

Non-selective cationic current — the basis of smooth muscle depolarisation

Pucovsky V, Bauer V

Neselektívny kationový prúd — základ depolarizácie hladkého svalu

Abstract

Pucovsky V, Bauer V:
Nonselective cationic current — the basis of smooth muscle depolarisation
 Bratisl Lek Listy 2000; 101 (6): 331–339

The activation of smooth muscle muscarinic receptors leads to its contraction. Electrophysiological and biochemical methods have gradually, over the time span of roughly 30–40 past years, helped to reveal this phenomenon's underlying processes. One element of this cascade of processes is the influx of cations into the smooth muscle cell — non-selective cationic current — causing depolarisation of the cell membrane and subsequent opening of voltage-operated calcium channels. This mini-review provides the reader with up-to-date knowledge on non-selective cationic current, supplemented with information on muscarinic receptors of smooth muscle, their coupling with effectors via G proteins, as well as on muscarinic modulation of calcium and potassium channels of smooth muscle. The conclusion is dedicated to pointing out the future trends of research in this area. (Tab. 2, Fig. 2, Ref. 82.)

Key words: smooth muscle, non-selective cationic current, depolarisation, cholinergic M receptors, G proteins.

Acetylcholin, ktorý je uvoľňovaný zo zakončení postganglionových vlákien parasympatika, pôsobením na cholinergické M-receptory na hladkom svalе spustí deje, ktoré v konečnom dôsledku majú za následok kontrakciu hladkého svalu. Výsledky získané za posledných 30 rokov najmä vďaka rozvoju elektrofyziologických a biochemických metód napomohli odhaleniu dejov prebiehajúcich na úrovni membrán, organel a makromolekúl tvoriacich podstatu tejto kontrakcie. Detailné spoznanie úlohy a fungovania jednotlivých iónových kanálov a enzýmov v tomto procese je základným predpokladom cieľeného vývoja liečiv a účinnej terapie chorôb tráviacej, kardiovaskulárnej, urogenitálnej a dýchacej sústavy. Cieľom tohto článku je poskytnúť čitateľovi prehľad o niektorých

Abstrakt

Pucovský V., Bauer V.:
Neselektívny kationový prúd — základ depolarizácie hladkého svalu
 Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 6, s. 331–339

Aktivácia muskarínových receptorov hladkého svalu vedie k jeho kontrakcii. Elektrofyziologickými a biochemickými metódami sa postupne, v rozpätí približne posledných 30–40 rokov podarilo odhaliť deje tvoriace jej podstatu. Jedným článkom kaskády týchto dejov je vtok kationov do bunky hladkého svalu — neselektívny kationový prúd, následkom ktorého dochádza k depolarizácii bunkovej membrány a následnému otvoreniu vápnikových kanálov riadených napätím. Tento krátky prehľad predkladá čitateľovi súčasné poznatky o neselektívnom kationovom prúde, ktoré sú doplnené údajmi o muskarínových receptoroch hladkého svalu, ich prepojení na efektohy prostredníctvom G-proteínov, ako aj poznatkami o muskarínovej modulácii vápnikových a draslíkových kanálov hladkého svalu. V závere sú uvedené smery, ktorými sa uberá ďalší výskum v tejto oblasti. (Tab. 2, obr. 2, lit. 82.)

Kľúčové slová: hladký sval, neselektívny kationový prúd, depolarizácia, cholinergické M-receptory, G-proteíny.

dejoch, ku ktorým dochádza aktiváciou cholinergických M-receptorov na bunkovej membráne hladkého svalu s dôrazom na neselektívny kationový prúd (I_{cat}) v bunkách longitudinálnej vrstvy hladkého svalu ilea.

Cholinergické M-receptory

Cholinergické M-receptory patria do skupiny receptorov spriahnutých s G-proteínmi, ktoré tvoria až 80 % všetkých známych receptorov (Bockaert, 1991). Ich molekula je zložená zo 7 lipofilných transmembránových domén (helixov) pozostávajúcich z 20–25 aminokyselinových zvyškov spojených hydrofilnými

Institute of Experimental Pharmacology of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava. exfabauv@savba.sk

Address for correspondence: V. Bauer, MD, DSc, Institute of Experimental Pharmacology SAV, Dubravská cesta 9, SK-842 16 Bratislava 4, Slovakia. Phone: +421.7.5477 3586, Fax: +421.7.5477 5928

Ústav experimentálnej farmakológie Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Adresa: Prof. MUDr. V. Bauer, DrSc., Ústav experimentálnej farmakológie SAV, Dúbravská cesta 9, 842 16 Bratislava 4.

Tab. 1. M receptor antagonists and their affinities towards individual subtypes of M receptor (Roux et al., 1998). pKB are given in the brackets, according to: a — Eglén and Watson, 1996; b — Bolton and Zholos, 1997; c — Watson et al., 1999; n.d.— not determined.

Tab. 1. Prehľad antagonistov M-receptorov a ich afínit voči jednotlivým podtypom M-receptorov (podľa Rouxa a spol., 1998). Hodnoty pKB sú uvedené v zátvorke: a — podľa Egléna a Watsonovej, 1996; b — podľa Boltóna a Zholosa, 1997; c — podľa Watsonovej a spol., 1999; n.d. — bližšie neurčené.

| M ₁ | M ₂ | M ₃ | M ₄ |
|---|--|--|---|
| pirenzepín (8,3 ^a) pirenzepine | metoktramín (7,9 ^a) methoctramine | 4-DAMP (8,8 ^c) | otenzepad (AF-DX 116) (n.d.) |
| telenzepín (n.d.) telenzepine | otenzepad (AF-DX 116) (n.d.) | p-F-HHSiD (7,6 ^c) | himbacín (8,8 ^a) himbacine |
| | himbacín (8,5 ^a) himbacine | darifenacín (8,9 ^c) darifenacin | telenzepín (n.d.) telenzepine |
| | tripitramín (9,7 ^a) tripitramine | zamifenacín (7,9 ^{b,c}) zamifenacin | |
| | | oxybutynin (8,4 ^c) | |

slučkami umiestnenými striedavo v extracelulárnom a intracelulárnom prostredí a z extracelulárneho amino- (N-) a intracelulárneho karboxy- (C-) terminálu (Wess, 1993). Tretia doména je najväčšia s dlhou intracelulárnou slučkou, sekvencia jej aminokyselín je pri každom podtype receptora iná a určuje, ktorý typ G-proteínu sa napojí na receptor (Brann a spol., 1993). Väzbové miesto pre acetylcholínu sa nachádza vo vaku vytvorenom 3., 5., 6. a 7. transmembránovou doménou (Wess a spol., 1995). Po naviazaní acetylcholínu dochádza ku konformačnej zmene receptorej molekuly, ktorá aktivuje príslušný G-proteín.

M-receptory umiestnené presynapticky, na postgangliových nervových vláknach, plnia funkciu autoreceptorov a regulujú výdaj acetylcholínu negatívnu spätnou väzbou. M-receptory umiestnené postsynapticky — na cieľových bunkách, akými sú bunky hladkého svala, podsliznicové žliazky, epitel a endotel (Barnes, 1993; Eglén a spol., 1994) významne ovplyvňujú činnosť efektorového tkaniva. Použitím antagonistov s relatívnu selektivitou a molekulovým klonovaním sa doteraz v tkanivách rôznych zvieracích druhov zistili štyri podtypy muskarínových receptorov (M₁, M₂, M₃ a M₄) a odhalila sa existencia piatich génov pre M-receptory (m₁ až m₅) (Hulme a spol., 1990), z ktorých prvé štyri produkty zodpovedajú receptorom M₁ až M₄, kým pre m₅ sa doteraz nezistil fyziologický korelát.

