

Muskarinik Asetilkolin Reseptörlerinin Dağılımı ve İlişkili Sinyal İletim Yolları

[Distribution of Muscarinic Acetylcholine Receptors and Related Signal Transduction Pathways]

Hülya Cabadak

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik A.B.D. Tıbbiye cad. No:49
Haydarpaşa/İSTANBUL
hcabadak@yahoo.com

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Hülya Cabadak

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik A.B.D. Tıbbiye cad. No:49
Haydarpaşa/İSTANBUL
hcabadak@yahoo.com

Kayıt tarihi 18 Temmuz 2005; kabul tarihi 07 Temmuz 2006
[Received 18 July 2005; accepted 07 July 2006]

ÖZET

Muskarinik reseptörler G protein kenetli reseptör ailesinin üyesidirler. Moleküler klonlama çalışmaları ile beş intronsuz gen tarafından kodlandığı ve beş farklı glikoproteini kodladığı belirlenmiştir. Muskarinik reseptör genleri türler arasında oldukça benzerlik göstermektedir. Muskarinik reseptörler (M_1 , M_3 , M_5) ve (M_2 , M_4) olmak üzere iki fonksiyonel kategoriye ayrılmaktadır: M_1 , M_3 , ve M_5 reseptörleri öncelikle Gq/11 proteinleri aracılığı ile fosfolipaz C'yi aktive ederken M_2 , M_4 reseptörleri Gi/o proteinleri aracılığıyla adenilat siklazı inhibe etmektedir. Muskarinik reseptörler merkezi ve periferel dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. M_1 reseptörleri önbeyinde özellikle hipokampus ve serebral korteksde, M_2 reseptörleri kalp ve beyin kökünde, M_3 reseptörleri düz kas, ekzokrin salgı bezleri ve serebral korteksde, M_4 reseptörleri neostriatumda ve M_5 reseptörleri substantia nigra'da bulunmaktadır. Merkezi sinir sisteminde fazla bulunan M_1 reseptörleri asetilkolinle indüklenen MAP kinaz aktivasyonuna aracılık etmektedir. MAP kinaz hafıza için gereklidir. Beyin M_2 reseptörleri "antinociseptive" etki için önemli rol oynamaktadır. Ayrıca M_2 reseptörleri muskarinik asetilkolin reseptörü bağımlı bradikardi ve mide, trake ve idrar kesesi düz kaslarının agonistle uyarılması için gereklidir. M_3 reseptörleri tükrük salgılanması, pupil daralması ve idrar kesesi detrusör kasının kasılmasında fonksiyoneldir. Beyin M_4 reseptörleri merkezi dopaminerjik cevapların ve periferel düz kas tonusunun düzenlenmesine katılmaktadır. M_5 reseptörlerinin dopamin salınımının düzenlenmesine katıldığı bilinmektedir, fakat bu düzenleme mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Muskarinik reseptörlerin kalp fonksiyon bozukluğu, Alzheimer, astım gibi hastalıklarda rolü olduğu belirtilmektedir. Muskarinik reseptörlerin çeşitli hücre ve dokularda belirlenmesi seçici ilaçların geliştirilmesinde önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Muskarinik asetilkolin reseptörler; G protein, sinyal iletimi,

ABSTRACT

Muscarinic receptors are members of G protein coupled receptor family. Molecular cloning studies indicate five intronless genes that encode five muscarinic receptor glycoproteins. Muscarinic receptor genes are fairly similar between species. Muscarinic receptors mediate many cellular responses by activating second messenger systems through the action of G proteins. Muscarinic receptors are divided into two functional categories; M_1 , M_3 , and M_5 receptors preferentially couple to the Gq/11 protein which activates phospholipase C, whereas M_2 and M_4 receptors preferentially couple to Gi/o protein, which inhibits adenylate cyclase activity. Muscarinic receptors are distributed widely in central and peripheral tissues. M_1 receptors are found in the forebrain, especially in the hippocampus and cerebral cortex. M_2 receptors are found heart and brainstem, M_3 receptors are found in the smooth muscle, exocrine glands and cerebral cortex. M_4 receptors are seen in the neo-striatum and M_5 receptor mRNA is found in the substantia nigra. M_2 receptors in the CNS are the main muscarinic acetylcholine receptors that mediate acetylcholine induced MAP kinase activation which is necessary for memory. The brain M_2 receptors play important role for antinociception. In addition, M_2 receptors are essential for muscarinic acetylcholine receptor-dependent bradycardia and agonist induced contraction of stomach, urinary bladder and trachea. M_3 receptors are involved in salivary secretion, pupillary constriction and bladder detrusor contraction. Brain M_4 receptors are participate in the modulation of central dopaminergic responses and regulate peripheral smooth muscle tone. M_5 receptors may regulate dopamine release. But this regulation is not fully understood. Muscarinic receptors are involved in different pathological conditions such as heart failure, Alzheimer disease and asthma. Identification of muscarinic receptor subtypes expressed in various cells and tissues is important in the de-velopment of selective drugs.

Key Words: Muscarinic acetylcholine receptor (mAChR); G protein, signal transduction

GİRİŞ

Asetilkolin reseptörleri 1914 yılında Sir Henry Dale (1) tarafından muskarinik ve nikotinik reseptörler olarak sınıflandırılmıştır. Dale'in çalışmalarından yıllar sonra muskarinik reseptörlerin farklı aktivitelere aracılık ettiği bulunmuştur (1-3). Muskarinik reseptörler hem merkezi hem de periferik sinir sisteminin nöronlarında ve otonom sinir sisteminin kontrolünde olan kalpte, solunum yollarında, gastrointestinal sistemde, üriner yollarında, göz ve ekzokrin bezlerde bulunur ve birçok önemli temel fizyolojik işlevi içeren düzenlemeye aracılık eder (2-5). Örneğin, muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR) aracılığı ile asetilkolin; kalp atışında, kan basıncının düzenlenmesinde, damarların gevşemesinde, hava yolundaki düz kasların kasılmasında, vücut ısısının ayarlanmasında, gastrointestinal bölgede bulunan organların motilitesinde, ekzokrin ve endokrin bezlerden salgı salınmasında, ayrıca motor ve duyu kontrolünde, hafıza, öğrenme gibi daha karmaşık olayların düzenlenmesinde rol alır (2,4,6).

MUSKARİNİK RESEPTÖRLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ VE ADLANDIRILMASI

1950-1980 yılları arasında yapılan çalışmalar sonucunda, muskarinik reseptörlerin farklı genler tarafından kodlandığı ve farklı farmakolojik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (2,3). Yapısal olarak farklı alttıplerin karakteristik doku dağılımları, farmakolojik bağlanma profilleri ve fizyolojik fonksiyonları belirlenmiştir. Birçok dokuda/hücrede birden fazla tipte mAChR birlikte bulunur (7).

İnsanlarda ve diğer memelilerde moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak muskarinik reseptör alttıplerini şifreleyen 5 farklı intronsuz genin varlığı rapor edilmiştir (3-5,8-11). Bu genler türler arasında dizi ve yapı homolojisi göstermektedir (5,9). Bu benzerlik membranı kateden bölgelerde, sitoplazmik ve hücre içi işlevsel bölgele (domain) göre nispeten daha yüksektir (2,10).

