinního jádra v případě Ch5 a z laterodorzálního tegmenta u dráhy Ch6 (Mesulam et al., 1983a; Mesulam et al., 1983b; Newman et al., 2012).

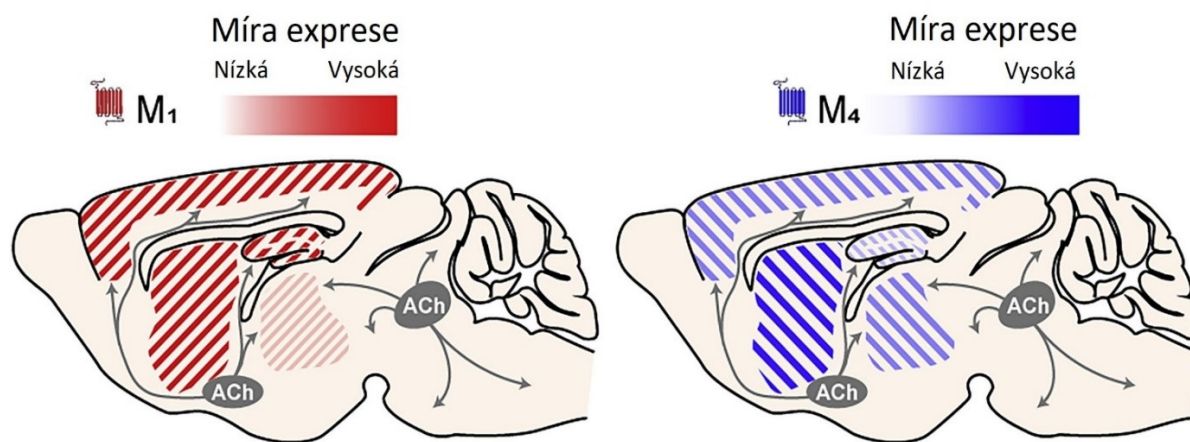


Obr. 5 Cholinergní systém v mozku: Projekční dráhy Ch1 – Ch4 cholinergního systému spodiny předního mozku vycházející z mediálního jádra septa (MS), vertikálního a horizontálního diagonálního Brocova pásu (DB) a bazálního magnocelulárního jádra (nBM). Tyto dráhy zajišťují cholinergní

projekci směřující z předního mozku do hipokampu (Ch1 + Ch2), neokortexu, čichového laloku a amygdaly (Ch3 + Ch4). Cholinergní dráhy (Ch5 + Ch6) směřují z pedunkulopontinního jádra (PPT) a laterodorzálního tegmenta (LDT) mozkového kmene do oblasti talamu. (Převzato a upraveno z Newman et al., 2012)

5.2. Výskyt muskarinových receptorů typu 4 v CNS

Místem s nejvyšší koncentrací muskarinových receptorů typu 4 v CNS je striatum (obr. 6). Zde se tyto receptory vyskytují v přítomnosti receptorů M_1 (Weiner et al., 1990; Hersch et al., 1994). Častý společný výskyt odráží schopnosti M_4 MR ovlivňovat odpověď post-synapticky umístěných M_1 MR na acetylcholin. Ve striatu je také možné nalézt M_4 MR v těsné blízkosti dopaminových D_1 receptorů (Weiner et al., 1990; Ince et al., 1997). Ve ventrálním striatu vykazují M_4 vysokou koncentraci výskytu také v nucleus accumbens a tuberculum olfactorium. Mimo striatum byly M_4 MR nalezeny i v hipokampu (v přítomnosti M_1 receptorů) a v menší míře i v kortexu, či talamu (Levey et al., 1991; Yasuda et al., 1993; Sugaya et al., 1997). V hipokampu jsou M_4 MR spolu s muskarinovými receptory typu 1 hlavními cholinergními regulátory pyramidových buněk (Dasari & Gullledge, 2011).



Obr. 6 Výskyt muskarinových receptorů typu 1 a 4 v myším mozku: M_1 MR (vlevo) jsou ve velké míře exprimovány v kůře, hipokampu a striatu (sytě vyznačené oblasti), a méně v talamu (světlá oblast). M_4 receptory (vpravo) jsou nejsilněji exprimovány v oblasti striata, v menší míře ovšem stále znatelně v oblasti kůry, talamu a hipokampu. Na schématu sagitálního řezu mozku s vyznačenými acetylcholinovými (ACh) drahami jsou patrná místa koexprese M_1 a M_4 receptorů. (Převzato a upraveno z Moran et al., 2019)

5.2.1. Striatum

Pro striatum je nejtypičtějším rysem ohledně muskarinových receptorů typu 4 interakce M₄ a D₁ receptorů. Dopaminové receptory D₁ patří stejně jako muskarinové receptory pod skupinu GPCRs. Na rozdíl od M₄ receptorů jsou dopaminové receptory skupiny D₁ (tzv. D₁-like receptory (D₁ podobné), ke kterým jsou řazeny D₁ a D₅ receptory) spřaženy s G_s proteiny. Oproti tomu jsou dopaminové receptory skupiny D₂ (D₂-like receptory (D₂ podobné), pod které patří receptory D₂, D₃ a D₄) podobně jako M₄MR spřaženy s inhibičními G_i proteiny (Gurevich et al., 2016). Zapojením D₁ receptorů dochází přes G_s proteiny k aktivaci adenylátcyklázové kaskády, jenž vede ke zvýšení koncentrace druhého posla cAMP.

Hlavním funkčním rysem D₁ receptorů je jejich vliv na lokomoci. Ve striatu jsou nejsilněji exprimovány v oblasti striatonigrálních drah, které mají na lokomoci zásadní význam. Právě v této části mozku je společná lokalizace s M₄MR nejvýraznější. Tyto receptory mají na sebe navzájem opačný regulační účinek, kdy M₄MR působí na D₁ receptory inhibičně (Ince et al., 1997; Gomeza et al., 1999; Tzavara et al., 2004). Při vyřazení M₄MR (nejčastěji jsou pro tyto účely využívány M₄KO myši, či antagonisté pro muskarinové receptory typu 4 (Wess et al., 2003)) nejsou dopaminové receptory inhibovány a dochází ke zvýšení lokomoce aktivací striatonigrálních drah (Gomeza et al., 1999; Gomeza et al., 2001; Koshimizu et al., 2012).