Populácia M-receptorov na hladkých svaloch je heterogénna a pozostáva prevažne z M₂ (70–80 %) a M₃-receptorov (20–30 %) (Eglén a spol., 1996). M₁-receptory sa vyskytujú na parasymptických gangliách. Podtyp presynaptického inhibičného M autoreceptora ešte nie je spoľahlivo určený. Staršie výsledky navedčovali tomu, že ide o podtyp M₂ (Barnes, 1992), novšie štúdie však hovoria v prospech podtypu M₄ (Kilbinger a spol., 1995). Keďže afinity jednotlivých „selektívnych“ antagonistov (tab. 1) sa do veľkej miery prekrývajú, presné určenie podtypu M-receptora je sťažené. Celkové množstvo prítomných M-receptorov sa mení v závislosti od druhu a veku zvierata a lokalizácie tkaniva. Tak napríklad v dýchacích cestách morčata ich hustota klesá smerom od trachey k bronchiolom (Haddad a spol., 1991).

G-proteíny

GTP-viažuce proteíny (G-proteíny) sú heterotrimerne regulačné GTP-hydrolázy pozostávajúce z podjednotky α viažucej GTP a podjednotiek β a γ , ktoré sa kvôli svojej pevnej väzbe javia ako afunkčný celok. Doteraz bolo klonovaných 23 rôznych podjednotiek (Gudermann a spol., 1996), ktoré sa na základe stupňa homológie α primárnej sekvencie zadeľujú do štyroch podtried (α_s , α_i , α_q a α_{12}), 6 rôznych β a 11 rôznych γ podjednotiek (Weng a spol., 1998). Celý komplex G-proteínu je vnorený do bunkovej membrány z cytoplazmatickej strany prostredníctvom lipidových modifikácií α (myristoylácia alebo palmitoylácia) a γ podjednotky (prenylácia a karboxymetylácia) (Offermans a Schultz, 1994). Neaktivovaný G-proteín má na svojej α podjednotke viazaný GDP, ktorý sa po aktivácii uvoľní a na prázdne väzbové miesto sa naviaže GTP. Väzba GTP vyvolá konformačnú zmenu v troch flexibilných regiónoch G α (nazývané Switch I až III). Táto zmena zníži jej afinitu voči G $\beta\gamma$. Následkom toho sa rozpoji G-proteínový komplex na GTP-G α a G $\beta\gamma$. Odpojená GTP-G α podjednotka má 20–100-krát vyššiu afinitu k efektorom, ktorými sú enzýmy, ako napr. adenylátcykláza (AC), fosfolipáza C (PLC), fosfolipáza A₂ (PLA₂), cGMP fosfodiesteráza (cGMP-PDE) alebo iónové kanály, ako napr. draslíkové a vápnikové kanály alebo tzv. GIRKS – G-protein-gated inward rectifier K⁺ channels (Bockaert, 1991; Clapham a Neer, 1997; Sprang, 1997), ako celý G-proteínový komplex (Hamm, 1998). I keď sa spočiatku myslelo, že G- $\beta\gamma$ iba inhibuje G α -podjednotku, výsledky viacerých experimentálnych prác z posledných rokov ukazujú, že obe zložky sú aktívne a ovplyvňujú efekty. GTPázovou aktivitou α -podjednotky sa GTP rozloží na GDP a fosfát, α -podjednotka sa znovu stane neaktívnou a reasociuje s G $\beta\gamma$ -komplexom.

Funkciu G-proteínov možno ovplyvniť farmakologicky. Pertussis atoxín (PTX) ADP-ribozyluje serínový zvyšok na C-termináli α_i -podjednotky, a tak inhibuje jej interakciu s receptorom. Cholératoxín ADP-ribozyláciou arginínového zvyšku G-proteínov s α_s -podjednotkou v polohe 201 umožní väzbu GTP a súčasne

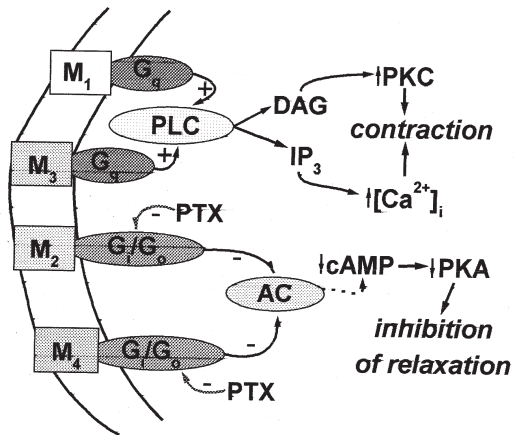


Fig. 1. The coupling of cholinergic M receptors with G proteins. AC — adenylate cyclase, PLC — phospholipase C, PKC — protein kinase C, DAG — diacylglycerol, IP₃ — inositoltrisphosphate, G_q, G_i, G_o — G_q, G_i or G_o protein, respectively, PTX — pertussis toxin, PKA — protein kinase A, cAMP — cyclic adenosinemonophosphate, [Ca²⁺]_i — concentration of free intracellular calcium, + stimulation, — inhibition.

Obr. 1. Prepojenie cholinergických M-receptorov s G-proteínmi. AC — adenylátcykláza, PLC — fosfolipáza C, PKC — proteínkináza C, DAG — diacylglycerol, IP₃ — inozitoltrisfosfát, G_q, G_i, G_o — G_q, G_i alebo G_o proteín, PTX — pertussis toxin, PKA — proteínkináza A, cAMP — cyklický adenosínmonofosfát, [Ca²⁺]_i — intracelulárna koncentrácia voľného ionizovaného vápnika, + stimulácia, — inhibícia.

inhibuje GTPázovú aktivitu tejto podjednotky (Sprang, 1997). Nehydrolyzovateľný analóg GDP, GDP-β-S blokuje funkciu G-proteínov a nehydrolyzovateľný analóg GTP, GTP-γ-S ich ireverzibilne aktivuje. V súčasnosti sú dostupné i protilátky voči jednotlivým typom G-proteínov, ktoré blokujú ich činnosť (Kim a spol., 1998 a; Wang a spol., 1997). Nevýhodou týchto látok je ich vysoká molekulová hmotnosť a neschopnosť prestupu bunkovou membránou.

Desenzitizácia

Desenzitizácia (tachyfyliaxia, tolerancia, adaptácia, deaktivácia, run-down) je významnou vlastnosťou všetkých receptorov spriahnutých s G-proteínmi. Je to fenomén, pri ktorom opakované podanie alebo dlhá expozícia rovnakej koncentrácii agonistu vyvoláva menší efekt, ako bol pôvodný.

Doterajší výskum nasvedčuje tomu, že receptory sú postupne fosforylované na serínových a treonínových zvyškoch tretej intracelulárnej slučky. V prípade M-receptorov sa na fosforylácii zúčastňujú proteínkináza A (PKA), proteínkináza C (PKC) a GRKs (G-protein-coupled receptor kinases) typ 2 a 3. Na fosforylovanú slučku sa viaže 48 kDa proteín β-arestín, ktorý bráni viazaniu G-proteínu s receptorom, a tým preruší prenos signálu z receptora do cytoplazmy (Haddad a Rousell, 1998). V primárnej sekvencii β-arestínu sa nachádza doména viažuca bielkovinu klatrín, pomocou ktorej dochádza k internalizácii receptora. Predpokladá sa, že tento proces prispieva k desenzitizácii (ale ju v úplnosti nevysvetľuje, keďže sa získali aj výsledky, keď inhibícia internalizácie neovplyvnila desenzitizáciu). V cytoplazme potom

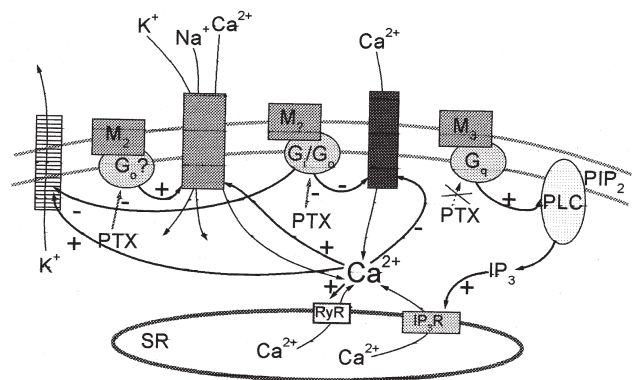


Fig. 2. The effects of muscarinic receptor activation in smooth muscle. PLC — phospholipase C, IP₃ — inositoltrisphosphate, G_q, G_i, G_o — G_q, G_i or G_o protein, PTX — pertussis toxin, IP₃R — inositoltrisphosphate receptor, RyR — ryanodine receptor, SR — sarcoplasmic reticulum, PIP₂ — phosphatidylinositolbisphosphate, + stimulation, — inhibition.