Muskarin, muskarinik reseptörlerin seçici olmayan agonisti, atropin ise seçici olmayan antagonistidir. Muskarinik reseptör alttıpleri, önceleri yapılarına ve amino asit dizilerine göre adlandırılmıştır. Daha önceki adlandırma sistemine göre moleküler olarak küçük "m" harfi ile farmakolojik olarak büyük "M" harfi ile gösterilmiştir (5). Yeni adlandırma sistemine göre farmakolojik ve moleküler alttıpler M_1 - M_5 olarak gösterilmektedir (12). M_1 , M_2 , M_3 ve M_4 primer dokularda farmakolojik ve fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir (13-15). M_5 reseptörünün doku dağılımı belirlenmesine karşın fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir.

Muskarinik Reseptörlerin Doku ve Organlardaki Dağılımı

Muskarinik reseptör alttıplerinden M_1 'in, beyin korteksi, striatumda; M_2 'nin, kalpte, beyincikde; M_3 'ün, ekzok-

rin salgı bezlerinde, düz kaslarda; M_4 'ün, striatumda; M_5 'in, substantia nigrada ekspresyonları yüksektir (2). Hipokampus, hipotalamik supraoptik çekirdek, striatum, korteks, ventral tegmental alan gibi merkezi sinir sisteminde, kalp, gastrointestinal sistem düz kasları, solunum sistemi, idrar kesesi, uterus gibi periferik dokularda mAChR alttıplerinin dağılımı, alttıpe özgü etkenler (agonist ve antagonistler) ile farmakolojik etkileşimleri incelenmiştir. Bunun yanı sıra moleküler, immünohistokimyasal ve immünoçökelleme çalışmaları ile mRNA ve protein ekspresyonları araştırılmıştır (3,19-21). Beyinde yapılan çalışmalar M_1 reseptörünün serebral korteks, hipokampus ve korpus striatumu içeren ön beyin bölgesinde eksprese edildiğini göstermiştir (17-19,22). Sıçan striatumunda M_4 lokalizasyonu immünoçökelleme çalışmaları ile gösterilmiştir (23). Sıçan beyin sapı mAChR'lerinin %84'ü M_2 'dir (18). Substantia nigra ve ventral tegmental alan gibi orta beyin bölgelerinde çok düşük düzeyde M_5 mRNA ve proteinleri belirlenmiştir (22,23). Kobay safra kesesinde M_2 ve M_3 mRNA'ları Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile gösterilmiştir (24). Tavşanda yapılan immünoçökelleme çalışmaları ile M_2 reseptörünün sempatik gangliyon, ileum, uterus ve atriyumda majör alttıpe olduğu, M_3 'ün submaksiller bezde çok miktarda, M_2 ve M_4 alttıplerinin akciğerlerde bulunduğu gösterilmiştir (15,16). Kobay safra kesesinde "western blot" analizi ile M_2 ve M_4 alttıpleri saptanmıştır (21). M_5 reseptörünün lenfositlerde, deri fibroblastlarında, iris sfinkter düz kaslarında, özefagusta ve parotid bezinde diğer muskarinik reseptörler ile birlikte yerleşik olduğu gösterilmiştir (25).

Muskarinik Reseptör Farmakolojisi

mAChR alttıpe seçici antagonistlerin geliştirilmesi, farklı mAChR alttıplerinin ayırımı sağlamıştır. Bunlardan M_1 için, pirenzepin ve "green mamba toxin" (MTK) (14), M_2 için metoktramin, AF-DX 116, AF-DX 385 ve tripitramin, M_3 için 4-DAMP (4-difenil asetoksi N metil piperidin metiyodit), p-f-HHSiD (hekza hidro-sila-difenidol hidroklorür pflora analogu), M_4 için tropicamide, himbazin, PD 102807 ve muskarinik toksinler MT_1 ve MT_3 seçicidir (26). Muskarinik reseptör antagonistlerinin reseptör afinite profilleri farklı alttıpler arasında çakışabilmektedir. Bunun sebebi, antagonistlerin muskarinik reseptör alttıplerini seçici olarak ayıramamasıdır. Bu bileşiklerin seçiciliği söz konusu doku veya hücredeki reseptör ekspresyonlarının düzeyine ve antagonistlerin ilgi sabitlerine bağlıdır (Tablo 1).

MUSKARİNİK RESEPTÖRLERİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ

Muskarinik reseptörler G proteinleriyle kenetli reseptörler ailesinin üyesidirler ve 50-70 kDa molekül ağırlığında glikoproteinlerdir (27-29). Muskarinik reseptörlerin hücre yüzeyinde ligand bağlama bölgesi, hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde G protein bağlama

Tablo 1: Muskarinik antagonistlerin bağlanma profilleri (antagonistik afiniteler (pKi).

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Atropin	9.0-9.7	8.7-9.3	8.9-9.2	8.9-9.1	8.9-9.7
Pirenzepin	8.0-8.5	6.3-6.7	6.8-7.1	7.1-8.1	6.9-7.2
Metoktramin	6.7-7.8	7.7-8.3	6.1-6.9	7.0-7.4	6.3-7.2
AFDX-116	6.9	7.2	6.6	7.0	6.6
4-DAMP	8.6-9.2	7.8-8.4	8.9-9.3	8.5-9.4	8.9-9.0
Himbacine	6.7-7.0	8.0-8.3	6.9-7.4	7.8-8.8	6.1-6.3

Kaynaklar 4,9,12 ve 35'den derlenmiştir

bölgesi vardır (30,31). Muskarinik reseptörlerin amino ucu hücre dışında, karboksil ucu hücre içindedir (2,32). Muskarinik reseptörler membranı katederken üçü hücre içinde (i1-i3), üçü hücre dışında (e1-e3) 6 ilmek oluşur (10,33,34). Muskarinik reseptör M₁, M₃, M₅ alttipleri arasında i3 bölgesi, M₂ ve M₄ reseptörlerine göre birbirlerine daha fazla benzerlik gösterir (35,36). Bu bölge reseptörün etkileyici sistemleri ile etkileşiminde önemli olup, bu etkileşimleri düzenleyen fosforillenme bölgelerini içermektedir (36). Ayrıca üçüncü sitoplazmik ilmek G proteini ile etkileşir (30). Muskarinik reseptörlerin amino ucunda bulunan asparajin dizilerinde glikolizlenme kovalent modifikasyonu bulunur (37).

MUSKARİNİK RESEPTÖRLER ARACILIĞIYLA GERÇEKLEŞEN SİNYAL İLETİ YOLLARI

Muskarinik reseptörlerin aktivasyonu ikinci haberci bağımlı ve bağımsız yolları uyarabilir. İkinci haberci bağımlı yollarda muskarinik reseptörlerin aktivasyonu ile adenilat siklaz, fosfolipaz C (PLC), fosfolipaz A₂ (PLA₂), fosfolipaz D (PLD) ve hücre içi Ca⁺² salınmasını da içeren farklı sinyal ileti yollarının uyarıldığı gösterilmiştir (10,36). Muskarinik reseptör aracılı sinyal iletilinde, farklı sistemlerde farklı G proteinleri etkili olabilir (10). Tek bir mAChR bir yada birden fazla G proteini ile etkileşebileceği gibi, mAChR'lerin farklı alttipleri aynı G proteini ile kenetlenmektedir (38). Ayrıca reseptör tek sinyal iletilici ile kenetlenerek hücre tipine göre farklı yanıtlar da oluşturabilir (10,36).