Objevují se ovšem studie, jejichž výsledky zvýšení lokomoce u M₄KO nepotvrzují (Turner et al., 2010; Fink-Jensen et al., 2011). Předpokládá se, že hlavním důvodem pro rozdílné výsledky jsou odlišnosti v genetickém zázemí M₄KO myši (Fink-Jensen et al., 2011). Mimo genetické odlišnosti pokusných myši je také nutné vzít v potaz i pohlaví experimentálního zvířete. Samičí pohlavní hormon estrogen totiž ovlivňuje na několika úrovních cholinergní systém, ať už ovlivňuje přímo výlev acetylcholinu, či reguluje aktivitu acetylcholinesterázy (Gibbs, 2000). Jakožto receptory citlivé na acetylcholin jsou proto těmito rozdíly v závislosti na pohlaví ovlivněny i muskarinové receptory. Konkrétně u M₄MR došlo po ovariectomii ke zvýšení jejich počtu, což by mohlo být vysvětleno jako reakce na pokles acetylcholinu, který byl vyvolaný snížením hladiny estrogenu (El-Bakri et al., 2002). Zvýšení lokomoce v důsledku vyřazení M₄ muskarinových receptorů tedy může být patrné pouze u M₄KO samic, a nikoliv u M₄KO samců (Thomsen et al., 2010; Valuskova et al., 2018), na kterých byla většina studií (Turner et al., 2010; Fink-Jensen et al., 2011) zabývajících se lokomocí prováděna.

Aktivaci M₄MR lze dosáhnout zvýšení propustnosti vápníku skrz Ca_v1 kanály, což jsou hlavní napětově ovládané kanály, jejichž aktivita je regulována dopaminovými receptory D₁ (Hernández-Flores et al., 2014).

Dalším případem regulační funkce M₄MR je jejich vliv na výlev glutamátu. GABAergní střední ostnaté neurony (MSN) patří mezi hlavní neurony striata, a právě muskarinové receptory typu 4 se ukázaly jakožto hlavní acetylcholinové receptory, které zprostředkovávají snížení exkrece glutamátu (Pancani et al., 2014) a propojení glutamatergního přenosu z talamu a kortexu s přenosem dopaminergním (Calabresi et al., 1998, Surmeier et al., 2007).

5.2.2. Hipokampus

Hipokampus je struktura CNS spojovaná hlavně s procesy učení a paměti. V hipokampu se muskarinové receptory typu 4 vyskytují primárně v místě výskytu pyramidových CA1 buněk a v gyrus dentatus (Levey et al., 1995) a ovlivňují také výlev glutamátu na pyramidových buňkách CA3 (Popiolek et al., 2019). Spolu s receptory M₂ jsou M₄ v hipokampu jakožto autoreceptory hlavními regulátory výlevu acetylcholinu (Tzavara et al., 2003). Abnormalitami v oblasti hipokampu se vyznačují onemocnění jako je Alzheimerova choroba a schizofrenie. U pacientů trpících schizofrenií bylo zaznamenáno postupné snižování množství M₄MR v oblasti hipokampu, kde se M₄ receptory nacházejí na pre-synaptických zakončení glutamatergních neuronů, které se pravděpodobně podílejí na zpracování a přenosu informací (Scarr et al., 2007). Předpokládá se, že aktivátory M₄MR by mohly být v časných fázích schizofrenie, Alzheimerovy choroby nebo v případě mírné kognitivní poruchy (MCI) využitelné jakožto léčebné látky (Popiolek et al., 2019).

5.3. Výskyt muskarinových receptorů typu 4 v PNS

Muskarinové receptory typu 4 jsou exprimovány hlavně v centrální nervové soustavě. V periferní nervové soustavě se vyskytují mnohem méně než ostatní typy MR (hlavní jsou zde typy 2 a 3), proto nebývají předmětem zájmu výzkumů zabývajících se rolí muskarinových receptorů v PNS. Předpokládá se, že hlavní funkcí M₄MR je jejich vliv na napětí hladké svaloviny. Výjimkou jsou svaloviny fundu žaludku, močového měchýře a průdušnice, které jsou ovládané přes MR typu 2 (Stengel et al., 2000).

5.4. Vliv M₄ receptorů na behaviorální a kognitivní funkce

Kromě lokomoce ovlivňují muskarinové receptory typu 4 i další behaviorální a kognitivní děje. U myši s vyřazenou aktivitou M₄ receptorů, došlo ke zvýšení počtu stavu úzkosti (Degroot & Nomikos, 2006), hyperaktivitě, abnormálnímu sociálnímu chování a ke snížení prepulzní inhibice (Koshimizu et al., 2012). M₄ receptory jsou spolu s M₁MR považovány za možný cíl v léčbě závislosti na kokainu (Thomsen et al., 2012). Ukázalo se také, že pozitivní alosterický modulátor M₄ receptoru sám snižuje míru závislosti na kokainu a výskyt relapsu (Dall et al., 2017). Kromě závislosti na kokainu se v poslední době poukazuje i na roli muskarinových receptorů typu 4 v případě závislosti na alkoholu, jelikož během dlouhodobého alkoholismu dochází ke snížení exprese M₄MR především v oblasti středních ostnatých neuronů (Walker et al., 2020). Použitím agonisty M₄ receptorů také došlo ke snížení behaviorální senzitivace vyvolané morfinem, při které dochází ke zvýšení odpovědi organismu na návykovou látku a hrozí tak i vyšší riziko relapsu (Ruan et al., 2019). V rostromediálním tegmentálním jádru přispívají M₄MR k mechanismu odměny (Buie et al., 2020).

Dále bylo pomocí pozitivní alosterické modulace M₄MR, která zvýšila jejich afinitu k acetylcholinu, u M₄KO myši dosaženo lepších výsledků v oblasti učení a paměti (Bubser et al., 2014; Galloway et al., 2014). Pro rozporuplnost výsledků stále ještě není plně objasněn vliv M₄ receptorů při katalepsi. V obou případech je prokázán antipsychotický účinek muskarinového antagonisty skopolaminu na katalepsi, studie se ale rozcházejí ohledně antikataleptického účinku skopolaminu u M₄KO, důvod odlišností výsledků není dosud znám (Karasawa et al., 2003; Fink-Jensen et al., 2011).

Muskarinové receptory typu 4 se spolu s M₂ receptory účastní na vnímání bolesti, kdy u myši postrádajících nejen M₂, ale i M₄, neměl oxotremorin žádné analgetické účinky (Duttaroy et al., 2002). Studie prováděné s deriváty neurotoxinu epibatidinu místo s oxotremorinem naznačují, že antinocicepční efekt těchto derivátů je zprostředkován M₄MR umístěnými v míše, a ne M₂ receptory (Ellis et al., 1999).