Obr. 2. Účinky aktivácie muskarínových receptorov hladkého svalu. PLC — fosfolipáza C, IP₃ — inozitoltrisfosfát, G_q, G_i, G_o — G_q, G_i alebo G_o proteín, PTX — pertussis toxin, IP₃R — receptor pre inozitoltrisfosfát, RyR — ryanodínový receptor, PIP₂ — fosfatidylinozitolbisfosfát, SR — sarkoplazmatické retikulum, + stimulácia, — inhibícia.

môže dôjsť k defosforylácii receptorovej bielkoviny, ktorá je takto recyklovaná a vracia sa do bunkovej membrány (Krupnick a Benovic, 1998).

Prepojenie muskarínových receptorov

Odlíšna primárna štruktúra M-receptorov im umožňuje väzbu s odlišnými G-proteínmi. Z tohto hľadiska možno rozdeliť M-receptory na dve triedy (obr. 1).

— M1-receptory a M3-receptory sa spájajú s G_q proteínmi, ktoré sú necitlivé na PTX. Ich efektorom je PLC a druhým poslom sú Ca²⁺-ióny. PLC hydrolyzuje v membráne sa nachádzajúci fosfatidylinozitolbisfosfát (PIP₂) na inozitoltrisfosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG). Hydrofilný IP₃ difunduje k sarkoplazmatickému retikulu, kde aktivuje inozitolové receptory a spúšťa uvoľňovanie vápnika z intracelulárnych zásobární. Tým zvyšuje koncentráciu voľného ionizovaného vnútrobunkového vápnika ([Ca²⁺]). DAG, ktorý je lipofilný, difunduje membránou a aktivuje PKC, ktorá fosforyluje niektoré kontraktilné proteíny, a tak napomáha udržať kontrakciu.

— M2-receptory a M4-receptory sa spájajú s G_i alebo G_o proteínmi, ktoré sú citlivé na PTX. Inhibujú AC, a tak znižujú koncentráciu druhého posla, cyklického adenosínmonofosfátu (cAMP). Keďže cAMP aktivuje PKA, ktorá fosforyluje kinázu ľahkých reťazcov myozínu, a tým inhibuje kontrakciu, výsledkom aktivácie M₂-receptorov a M₄-receptorov bude inhibícia relaxácie.

Keďže na membráne hladkých svalov sa nachádzajú M₂ a M₃-receptory (obr. 2), acetylchólin svojim pôsobením na tieto recep-

tory ovplyvňuje kontrakciu a svalový tonus obidvoma vyššie uvedenými mechanizmami (Roux a spol., 1998).

Účinky stimulácie cholinergických muskarínových receptorov hladkého svalu sú najviac preskúmané na modeli izolovanej bunky longitudinálneho hladkého svalu tenkého čreva morčata. Elektrofyziológickými metódami sa zistilo, že acetylcholín, karcholol a iné muskarínové agonisty aktivujúci M-receptory vyvolajú signál, ktorý sa šíri niekoľkými cestami:

- prostredníctvom G-proteínu citlivého na PTX k neselektívnemu kationovému kanálu (Inoue a Isenberg, 1990 a; Komori a spol., 1992). Prúd kationov do bunky cez neselektívne kationové kanály — neselektívny kationový prúd (I_{cat} , Benham a spol., 1985; Inoue a spol., 1987; Inoue a Isenberg, 1990 b) depolarizuje membránu, čoho dôsledkom je otvorenie vápnikových kanálov typu L riadených napätím a vtok vápnika do bunky z extracelulárneho prostredia. Vápnikové ióny potom aktivujú kontrakčné procesy, ale aj od vápnika závislé iónové, napr. draslíkové kanály (BK_{Ca}). K uvoľňovaniu vápnika zo sarkoplazmatického retikula dochádza i spontánne, bez stimulácie M-receptorov. Koncentrácia vnútrobunkového vápnika sa kolísavo mení, čo sa odzrkadľuje i na draslíkovom alebo chloridovom prúde závislým od vápnika. Vzniká tak spontánny prechodný vystupujúci prúd — STOC (Benham a Bolton, 1986) alebo vstupujúci prúd — STIC (Bauer a spol. 1997);
- prostredníctvom G-proteínu necitlivého na PTX k PLC (Komori a spol., 1992), čo vedie k produkcii IP_3 a DAG z PIP_2 . IP_3 potom prostredníctvom svojho receptoru (IP_3R) uvoľní vápnik zo sarkoplazmatického retikula (Komori a Bolton, 1991; Pacaud a Bolton, 1991);
- (pri myocytoch kolónu psa) prostredníctvom G-proteínu citlivého na PTX k draslíkovým kanálom závislým od vápnika, ktoré inhibuje (Cole a spol., 1989; Cole a Sanders, 1989);
- prostredníctvom G-proteínu, o ktorom sa predpokladá, že je citlivý na PTX (Pucovský a spol., 1998) k vápnikovým kanálom typu L riadeným napätím (Inoue a Isenberg, 1990 c; Mitsui a Karaki, 1990; Beech, 1993), ktorých vodivosť potláča priamo alebo prostredníctvom druhého posla.

Šírenie signálu prvými tromi cestami rezultuje v depolarizácii bunkovej membrány hladkých svalov a vo zvýšení koncentrácie voľného cytoplazmatického vápnika. Štvrtá cesta je pravdepodobne ochranným mechanizmom. Spolu s hyperpolarizujúcim draslíkovým prúdom závislým od vápnika chráni bunku pred preplnením vápnikom. Je jedným z faktorov funkčnej desenzitizácie na acetylcholín v morčacom ileu (Himpens a spol., 1991). Okrem toho, prihliadnúc na kábové vlastnosti hladkého svalu, inhibíciu BK_{Ca} -kanálov sa zvyšuje vstupný odpor myocytov, čo zvyší dĺžkovú konštantu a spôsobí, že excitácia je schopná rýchlejšie sa šíriť na väčšie vzdialenosti a že sa ušetrí energia, ktorá by bola potrebná na vstupujúci prúd udržiavajúci depolarizáciu (Shuba, 1981).

Neselektívny kationový prúd

Zistením Boltóna (1971) a Benhama a spol. (1985), že acetylcholín depolarizuje membránu myocytov ilea aktiváciou vstupujúceho prúdu cez neselektívny kationový kanál sa otvoril výskum I_{cat} . Neselektívny kationový kanál sa zistil aj na myocytoch jejúna (Pacaud a Bolton, 1991) a žalúdka morčata (Kim a spol.,

1997), trachey koňa (Fleischmann a spol., 1997), portálnej vény kráľika (Helliwell a Large, 1996) a kultúre myocytov aorty potkana A7r5 (Nakajima a spol., 1996). I_{cat} je hlavným mechanizmom, ktorým muskarínové agonisty depolarizujú membránu. Neselektívny kationový kanál myocytov tenkého čreva alebo žalúdka morčata je priepustný pre Na^+ a K^+ -ióny (Kim a spol., 1995). Kanály sú priepustné približne rovnako pre Rb^+ , K^+ , Cs^+ , Na^+ a Li^+ (pomer priepustností 1,1:1,1:1:0,98:0,80) (Kim a spol., 1995) a slabo priepustné až nepriepustné pre ióny Ca^{2+} , Mg^{2+} a Cl^- (Inoue a Isenberg, 1990 b). Muskarínová stimulácia zrejme nie je jediným spôsobom, ako aktivovať tento receptorom riadený kanál. Na neselektívny kationový kanál konvergujú i signály z histamínového (na ileu morčata) (Komori a spol., 1992), cholecystokinínového (na žalúdku morčata) (Wang a Sims, 1998) a tachykinínových receptorov (myocyty hrubého čreva psa) (Lee a spol., 1995).