Muskarinik reseptörlerin aktivasyonu, farklı yollar aracılığıyla iyon kanal aktivitesini düzenleyebilir. İkinci haberci bağımlı yolak için, kalpte G_i kenetli mAChR nitrik oksit sentetazın aktivasyonu örnek verilebilir. Nitrik oksidin guanilat siklazı aktive etmesi ile oluşan cGMP, fosfodiesteraz (PDE) 'ın aktivasyonuna neden olur. PDE hücre içi cAMP düzeyini azaltır (10). Kobay safra kesesi düz kas hücrelerinde de muskarinik reseptörler aracılığı ile nitrik oksit oluşumu belirlenmiştir (39). Kalpte, M₂ reseptörlerinin ikinci haberciden bağımsız olarak aktivasyonu G proteinlerinin βγ altbirimleri aracılığı ile içeriye doğrultucu potasyum kanallarını (GIRK) akti-

ve edebilir (2,3). Muskarinik reseptör aktivasyonu, G_i ailesi proteinlerinin βγ altbirimleri aracılığı ile içeriye doğrultucu N ve P/Q tip potasyum kanallarının inhibe olmasına yol açar (40). Aynı mekanizma ile sempatik gangliyondaki nöronlarda ise M₁ ve M₄ reseptörleri kalisyum kanal aktivitesinin inhibisyonuna sebep olabilir (2). Muskarinik reseptörler diğer G protein kenetli reseptörler gibi protoonkogen *p21 ras*, mitojenle aktive olan kinaz (MAPK) ve stresle aktive olan kinaz (SAPK) yollarını uyararak hücre büyüme, çoğalma ve farklılaşmasını düzenler (2,10,41). M₁ ve M₂ reseptörleri Gβγ aracılı fosforillenme ve guanin nükleotid değişim faktörü ile *ras* aktivasyonuna neden olmaktadır (10,40). Ayrıca M₂ reseptörü, Gβγ aracılı fosfotidil inositol-3-kinaz aktivasyonu mitojenle aktive olan kinazı (MAPK) aktive edebilir. Bunu takiben *src* ailesi kinaz, *ras* ve *raf* aktive olur (40) (Tablo 2).

Muskarinik Reseptör G Protein Etkileşimi

Agonistin reseptöre bağlanması reseptörün konformasyonunu değiştirerek G proteini ile etkileşimini sağlar. Reseptörün i3 ilmeği G proteiniyle etkileşim bölgesidir. i3 bölgesindeki 4 amino asidin, G proteinin α altbiriminin karboksil ucundaki beş amino asitle etkileşiminde önemli olduğu gösterilmiştir. Muskarinik reseptörlerin farklı G proteinleri ile etkileşimi için i3 ilmeğinde farklı bölümler olduğu belirlenmiştir (2,36).

Muskarinik reseptörlere agonistin bağlanması ile reseptör proteinin üç boyutlu yapısı değişir. Reseptörün aktivasyonu ile G proteininde GDP-GTP değiş tokuşu tetiklenir, GTP bağlı α altbirimi βγ altbirimlerinden ayrılır ve farklı etkileyici sistemlerle etkileşebilir (10,14,37).

Muskarinik reseptör alttipleri özgül G proteinleri ile etkileşimlerine göre iki büyük gruba ayrılır (2,3,42,43): 1) M₁, M₃, M₅ reseptörlerinin G protein ailesinden boğmaca toksinine duyarsız Gα_{q/11} ve Gα₁₃ ile etkileşimi PLC ve PLD'nin aktivasyonuna neden olur. M₁, M₃, M₅ reseptörleri PLC, PLA₂ ve PLD ile M₂ ve M₄ reseptörlerine göre daha fazla kenetlenir (10,36,44). Bunlara ek olarak M₁, M₃, M₅ reseptörleri PLC'nin aktivasyonu, inositol 1,4,5-trifosfat (IP₃) ve diaçilgliserol (DAG) salınmasına neden olur (2). DAG protein kinaz C'nin uyarılmasını, IP₃ ise hücre içi depolardan Ca⁺²'un salın-

Tablo 2. mAChR alttıplerinin özellikleri. Muskarinik Asetilkolin Reseptörleri ve Fizyolojik Fonksiyonları

Adlandırma	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Doku dağılımı	Korteks Hipokampus	Kalp düz kas	Dışsalgı bezleri Gastrointestinal yollar düz kas ,beyin	Neostriatum	Substantia nigra * striatum,hipokampus Ponsmedulla serebellum
Antagonistler	Pirenzepin	AF-DX 116	pF-HHSiD		(*az)
Agonistler	Xanomeline CDD-0097				
G protein	G $\alpha_{q/11}$,G α_{13}	G $\alpha_{i/o}$	G $\alpha_{q/11}$ G α_{13}	G $\alpha_{i/o}$	G $\alpha_{q/11}$ G α_{13} G α_s
Hücre içi cevap	Fosfolipaz C β Fosfolipaz D	Adenilat siklaz inhibisyonu Fosfolipaz D*	Fosfolipaz C β Fosfolipaz D ⁺⁺⁺	Adenilat siklaz inhibisyonu Fosfolipaz D*	Fosfolipaz C β Fosfolipaz D ⁺⁺⁺ adenilat siklaz ?
İkincil ulak	InsP ₃ /DAG Ca ⁺² PKC	cAMP/K ⁺ kanalları	InsP ₃ / DAG Ca ⁺² PKC	cAMP	InsP ₃ /DAG,Ca,MAPkinaz PKC
I_{Kir} Aktivasyonu	-	+++ (I _{KACH})	-	+++ (GIRK)1	Bilinmiyor
I_K Aktivasyonu	-	-	+++ (I _{KMB})	+++ (I _{KACH})	Bilinmiyor
I_f İnhibisyonu	Bilinmiyor	++	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor
Mitojenesis İnhibisyonu	+++	-	+++	-	Bilinmiyor
Mitojenesis Uyarımı	++	++	++	Bilinmiyor	Bilinmiyor
Kalp hızının yavaşlaması	-	+++	+	±	Bilinmiyor
Kalp kasılması	↑↑	↓↓	↑	Bilinmiyor	Bilinmiyor
Düz kas kasılması	Bilinmiyor	↑↑	↑↑↑	Bilinmiyor	Bilinmiyor

+++; güçlü etki, +; zayıf etki,-; etkisiz, ±: Facilitating etki, ↑: artışı, ↓: azalma, I_{Kir}: içeriye doğrultucu K kanal akımı, I_K: Gecikmiş doğrultucu K kanal akımı If: Pacemaker akım

Kaynaklar 4,9,12 ve 35'den derlenmiştir

masını tetikler (2,14). Hücre içi Ca⁺² artışı; kalmodülün'e bağımlı adenilat siklazın, kalmodülün'e bağımlı fosfodiesterazların, kalmodülün'e bağımlı protein kinazların ve nitrik oksit sentetazın aktivasyonuna neden olur (2). Model hücre soylarında rekombinant (yeniden birleşme, düzenlenme) M₁, M₃, M₅ reseptörlerinin G_s ve G_i proteinleri ile etkileşimi de gösterilmiştir (38). Sıçan beyninin farklı bölgelerinde öncelikle M₁ ve M₃ reseptörleri aracılığı ile fosfoinositid (PI) hidrolizinin olduğu belirlenmiştir (45).

2) M₂ ve M₄ reseptörleri öncelikle boğmaca toksinine duyarlı G_{i/o} altbirimleri ile kenetlenerek adenilat siklazı inhibe eder ve cAMP sentezi baskılanır (2,3,5,21,46). Belirli hücre tiplerinde M₂ ve M₄ reseptörlerinin G_i ailesine kenetlenmesiyle fosfolipaz C β (PLC β) izoformlarının aktivasyonu belirlenmiş ve G proteinlerinin $\beta\gamma$

altbirimleri aracılı yolla adenilat siklaz izoformlarının aktive olduğu saptanmıştır (2). Bunun yanısıra, $\beta\gamma$ altbirimlerinin doğrudan potasyum ve kalsiyum kanallarını düzenlediği belirlenmiştir (3,47,48).