5.5. Vliv M₄ receptorů na cirkadiánní rytmy

Hlavní strukturou centrální nervové soustavy, která je zodpovědná za koordinaci cirkadiánních, rytmů jsou suprachiasmatická jádra (SCN). Díky své periodicky se opakující aktivitě mají SCN vliv nejen na rytmus bdění a spánku, ale i na celou řadu dalších fyziologických procesů. Suprachiasmatická jádra je párová struktura umístěná v oblasti hypotalamu, ve které se

vyskytuje všech pět podtypů muskarinových receptorů (Yang et al., 2010). Biorytmy vyvolané SCN se ukázaly být citlivé na karbachol, kdy po jeho aplikaci došlo k narušení rytmů v důsledku posunutí jejich fází (Zatz & Herkenham, 1981). Ukázalo se, že karbachol ovlivňuje SCN skrze muskarinové receptory (Dojo et al., 2017).

Stejného narušení jako po použití karbacholu bylo dosaženo i po injekci muskarinového agonisty selektivního pro M_1 a M_4 receptory (Yang et al., 2010), ale ne po aplikaci M_2 a M_3 selektivního agonisty, z čehož je možné usuzovat, že citlivost SCN na muskarinové agonisty je zprostředkovaná $M_{1/4}$ receptory (Basu et al., 2016). Mimo karbachol ovlivňují fáze biorytmů i další agonisté jako je například oxotremorin. Vliv oxotremorinu na posun fází byl výrazně umocněn po podání pozitivního alosterického modulátoru M_4MR , což poukazuje na zásadní vliv muskarinových receptorů typu 4 v suprachiasmatických jádrech na cirkadiální rytmy (Gannon & Millan, 2012).

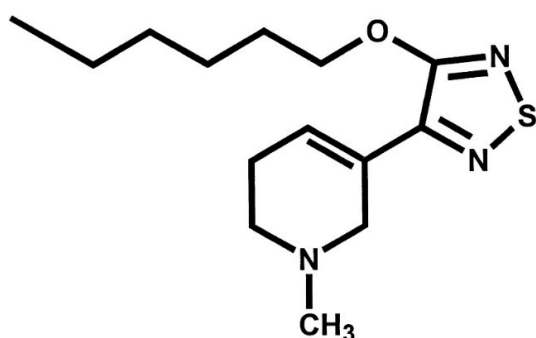
6. PATOFYZIOLOGIE

6.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je atroficko-degenerativní onemocnění postihující neuronální buňky centrální nervové soustavy. Jedná se o nejčastější případ demence u lidí středního (presenilní demence do 65 let) a vyššího věku (senilní demence od 65 let). Během AD dochází k postupné ztrátě paměti, a to krátkodobé i dlouhodobé, a k poruchám dalších kognitivních funkcí, jako je například afázie nebo apraxie. Dochází také k behaviorálním změnám, během kterých nastává ztráta osobnosti, zájmu o okolí a emoční vyrovnanosti.

Při onemocnění se tvoří β -amyloidní plaky, košíčky tvořené hyperfosforylovaným τ -proteinem a je narušen pre-synaptický cholinergní systém nucleus basalis Meynerti (Adolfsson et al., 1979; Bondareff et al., 1987; Selkoe, 2011). Kvůli změnám v neuronálních drahách využívajících acetylcholin jsou pro léčbu AD primárně používány inhibitory acetylcholinesterázy, jako je galantamin, rivastigmin a donepezil. Ukazuje se, že tyto inhibiční látky neovlivňují pouze aktivitu AChE, ale dochází i ke změnám v její expresi (Darreh-Shori et al., 2014). Při studiu potencionálních léčiv byla zaměřena pozornost i na ovlivnění cholinergního systému skrze muskarinové receptory. Hlavním předmětem výzkumu byly původně muskarinové receptory typu 1, později se ale pozornost obrátila i k M_3 a M_4 receptorům (Rodríguez-Puertas et al., 1997).

Xanomelin je agonistou muskarinových receptorů, který se selektivně váže jak na M_1 , tak i na M_4 receptory. Tato látka (obr. 7) projevila své antipsychotické účinky a využívá se pro léčbu jak AD, tak i schizofrenie (Shannon et al., 2000). U Alzheimerovy choroby sice nepůsobí výrazně na zlepšení kognice, ale je zaznamenán významný pozitivní dopad na behaviorální změny, kdy u pacientů, kteří užívají xanomelin, dochází ke snížení halucinací, bludů, výkyvů nálad a podezřívavosti (Bodick et al., 1997). Některá data naznačují, že hlavní antipsychotický účinek mají více M_4MR než M_1MR , a to právě na základě jejich vlivu na dopaminergní systém (Woolley et al., 2009; Watt et al., 2013), přesný mechanismus ovšem ještě není znám.



Obr. 7 Struktura xanomelinu: Selektivní agonista M_1 a M_4 receptorů, který je využíván jako antipsychotikum při léčbě Alzheimerovy choroby a schizofrenie. Při dlouhodobém užívání způsobuje vedlejší účinky, nejčastěji gastrointestinální obtíže. (Převzato z Christopoulos et al., 1999)

6.2. Schizofrenie

Schizofrenie je chronická duševní porucha, pro kterou je nejtypičtější disociace procesu myšlení a reality. Nejběžněji se projevuje sluchovými halucinacemi, paranoidními či bizarními bludy nebo zmatenou řečí a myšlením. Mimo to dochází i k dalším psychopatologickým stavům, jako je například apatie nebo deprese. I přes to, že přesný původ schizofrenie dosud není znám, existuje několik hypotéz, které se snaží vznik schizofrenie vysvětlit. Hovoří se jak o molekulární podstatě na úrovni dopaminergního systému, tak i vlivu genetické predispozice, okolních vlivů během života pacienta, nebo dokonce i o kombinaci všech výše uvedených faktorů (Schultz et al., 2007; Keefe et al., 2012; Alherz et al., 2017).

I přes to, že dysfunkce v dopaminergním systému hrají určitou roli při rozvoji schizofrenie, nelze tyto poruchy považovat za hlavní a jedinou příčinu onemocnění. Při schizofrenii je ovlivněna celá škála dalších neuropřenaškových systémů, a to systémů využívající glutamát, GABA, serotonin a acetylcholin (Crow et al., 1988; Olney & Farber, 1995; Benes et al., 1996).

