

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Fyziologie živočichů



Mgr. Vendula Tvrdoňová

Úloha variabilních řetězců na rozhraní podjednotek
ve formování ATP-vazebné kapsy a funkci P2X4 receptoru

Role of variable chains at the interface between subunits in
forming ATP-binding pocket and function of P2X4 receptor

Dizertační práce

Školitel: RNDr. Hana Zemková, CSc.

Praha, 2014

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Hany Zemkové, CSc., vedoucí Laboratoře buněčné a molekulární neuroendokrinologie Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Fyziologický ústav Akademie věd České republiky je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a pracoviště školitele.

V Praze dne 24. října 2014

podpis

.....

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Zemkové, CSc. za trpělivost a rady, svým kolegům MUDr. Marii Jindřichové, PhD. a Mgr. Vojtěchu Vávrovi, PhD. za podporu a předání znalostí. Ostatním laboratorním pracovníkům pak děkuji za pomoc se vším, co bylo zrovna potřeba, stejně tak jako za psychickou podporu v průběhu studia. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc. a paní Janě Klimentové, jež je studnicí informací studijního charakteru, za jejich neocenitelné rady.

GRANTOVÁ PODPORA

Tato práce byla financována z grantů Grantové agentury České republiky (P304/12/G069), Grantovou agenturou Akademie věd (IAA500110910), z projektu "BIOCEV - Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd ČR a Univerzity Karlovy" (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) financovaného Evropskými regionálními rozvojovými fondy a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (3446/2011).

OBSAH

1. ÚVOD	10
1.1. VÝSKYT A FYZIOLOGICKÁ ÚLOHA P2X4 RECEPTORU	11
1.1.1. Jednonukleotidový polymorfismus	14
1.2. FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI P2X4 RECEPTORU	15
1.2.1. Agonisté	15
1.2.2. Inhibice a modulace	19
1.3. STRUKTURA A FUNKCE P2X4 RECEPTORU	20
1.3.1. Vazba adenosin-5'-trofosfátu	22
1.3.2. Styčné plochy podjednotek	27
1.3.3. Cesta iontů kanálem	30
1.4. KINETICKÉ MODELY P2X RECEPTORŮ	31
2. CÍLE PRÁCE	33
3. METODY	34
3.1. BODOVÉ MUTACE V PROTEINU	34
3.1.1. Polymerázová řetězová reakce	34
3.1.2. Transformace kompetentních buněk	35
3.1.3. Izolace DNA a sekvenace	36
3.2. PÉČE O BUŇKY	37
3.2.1. Pasážování	37
3.2.2. Transfekce	38
3.3. ELEKTROFYZIOLOGICKÁ MĚŘENÍ	38
3.3.1. Roztoky	39
3.3.2. Snímání signálů z buněk	40
3.4. KVANTIFIKACE EXPRESE RECEPTORU	41
3.5. HOMOLOGNÍ MODELOVÁNÍ	42
3.6. VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ – VÝPOČTY	43
3.6.1. Maxima a EC ₅₀	43
3.6.2. Deaktivace a desenzitizace	43
3.6.3. Statistika a zpracování	44
4. VÝSLEDKY	45
4.1. ROLE AMK FORMUJÍCÍCH STYČNÉ PLOCHY MEZI LEVOU A HŘBETNÍ PLOUTVÍ	45
4.1.1. Citlivost alaninových mutací k ATP a maximální proudová odpověď	45
4.1.2. Charakterizace nefunkčních a málo funkčních mutací analýzou účinku ivermektinu	49
4.1.3. Rychlost desenzitizace alaninových mutací a rozdíly mezi levou a hřbetní ploutví	51
4.1.4. Změny v odpovědích ortosterických agonistů u mutovaných receptorů	52
4.1.5. Předpokládaná pozice identifikovaných reziduí v levé a hřbetní ploutvi	56
4.2. IDENTIFIKACE KRITICKÝCH AMK VE STRUKTUŘE EXTRACELULÁRNÍHO VESTIBULU	57
4.3. KINETICKÝ MODEL CHOVÁNÍ P2X4 RECEPTORU	59
5. DISKUZE	62
5.1. ROLE OBLASTI STYČNÝCH PLOCH MEZI LEVOU A HŘBETNÍ PLOUTVÍ	62
5.1.1. Formování kapsy pro ATP	65
5.1.2. Převod informace receptorem	68
5.1.3. Desenzitizace P2X4 receptoru	70
5.2. ROLE AMINOKYSELIN FORMUJÍCÍCH EXTRACELULÁRNÍ VESTIBUL	71
5.3. KINETIKA P2X4 RECEPTORU	72
6. ZÁVĚR	74
7. POUŽITÁ LITERATURA	76
8. PŘÍLOHY	86
8.1. AUTORSKÉ PUBLIKACE	86
8.2. SEZNAM OBRÁZKŮ	