Inoue a Isenberg (1990 b) zistili, že k aktivácii I_{cat} dochádza prostredníctvom G-proteínu citlivého na PTX. Dokázali, že I_{cat} je blokován pridaním nehydrolyzovateľného analógu GDP, GDP- β -S, do bunky a je evokovaný ireverzibilným aktivátorom G-proteínov, γ -GTP- γ -S. GTP- γ -S zvýši vodivosť jednotlivých kanálov, zmení závislosť prúdu od koncentrácie intracelulárneho vápnika a od napätia na membráne podobne, ako je to pôsobením acetylcholínu. Po pridaní acetylcholínu sa intenzita tohto prúdu už ďalej nezvyšuje. Výsledky Zholosa a Boltóna (1994) naznačujú, že na aktiváciu neselektívneho kationového kanálu je potrebné naviazanie aspoň jednej podjednotky aktivovaného G-proteínu, pritom je možné naviazanie i dvoch alebo viacerých takýchto podjednotiek. Zdá sa, že úlohu pri I_{cat} má i tyrozínkináza, lebo jej inhibítor genisteín inhibuje I_{cat} . Presný mechanizmus inhibície sa zatiaľ nepodarilo objasniť. Predpokladá sa, že inhibíciou tyrozínkinázy je znížená fosforylačná aktivácia bielkovín potrebných pre mobilizáciu intracelulárneho vápnika (Inoue a spol., 1994).

I_{cat} závisí od napätia na membráne. Krivka závislosti prúdu od membránového potenciálu je zvonovitá, s maximom okolo -30 mV, s potenciálom reverzie (E_{rev}) v negatívnej časti potenciálovej osi blízko 0 mV a s tzv. inward rektifikáciou pri kladných hodnotách membránového potenciálu (Inoue a Isenberg, 1990 a). Hyperpolarizácia membrány deaktivuje neselektívne kationové kanály (Zholos a Bolton, nepublikované údaje). I_{cat} tiež výrazne závisí od $[Ca^{2+}]_i$, ktorý facilituje I_{cat} . Tento mechanizmus pravdepodobne slúži ako pozitívna spätná väzba na udržanie vtoku vápnika do bunky pretrvávajúcou depolarizáciou (Inoue a Isenberg, 1990 c). I_{cat} má bifázický priebeh, ktorý sleduje a odzrkadľuje zmeny koncentrácie vnútrobunkového vápnika. Prvá fáza je prechodný nárast prúdu spôsobený uvoľnením vápnika zo sarkoplazmatického retikula a jeho facilitačným účinkom na I_{cat} . Druhá fáza je, po odznení efektov uvoľnenia vápnika, demaskovaný primárny mechanizmus, ktorý pozostáva z muskarínovej aktivácie G-proteínu sprostredkujúceho otvorenie neselektívneho kationového kanála (Pacaud a Bolton, 1991). Napätová závislosť I_{cat} sa zdá byť modulovaná G-proteínmi, keďže sa zistilo, že koncentrácia aktivovaných podjednotiek G-proteínu v bunke určuje polohu aktivačnej krivky I_{cat} na napätovej osi. Zvýšenie podielu obsadených muskarínových receptorov posunulo aktivačnú krivku I_{cat} do negatívnej oblasti a pretrvávajúca prítomnosť agonistu (t.j. desenzitizácia) ju posunula pozitívne (Zholos a Bolton, 1994).

Názory na moduláciu I_{cat} extracelulárnym pH sa rozchádzajú. Výsledky Inoueho a spol. (1995) nasvedčujú tomu, že acidifiká-

cia extracelulárneho prostredia zväčšuje I_{cat} , čo autori vysvetľujú alosterickou modifikáciou neselektívneho kationového kanála protónmi a následnou zmenou jeho kinetiky otvárania. Na druhej strane ukázala práca Zholosa a Boltona (1997 a), že zvýšená koncentrácia H^+ -iónov inhibuje I_{cat} vyvolaný bud karbacholom alebo intracelulárnym podaním GTP- γ -S. Tento účinok vzniká moduláciou samotného kanálu a/alebo tinením fixovaných negatívnych nábojov na membráne, posúvajú tak transmembránový potenciálový rozdiel, ktorý registruje vrátkovací mechanizmus kanálu. Podobným spôsobom sa zdá byť I_{cat} modulovaný i dvojmocnými kationmi, Ca^{2+} a Mg^{2+} , ktorých zvyšujúca sa extracelulárna koncentrácia ho inhibuje (ileum) (Zholos a Bolton, 1995), (vaskulárne myocyty) (Nakajima a spol., 1997).

Hypotonické napučanie bunky zmenou osmolality externého roztoku z 312 na 262 mosmol/l, ktoré nemení prúd cez napäťovo závislé draslíkové a vápnikové kanály, zvýši I_{cat} približne o 50 % nezávisle od vnútrobunkového vápnika. Svedčí to o jeho možnej mechanosenzitivnej modulácii (Waniishi a spol., 1997).

Príspevok chloridových aniónov, ktoré výstupom z bunky môžu napodobňovať vstupujúci kationový prúd, sa zdá minimálny v ileálnych myocytoch morčafa. Zholos a Bolton (1995) ukázali, že keď sa sodné ióny nahradia nepermeujúcimi iónmi N-metyl-D-glukamínu, neselektívny kationový prúd nevznikne. Práca Fleischmanna a spol. (1997) na tracheálnych myocytoch koňa však ukazuje, že prechodná zložka vstupujúceho prúdu vyvolaného aktiváciou muskarínových receptorov je vlastne vystupujúci prúd chloridových iónov cez chloridové kanály závislé od vápnika.

Okrem uvedeného mechanizmu desenzitizácie receptorov, na ktorom sa zúčastňujú GRKs a arestíny, v desenzitizácii I_{cat} má úlohu i obsah GTP a aktivita PKC v bunke. Zholos a Bolton (1996) pozorovali, že desenzitizácia I_{cat} je pomalšia, keď v pipetovom roztoku je prítomné GTP alebo GTP- γ -S a rýchlejšia, keď je tam GDP- β -S. Predpokladajú, že desenzitizácia I_{cat} je spôsobená poklesom koncentrácie aktívovaného G-proteínu. Opakované podanie agonistu muskarínových receptorov vyvolá I_{cat} , ktorého amplitúda sa postupne znižuje. Ak sa však v pipetovom roztoku nachádza 1 mM GTP, k desenzitizácii prakticky nedochádza (Pucovský a spol., 1998). Aktivátor PKC, forbol-12, 13-dibutyrát v prítomnosti MgATP potlačí I_{cat} gastrických myocytov a inhibitor PKC, cheletrytrín tomu zabráni (Ahn a spol., 1997). V prítomnosti 2 mM EGTA (chelátor vápnika) v pipetovom roztoku bola desenzitizácia pomalšia ako v prípade, keď tam bolo len 0,5 mM EGTA, čo svedčí o tom, že desenzitizácia I_{cat} je sčasti spôsobená fosforyláciou proteínov enzýmom PKC za spoluúčasti vápnika (Kim a spol., 1998 b).