Muskarinik reseptörlerde doğal ve sentetik ligandlar için bağlanma bölümleri ve reseptörün hücre dışı ilmeklerinde birkaç allosterik bağlanma bölgesi de belirlenmiştir (49–51). Proteinin allosterik özelliği G proteini ile etkileşimi sırasında görülür. Allosterik ligandların bağlanması, klasik bağlanma bölgelerinin bağlanma özelliğini etkilemez. Ancak allosterik ligandlar muskarinik agonist karbakolun yokluğunda doğrudan G proteinlerini uyarırlar. Bu allosterik ligandlarla aktivasyonun muskarinik antagonistlerle önlenemediği belirlenmiştir (3,52,53).

Muskarinik Reseptör Sinyal Yolunun G Proteinlerinden Bağımsız Olarak Düzenlenmesi

Son yapılan çalışmalarla G proteinleriyle kenetli reseptörlerin (GPCR), heterotrimerik G proteinlerinden bağımsız olarak da sinyal ilettikleri belirlenmiştir (54). Ancak sıçan beyin sinaptozomu presinaptik mAChR'leri dinlenme potansiyeli sırasında agonistlere yüksek ilgi gösterirler. mAChR'leri ekzositik aygıttaki sintaksin ve SNAP-25 proteinleri ile spesifik olarak etkileşir ve bu etkileşim düşük membran potansiyelinde zayıflar. Önerilen modele göre, agonist bağlı reseptör ekzositik aygıtı bloke eder. Fakat zarın depolarizasyonu ile reseptörlerin agonistlere ilgisi azalır, asetilkolin ayrılır ve boş reseptörler artık sintaksin ve SNAP-25 proteinleri ile etkileşemez. Bu işleme paralel olarak, voltaja bağımlı kanallarla giren Ca^{+2} , Ca^{+2} 'a bağımlı olayları gerçekleştirir. Bu paralel işlemler nörotransmitter salınımını sağlayabilir. Bu aşamada zar potansiyelindeki değişimin, reseptörün agoniste olan afinitesini nasıl değiştirdiği henüz bilinmemektedir (54).

MUSKARİNİK RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİ İLE MUSKARİNİK ASETİLKOLİN RESEPTÖRLERİNİN ARTIŞI (UP-REGULASYONU)

Atropin gibi muskarinik antagonistlerin 14 günden fazla kronik olarak uygulanmasının beyin, kalp ve solunum yollarında mAChR sayısında doza bağımlı olarak %100 artışa yol açtığı bilinmektedir. Genelde kronik atropin veya skopolamin verilmesiyle yanıtın azalması reseptör sayısındaki artışla beraber gerçekleşir. Nitekim, atropin ve skopolamin verilen sıçan serebral granül hücrelerinde, sıçan kortikostriatal nöron ve HEL 299 hücre kültürlerinde, inkübasyonun 1-8. saatleri içinde M_1 - M_3 mRNA konsantrasyonunun %40-250 arttığı belirlenmiştir. *In vivo* deneylerde ise 1 hafta atropin enjeksiyonu yapılan sıçanların beyin korteks bölgelerinde M_1 mRNA'sının %50 arttığı belirlenmiştir. Tavşan akciğerine kronik atropinin 4 hafta uygulanması M_3 mAChR sayısını %66 artırırken, M_2 reseptör sayısını %27 arttırmış, M_4 sayısı ise değişmemiştir. Muskarinik antagonistlerle kronik tedaviden sonra astım hastalarında görülen kolinerjik cevapsızlığın sebebinin solunum yolu M_3 reseptörü ekspresyonundaki artış (up-regulasyon) olduğu ileri sürülmektedir (54).

MUSKARİNİK ASETİLKOLİN RESEPTÖRLERİNİN ÇEŞİTLİ DOKULARDAKİ FİZYOLOJİK ROLLERİ

M₂ Reseptörünün Düz Kaslarda Rolü:

M_3 reseptörleri, kolinerjik etkenlerle uyarıldıklarında kasılma cevabına aracılık etmektedirler. Bunun yanısı-

ra M_2 ekspresyonu da düz kaslarda yüksektir. Farmakolojik çalışmalar M_2 'nin düz kas kasılmasına katkısının az olduğunu fakat mesane detrusör kas kasılmasına aktif olarak katıldığını göstermektedir (12). M_2 reseptörlerinin düz kas gevşemesinde rolleri olduğu ve M_2 'lerin antagonize edilmesiyle düz kas gevşemesinin de inhibe olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda M_3 reseptörünün M_2 aracılı gevşemeleri ve M_2 reseptörünün M_3 aracılı kasılmaları da güçlendirdiği bildirilmiştir (55).

Muskarinik Reseptörlerin Merkezi Sinir Sistemindeki Roller

Farmakolojik çalışmalar M_1 reseptörünün öğrenme ve hafızada önemli olduğunu düşündürmektedir (2,6). Alzheimer'lı hastalarda görülen algılama eksikliklerinde mAChR'lerinin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Muskarinik reseptörlerin REM uykusunun indüklenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir. Beyin sapında pontin retiküler bölgedeki oluşumda M_2 ve/veya M_4 reseptörlerinin aktivasyonu, boğmaca toksinine duyarlı G proteinleri aracılığıyla REM uykusunu uyarır. REM uykusunda, beyin kökündeki kolinerjik sinirlerden asetilkolinin salınması artar ve muskarinik antagonistlerin verilmesi REM uykusunu azaltır (2,56). Muskarinik reseptörler bazal gangliyonların fonksiyonlarının düzenlenmesinde de önemli rol oynar. Omuriliğin orta bölümünde bulunan sinirlerdeki M_1 ve M_4 reseptörleri striatumda dopaminerjik aktarımı düzenler. Örneğin, muskarinik antagonistlerin uygulanması haloperidol gibi dopamin D_2 reseptör antagonistinin verilmesi ile katelepsi oluşumunu önler (2,57). Muskarinik reseptörlerin merkezi sinir sistemi aracılı hipotansiyon, bradikardi, epilepsi gelişiminde ve alkolik davranışı da içeren diğer süreçlerde etkisi gösterilmiştir (2).

Kalpdeki Muskarinik Reseptörler

Klasik görüşe göre, kalpte en çok bulunan mAChR'ü M_2 'dir (14,60). mAChR'lerinin kalp fonksiyonunda parasempatik etkilerde önemli rolü vardır. Kalpte mAChR uyarımının; yavaşlama veya hızlandırmada (negatif veya pozitif kronotropik etkiler); kasılma kuvvetinin zayıflaması veya artmasında; kısa atrial aksiyon potansiyel süresinde (APD = Action potential duration); atrioventriküler nodal ileti hızının yavaşlamasında ve kardiomyosit apoptotik hücre ölümü azalmasında etkili olduğu belirlenmiştir (14). Ancak diğer alttıplerin (M_1 , M_3) olası rolleri hakkında bazı kanıtlar vardır. Normal fizyolojik şartlarda ve bazı patolojik durumlarda kalbin parasempatik kontrolünde, M_3 reseptörünün önemli rol oynayabileceği önerilmektedir (14,61). Sıçan kalbinde Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) tekniği ile M_1 - M_3 alttıplerinin mRNA'ları belirlenmiştir. mAChR'leri sinoatriyal düğüm (SA), atriyoventriküler düğüm (AV) ve ventrikülü de içeren kalp dokularında bulunmuştur. Farklı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda, sol ve sağ ventriküllerinde M_2 ve M_3 mRNA ekspresyon düzeylerinin farklı olduğu, sıçan ventrikül

miyositlerinde fonksiyonel M_1 reseptörünün bulunduğu, sıçan atriyumlarında ve ventriküllerde M_3 mRNA'sının M_2 mRNA'sına göre çok az eksprese olduğu belirlenmiştir (14,58,59,62,63). M_3 reseptörü, insan kalbinde, kobay kalbinde, tavşanda ve köpek atriumunda, fare atrium miyositlerinde gösterilmiştir (21,60,62).