ABSTRAKT

Krystalizace P2X4 receptoru (P2X4R) ze zebřičky („zebra fish“, zfP2X4) v uzavřeném a otevřeném stavu odhalila změny v konformacích ektodomény včetně změn v oblasti styčných ploch mezi levou („left flipper“; LF) a hřbetní („dorsal fin“; DF) ploutví. Roli těchto struktur ve formování ATP vazebné kapsy a funkci receptoru jsme zkoumali pomocí alaninové skenovací mutagenese úseků LF (D280-N293) a DF (R203-L214) potkaního P2X4R, a s využitím ATP a analogických agonistů 2-(methylthio)adenosin 5'-trifosfátu, adenosin 5'-(γ -thio)trifosfátu, 2'(3'-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosin 5'-trifosfátu a α,β -methylenadenosin 5'-trifosfátu. Sníženou citlivost anebo účinnost ATP mělo 15 z 26 vytvořených mutací. Mutace R203A, N204A a N293A byly v podstatě nefunkční, ale jejich funkci bylo možné obnovit ivermektinem, alosterickým modulátorem P2X4R. Mutace I205A, T210A, L214A, P290A, G291A a Y292A měly změněnou odpověď na ATP a na analogické agonisty. Naproti tomu mutace L206A, N208A, D280A, T281A, R282A a H286A nevykazovaly ve srovnání s divokým typem receptoru žádnou změnu v odpovědích na ortosterické agonisty. Tyto pokusy, společně s homologním modelováním ukázaly, že aminokyseliny z první skupiny nacházející se v horní části obou řetězců LF a DF, se podílejí na přesné organizaci ATP-vazebné kapsy a iniciaci převodu signálu skrze receptor směrem ke druhé skupině aminokyselin ve spodní části obou řetězců. Aminokyseliny R203 a N204, zanořené hlouběji do proteinu, mohou integrovat informaci přicházející z obou řetězců a směřovat ji dále k bráně receptorového kanálu. Navíc, aminokyseliny v oblasti LF se přednostně podílejí na kontrole převodu receptoru ze stavu otevřeného do stavu desenzitizovaného. Výraznými konformačními změnami procházejí i řetězce extracelulárního vestibulu. Nativní rezidua mutací Y54A, Q55A, F324A a G325A, jejichž funkci nebylo možné obnovit ivermektinem, jsou důležitá pro správnou strukturu a funkci vestibulu. Přispěli jsme také k vypracování nového kinetického (Markovova) modelu P2X4 receptoru, kde ivermektinem vyvolaný převod z otevřeného do dilatovaného stavu je svázaný se senzitivací receptoru, která jde proti desenzitizaci a následné internalizaci.