V poslednom čase sa pozornosť sústreďuje na odhalenie podtypu M-receptora a G-proteínu, ktorými je mediovaný I_{cat} . Odpoveď na prvú otázku sa zdá jednoznačná. Antagonisty cholínerygických M_3 -receptorov himbacín, tripiramín a metoktramín kompetitívne inhibovali, kým zamifenacín, p-F-HHSiD (parafluoro-hexahydro-sila-difenidolhydrochlorid) a 4-DAMP (4-difenylacetoxy-N-metyl-piperidínmetiodid), antagonisty cholínerygických M_3 -receptorov, len znižovali maximálnu amplitúdu I_{cat} . Zdá sa preto, že otváranie neselektívnych kationových kanálov je spôsobené aktiváciou M_2 -receptorov a aktivácia M_3 -receptorov má „permissívnu“ úlohu, ktorá by mohla spočívať vo fosforylačnom odstraňovaní inhibície M_2 -receptora alebo neselektívneho kationového kanálu proteínkinázou C (Bolton a Zholos, 1997; Zholos a Bolton, 1997b). Takéto závery

Tab. 2. Division of substances which block I_{cat} into two groups according to the rate of I_{cat} inhibition. IC_{50} values are: a — according Chen et al. (1993); b — according Kim et al. (1995).

Tab. 2. Rozdelenie látok blokujúcich I_{cat} podľa rýchlosti blokády do dvoch skupín. Hodnoty IC_{50} sú: a — podľa Chena a spol. (1993); b — podľa Kima a spol. (1995).

| Fast I_{cat} blockers Rýchle blokátory I_{cat} | | Slow I_{cat} blockers Pomalé blokátory I_{cat} | |
|---|-------------------------------|---|---------------------------|
| K ⁺ channel blockers blokátory K ⁺ kanálov | | DPC derivatives deriváty DPC | |
| látka substance | IC_{50} | látka substance | IC_{50} |
| TEA | ~10 mM (4,1 mM ^b) | DPC | >100 μ M ^a |
| 4-AP | 2,5 mM (3,3 mM ^b) | DCDPC | <30 μ M ^a |
| procaine prokain | 1-5 mM | niflumic acid maniflumová kyselina | >100 μ M ^a |
| | | flufenamic acid flufenamová kyselina | 32 μ M ^a |
| caffeine kofeín | ~10 mM ^a | quinine chinín | 1 μ M ^a |
| | | quinidine chinidín | 0,25 μ M ^b |

podporili aj výsledky Komoriho a spol. (1998), ktorí zistili, že: a) aktivácia M_2 -receptora aktivuje G-proteín citlivý na PTX, ktorý otvára neselektívny kationový kanál a inhibuje AC, b) aktivácia M_3 -receptora aktivuje G-proteín necitlivý na PTX, ktorý sa napojí na PLC a v konečnom dôsledku vedie k uvoľňovaniu vápnika zo sarkoplazmatického retikula. Wang a spol. (1997) ukázali, že blokádou M_3 -receptorov je inhibovaná prvá, prechodná zložka a blokádou M_2 -receptorov druhá, pretrvávajúca zložka I_{cat} . V súvislosti s otázkou, ktorý typ G-proteínu sprostredkuje otváranie neselektívneho kationového kanála, boli doteraz publikované dve práce. Wang a spol. (1997) zistili, že v tracheálnych myocytoch koňa pretrvávajúca zložka I_{cat} je blokovaná niekoľkými druhmi protilátok anti- $G\alpha_i$ a protilátkou anti- $G\alpha_o$. Kim a spol. (1998 b) na gastrických myocytoch morčafa zistili, že anti- $G\alpha_o$ protilátka inhibuje I_{cat} , kým anti- $G\alpha_i$ protilátka je bez účinku. Predpokladajú, že v tomto type tkaniva sa na neselektívny kationový kanál pravdepodobne napája G_o -proteín.

O neselektívnom kationovom kanáli sa málo vie. Doteraz nebol izolovaný, ani nie je známa jeho primárna sekvencia. Činnosť jednotlivých kanálov ťažko sledovať, lebo ich hustota na membráne je malá (asi 1000 funkčných kanálov na jednej bunke) a majú rýchlu desenzitizáciu. Vodivosť kanálu je v rozmedzí 20-25 pS (Inoue a spol., 1987), 25-30 pS (Zholos, nepublikované údaje). Počas stimulácie sa simultánne otvorí okolo 3600 kanálov, ale skutočný počet kanálov je najmenej dvakrát väčší, keďže pravdepodobnosť otvorenia kanálu (NP_o) je pri maximálnej aktivácii menšia ako 0,5. Priemerná hustota kanálov by potom bola $1/\mu$ m².

Neselektívny kationový prúd možno farmakologicky ovplyvniť rôznymi látkami. Chen a spol. (1993) tieto látky rozdelili do dvoch skupín (tab. 2). Rýchle blokátory I_{cat} (blokátory draslíkových kanálov a kofeín) inhibujú neselektívny kationový kanál do 50—100

ms a ich blokáda je silnozavislá od napätia na membráne. Predpokladá sa, že interferujú s permeáciou katiónov cez kanál. Pomalé blokátory I_{cat} (deriváty difenylamín 2-karboxylovej kyseliny (DPC), chinín a chinidín) inhibujú kanál asi 10-krát pomalšie ako rýchle blokátory, ich blokáda je takmer nezávislá od napätia a po výplachu nedôjde ku kompletnému obnoveniu prúdu. Keďže deriváty DPC sú látky lipofilnej povahy, predpokladá sa, že prestupujú membránou a ovplyvňujú kanál z vnútornej strany.

Miestom účinku blokátorov I_{cat} je pravdepodobne neselektívny katiónový kanál, keďže I_{cat} vyvolaný GTP- γ -S bol tiež inhibovaný. Tieto látky nemenia iónovú selektivitu neselektívneho katiónového kanálu, ale ich selektivita je dosť nízka, lebo inhibujú i vápnikový prúd (prokaín, DPC, DCDPC) (Chen a spol., 1993). Relatívne najselektívnejším blokátorom neselektívneho katiónového kanálu je chinidín, ktorý reverzibilne inhibuje I_{cat} , pôsobí extracelulárne a pri IC_{50} pre neselektívny katiónový kanál relatívne málo inhibuje draslíkový prúd závislý od napätia a od vápnika a vápnikový prúd (Kim a spol., 1995).

Modulácia iných iónových kanálov hladkého svalu muskarínovými receptormi

Modifikácia vlastností iónových kanálov na cytoplazmatickej membráne predstavuje dôležitý mechanizmus regulácie excitability hladkosvalovej bunky. Aktivácia muskarínových receptorov hladkého svalu moduluje prúd vápnika cez kanály typu L riadené napätím a prúd draslíka cez kanály závislé od vápnika. Známe sú i pôsobenia na iné typy iónových kanálov, ako napr. na K_{ATP} kanály tracheálnych myocytov (Nuttall a Farley, 1997) alebo na chlórídové kanály riadené napätím (v myocytoch kolónu kráľika) (Sun a spol., 1992).

V črevnom hladkom svale dochádza k muskarínovému potlačeniu vápnikového prúdu, i keď sa v niektorých tkanivách pozorovala i muskarínová potenciácia (v gastrických myocytoch obožžielnikov) (Clapp a spol., 1987), v bronchiálnych myocytoch potkana (Kamishima a spol., 1992), v koronárnej artérii kráľika (Matsuda a spol., 1990). Fenomén potlačenia vápnikového prúdu nie je obmedzený iba na črevný hladký sval a cholinergickú stimuláciu, ale sa zdá rozšíreným mechanizmom, ktorým dochádza ku komunikácii medzi elektromechanickým a farmakomechanickým prepojením. Podobné účinky na vápnikový prúd sa pozorovali na bunkách bazilárnej artérie kráľika po stimulácii estradiolom (Ogata a spol., 1996), na pacemakerových bunkách sínusatriálneho uzla kráľika po karbachole (Han a spol., 1995), na gastrických a tracheálnych myocytoch (Wade a spol., 1996), na myocytoch močového mechúra (Yoshino a Yabu, 1995) a na myocytoch ilea morčiat po histamíne, bradykiníne, substancii P alebo acetylcholíne (Beech, 1993).