MUSKARİNİK RESEPTÖR ALTIPLERİ

M_1 Muskarinik Reseptörü

İnsanda 460 amino asit uzunluğundaki M_1 reseptörü, merkezi sinir sisteminde asetilkolinle indüklenen MAP kinaz aktivasyonuna aracılık eden tek muskarinik reseptördür. Asetilkolinle MAP kinaz aktivasyonu hafızada önemlidir (2,64). Yetişkin memeli sinir sistemindeki nöronlar arasında sinaptik bağlantıların modifikasyonunda MAP kinaz yolağının rolü vardır (64). Striatumda M_1 eksikliğinin dopaminerjik aktarımını anlamlı düzeyde arttırdığı ve lokomotor etkinliğin arttığı belirtilmektedir (54).

M_2 Muskarinik Reseptörü

İnsan M_2 muskarinik reseptörü 466 amino asite sahip bir protein olup en fazla kalp ve beyincikte eksprese olmaktadır. Bundan başka merkezi sinir sisteminde ve otonomik sinirlerin sinir uçlarında bulunur. İnsan periferik lenfositlerinde ve çeşitli lösemi hücre soylarında varlığı gösterilmiştir (65,66). G proteini ailesinden $G_{i/o}$ ailesi aracılığı ile K^+ kanallarının uyarılmasına aracılık eder ve uyarılabilir hücrelerin plazma zarında hiperpolarizasyona neden olur (3,14). M_2 reseptörü, akciğerlerde kolinerjik nöronlardan asetilkolinin salınmasını inhibe eder. Solunum yollarında parasempatik nöronlarda M_2 ekspresyonu viral enfeksiyonla ve interferon γ verilmesiyle azalırken asetilkolinin salınması artar. Deksmetazon ise M_2 reseptör ekspresyonunu artırır, asetilkolinin salınmasını azaltır (67). Akciğerlerdeki parasempatik sinirlerde M_2 'nin bloke edilmesi ile vagus aracılı bronş kasılmasının 8 kat arttığı belirlenmiştir. Allerjenler, viral enfeksiyon ve ozon M_2 reseptör işlevini azaltır ve böylece vagus aracılı bronş kasılması artar (68).

M_3 Muskarinik Reseptörü

İnsan M_3 muskarinik reseptör altıtipi 590 amino asit içerir. M_3 reseptör altıtipinin ekzokrin salgı bezlerinde ve düz kaslarda ekspresyonu yüksektir. Ayrıca fare eritrolösemi hücreleri (MELC), sıçan mononükleer hücrelerinde, insan kan hücrelerinde, Peer hücrelerinde, oligodendrositlerde, insan nörogloma, astrositoma, glioblastoma hücrelerinde ekspresyonu gösterilmiştir. Beyinde, göz sfinkter kaslarında, akciğerlerde, safra kesesi düz kasında, mide ve bağırsaklarda işlevseldir (2,21). $G_{q/11}$ ailesi aracılığı ile PLC, IP_3 /DAG oluşumuna neden olur. IP_3 Ca^{+2} 'un salınmasına yol açarken DAG protein kinaz yolağını aktive eder (69). Bu reseptör altıtipi tükürük salgılanması ve yiyecek alımının düzenlenmesinde

önemlidir. M_3 eksikliğinde yiyecek alımı azalır ve buna bağlı olarak vücut ağırlığı azalır, periferik yağ birikimi meydana gelir (25).

M_4 Muskarinik Reseptörü

İnsanda 479 amino asit uzunluğunda olup, striatumda ekspresyonu yüksektir (11). Beyin M_4 reseptörleri M_1 reseptörleri gibi merkezi dopaminerjik yanıtların düzenlenmesinde önemlidir. M_4 eksik farelerde bazal lokomotor aktivitesinde ve D_1 dopamin reseptör aktivasyonundan sonra lokomotor cevaplarda artış gösterilmiştir. M_4 'ün periferik düz kas kasılmasının düzenlenmesinde de rol oynayabileceği belirtilmiştir (70).

M_5 Muskarinik Reseptörü

İnsanda ve farede 532 amino asitten ibaret bir glikoproteindir. İnsanda 15q26 kromozom bölgesinde bulunur. Fare M_5 gen dizisi insan geni ile %89 benzerlik göstermektedir (8,71). İnsan A2058 melanoma hücrelerinin endojen olarak M_5 reseptörünü eksprese ettiği gösterilmiştir (72). İmmün-reaksiyon çalışmaları ile M_5 reseptörü striatum, hipokampus ve serebellumda düşük düzeyde bulunmuştur (23). Substantia nigra ve ventral tegmental alan gibi orta beyin bölgelerinde çok fazla düzeyde M_5 mRNA'sı ve proteinleri belirlenmiştir (22,23). Bu bölgelerde M_5 reseptörünün fazla olması nedeniyle dopaminerjik iletinin düzenlenmesinde rolü olabileceği önerilmiş fakat kanıtlanmamıştır (2,38,73) M_5 muskarinik reseptörleri serebral kan arter ve arteriollerinin kolinerjik dilatasyonu için gereklidir (54). RT-PCR ile sıçan baziler, pulmoner, mezenterik ve kuyruk arterlerinde M_5 mRNA'sının varlığının belirlenmesine karşın, henüz fonksiyonel önemi bilinmemektedir (74). Radyoligand bağlama deneylerinden elde edilen verilere göre M_5 reseptörü AF-DX 116, AQ-RA 741'e düşük, metoktramin ve pirenzepine orta derecede ilgilidir. AQRA 741, himbazin ve darifenasin gibi ligandlar M_5 'e göre öncelikle M_3 'e ilgi gösterir (75). M_5 reseptörü için seçici antagonist yoktur.

MUSKARİNİK LİGANDLARLA MUSKARİNİK RESEPTÖR ÜÇ BOYUTLU YAPISININ DÜZENLENMESİ

mAChR'ler kendiliğinden birden fazla farklı reseptör üç boyutlu yapısına (konformasyon) uyum gösterebilirler; klasik agonistler ve antagonistler ile reseptörün etkileşimi sonucunda farklı üç boyutlu yapıya geçebilirler yada yapılarını değiştirmeden kalabilirler. Antagonistler, reseptör G protein etkileşimini önleyen üç boyutlu yapı oluşumunu, agonistler ise heterotrimerik G proteini ile etkileşimi sağlayan yapıyı tetikler. Çoklu reseptör üç boyutlu yapı modelinde, farklı muskarinik ligandlar farklı farmakolojik özellikli reseptör yapılarını uyarabilir. Örneğin M_3 muskarinik reseptöründe aynı bölgeye bağlanan metakolin ve pilokarpinin farklı reseptör üç boyutlu yapısını indükleyerek farklı G proteinlerini aktive edebileceği düşünülmektedir (54).