PŘEDMĚTOVÁ SLOVA

molekulární biologie, polymerázová řetězová reakce, buněčné linie, transfekce, elektrofyziologie, patch clamp, western blot, strukturní homologní modelování, kinetické modelování, alosterická modulace

KLÍČOVÁ SLOVA

HEK293 buňky, purinergní receptory, P2X4 receptor, mimobuněčný adenosin-5'-trifosfát, ivermektin, iontový kanál, deaktivace, desenzitizace, dilatace póru, vazebné místo pro ATP, zelený fluorescenční protein, mutageneze, EC₅₀

SUBJECT WORDS

molecular biology, polymerase chain reaction, cell line, transfection, electrophysiology, patch clamp, western blot, structure homology modeling, kinetic modeling, allosteric modulation

KEY WORDS

HEK293 cell, purinergic receptor, P2X4 receptor, extracellular adenosin-5'-triphosphate, ivermectin, ion channel, deactivation, dilatation, desensitization, ATP-binding site, green fluorescent protein, mutagenesis, EC₅₀

ABSTRACT

Crystallization of the zebrafish P2X4 receptor in both open and closed states revealed conformational differences in the ectodomain structures, including the dorsal fin and left flipper domains. The role of these domains in forming of ATP-binding pocket and receptor function was investigated by using alanine scanning mutagenesis of the R203-L214 (dorsal fin) and the D280-N293 (left flipper) sequences of the rat P2X4 receptor and by examination of the responsiveness to ATP and orthosteric analog agonists 2-(methylthio)adenosine 5'-triphosphate, adenosine 5'-(γ -thio)triphosphate, 2'(3'-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate, and α,β -methyleneadenosine 5'-triphosphate. ATP potency/efficacy was reduced in 15 out of 26 alanine mutants. The R203A, N204A, and N293A mutants were essentially non-functional, but receptor function was restored by ivermectin, an allosteric modulator. The I205A, T210A, L214A, P290A, G291A, and Y292A mutants exhibited significant changes in the responsiveness to orthosteric analog agonists. In contrast, the responsiveness of L206A, N208A, D280A, T281A, R282A, and H286A mutants to analog agonists was comparable to that of the wild type receptor. These experiments, together with homology modeling, indicate that residues of the first group located in the upper part of the dorsal fin and left flipper domains, contribute to the organization of the ATP binding pocket and to the initiation of signal transmission towards residues of the second group located in the lower part of both domains. The R203 and N204 residues, deeply buried in the protein, may integrate the output signal from these two domains towards the gate. In addition, the left flipper residues predominantly account for the control of transition of channels from an open to a desensitized state. Strong conformation changes occur during transformation from closed to open state also in the extracellular vestibule. Native residues of Y54A, Q55A, F324A and G325A mutants, that could not be restored by ivermectin, have been identified as important for correct vestibule structure and function. Finally, new kinetic (Markov state) model of P2X4 receptor was developed and indicates that the ivermectin-dependent transition from open to dilated state is coupled to receptor sensitization, which rescues the receptor from desensitization and subsequent internalization.

POUŽITÉ ZKRATKY

-/-	vyřazení genu, knock-out
2-MeSATP	2-methylthioadenosin-5'-trifosfát
α,β -meATP	α,β -methylenadenosin-5'-trifosfát
AMK	aminokyselina
ATP	adenosin-5'-trifosfát
ATP γ S	adenosin 5'-O-(3-thiotrifosfát)
BzATP	3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5'-trifosfát
[Ca ²⁺] _i	vnitrobuněčná koncentrace vápenatých kationtů
DF	„dorsal fin“, hřbetní ploutev
D-MEM	modifikované Eaglovo médium
DMSO	dimethylsulfoxid
EC ₅₀	poloviční efektivní koncentrace
ECS	mimobuněčný roztok
EGFP	zesílený zelený fosforeskující protein
GABA _A R	receptory pro kyselinu γ -aminomáselnou
HEK293T	lidské embryonální ledvinné buňky z linie č.293 se zvýšenou citlivostí k transfekci
HEPES	N-(2-hydroxyetyl)piperazin- N'-2-etansulfonová kyselina
ICS	vnitrobuněčný roztok
I _{max}	maximální proudová odpověď
JNP	jednonukleotidový polymorfismus
LF	„left flipper“, levá ploutev
NMDG	N-methyl-D-glukamin
P2XR	ionotropní purinergní P2X receptor
P2X*R	purinergní P2X* (1-7) receptor
PCR	polymerázová řetězová reakce
rP2X4R	potkaní forma purinergního P2X4 receptoru (<i>Rattus norvegicus</i>)
RT	„room temperature“, pokojová teplota
SEM	směrodatná odchylka
TM	transmembránová doména
τ_{des}	vážená časová konstanta desenzitizace
τ_{off}	časová konstanta deaktivace
WT	divoký typ
zfP2X4R	P2X4 receptor ze zebřičky (<i>Danio rerio</i>)