Muskarinové receptory typu 4 jsou se schizofrenií spojovány opět přes antipsychotického agonistu xanomelin, který se využívá při léčbě. Dále M₄KO myši vykazovaly při pokusech zvýšenou hyperaktivitu, abnormální sociální chování a sníženou prepulzní inhibici úlekové reakce (PPI), kdy bylo zaznamenáno stejné chování jako u myšičího modelu schizofrenie (Koshimizu et al., 2012). Prepulzní inhibice úlekové reakce (PPI) je metoda využívaná jako doplňkové diagnostické vyšetření pro určení schizofrenie, kdy pro pacienty trpící schizofrenií je typický deficit PPI. Ukázalo se, že díky antipsychotickým účinkům je xanomelin schopen zvrátit jak apomorfinem a skopolaminem vyvolané narušení prepulzní inhibice, tak i amfetaminem vyvolanou hyperaktivitu, což jsou metody imitující psychotické stavy u pokusných zvířat (Stanhope et al., 2001; Jones et al., 2005; Thomsen et al., 2010; Koshimizu et al., 2012).

6.3. Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD) je chronické neurodegenerativní onemocnění, během kterého dochází ke ztrátě dopaminergních buněk pars compacta v oblasti substantia nigra a hromadění Lewyho tělísek. Následkem zániku těchto neuronů dochází k postupnému deficitu dopaminu, který se následně projevuje jako poruchy lokomoce. Mezi projevy PD patří klidový třes, zpomalenost a ztuhlost pohybů, poruchy chůze. Mimo problémy s lokomocí se u pacientů vyskytují také psychické poruchy, jako je například deprese, poruchy spánku, demence, nebo i kognitivní potíže. Parkinsonova choroba se nejčastěji projevuje u lidí s věkem nad 50 až 60 let, výjimečně i dříve (Lang & Lozano, 1998).

V současné době je léčba cílena především na posílení dopaminergní transmise. Nejčastěji využívaným léčivem je levodopa (L-DOPA), což je prekurzor dopaminu, který je v CNS dopa-dekarboxylázou přeměněn na dopamin, jenž není využíván k léčbě přímo pro jeho neschopnost pronikat hematoencefalickou bariérou. Aby se zabránilo účinku léku levodopa i na PNS, podává se L-DOPA v kombinaci s látkami karbidopa a benserazid, které v PNS inhibují dopa-dekarboxylázu a zabraňují tak přeměně L-DOPA na dopamin.

Levodopa má ovšem celou řadu nežádoucích účinků a při dlouhodobém užívání dochází u pacientů s PD k častému výskytu dyskineze (LID). V posledních letech vznikla řada studií zabývajících se snížením nežádoucích účinků v podobě LID, během nichž se ukázal cholinergní systém reprezentovaný muskarinovými receptory jako vhodný cíl. Na základě výsledků vznikla hypotéza, že blokadou muskarinového receptoru typu 4 by díky jeho vlivu na dopaminergní

receptor D_1 bylo možné snížit LID (Ding et al., 2011; Won et al., 2014; Ztaou et al., 2016). Snížení LID bylo ovšem také zaznamenáno aktivací (a nikoliv inhibicí) M_4 MR pomocí pozitivní alosterické modulace (Shen et al., 2015). Rozdílnosti výsledků mohou být způsobeny volbou myšního modelu s parkinsonovskými znaky (Chambers et al., 2019).

6.4. Potenciál M_4 receptorů v léčbě

Muskarinové receptory jsou díky jejich mnoha funkcím a regulačním vlivům na ostatní neurální struktury předmětem výzkumů v oblasti vývoje léčiv pro patofyziologické stavy centrální nervové soustavy. Pro léčbu psychiatrických poruch je v případě muskarinových receptorů vhodné zvolit selektivního antagonistu, nebo agonistu, či pozitivní alosterický modulátor, jelikož muskarinové receptory se vyznačují relativně konzervovaným orthostatickým vazebným místem. Ovlivnění duševních chorob prostřednictvím muskarinových receptorů se nejčastěji týká pouze jednoho, či dvou typů MR. Nejčastěji se jedná o receptory typu 1, 4 a 5, které jsou nejvíce zastoupeny v CNS, kdežto M_2 a M_3 MR jsou exprimovány preferenčně dominantně na periférii (Moran et al., 2019).

Pro využití léčiv cílených na MR jsou bohužel ovšem typické vedlejší příznaky spojené s nechtěnou aktivací MR na periférii. Například u pacientů dlouhodobě užívajících xanomelin na léčbu AD či schizofrenie, byl zaznamenán častý výskyt gastrointestinálních obtíží (Shannon et al., 1994; Bodick et al., 1997). Látky využívané pro léčbu psychóz jsou ve většině případů cílené na kombinaci M_1 a M_4 , kdežto léčiva zaměřující se pouze na M_4 jsou stále ve fázi preklinických testů (Moran et al., 2019). Fáze dne, během které dochází k testování látek účinkujících na MR s potencionálním léčebným efektem, se ukázala jako zásadní při testování na myších, které patří mezi noční zvířata se sníženou aktivitou ve světlé periodě dne, kdy bývá prováděna většina testů (Valuskova et al., 2019).

7. ZÁVĚR

Receptory jsou základní buněčnou strukturou, která je klíčová pro komunikaci mezi buňkou a jejím okolím. Zajištění správného přenosu signálu je nezbytné hlavně pro buňky centrální nervové soustavy, kde je důraz na společnou interakci buněk největší v celém organismu. Informace je zde přenášena pomocí neurotransmiterů. V buňkách centrální nervové soustavy je exprimováno nezměrné množství receptorů ať už membránových, nebo cytoplazmatických. Nejrozšířenějším neuropřenašečem mozku je acetylcholin, který aktivuje nikotinové a muskarinové receptory. A právě muskarinové receptory jsou nejrozšířenější cholinergní receptory CNS.

Muskarinové receptory, které lze dále dělit do pěti podtypů, jsou exprimovány napříč celou centrální soustavou, ale bohatě zastoupeny jsou i na periférii. Tyto s G-proteiny spřážené receptory zajišťují přenos signálu skrze systém druhých posílů, pomocí kterých dochází uvnitř buňky ke změnám v koncentracích iontů, konformacích enzymů, či ke změnám až na úrovni buněčné exprese. Všech pět podtypů pokrývá celou škálu různorodých funkcí spojených se zajištěním správného fyziologického chodu celého těla.