MUSKARİNİK ASETİLKOLİN RESEPTÖRLERİNİN FOSFORİLENME VE DUYARSIZLAŞTIRILARAK DÜZENLENMESİ

Reseptörlerde duyarsızlaştırma farklı yollarla olabilir. G proteinine kenetli diğer reseptörler gibi muskarinik reseptörlerin işlevi ve ekspresyonu değişken ve çeşitli faktörler tarafından düzenlenmektedir. Farklı araştırmacılar mAChR duyarsızlaştırılmasında reseptör fosforillenmesinin önemli rolü olduğunu belirtmektedir (76). M_1 ve M_3 reseptörlerinin agonistten ve $G\beta\gamma$ 'dan bağımsız olarak da PKC ile fosforillendiği gösterilmiştir (77,78). PKC, M_1 reseptörünün karboksil (C) ucundaki Ser-451 ve Thr-455'den ve 3. sitoplazmik ilmeğin C ucundan fosforiller (77,79). Memeli M_2 mAChR'ü PKC'nin substratı değildir. Forbol esterlerin, çeşitli hücre soylarında mAChR aracılı olarak PI hidrolizini, Ca^{+2} artışını ve cAMP birikimini bloke ettiği gösterilmiştir (80,81). Bundan dolayı protein kinaz aracılı reseptör duyarsızlaştırması düşünülmektedir. Agonistten bağımsız olarak GRK2'nin $G\beta\gamma$ aracılığı ile M_1 ve M_3 reseptörlerini fosforilleyebildiği gösterilmiştir (54,77,82). M_1 reseptöründe GRK₂ ile fosforillenen ana bölümler 3. sitoplazmik ilmeğindedir. K. Kameyama ve grubu (54) saflaştırılmış Gai/Gao ile M_2 reseptörünün etkileşiminin GRK2 aracılı fosforillenmeyi etkilemediğini göstermiştir. M_2 'nin GRK2 ve GRK3 aracılı fosforilasyonunun Gao proteini ile kenetlenmesini bozduğu bildirilmektedir (83). Son zamanlarda, mitojenle aktive olan protein kinazlar ERK1/2'nin GRK2'nin karboksil ucu bölgesinde 670 numaralı serini fosforilleyerek, kinazın GPCR'lere (G protein kenetli reseptör) ilgisini azalttığı gösterilmiştir (84). Öte yandan, GRK2'nin etkinliği PKC ve c-src ile fosforillenerek uyarılabilir. ERK1/2, PKC ve cSrc, mAChR ile uyarıldıklarına göre, mAChR duyarsızlaştırmasının GRK2'nin geri beslemeli uyarısı yada inhibisyonu ile düzenlendiği düşünülebilir (54). Agonist varlığında da M_2 ve M_3 reseptörlerinin akut duyarsızlaştırılmasından söz edilmektedir (54).

MUSKARİNİK RESEPTÖRLERİN YER ALDIĞI PATOLOJİK OLAYLAR

Muskarinik asetilkolin reseptörleri çeşitli hastalıkların tedavisinde hedef reseptörlerdir. Muskarinik reseptör sayısının değişimi ve işlevinin bozulmasının Alzheimer, Down sendromu ve Parkinson gibi nörolojik hastalıkların oluşumunun nedenlerinden biri olduğu bilinmektedir (2,5,38). Örneğin Alzheimer hastalığında, bilişin kavranmasındaki eksiklikler beyinde asetilkolin düzeyinin yükselmesiyle azaltılabilir. Alzheimer'lı hastaların beyinde ölüm sonrası yapılan çalışmalar ile muskarinik reseptör ekspresyonlarında değişim belirlenmiştir. M_1 ve M_2 reseptörlerinin immün reaktivitesi azalırken,

M_4 reseptörlerinin sayısının arttığı belirlenmiştir (38). Ayrıca muskarinik reseptör ekspresyonu beyin gelişimi ve yaşlanma sürecinde değişmektedir. Sitokinlerin, sinir büyüme faktörü (NGF), siliari nörotrofik faktör (CNTF) ve lösemi inhibitör faktör (LIF) 'ün merkezi sinir sistemindeki muskarinik reseptör ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (85). Muskarinik reseptörler, solunum yollarının, akciğer fonksiyonlarının normal fizyolojisinde ve patofizyolojisinde önemlidir (10). Solunum yollarında beta adrenoreseptör aracılı gevşeme adenilat siklaz enzimi aracılığıyla gerçekleşir. Astımda, kolinerjik etkinlik, aynı adenilat siklaz enziminin M_2 reseptör aracılı inhibisyonu ile solunum yollarının daralmasına yol açar. İnsan ve hayvan idrar keselerinde yapılan araştırmalar muskarinik reseptörler hakkındaki bilgilerin artmasına ve çok çalışan idrar kesesinin tedavisine katkıda bulunmuştur (12). Parkinson hastalığı, astım, hava yollarında kronik inflamasyon ve peptik ülser tedavisinde antimuskarinik etkenler kullanılmaktadır. Muskarinik ve antimuskarinik ilaçların tedavi potansiyeli çok yüksek olmasına rağmen, yan etkilerinden dolayı klinik kullanımı kısıtlıdır (10,12,25,86).

Doğal Olarak Oluşan Muskarinik Antikorlar

Chagas hastalığının nedeni *Trypanosoma cruzi* parazidir. Chaga hastalığı yavaş yavaş kardiomyopati gelişimine neden olur. Chaga hastalığının kronik evresindeki hastaların serumlarında M_2 reseptörünün hücre dışı 2. ilmeğine özgün antikorlar belirlenmiştir. M_2 reseptörünün hücre dışı 2. ilmeğinde negatif yüklü amino asitler, parazitin immünobaskın ribozomal proteinine benzemektedir. M_2 reseptörünün 2. hücre dışı ilmeği ile Chagas tanı hastaların antikorlarının etkileşimi bu reseptörü aktive eder ve kısmen atropine duyarlı yolda cAMP oluşumu ve atrial kasılma azalır. M_2 reseptörlerinin bu antikorlara uzun süreli maruz kalması reseptör duyarsızlaştırılmasıyla ve internalizasyonla sonuçlanır (54). Bu antikorların M_2 reseptörünün allosterik etkilendiricileri olarak rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca M_2 reseptörünün 3. sitoplazmik ilmeğine özgün antikorlar da kronik Chagas hastalığı tanısı almış şahısların serumlarında belirlenmiştir (54).

Muskarinik reseptörler hafıza, öğrenme, kalp hızının düzenlenmesi, motor ve duyu kontrol gibi kompleks davranışlarda rol oynamaktadır. Fakat bu davranışları sinyal ileti düzeyinde başlatanın ne olduğu hakkında bilinenler çok azdır. Bir muskarinik reseptör alttipini endojen olarak eksprese eden hücrelerde veya dokularında yapılan çalışmaların verileri, transfekte hücre soylarında yapılan çalışma verileri ile kombine edilerek gelecekte bu ve diğer sorulara yanıt bulunabilir. Çeşitli doku ve organlarda muskarinik reseptör alttiplerinin dağılımındaki ve fonksiyonlarındaki farklılıklar seçici ilaçların geliştirilmesinde ve bazı hastalıkların fizyopatolojilerine açıklık getirilmesinde önem taşımaktadır.