Potlačenie vápnikového prúdu je bifázické a dochádza k nemu pravdepodobne na samom vápnikovom kanáli (Beech, 1993; Yoshino a Yabu, 1995). Prechodná zložka je zapríčinená uvoľnením vápnika z vnútrobunkových zásob (Ganitkevich a spol., 1987), ktorého zvýšená hladina inhibuje vápnikový kanál. Tento mechanizmus je sprostredkovaný G-proteínom necitlivým na PTX, pravdepodobne typu G_{q11} , spájajúcim sa s M_3 -receptorom, ktorý aktivuje PLC/ IP_3 kaskádu (Komori a spol., 1992). Pretrvávajúca zložka je tiež mediovaná G-proteínom a na fungovanie potrebuje minimálne pokojovú koncentráciu cytoplazmatického vápnika, zhruba 100 nM (Beech, 1993). Potlačenie sa vyvíja postupne (k maximum

potlačenia dôjde 1–2 min po podaní agonistu) a nedesenzitizuje sa. Zatiaľ nie je známe, ktorým typom M-receptora je mediovaná. Naše výsledky (Pucovský a spol., 1998) a nepriamo aj výsledky Wanga a spol. (1997) nasvedčujú tomu, že G-proteín sprostredkujúci pretrvávajúcu zložku potlačenia vápnikového prúdu je citlivý na PTX, kým výsledky Unnoa a spol. (1995) viedli autorov k opačnému záveru. Nie je známy ani mediátor inhibujúci vápnikový kanál. Zatiaľ sa zdá, že to nie sú kyselina arachidónová a jej metabolity (Unno a spol., 1996) a ani NO (Pucovský a spol., 1998). Na myocytoch longitudinálneho svalu čreva kráľika však kyselina arachidónová a iné *cis*-nenасыténé mastné kyseliny s dlhým reťazcom inhibovali vápnikový prúd (Shimada a Somlyo, 1992). Najnovšie výsledky ukazujú, že na oboch zložkách potlačenia vápnikového prúdu sa pravdepodobne zúčastňuje PLC alebo fosfolipáza D (PLD). D609 a wortmannin, chemicky nepríbuzné inhibitory PLC a PLD, inhibovali obe zložky spazmogénmi vyvolaného potlačenia vápnikového prúdu, čo nasvedčuje tomu, že sú mediované tým istým alebo farmakologicky podobným faktorom (Unno a spol., 1998).

Draslíkové kanály závislé od vápnika tvoria väčšinu populácie draslíkových kanálov myocytov ilea (Gagov a spol., 1993). Účinok muskarínovej aktivácie na BK_{Ca} kanál je bifázický (Komori a spol., 1992). V prvej fáze je prúd cez tieto kanály prechodne potencovaný uvoľneným vápnikom (prostredníctvom M_3 -receptorov, PLC a IP_3), v druhej fáze je inhibovaný. Cole a spol. (1989) a Cole a Sanders (1989) na myocytoch kolónu psa zistili, že acetylcholíni zníži vystupujúci prúd vyvolaný depolarizáciou bunkovej membrány a že nifedipín blokuje tento účinok. Sledovaním aktivity jednotlivých BK_{Ca} kanálov zistili, že acetylcholíni posúva ich aktivačné napätie do pozitívnej oblasti. Keďže inhibícia draslíkového prúdu bola zvýšená pridaním GTP alebo GTP- γ -S do pipety a blokováná pridaním PTX, títo autori uzavreli, že muskarínová aktivácia inhibuje BK_{Ca} kanál pravdepodobne prostredníctvom G-proteínu.

Zjednodušená schéma účinkov muskarínovej stimulácie na hladkom svale je znázornená na obrázku 2.

Záver a perspektívy

Neselektívny katiónový kanál predstavuje z veľkej časti doteraz neprebádanú a z terapeutického hľadiska zaujímavú štruktúru hladkosvalovej bunkovej membrány. Poznanie štruktúry a úplné pochopenie funkcie a tkanivových odlišností tohto kanála by mohlo viesť k vývoju látok schopných selektívne zabrániť depolarizácii membrány buniek jednotlivých typov hladkého svalu (a tým zabrániť aj jeho aktivácii), čo môže priaznivo ovplyvniť priebeh chorôb súvisiacich so zmenenou reaktivitou hladkého svalu. V súčasnosti sa výskum v tejto oblasti uberá dvoma hlavnými smermi.

Niekoľko laboratórií sa usiluje preskúmať neselektívny katiónový kanál na úrovni jednej molekuly alebo funkčne jednotného komplexu molekúl (v prípade, že je kanál asociovaný s muskarínovým receptorom a/alebo G-proteínom). Toto možno teoreticky uskutočniť sledovaním aktivity jednotlivých iónových kanálov elektrofyziologickými metódami. Pomerne nízka hustota týchto kanálov a ich rýchla desenzitizácia predstavujú však metodickú prekážku, ktorá doteraz nebola prekonaná.

Metódami molekulovej biológie sa hľadá gén a biochemická štruktúra týchto kanálov. Nedávno sa zistilo, že proteín hTRPC6

zvyšuje vstup vápnika do buniek ko-transfikovaných génom pre muskarínový receptor typu M_3 a stimulovaných karbacholom (Boulay a spol., 1997). Hofmann a spol. (1999) doplnili poznatky o TRPC6 zistením, že prepúšťa katióny neselektívnym spôsobom a je aktivovaný diacylglycerolom. Tieto vlastnosti nasvedčujú tomu, že práve táto bielkovina by mohla byť hľadaným neselektívnym katiónovým kanálom alebo jeho súčasťou. TRP (transient receptor potential) gény boli pôvodne objavené u *Drosophily*, kde kódujú neselektívny katiónový kanál regulovaný obsahom vápnika v intracelulárnych zásobárňach (Clapham, 1996), ktorý má úlohu vo fototransdukcii tohto hmyzu. Neskôr boli objavené cicavčie homology týchto génov, TRPC gény (TRPC1 až 6), z ktorých hTRP1 a hTRP3 (Zhu a spol., 1996) a mTRP2 (Vannier a spol., 1999) sú regulované vyprázdňovaním intracelulárnych zásobární vápnika. Otázkou, či TRPC6 je neselektívny katiónový kanál, bude možné definitívne zodpovedať, až keď sa podrobnejšie preskúmajú vlastnosti prúdu tečúceho cez TRPC6 a keď sa expresiou dominantne negatívneho variantu tohto génu potlačí neselektívny katiónový prúd v bunkách, ktoré ho vykazujú. V prípade, že sa táto hypotéza ukáže správnu, už nič nebude stáť v ceste obmenám molekuly kanálu a detailnej disekcii vzťahov štruktúra-funkcia a získaniu farmák ovplyvňujúcich tieto kanály.*