ZKRATKY AMINOKYSELIN

A, Ala	alanin
C, Cys	cystein
D, Asp	kyselina asparagová
E, Glu	kyselina glutamová
F, Phe	fenylalanin
G, Gly	glycin
H, His	histidin
I, Ile	isoleucin
K, Lys	lysin
L, Leu	leucin
M, Met	methionin
N, Asn	asparagin
P, Pro	prolin
Q, Gln	glutamin
R, Arg	arginin
S, Ser	serin
T, Thr	threonin
V, Val	valin
W, Trp	tryptofan
Y, Tyr	tyrosin

1. ÚVOD

Purinerní P2X receptory (P2XR) jsou kationtové kanály aktivované extracelulárním adenosin-5'-trifosfátem (ATP). Tato skupina kanálů byla objevena v 70. letech minulého století (Burnstock, 1972). P2XR jsou tvořeny pouze třemi podjednotkami, každá podjednotka má dvě transmembránové domény (TM). N- i C-konec se nachází uvnitř buňky, vně buňky je velká klička s vazebným místem pro ATP a jeho analogy. Vyskytují se hojně po celém organismu od centrální nervové soustavy, přes periferní nervovou soustavu, svaly, plíce, střevo, endokrinní a exokrinní žlázy až po ledviny, močový měchýř a chánovody. Podílejí se také na tvorbě kostí, imunitní reakci, funkci smyslů či vývoji bolesti (North, 2002; Burnstock, 2013, 2014).

U savců bylo dosud identifikováno sedm různých podjednotek purinerních P2XR, P2X1-P2X7, které jsou schopny formovat homomerní nebo heteromerní receptor. Každý homomerní receptor tvořený ze stejných podjednotek má své specifické vlastnosti – různou citlivost na agonisty, antagonisty a modulátory, různou kinetiku otevírání kanálu, desenzitizace a dilatace, či různou propustnost pro ionty. P2XR jsou neselektivní iontové kanály, které propouštějí především sodné a draselné kationty, některé podtypy ale mají abnormálně vysokou propustnost pro vápníkové kationty (P2X1, P2X3 a P2X4 receptory). Podle specifických vlastností lze jednotlivé podtypy P2XR v organismu odlišit, přestože pro mnohé z nich neexistují specifické agonisté ani antagonisté (North, 2002; Burnstock, 2006; Coddou a kol., 2011).

Předkládaná dizertační práce je zpracována na modelové podjednotce purinerního P2X4 receptoru (P2X4R) potkana. Důvodem pro výběr P2X4 podjednotky byly její specifické funkční, fyziologické a farmakologické vlastnosti. Jedná se o jednu z nejvýznamnějších a nejhojnějších P2X podjednotek v organismu savců včetně člověka (více v následující kapitole), vlastnosti homomerního P2X4R jsou průmětem možných vlastností P2XR (má středně rychlou aktivaci, desenzitizaci i dilataci) a lze jej navíc specificky modulovat ivermektinem. Tato práce má za cíl přispět k objasnění mechanismů, které po navázání extracelulárního ATP vedou k otevření póru iontového kanálu P2X4R na molekulární úrovni, především pochopit úlohu dvou struktur na

rozhraní podjednotek v těsné blízkosti ATP-vazebného místa a význam rozpínání extracelulárního vestibulu nad samotným iontovým pórem. Podrobné znalosti o struktuře a funkci receptoru jsou předpokladem pro využití výsledků základního výzkumu v klinickém vývoji léčiv.