Muskarinové receptory typu 4 patří k významným podtypům muskarinových receptorů, jenž se vyskytují v centrální nervové soustavě ve velkém počtu. Hlavním místem jejich exprese je striatum, kde mají spolu s dopaminovými receptory zásadní vliv na lokomoci. Mimo lokomoci se podílejí ale i na dalších behaviorálních a kognitivních funkcích. Díky zvýšenému zájmu o výzkum M_4 receptorů byl odhalen jejich potenciál pro možnou léčbu celé řady patofyziologických duševních onemocnění, které pro svou četnost a závažnost stojí ve středu zájmu společnosti, a jejichž úspěšná terapie je pro nás stále nedosažitelná. Mezi tyto rozšířené duševní poruchy patří hlavně Alzheimerova nemoc, schizofrenie či Parkinsonova choroba, kde u všech těchto zmíněných onemocnění se ukázal zájem o bližší poznání muskarinových receptorů typu 4 jakožto správný směr pro nalezení účinné léčby.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

(* sekundární citace)

- Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, Kay G, Laties A, Nathanson NM, Pasricha PJ, Wein AJ. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol.* 2006;148(5):565–578.
- Adolfsson R, Gottfries CG, Roos BE, Winblad B. Changes in the brain catecholamines in patients with dementia of Alzheimer type. *Br J Psychiatry.* 1979;135:216–223.
- Alherz F, Alherz M, Almusawi H. NMDAR hypofunction and somatostatin-expressing GABAergic interneurons and receptors: A newly identified correlation and its effects in schizophrenia. *Schizophr Res Cogn.* 2017;8:1–6.
- Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS. Scopolamine selectively disrupts the acquisition of contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 1995;64(3):191–194.
- Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature.* 1994;370(6486):226–229.
- Aubert I, Araujo DM, Cécyre D, Robitaille Y, Gauthier S, Quirion R. Comparative alterations of nicotinic and muscarinic binding sites in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Neurochem.* 1992;58(2):529–541.
- Basile AS, Fedorova I, Zapata A, Liu X, Shippenberg T, Duttaroy A, Yamada M, Wess J. Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11452–11457.
- Basu P, Wensel AL, McKibbin R, Lefebvre N, Antle MC. Activation of M1/4 receptors phase advances the hamster circadian clock during the day. *Neurosci Lett.* 2016;621:22–27.
- Benes FM, Vincent SL, Marie A, Khan Y. Up-regulation of GABA_A receptor binding on neurons of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *Neuroscience.* 1996;75(4):1021–1031.

- 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. Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1997;54(4):465–473.
- Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M, Rossor MN, Iversen LL, Reynolds GP, Hauser DL. Neuronal degeneration in locus ceruleus and cortical correlates of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1987;1(4):256–262.
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes [published correction appears in *Science* 1987 Sep 25;237(4822):237]. *Science.* 1987;237(4814):527–532.
- Broadley KJ, Kelly DR. Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists. *Molecules.* 2001;6(3):142–193.
- Brown DA, Adams PR. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature.* 1980;283(5748):673–676.
- Bubser M, Bridges TM, Dencker D, Gould RW, Grannan M, Noetzel MJ, Lamsal A, Niswender CM, Daniels JS, Poslusney MS, Melancon BJ, Tarr JC, Byers FW, Wess J, Duggan ME, Dunlop J, Wood MW, Brandon NJ, Wood MR, Lindsley CW, Conn PJ, Jones CK. Selective activation of M4 muscarinic acetylcholine receptors reverses MK-801-induced behavioral impairments and enhances associative learning in rodents. *ACS Chem Neurosci.* 2014;5(10):920–942.
- Buie N, Sodha D, Scheinman SB, Steidl S. Rewarding effects of M4 but not M3 muscarinic cholinergic receptor antagonism in the rostromedial tegmental nucleus. *Behav Brain Res.* 2020;379:112340.
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Sancesario G, North RA, Bernardi G. Muscarinic IPSPs in rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol.* 1998;510 (Pt 2)(Pt 2):421–427.
- Cannon DM, Carson RE, Nugent AC, Eckelman WC, Kiesewetter DO, Williams J, Rollis D, Drevets M, Gandhi S, Solorio G, Drevets WC. Reduced muscarinic type 2 receptor binding in subjects with bipolar disorder [published correction appears in *Arch Gen Psychiatry.* 2006 Nov;63(11):1208]. *Arch Gen Psychiatry.* 2006;63(7):741–747.

- Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998;50(2):279–290.*
- Chambers NE, Meadows SM, Taylor A, Sheena E, Lanza K, Conti MM, Bishop C. Effects of Muscarinic Acetylcholine m1 and m4 Receptor Blockade on Dyskinesia in the Hemi-Parkinsonian Rat. *Neuroscience.* 2019;409:180–194.
- Christopoulos A, Parsons AM, El-Fakahany EE. Pharmacological analysis of the novel mode of interaction between xanomeline and the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(3):1220–1228.
- Crow TJ, Baker HF, Cross AJ, Joseph MH, Lofthouse R, Longden A, Owen F, Riley GJ, Glover V, Killpack WS. Monoamine mechanisms in chronic schizophrenia: post-mortem neurochemical findings. *Br J Psychiatry.* 1979;134:249–256.
- Dall C, Weikop P, Dencker D, Molander AC, Wörtwein G, Conn PJ, Fink-Jensen A, Thomsen M. Muscarinic receptor M4 positive allosteric modulators attenuate central effects of cocaine. *Drug Alcohol Depend.* 2017;176:154-161.
- Darreh-Shori T, Hosseini SM, Nordberg A. Pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors suggests add-on therapy with a low-dose carbamylating inhibitor in patients on long-term treatment with rapidly reversible inhibitors. *J Alzheimers Dis.* 2014;39(2):423–440.
- Dasari S, Gullledge AT. M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 2011;105(2):779–792.
- Degroot A, Nomikos GG. Genetic deletion of muscarinic M4 receptors is anxiolytic in the shock-probe burying model. *Eur J Pharmacol.* 2006;531(1-3):183–186.
- Digby GJ, Shirey JK, Conn PJ. Allosteric activators of muscarinic receptors as novel approaches for treatment of CNS disorders [published correction appears in *Mol Biosyst.* 2011 Dec;7(12):3376]. *Mol Biosyst.* 2010;6(8):1345–1354.
- Ding Y, Won L, Britt JP, Lim SA, McGehee DS, Kang UJ. Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(2):840–845.
- Dojo K, Yamaguchi Y, Fustin JM, Doi M, Kobayashi M, Okamura H. Carbachol Induces Phase-dependent Phase Shifts of Per1 Transcription Rhythms in Cultured Suprachiasmatic Nucleus Slices. *J Biol Rhythms.* 2017;32(2):101–108.