Literatúra

- Ahn S.C., Kim S.J., So I., Kim K.W.:** Inhibitory effect of phorbol 12,13 dibutyrate on carbachol-activated nonselective cationic current in guinea-pig gastric myocytes. *Pflüg. Arch.-Europ. J. Physiol.*, 434, 1997, s. 505—507.
- Barnes P.J.:** Modulation of neurotransmission in airways. *Phys. Rev.*, 72, 1992, s. 699—729.
- Barnes P.J.:** Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci.*, 52, 1993, s. 521—527.
- Bauer V., Oike M., Tanaka H., Inoue R., Ito Y.:** Hydrogen peroxide induced responses of cat tracheal smooth muscle cells. *Brit. J. Pharmacol.*, 121, 1997, s. 867—874.
- Beech D.J.:** Inhibitory effects of histamine and bradykinin on calcium current in smooth muscle cells isolated from guinea-pig ileum. *J. Physiol. (Lond.)*, 463, 1993, s. 565—583.
- Benham C.D., Bolton T.B., Lang R.J.:** Acetylcholine activates an inward current in single mammalian smooth muscle cells. *Nature (Lond.)*, 316, 1985, s. 345—347.
- Benham C.D., Bolton T.B.:** Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of rabbit. *J. Physiol.* 381, 1986, s. 385—406.
- Bockaert J.:** G proteins and G protein-coupled receptors: structure, function and interactions. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1, 1991, s. 32—42.
- Bolton T.B.:** On the nature of the oscillations of the membrane potential (slow waves) produced by acetylcholine or carbachol in intestinal smooth muscle. *J. Physiol.*, 216, 1971, s. 403—418.
- Bolton T.B., Zholos A.V.:** Activation of M_2 muscarinic receptors in guinea-pig ileum opens cationic channels modulated by M_3 muscarinic receptors. *Life Sci.*, 60, 1997, s. 1121—1128.
- Boulay G., Zhu X., Peyton M., Jiang M., Hurst R., Stefani E., Birnbaumer L.:** Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J. Biol. Chem.*, 272 (47), 1997, s. 29672—29680.
- Brann M.R., Ellis J., Jorgensen H., Hill-Eubanks D., Jones S.V.:** Muscarinic acetylcholine receptor subtypes: localization and structure/function. *Prog. Brain Res.*, 98, 1993, s. 121—127.
- Chen S., Inoue R., Ito Y.:** Pharmacological characterization of muscarinic receptor-activated cation channels in guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.*, 109, 1993, s. 793—801.
- Clapham D.E.:** TRP is cracked but is CRAC TRP? *Neuron*, 16, 1996, s. 1069—1072.
- Clapham D.E., Neer E.J.:** G protein subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37, 1997, s. 167—203.
- Clapp L.H., Vivaudou M.B., Walsh Jr. J.V., Singer J.J.:** Acetylcholine increases voltage-activated Ca^{2+} current in freshly dissociated smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1987, s. 2092—2096.
- Cole W.C., Carl A., Sanders K.M.:** Muscarinic suppression of Ca^{2+} -dependent K current in colonic smooth muscle. *Amer. J. Physiol.*, 257, 1989, s. C481—487.
- Cole W.C., Sanders K.M.:** G proteins mediate suppression of Ca^{2+} -activated K current by acetylcholine in smooth muscle cells. *Amer. J. Physiol.*, 257, 1989, s. C596—600.
- Eglen R.M., Reddy H., Watson N., Challiss R.A.J.:** Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends Pharmac. Sci.*, 15, 1994, s. 114—119.
- Eglen R.M., Hegde S.S., Watson N.:** Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmac. Rev.*, 48, 1996, s. 531—565.
- Eglen R.M., Watson N.:** Selective muscarinic receptor agonists and antagonists. *Pharmacol. Toxicol.*, 78, 1996, s. 59—68.
- Fleischmann B.K., Wang Y.X., Kotlikoff M.I.:** Muscarinic activation and calcium permeation of nonselective cation currents in airway myocytes. *Amer. J. Physiol.*, 272, 1997, s. C341—349.
- Gagov H.S., Duridanova D.B., Boev K.K.:** Participation of calcium, released from the IP_3 -sensitive Ca-store in activation of Ca-dependent potassium conductance of ileal smooth muscle cells. *Gen. Physiol. Biophys.*, 12, 1993, s. 199—211.
- Ganitkevich V.Ya., Shuba M.F., Smirnov S.V.:** Calcium-dependent inactivation of potential-dependent calcium inward current in an isolated guinea-pig smooth muscle cell. *J. Physiol. (Lond.)*, 392, 1987, s. 431—449.
- Gudermann T., Kalkbrenner F., Schultz G.:** Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36, 1996, s. 429—459.
- Haddad E.B., Landry Y., Gies J.P.:** Muscarinic receptor subtypes in guinea pig airways. *Amer. J. Physiol.*, 261, 1991, s. L327—333.
- Haddad E.B., Rousell J.:** Regulation of the expression and function of the M_2 muscarinic receptor. *Trends Pharmac. Sci.*, 19, 1998, s. 322—327.
- Hamm H.E.:** The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.*, 273, 1998, s. 669—672.
- Han X., Shimoni Y., Giles W.R.:** A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. *J. Gen. Physiol.*, 106, 1995, s. 45—65.

* This work has been supported by the grant VEGA 1/6024/99.