Kaynaklar

- [1] Dale HH (1914) The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther.* 6,147-190.
- [2] Nathanson NM (2001) Muscarinic acetylcholine receptors. *Encyclopedia of Life Sci.* 1-6, doi: 10.1038/npg.els.0000193.
- [3] Krejci A, Michal P, Jakubik J, Rıcný J, Dolezal V (2004) Regulation of signal transduction at M₂ muscarinic receptors. *Physiol Res.* 53, (supl 1) 131-140.
- [4] Ehlert FJ, Roeske W R and Yamamura HI (1999) Molecular biology, pharmacology and brain distribution of subtypes of the muscarinic receptor. *Neuropsychopharmacol.* 25, 75-80.
- [5] Caulfield MP, Birdsall NJM (1998) International Union of Pharmacology XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 50, 279-290.
- [6] Messer WS, Bohnett Jr and Stibbe J (1990) Evidence for preferential involvement of M₁ muscarinic receptors in representational memory. *Neurosci Lett.* 116,184-189.
- [7] Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR (1987) Identification of family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237, 527-532.
- [8] Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ (1988) Cloning and expression of the human and rat M₅ muscarinic receptor genes. *Neuron* 1 (5), 403-410.
- [9] Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J, Capon DJ (1987) Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* 9, 3923-3929.
- [10] Hulme EC, Birdsall NJM, Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 30, 633-673.
- [11] Eglén RM, Hedge SS, Watson N (1996) Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev.* 48, 531-565.
- [12] Scarpero HM, Dmochowski MD (2003) Muscarinic receptors: What we know. *Current Urology Reports* 4, 421-428.
- [13] Van Zivieten PA, Doods HN (1995) Muscarinic receptors and drugs in cardiovascular medicine. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 9, 159-167.
- [14] Wang Z, Shi H, Wang H (2004) Functional M₃ muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts. *Br J Pharmacol.* 142, 395-408.
- [15] Nathanson MN (2000) A multiplicity of muscarinic mechanisms: Enough signalling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci.* 97, 6245-6247.
- [16] Dörje F, Levey AI, Brann MR (1991) Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m₁-m₅) in rabbit peripheral tissues. *Mol. Pharmacol.* 40 (4),459-462.
- [17] Wall SJ, Yaduda RP, Hory F, Flagg S, Martin BM, Ginns EI, Wolfe BB (1991) Production of antisera selective for m₁ muscarinic receptors using fusion proteins: distribution of m₁ receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 39 (5),643-649.
- [18] Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR (1991) Identification of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype specific antibodies. *J. Neurosci.* 11, 3218-3226.
- [19] Wei J, Walton EA, Milici A, Buccafusca JJ (1994) m₁-m₅ Muscarinic receptor distribution in rat CNS by RT-PCR and HPLC. *J Neurochem.* 63 (3),815-821.
- [20] Wess J. (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit.Rev. Neurobiol.* 10, 69-99.
- [21] Oktay Ş, Cabadak H, İskender E, Gören Z, Çalışkan E, Orun O, Aslan N, Karaalp A, Tolun A, Ulusoy NB, Levey AI, El-Fakahany E, Kan B (1998) Evidence for the presence of M₂ and M₄ muscarinic receptors in guinea-pig gallbladder smooth muscle. *J Auton Pharmacol.* 18, 195-204.
- [22] Vilario MT, Palacios JM, Mengod G (1990) Localization of m₂ muscarinic receptor mRNA in brain examined by insitu hybridization histochemistry. *Neurosci Letters* 114 (2),154 -159.
- [23] Yasuda RP, Cielsa W, Flores LR, Wall SJ Li M, Satkus SA, Weisstein JS, Spangola BV, Wolfe BB (1993) Development of antisera selective for m₄ and m₅ muscarinic cholinergic receptors: distribution of m₄ and m₅ receptors in rat brain. *Mol Pharmacol.* 43 (2),149-157.
- [24] Cabadak H, Cuadra AE, El-Fakahany EE, Oktay Ş, Ulusoy NB, Kan B (Luxembourg 2000) The presence of M₂ and M₃ Muscarinic receptors in Guinea-pig Gallbladder. Signal Transduction Pathways and Regulation of Gene Expression as Therapeutic Targets Congress abstract books page116.
- [25] Matsui M, Yamada S, Oki T, Manabe T, Taketo MM, Ehlert F (2004) Functional analysis of muscarinic acetylcholine receptors using knockout mice. *Life Sci.* 75, 2971-2981.
- [26] Jerusalinsky YD, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Ferreira A, Rıal VE, Duran R, Cervenansky C. (2000) Muscarinic toxin: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon* 38, 747-761.
- [27] Bany U, Ryzewski J, Maslinski W (1999) Relative amounts of mRNA encoding four subtypes of muscarinic receptors (m₂-m₅) in human peripheral blood mononuclear cells. *J Neuro Immunol* 97, 191-195.
- [28] Birdshall NJ, Farries T, Gharagozloo P, Kobayashi S, Kuonen D, Lazareno S, Popham A, Sugimoto M (1997) Selective allosteric enhancement of the binding and actions of acetylcholine at muscarinic subtypes. *Life Sci.* 60,1047-1052.
- [29] Hosky MM (1992) Diversity of structure is signalling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J.* 0892-6638, 845-851.
- [30] Bonner TI (1989) The Molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends in Neurosci.* 12, 148-151.
- [31] Bonner TI (1989) New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacol. Sci. Suppl* 1,11-15.
- [32] Wheatley M, Birshall NJM, Eveleigh P, Pedder EK (1986) The structure and properties of the purified muscarinic acetylcholine receptor from rat forebrain. *Trans Biochem Soc.* 15,113-116.
- [33] Hirota SA (2001). A quick guide to muscarinic acetylcholine receptors. *Biopharma Online Journal* 5, 6-8.
- [34] Kostenis E, Zeng FY, Wess J (1998) Structure–function analysis of muscarinic acetylcholine receptors. *J Physiol.* 92, 265-268.
- [35] Chen Q, Yu P, De Petris G, Biancani P, Behar J (1995) Distinct muscarinic receptors and signal transduction pathways in gallbladder muscle. *J Pharm Exp Ther.* 273, 650-655.
- [36] Felder CC (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: Signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* 9, 619-625.
- [37] Liu J, Blin N, Conklin BR and Wess J (1996) Molecular mechanisms involved in muscarinic acetylcholine receptor-mediated G protein activation studied by insertion mutagenesis. *J Biol Chem.* 271, 6172-6178.
- [38] Eglén RM, Nahorski SR (2000) The muscarinic M₅ receptor: a silent or emerging subtype? *Br J Pharmacol.* 130,13-21.
- [39] İskender E, Cabadak H, Akıcı A, Gören MZ, Karaalp A, Ulusoy NB, Kan B, El-Fakahany EE, Oktay Ş. (2002). Carbachol induces nitric oxide generation in guinea-pig gallbladder. *Marmara Medical Journal* 15 (1), 7-14.