- Downes GB, Gautam N. The G protein subunit gene families. *Genomics*. 1999;62(3):544-552.*
- Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, Smith PL, Felder CC, Levey AI, Wess J. Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*. 2002;62(5):1084–1093.
- Eglen RM, Choppin A, Watson N. Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(8):409–414.
- English JD, Sweatt JD. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem*. 1997;272(31):19103–19106.
- El-Bakri NK, Adem A, Suliman IA, Mulugeta E, Karlsson E, Lindgren JU, Winblad B, Islam A. Estrogen and progesterone treatment: effects on muscarinic M(4) receptor subtype in the rat brain. *Brain Res*. 2002;948(1-2):131–137.
- Ellis JL, Harman D, Gonzalez J, Spera ML, Liu R, Shen TY, Wypij DM, Zuo F. Development of muscarinic analgesics derived from epibatidine: role of the M4 receptor subtype [published correction appears in *J Pharmacol Exp Ther* 1999 May;289(2):1184]. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;288(3):1143–1150.
- Farar V, Mohr F, Legrand M, Lamotte d'Incamps B, Cendelin J, Leroy J, Abitbol M, Bernard V, Baud F, Fournet V, Houze P, Klein J, Plaud B, Tuma J, Zimmermann M, Ascher P, Hrabovska A, Myslivecek J, Krejci E. Near-complete adaptation of the PRiMA knockout to the lack of central acetylcholinesterase. *J Neurochem*. 2012;122(5):1065–1080.
- Felder CC, Porter AC, Skillman TL, Zhang L, Bymaster FP, Nathanson NM, Hamilton SE, Gomeza J, Wess J, McKinzie DL. Elucidating the role of muscarinic receptors in psychosis. *Life Sci*. 2001;68(22-23):2605–2613.
- 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. Role for M5 muscarinic acetylcholine receptors in cocaine addiction. *J Neurosci Res*. 2003;74(1):91–96.
- Fink-Jensen A, Schmidt LS, Dencker D, Schülein C, Wess J, Wörtwein G, Woldbye DP. Antipsychotic-induced catalepsy is attenuated in mice lacking the M4 muscarinic acetylcholine receptor. *Eur J Pharmacol*. 2011;656(1-3):39–44.

- Galloway CR, Lebois EP, Shagarabi SL, Hernandez NA, Manns JR. Effects of selective activation of M1 and M4 muscarinic receptors on object recognition memory performance in rats. *Pharmacology*. 2014;93(1-2):57–64.
- Gannon RL, Millan MJ. LY2033298, a positive allosteric modulator at muscarinic M4 receptors, enhances inhibition by oxotremorine of light-induced phase shifts in hamster circadian activity rhythms. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;224(2):231–240.
- Gibbs RB. Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function. *Neuroscience*. 2000;101(4):931–938.
- Gomez J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, Wess J. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(4):1692–1697.
- Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder CC, Bymaster FP, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Duttaroy A, Deng CX, Wess J. Generation and pharmacological analysis of M2 and M4 muscarinic receptor knockout mice. *Life Sci*. 2001;68(22-23):2457–2466.
- Gurevich EV, Gainetdinov RR, Gurevich VV. G protein-coupled receptor kinases as regulators of dopamine receptor functions. *Pharmacol Res*. 2016;111:1–16.*
- Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature*. 2012;482(7386):547–551.
- Hamilton SE, Nathanson NM. The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *J Biol Chem*. 2001;276(19):15850–15853.
- Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJ, Burgen AS, Hulme EC. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature*. 1980;283(5742):90–92.
- Hernández-Flores T, Hernández-González O, Pérez-Ramírez MB, Lara-González E, Arias-García MA, Duhne M, Pérez-Burgos A, Prieto GA, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J. Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M4-type receptors. *Neuropharmacology*. 2015;89:232–244.

- Hersch SM, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Levey AI. Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J Neurosci*. 1994;14(5 Pt 2):3351–3363.
- Hersch SM, Levey AI. Diverse pre- and post-synaptic expression of m1-m4 muscarinic receptor proteins in neurons and afferents in the rat neostriatum. *Life Sci*. 1995;56(11-12):931–938.
- Chambers NE, Meadows SM, Taylor A, Sheena E, Lanza K, Conti MM, Bishop C. Effects of Muscarinic Acetylcholine m1 and m4 Receptor Blockade on Dyskinesia in the Hemiparkinsonian Rat. *Neuroscience*. 2019;409:180–194.
- Christopoulos A, Parsons AM, El-Fakahany EE. Pharmacological analysis of the novel mode of interaction between xanomeline and the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(3):1220–1228.
- Ince E, Ciliax BJ, Levey AI. Differential expression of D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse*. 1997;27(4):357–366.
- Jakubík J, Janíčková H, Randáková A, El-Fakahany EE, Doležal V. Subtype differences in pre-coupling of muscarinic acetylcholine receptors. *PLoS One*. 2011;6(11):e27732.
- Jolkkonen M, van Giersbergen PL, Hellman U, Wernstedt C, Karlsson E. A toxin from the green mamba *Dendroaspis angusticeps*: amino acid sequence and selectivity for muscarinic m4 receptors. *FEBS Lett*. 1994;352(1):91–94.
- Jones CK, Eberle EL, Shaw DB, McKinzie DL, Shannon HE. Pharmacologic interactions between the muscarinic cholinergic and dopaminergic systems in the modulation of prepulse inhibition in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(3):1055–1063.
- Kanaho Y, Moss J, Vaughan M. Mechanism of inhibition of transducin GTPase activity by fluoride and aluminum. *J Biol Chem*. 1985;260(21):11493–11497.
- Karasawa H, Taketo MM, Matsui M. Loss of anti-cataleptic effect of scopolamine in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor subtype 4. *Eur J Pharmacol*. 2003;468(1):15–19.