- Helliwell R.M., Large W.A.:** Dual effect of external Ca^{2+} on noradrenaline-activated cation current in rabbit portal vein smooth muscle cells. *J. Physiol.*, 492, 1996, s. 75–88.
- Himpens B., Droogmans G., Casteels R.:** Carbachol-induced non-specific desensitization in guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 343, 1991, s. 580–587.
- Hofmann T., Obukhov A.G., Schaefer M., Harteneck C., Gudermann T., Schultz G.:** Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397, 1999, s. 259–263.
- Hulme E.C., Birdsall N.J., Buckley N.J.:** Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmac. Toxicol.*, 30, 1990, s. 633–673.
- Inoue R., Kitamura K., Kuriyama H.:** Acetylcholine activates single sodium channels in smooth muscle cells. *Pflügers Arch.*, 410, 1987, s. 69–74.
- Inoue R., Isenberg G.:** Acetylcholine activates nonselective cation channels in guinea pig ileum through a G protein. *Amer. J. Physiol.*, 258, 1990 a, s. C1173–1178.
- Inoue R., Isenberg G.:** Effect of membrane potential on acetylcholine-induced inward current in guinea-pig ileum. *J. Physiol. (Lond.)*, 424, 1990 b, s. 57–71.
- Inoue R., Isenberg G.:** Intracellular calcium ions modulate acetylcholine-induced inward current in guinea-pig ileum. *J. Physiol. (Lond.)*, 424, 1990 c, s. 73–92.
- Inoue R., Waniishi Y., Yamada K., Ito Y.:** A possible role of tyrosine kinases in the regulation of muscarinic receptor-activated cation channels in guinea pig ileum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 203, 1994, s. 1392–1397.
- Inoue R., Waniishi Y., Ito Y.:** Extracellular H^+ modulates acetylcholine-activated nonselective cation channels in guinea pig ileum. *Amer. J. Physiol.*, 268, 1995, s. C162–170.
- Kamishima T., Nelson M.T., Patlak J.B.:** Carbachol modulates voltage sensitivity of calcium channels in bronchial smooth muscle of rats. *Amer. J. Physiol.*, 263, 1992, s. C69–77.
- Kilbinger H., von Bardeleben R.S., Siefken N., Wolf D.:** Prejunctional muscarinic receptors regulating neurotransmitter release in airways. *Life Sci.*, 56, 1995, s. 981–987.
- Kim S.J., Ahn S.C., So I., Kim K.W.:** Quinidine blockade of the carbachol-activated nonselective cationic current in guinea-pig gastric myocytes. *Brit. J. Pharmacol.*, 115, 1995, s. 1407–1414.
- Kim Y.C., Kim S.J., Kang T.M., Suh S.H., So I., Kim K.W.:** Effects of myosin light chain kinase inhibitors on carbachol-activated nonselective cation current in guinea-pig gastric myocytes. *Pflüg. Arch.-Europ. J. Physiol.*, 434, 1997, s. 346–353.
- Kim Y.C., Kim S.J., Sim J.H., Cho C.H., Juhn Y.S., Suh, S.H., So I., Kim K.W.:** Suppression of the carbachol-activated nonselective cationic current by antibody against alpha subunit of Go protein in guinea-pig gastric myocytes. *Pflüg. Arch.-Europ. J. Physiol.*, 436, 1998 a, s. 494–496.
- Kim Y.C., Kim S.J., Sim J.H., Jun J.Y., Kang T.M., Suh, S.H., So I., Kim K.W.:** Protein kinase C mediates the desensitization of CCh-activated nonselective cationic current in guinea-pig gastric myocytes. *Pflüg. Arch.-Europ. J. Physiol.*, 436, 1998 b, s. 1–8.
- Komori S., Bolton T.B.:** Calcium release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate in single rabbit intestinal smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 433, 1991, s. 495–517.
- Komori S., Kawai M., Takewaki T., Ohashi H.:** GTP-binding protein involvement in membrane currents evoked by carbachol and histamine in guinea-pig ileal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 450, 1992, s. 105–126.
- Komori S., Unno T., Nakayama T., Ohashi H.:** M_2 and M_3 muscarinic receptors couple, respectively, with activation of nonselective cationic channels and potassium channels in intestinal smooth muscle cells. *Jap. J. Pharmacol.*, 76, 1998, s. 213–218.
- Krupnick J.G., Benovic J.L.:** The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 1998, s. 289–319.
- Lee H.K., Shuttleworth C.W., Sanders K.M.:** Tachykinins activate non-selective cation currents in canine colonic myocytes. *Amer. J. Physiol.*, 269, 1995, s. C1394–1401.
- Matsuda J.J., Volk K.A., Shibata E.F.:** Calcium currents in isolated rabbit coronary arterial smooth muscle myocytes. *J. Physiol.*, 427, 1990, s. 657–680.
- Mitsui M., Karaki H.:** Dual effects of carbachol on cytosolic Ca^{2+} and contraction in intestinal smooth muscle. *Amer. J. Physiol.*, 258, 1990, s. C787–793.
- Nakajima T., Hazama H., Hamada E., Wu S.N., Igarashi K., Yamashita T., Seyama Y., Omata M., Kurachi Y.:** Endothelin-1 and vasopressin activate Ca^{2+} -permeable non-selective cation channels in aortic smooth muscle cells: mechanism of receptor-mediated Ca^{2+} influx. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 28, 1996, s. 707–722.
- Nakajima T., Iwasawa K., Hazama H., Asano M., Okuda Y., Omata M.:** Extracellular Mg^{2+} inhibits receptor-mediated Ca^{2+} -permeable non-selective cation currents in aortic smooth muscle cells. *Europ. J. Pharmacol.*, 320, 1997, s. 81–86.
- Nuttall L.C., Farley J.M.:** Muscarinic receptors inhibit ATP-sensitive K^+ channels in swine tracheal smooth muscle. *Amer. J. Physiol.*, 273, 1997, s. L478–484.
- Offermans S., Schultz G.:** Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. *N.-S. Arch. Pharmacol.*, 350, 1994, s. 329–338.
- Ogata R., Inoue Y., Nakano H., Ito Y., Kitamura K.:** Oestradiol-induced relaxation of rabbit basilar artery by inhibition of voltage-dependent Ca channels through GTP-binding protein. *Brit. J. Pharmacol.*, 117, 1996, s. 351–359.
- Pacaud P., Bolton T.B.:** Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 441, 1991, s. 477–499.
- Pucovský V., Zholos A.V., Bolton T.B.:** Muscarinic cation current and suppression of Ca^{2+} current in guinea pig ileal smooth muscle cells. *Europ. J. Pharmacol.*, 346, 1998, s. 323–330.
- Roux E., Molimard M., Savineau J.-P., Marthan R.:** Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *Gen. Pharmac.*, 31, 1998, s. 349–356.
- Shimada T., Somlyo A.P.:** Modulation of voltage-dependent Ca channel current by arachidonic acid and other long-chain fatty acids in rabbit intestinal smooth muscle. *J. Gen. Physiol.*, 100, 1992, s. 27–44.
- Shuba M.F.:** Mechanisms of action of transmitters on smooth muscle cells. S. 105–128. In: *Physiology of autonomic nervous system*. Leningrad, Nauka 1981.

- Sprang S.R.:** G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 66, 1997, s. 639—678.
- Sun X.P., Supplisson S., Torres R., Sachs G., Mayer E.:** Characterization of large-conductance chloride channels in rabbit colonic smooth muscle. *J. Physiol.*, 448, 1992, s. 355—382.
- Unno T., Komori S., Ohashi H.:** Inhibitory effect of muscarinic receptor activation on Ca²⁺ channel current in smooth muscle cells of guinea-pig ileum. *J. Physiol. (Lond.)*, 484, 1995, s. 567—581.
- Unno T., Komori S., Ohashi T.:** Some evidence against the involvement of arachidonic acid in muscarinic suppression of voltage-gated calcium channel current in guinea-pig ileal smooth muscle cells. *Brit. J. Pharmacol.*, 119, 1996, s. 213—222.
- Unno T., Beech D.J., Komori S., Ohashi H.:** Inhibitors of spasmogen-induced Ca²⁺ channel suppression in smooth muscle cells from small intestine. *Brit. J. Pharmacol.*, 125, 1998, s. 667—674.
- Vannier B., Peyton M., Boulay G., Brown D., Qin N., Jiang M., Zhu X., Birnbaumer L.:** Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1999, s. 2060—2064.
- Wade G.R., Barbera J., Sims S.M.:** Cholinergic inhibition of Ca²⁺ current in guinea-pig gastric and tracheal smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 491, 1996, s. 307—319.
- Wang B., Sims S.M.:** CCK regulates nonselective cation channels in guinea pig gastric smooth muscle cells. *Amer. J. Physiol.*, 274, 1998, s. G709—717.
- Wang Y.-X., Fleischmann B.K., Kotlikoff M.I.:** M₂ receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: calcium and Gi/Go requirements. *Amer. J. Physiol.*, 273, 1997, s. C500—508.
- Waniishi Y., Inoue R., Ito Y.:** Preferential potentiation by hypotonic cell swelling of muscarinic cation current in guinea pig ileum. *Amer. J. Physiol.*, 272, 1997, s. C240—253.
- Watson N., Daniels D.V., Ford A.P.D.W., Eglen R.M., Hegde S.S.:** Comparative pharmacology of recombinant human M₃ and M₅ muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Brit. J. Pharmacol.*, 127, 1999, s. 590—596.
- Weng G., Dedrick Jordan J., Chen Y.:** Structural basis for the function of the heterotrimeric G-proteins. *Semin. Neurosci.*, 9, 1998, s. 175—188.
- Wess J.:** Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmac. Sci.*, 14, 1993, s. 308—313.
- Wess J., Blin N., Mutschler E., Bluml K.:** Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G protein coupling. *Life Sci.*, 56, 1995, s. 915—922.
- Yoshino M., Yabu H.:** Muscarinic suppression of Ca²⁺ current in smooth muscle cells of the guinea-pig urinary bladder. *Exp. Physiol.*, 80, 1995, s. 575—587.
- Zholos A.V., Bolton T.B.:** G-protein control of voltage dependence as well as gating of muscarinic metabotropic channels in guinea-pig ileum. *J. Physiol. (Lond.)*, 478, 1994, s. 195—202.
- Zholos A.V., Bolton T.B.:** Effects of divalent cations on muscarinic receptor cationic current in smooth muscle from guinea-pig small intestine. *J. Physiol.*, 486, 1995, s. 67—82.
- Zholos A.V., Bolton T.B.:** A novel GTP-dependent mechanism of ileal muscarinic metabotropic channel desensitization. *Brit. J. Pharmacol.*, 119, 1996, s. 997—1012.
- Zholos A.V., Bolton T.B.:** Effects of protons on muscarinic receptor cationic current in single visceral smooth muscle cells. *Amer. J. Physiol.*, 272, 1997 a, s. G215—223.
- Zholos A.V., Bolton T.B.:** Muscarinic receptor subtypes controlling the cationic current in guinea-pig ileal smooth muscle. *Brit. J. Pharmacol.*, 122, 1997 b, s. 885—893.
- Zhu X., Jiang M., Peyton M., Boulay G., Hurst R., Stefani E., Birnbaumer L.:** *Trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell*, 85, 1996, s. 661—671.

Received December 16, 1999.

Accepted May 12, 2000.