1.1. VÝSKYT A FYZIOLOGICKÁ ÚLOHA P2X4 RECEPTORU

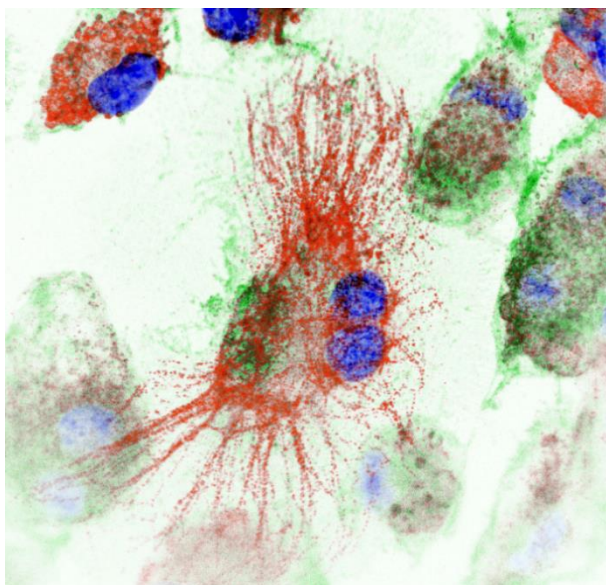
Výskyt P2X4R není v organismu omezen jen na některé tkáně, najdeme ho téměř po celém těle. Nejvyšší zastoupení má v centrální nervové soustavě a míše, vyskytují se v periferní nervové soustavě a to jak v sympatiku, tak i v parasympatiku – najdeme ho především na tělech neuronů, astrocytů i mikroglií (Burnstock a Knight, 2004; Burnstock, 2014), ale také na presynaptických nervových zakončeních (Vavra a kol., 2011; Khakh a North, 2012; Bhattacharya a kol., 2013). Vyskytuje se v mnoha žlázách s vnitřní sekrecí (brzlík, nadledvinky, štítná žláza, nadvarle, slinivka), slinných žlázách či slezině a žlučovodech (Burnstock a Knight, 2004; Stojilkovic a Zemkova, 2013; Burnstock, 2014). Výrazně je zastoupen v ledvinách, v glomerulech i v tubulech, v epitelu a hladkých svalech močového měchýře. V dýchací soustavě se vyskytuje v plicním epitelu a v průdušnicích. Oběhová soustava je na P2X4R obzvláště bohatá – najdeme je v srdci, komorách i síních, a v hladkých svalech a endoteliálních buňkách všech cév, včetně srdečních a mozkových (Burnstock a Knight, 2004; Burnstock, 2014). P2X4R byl nalezen i v osteoblastech a neonatálních osteoklastech a také v hnědém tuku. Najdeme jej v mnoha typech imunitních buněk včetně makrofágů a dendritických buněk.

Role P2X4R v srdci a oběhové soustavě byla zkoumána na transgenních kmenech myši a to jak na kmenech s vyřazeným genem (-/-), tak na kmenech se zvýšenou expresí P2X4R. Na modelu myši bez genu pro P2X4 podjednotku byl prokázán pozitivní modulační efekt P2X4R na průtokovou regulaci krevního tlaku a remodelaci cév. Tato P2X4^{-/-} pokusná zvířata trpěla zvýšeným krevním tlakem a měla menší průměr tepen než plně geneticky vybavení jedinci (Yamamoto a kol., 2000; Yamamoto a kol., 2006). Funkce P2X4R v srdci byla zkoumána především na modelu myši se zvýšeným výskytem P2X4R. Za běžných podmínek tato zvířata nevykazují žádné změny v srdeční akci, ani