- [40] Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R (1997). Linkage of G protein coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase ganuna. *Science* 275, 394-397.
- [41] Felsch JS, Cachero TG, Peralta EG (1998) Activation of protein tyrosine kinase PYK2 by the m₁ muscarinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 95, 5051-5056.
- [42] Jones SV, Heilman CJ, Brann MR (1991) Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol.* 54, 242-247.
- [43] Jones SV (1993) Muscarinic receptor subtypes: modulation of ion channels. *Life Sci.* 52, 457-464.
- [44] Caufield MP (1993) Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol Rev.* 50, 279-290.
- [45] Cabadak H, Kan B (1999) Muscarinic receptor-mediated phosphoinositide hydrolysis in rat brain. *Marmara Medical Journal* 12 (1), 25-28.
- [46] Nathanson NM. (2000) A multiplicity of muscarinic mechanisms: Enough signalling pathways to take your breath away. *Proc Natal Acad Sci.* 97, 6245-6247.
- [47] Hille B (1992) G protein-coupled mechanisms and nervous signalling. *Neuron* 9, 187-195.
- [48] Herlitz S, Garcia De, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380, 258-162.
- [49] Lazereno S, Popham A, Birdshall NJ (2000) Allosteric interaction of staurosporine and other indolecarbazoles with N-methyl ³H scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site. *Mol Pharmacol.* 58,194-207.
- [50] Lazereno S, Birdshal NJM (1995) Detection, quantitation and verification of allosteric interactions of agent with labeled and unlabeled ligands at G protein coupled receptors. *Mol Pharmacol.* 48, 362-378.
- [51] Birdshall NJ, Lazareno S, Popham A, Saldanha J (2001) Multiple allosteric sites on muscarinic receptors. *Life Sci.* 68, 2517-2524.
- [52] Jakubik J, Haga T, Tucek S (1998) Effects of an agonist, allosteric modulator, and antagonist on guanosine-gamma ³⁵S thiotriphosphate binding to liposomes with varying muscarinic receptor/Go protein stoichiometry. *Mol Pharmacol.* 54, 899-906.
- [53] Jakubik J, Bacakova L, Lisa V, El-Fakahany EE, Tucek S (1996). Activation of muscarinic acetylcholine receptors via their allosteric binding site. *Proc Natl Acad Sci.* 93, 8705-8709.
- [54] VanKoppen CJ, Kaiser B (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signalling. *Pharmacol Ther.* 98,197-220.
- [55] Ehlert FJ, Sawyer GW, Esqueda EE (1999). Contractile role of M₂ and M₃ muscarinic receptors in gastrointestinal muscle. *Life Sci.* 64 (6-7),387-394.
- [56] Coleman CG, Lydic R, Baghdoyan HA (2004) Acetylcholine release in the pontine reticular formation of C57BL/6J mouse is modulated by non-M₁ muscarinic receptors. *Neurosci.* 126, 831-838.
- [57] Coleman CG, Lydic R, Baghdoyan HA. (2004). M₂ muscarinic receptors in pontine reticular formation of C57BL/6J mouse contribute to rapid eye movement sleep generation. *Neurosci.* 126,821-830.
- [58] Sharma UK, Colecraft HM, Wang DX, Levey AI, Grigorenko EV, Yeh H.H Sheu SS (1996). Molecular and functional identification of m₁ muscarinic acetylcholine receptors in rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 79, 86-93.
- [59] Sharma UK, Colecraft HM, Rubin LE, Sheu SS (1997) Does mammalian heart contain only the M₂ muscarinic subtype? *Life Sci.* 60,1023-29.
- [60] Krejci A, Tucek S. (2002) Quantitation of mRNAs for M₁ to M₅ subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol.* 61, 1267-1272.
- [61] Shi H, Wang H, Li D, Nattel S, Wang Z (2004) Differential alterations of receptor densities of three muscarinic acetylcholine receptor subtypes and current densities of the corresponding K⁺ channels in canine atria with atrial fibrillation induced by experimental congestive heart failure. *Cell Physiol Biochem.* 14, 31-40.
- [62] Cho H, Hwang JY, Kim D, Shin HS, Kim Y, Earm YE, Ho WK (2002) Acetylcholine-induced phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate depletion does not cause short-term desensitization of G protein-gated inwardly rectifying K⁺ current in mouse atrial myocytes. *J Biol Chem.* 277, 42-47.
- [63] Hellgren I, Mustafa A, Riazi M, Suliman I, Sylvenic AA (2000) Muscarinic M₃ receptor subtype gene expression in human heart. *Cell Mol. Life Sci.* 57,175-180.
- [64] English JD, and Sweatt JD. (1997) A Requirement for the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade in Hippocampal Long Term Potentiation. *J Biol Chem.* 272, 19103-19106.
- [65] Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A, Amenta F (2002) Immunohistochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuro Immunol.* 132, 147-155.
- [66] Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Kazuka F, Kawashima K (1999) Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leucemic cell lines. *Neurosci Lett.* 266, 17-20.
- [67] Zhou C, Fryer AD, Jacoby DB (2001) Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor gene and its promoter. *Gene* 271, 87-92.
- [68] Haddad E and Rousell J. Regulation of the expression and function of the M2 muscarinic receptors *TIPS* 1998,19, 322-327.
- [69] Cellal C, Matucci R, Vannucchi AM, Paoletti F (1999) Constitutive muscarinic receptors are involved in growth and differentiation of friend erythroleukemia cells. *J Cellular Physiol.* 178, 333-340.
- [70] Stengel PW, Gomeza J, Wess J, Cohen MI (2000) M₂ and M₄ receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 292, 877-885.
- [71] Liao CF, Themmen AP, Barberis JR, Birnbaumer M, Birnbaumer L (1989) Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 264, 7328-7337.
- [72] Kohn EC, Alessandro R, Probst J, Jacobs W, Brille E, Felder CC (1996) Identification and molecular characterization of a M₃ muscarinic receptor in A 2058 human melanoma cells. Coupling to inhibition of adenylate cyclase and stimulation of phospholipase A2. *J Biol Chem,* 271, 17476-17484.
- [73] Reever CM, Ferrari-Di-Leo G and Flynn DD, 1997. The M₃ receptor subtype: fact of fiction? *Life Sci.* 60,1105-1112.
- [74] Philipps JK, Vidovic M, Hill CE (1997). Variation in mRNA expression of α adrenergic, neurokinin ve muskarinik receptors amongst four arteries of the rat. *J Auton Nerv Syst* 62, 85-93.
- [75] Buckley NJ, Bonner TI, Buckley CM, Brann MR (1989) Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptor expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol.* 35, 469-476.
- [76] Haga K, Haga, T (1990) Dual regulation by G proteins of agonist dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors. *FEBS Lett.* 268, 43-47.
- [77] Haga K, Kameyama K, Haga T, Kikkawa U, Shiozaki K, Uchiyama H. (1996) Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J Biol Chem.* 271, 2776-2782.
- [78] Richardson RM, Hosey MM (1990) Agonist-independent phosphorylation of purified cardiac muscarinic cholinergic receptors by protein kinase C. *Biochemistry* 29, 8555-8561.

- [79] Haga K, Haga T, Ichiyama A (1990) Phosphorylation by protein activator, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA) inhibits muscarinic (M_1) receptor mediated inositol phosphate and cyclic GMP formation in murine neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol.* 125, 155-156.
- [80] Kanba S, Kanba KS & Richelson E (1986) The protein kinase C activator, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) inhibits muscarinic (M_1) receptor-mediated inositol phosphate release and cyclic GMP formation in murine neuroblastoma cells (N1E-115). *Eur J Pharmacol.* 125, 155-156.
- [81] Lo, WWY, Hughes J (1988) Differential regulation of cholecystokinin-and muscarinic receptor-mediated phosphoinositide turnover in Flow 9000 cells. *Biochem J.* 251, 625–630.
- [82] Debburman SK, Kunapuli P, Benovic JL, Hosey MM (1995) Agonist-dependent phosphorylation of human muscarinic receptors in *Spodoptera frugiperda* insect cell membranes by G protein-coupled receptor kinases. *Mol Pharmacol.* 47, 224–233.
- [83] Richardson RM, Kim C, Benovic JL, Hosey MM (1993) Phosphorylation and desensitization of human m_2 muscarinic cholinergic receptors by two isoforms of the β -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem.* 268, 13650–13656.
- [84] Elorza A, Sarnago S, Mayor FJr (2000) Agonist-dependent modulation of G protein coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol.* 57, 778– 783.
- [85] Haddad E-B And Rousell J (1998) Regulation of the expression and function of the M_2 muscarinic receptor. *TiPS* 19, 322-327.
- [86] Kreier F, Yilmaz A, Kalsbeek A, Romijn JA, Sauerwein HP, Fliers E, Buijs RM (2003) Hypothesis: shifting the equilibrium from activity to food leads to autonomic unbalance and metabolic syndrome. *Diabetes* 52 (11), 2652-2656.