- Kayadjanian N, Gioanni H, Ménetrey A, Besson MJ. Muscarinic receptor stimulation increases the spontaneous [3H]GABA release in the rat substantia nigra through muscarinic receptors localized on striatonigral terminals. *Neuroscience*. 1994;63(4):989–1002.
- Keefe RS, Harvey PD. Cognitive impairment in schizophrenia. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(213):11–37.*
- Koshimizu H, Leiter LM, Miyakawa T. M4 muscarinic receptor knockout mice display abnormal social behavior and decreased prepulse inhibition. *Mol Brain*. 2012;5:10.
- Kow RL, Nathanson NM. Structural biology: Muscarinic receptors become crystal clear. *Nature*. 2012;482(7386):480–481.
- 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. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 2012;482(7386):552–556.
- Kukkonen A, Peräkylä M, Akerman KE, Näsman J. Muscarinic toxin 7 selectivity is dictated by extracellular receptor loops. *J Biol Chem*. 2004;279(49):50923–50929.
- Kurose H, Katada T, Amano T, Ui M. Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J Biol Chem*. 1983;258(8):4870–4875.
- Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*. 1998;339(15):1044–1053.*
- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci*. 1991;11(10):3218–3226.
- Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci*. 1995;15(5 Pt 2):4077–4092.
- Li M, Yasuda RP, Wall SJ, Wellstein A, Wolfe BB. Distribution of m2 muscarinic receptors in rat brain using antisera selective for m2 receptors. *Mol Pharmacol*. 1991;40(1):28–35.

- Liu L, Huang Y, Huang Q, Zhao Z, Yu J, Wang L. Muscarinic acetylcholine M4 receptors play a critical role in oxotremorine-induced DARPP-32 phosphorylation at threonine 75 in isolated medium spiny neurons. *Neuropharmacology*. 2017;117:376–386.
- Mangmool S, Kurose H. G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)*. 2011;3(7):884–899.
- Martos F, Monferini E, Giraldo E, De Paoli AM, Hammer R. Characterization of muscarinic receptors in salivary and lacrimal glands of the rat. *Eur J Pharmacol*. 1987;143(2):189–194.
- Maurer SV, Williams CL. The Cholinergic System Modulates Memory and Hippocampal Plasticity via Its Interactions with Non-Neuronal Cells. *Front Immunol*. 2017;8:1489.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*. 1983a;10(4):1185–1201.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 1983b;214(2):170–197.
- Migeon JC, Nathanson NM. Differential regulation of cAMP-mediated gene transcription by m1 and m4 muscarinic acetylcholine receptors. Preferential coupling of m4 receptors to Gi alpha-2. *J Biol Chem*. 1994;269(13):9767–9773.
- Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(18):6682–6686.
- Moran SP, Maksymetz J, Conn PJ. Targeting Muscarinic Acetylcholine Receptors for the Treatment of Psychiatric and Neurological Disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(12):1006–1020.*
- Newman EL, Gupta K, Climer JR, Monaghan CK, Hasselmo ME. Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Front Behav Neurosci*. 2012;6:24.

- Olianas MC, Adem A, Karlsson E, Onali P. Rat striatal muscarinic receptors coupled to the inhibition of adenylyl cyclase activity: potent block by the selective m4 ligand muscarinic toxin 3 (MT3). *Br J Pharmacol*. 1996;118(2):283–288.
- Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1995;52(12):998–1007.*
- Pancani T, Bolarinwa C, Smith Y, Lindsley CW, Conn PJ, Xiang Z. M4 mAChR-mediated modulation of glutamatergic transmission at corticostriatal synapses. *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(4):318–324.
- Pemberton KE, Jones SV. Enhancement of an L-type calcium current in AtT-20 cells; a novel effect of the m4 muscarinic receptor. *Pflugers Arch*. 1995;429(5):699–707.
- Peretto I, Petrillo P, Imbimbo BP. Medicinal chemistry and therapeutic potential of muscarinic M3 antagonists. *Med Res Rev*. 2009;29(6):867–902.*
- Perrier AL, Massoulié J, Krejci E. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*. 2002;33(2):275–285.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(9):639–650.*
- Popiolek M, Mandelblat-Cerf Y, Young D, Garst-Orozco J, Lotarski SM, Stark E, Kramer M, Butler CR, Kozak R. In Vivo Modulation of Hippocampal Excitability by M4 Muscarinic Acetylcholine Receptor Activator: Implications for Treatment of Alzheimer's Disease and Schizophrenic Patients. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(3):1091–1098.
- Poulin B, Butcher A, McWilliams P, Bourgognon JM, Pawlak R, Kong KC, Bottrill A, Mistry S, Wess J, Rosethorne EM, Charlton SJ, Tobin AB. The M3-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(20):9440–9445.
- Raiteri M, Marchi M, Paudice P. Presynaptic muscarinic receptors in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;604:113–129.*
- Rodríguez-Puertas R, Pascual J, Vilaró T, Pazos A. Autoradiographic distribution of M1, M2, M3, and M4 muscarinic receptor subtypes in Alzheimer's disease. *Synapse*. 1997;26(4):341–350.

- Ruan H, Sun J, Liu X, Liu L, Cui R, Li X. Cholinergic M₄ receptors are involved in morphine-induced expression of behavioral sensitization by regulating dopamine function in the nucleus accumbens of rats. *Behav Brain Res*. 2019;360:128-133.
- Sanford LD, Yang L, Tang X, Dong E, Ross RJ, Morrison AR. Cholinergic regulation of the central nucleus of the amygdala in rats: effects of local microinjections of cholinomimetics and cholinergic antagonists on arousal and sleep. *Neuroscience*. 2006;141(4):2167–2176.
- Scarr E, Sundram S, Keriakous D, Dean B. Altered hippocampal muscarinic M₄, but not M₁, receptor expression from subjects with schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2007;61(10):1161–1170.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(7):a004457.*
- Shannon HE, Bymaster FP, Calligaro DO, Greenwood B, Mitch CH, Sawyer BD, Ward JS, Wong DT, Olesen PH, Sheardown MJ, Swedberg MD, Suzdak PD, Sauerberg P. Xanomeline: a novel muscarinic receptor agonist with functional selectivity for M₁ receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;269(1):271–281.
- Shannon HE, Rasmussen K, Bymaster FP, Hart JC, Peters SC, Swedberg MD, Jeppesen L, Sheardown MJ, Sauerberg P, Fink-Jensen A. Xanomeline, an M(1)/M(4) preferring muscarinic cholinergic receptor agonist, produces antipsychotic-like activity in rats and mice. *Schizophr Res*. 2000;42(3):249–259.
- Shen W, Plotkin JL, Francardo V, Ko WK, Xie Z, Li Q, Fieblinger T, Wess J, Neubig RR, Lindsley CW, Conn PJ, Greengard P, Bezaud E, Cenci MA, Surmeier DJ. M₄ Muscarinic Receptor Signaling Ameliorates Striatal Plasticity Deficits in Models of L-DOPA-Induced Dyskinesia [published correction appears in *Neuron*. 2016 Jun 1;90(5):1139]. *Neuron*. 2015;88(4):762–773.
- Schultz SH, North SW, Shields CG. Schizophrenia: a review. *Am Fam Physician*. 2007;75(12):1821–1829.*
- Schütz W, Freissmuth M. Reverse intrinsic activity of antagonists on G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1992;13(10):376–380.*
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*. 1991;252(5007):802-808.*

- Sipos ML, Burchnell V, Galbicka G. Dose-response curves and time-course effects of selected anticholinergics on locomotor activity in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999;147(3):250–256.
- Stengel PW, Gomeza J, Wess J, Cohen ML. M(2) and M(4) receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;292(3):877–885.
- 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. The muscarinic receptor agonist xanomeline has an antipsychotic-like profile in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299(2):782–792.
- Sugaya K, Clamp C, Bryan D, McKinney M. mRNA for the m4 muscarinic receptor subtype is expressed in adult rat brain cholinergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;50(1-2):305–313.
- Tayebati SK, Di Tullio MA, Tomassoni D, Amenta F. Localization of the m5 muscarinic cholinergic receptor in rat circle of Willis and pial arteries. *Neuroscience*. 2003;122(1):205–211.
- Thal DM, Sun B, Feng D, Nawaratne V, Leach K, Felder CC, Bures MG, Evans DA, Weis WI, Bachhawat P, Kobilka TS, Sexton PM, Kobilka BK, Christopoulos A. Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. *Nature*. 2016;531(7594):335–340.
- Thomsen M, Woldbye DP, Wörtwein G, Fink-Jensen A, Wess J, Caine SB. Reduced cocaine self-administration in muscarinic M5 acetylcholine receptor-deficient mice. *J Neurosci*. 2005;25(36):8141–8149.
- Thomsen M, Wess J, Fulton BS, Fink-Jensen A, Caine SB. Modulation of prepulse inhibition through both M(1) and M (4) muscarinic receptors in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010;208(3):401–416.
- Thomsen M, Lindsley CW, Conn PJ, Wessell JE, Fulton BS, Wess J, Caine SB. Contribution of both M1 and M4 receptors to muscarinic agonist-mediated attenuation of the cocaine discriminative stimulus in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;220(4):673–685.

- Tomankova H, Myslivecek J. Mechanisms of G protein-coupled receptors regulation. *Neuro Endocrinol Lett.* 2011;32(5):607–615.*
- Turner J, Hughes LF, Toth LA. Sleep, activity, temperature and arousal responses of mice deficient for muscarinic receptor M2 or M4. *Life Sci.* 2010;86(5-6):158–169.
- Tzavara ET, Bymaster FP, Felder CC, Wade M, Gomeza J, Wess J, McKinzie DL, Nomikos GG. Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice. *Mol Psychiatry.* 2003;8(7):673–679.
- Tzavara ET, Bymaster FP, Davis RJ, Wade MR, Perry KW, Wess J, McKinzie DL, Felder C, Nomikos GG. M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related CNS pathologies. *FASEB J.* 2004;18(12):1410–1412.
- Valuskova P, Forczek ST, Farar V, Myslivecek J. The deletion of M4 muscarinic receptors increases motor activity in females in the dark phase. *Brain Behav.* 2018;8(8):e01057.
- Valuskova P, Riljak V, Forczek ST, Farar V, Myslivecek J. Variability in the Drug Response of M4 Muscarinic Receptor Knockout Mice During Day and Night Time. *Front Pharmacol.* 2019;10:237.
- Walker LC, Berizzi AE, Chen NA, Rueda P, Perreau VM, Huckstep K, Srisontiyakul J, Govitrapong P, Xiaojian J, Lindsley CW, Jones CK, Riddy DM, Christopoulos A, Langmead CJ, Lawrence AJ. Acetylcholine Muscarinic M₄ Receptors as a Therapeutic Target for Alcohol Use Disorder: Converging Evidence From Humans and Rodents [published online ahead of print, 2020 Feb 29]. *Biol Psychiatry.* 2020;S0006-3223(20)30131-1.
- Watt ML, Rorick-Kehn L, Shaw DB, Knitowski KM, Quets AT, Chesterfield AK, McKinzie DL, Felder CC. The muscarinic acetylcholine receptor agonist BuTAC mediates antipsychotic-like effects via the M4 subtype. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(13):2717–2726.
- Weiner DM, Levey AI, Brann MR. Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(18):7050–7054.

- Wess J, Duttaroy A, Zhang W, Gomeza J, Cui Y, Miyakawa T, Bymaster FP, McKinzie L, Felder CC, Lamping KG, Faraci FM, Deng C, Yamada M. M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to study the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Receptors Channels*. 2003;9(4):279–290.*
- West RE Jr, Moss J, Vaughan M, Liu T, Liu TY. Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J Biol Chem*. 1985;260(27):14428–14430.
- Won L, Ding Y, Singh P, Kang UJ. Striatal cholinergic cell ablation attenuates L-DOPA induced dyskinesia in Parkinsonian mice. *J Neurosci*. 2014;34(8):3090–3094.
- Woolley ML, Carter HJ, Gartlon JE, Watson JM, Dawson LA. 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*. 2009;603(1-3):147–149.
- Yamada M, Lamping KG, Duttaroy A, Zhang W, Cui Y, Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC, Deng CX, Faraci FM, Wess J. Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001b;98(24):14096–14101.
- 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. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature*. 2001a;410(6825):207–212.
- Yan Z, Surmeier DJ. Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci*. 1996;16(8):2592–2604.
- Yang JJ, Wang YT, Cheng PC, Kuo YJ, Huang RC. Cholinergic modulation of neuronal excitability in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol*. 2010;103(3):1397–1409.
- Yasuda RP, Ciesla W, Flores LR, Wall SJ, Li M, Satkus SA, Weisstein JS, Spagnola BV, Wolfe BB. Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1993;43(2):149–157.

Zatz M, Herkenham MA. Intraventricular carbachol mimics the phase-shifting effect of light on the circadian rhythm of wheel-running activity. *Brain Res.* 1981;212(1):234–238.

Zhang W, Yamada M, Gomeza J, Basile AS, Wess J. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 2002;22(15):6347–6352.

Ztaou S, Maurice N, Camon J, Guiraudie-Capraz G, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C, Liberge M, Amalric M. Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *J Neurosci.* 2016;36(35):9161–9172.