její síle. Dojde-li ale k traumatu (ověřeno pro různé modely vyvolání infarktu), umožňuje vyšší výskyt P2X4R jedinci mnohem delší přežití. Nedochozí sice k uzdravování tkáně, ale zbylá tkáň je schopna vyvinout mnohem větší sílu než u jedinců s normální úrovní výskytu P2X4R (Hu a kol., 2001; Yang, A. a kol., 2004; Sonin a kol., 2008). Jakkoli je model vyšší exprese umělý, byly jeho výsledky potvrzeny i na modelu myši, které specificky neexprimovaly P2X4R v srdci (Yang, T. a kol., 2014). Studie na srdci a oběhové soustavě se shodují v efektu, kterým P2X4R ovlivňují činnost těchto orgánů – vliv na produkci oxidu dusnatého (NO) (Yamamoto a kol., 2006), respektive na aktivitu nitrátové oxidázy 3 (eNOS) (Yang, T. a kol., 2014). Nepřímý vliv skrze nedokonalé krevní zásobením měly chybějící P2X4R pravděpodobně také u modelu renální fibrózy (Kim a kol., 2014).

Aktivace P2X4R, pravděpodobně skrze ovlivnění hladiny intracelulárního vápníku ($[Ca^{2+}]_i$), napomáhá dlouhodobé potenciaci nervových buněk v hipocampu (Sim a kol., 2006; Baxter a kol., 2011). V hypofýze způsobuje aktivace P2X4R depolarizaci, která zvyšuje frekvenci i velikost akčního potenciálu v klidových buňkách a usnadňuje tok vápenatých iontů přes napětím řízené vápníkové kanály. Výskyt P2X4R v laktotropech potvrzuje jejich podíl na modulaci prolaktinové sekrece (He, M. L. a kol., 2003; Zemkova a kol., 2010). Důležitý je výskyt P2X4R na tělech neuronů. Astrocyty umí velmi rychle a cíleně uvolňovat ATP, který působí na neurony přes P2X4R a vyvolává v nich zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ nezbytné k posílení kontaktu těchto dvou složek centrální nervové soustavy. Mikroglie umí také uvolňovat kvanta ATP, ovšem mnohem pomaleji, a výsledkem jejich modulace P2X4 (a P2X2) receptorů je na fosforylaci závislé snížení počtu receptorů pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA_AR) v membráně (Lalo a kol., 2014). Na ovlivnění počtu a složení GABA_AR v mozku ukazuje také studie věnující se příjmu etanolu u myši, kde byly využity P2X4^{-/-} kmeny (Wyatt a kol., 2014), některé studie P2X4^{-/-} ukazují i změny v podjednotkovém složení receptorů aktivovaným N-methyl-D-aspartátem (NMDA) (Baxter a kol., 2011). Přítomnost P2X4R v mozku je důležitá pro jeho správnou funkci, ale roste-li množství těchto receptorů, mohou vznikat patofyziologické jevy. Zvýšená exprese P2X4R byla zaznamenána v modelu mozkové ischemie (Hu a kol., 2001; Yang, A. a kol., 2004) a u mikroglíí po zranění míchy

(Ulmann a kol., 2008; Jarvis, 2010). Zvýšený výskyt P2X4R je doložen u aktivovaných mikroglíí (Obr. 1), jedná se o tzv. P2X4R⁺ stav (Tsuda a kol., 2012). Jejich nadstav vzniká také po zranění míchy, což je spojováno s neuropatickou bolestí (Di Virgilio a kol., 2009; Jarvis, 2010; Tsuda a kol., 2012). Obdobně přibývá mikroglíálních P2X4R i po epileptickém záchvatu (Ulmann a kol., 2013) či hypoxické ischemii mozku (Wixey a kol., 2009).



Obrázek 1: Ilustrativní snímek aktivované mikroglie

Imunohistochemické značení hypotalamických gliových buněk v kultuře. Zeleně lectin BS-1 (mikroglie); červeně anti-P2X4R; modře DAPI (jádra). Zvětšení 63x, mikroskop Leica SPE. (Tvrdohňová a spol., připravováno do tisku)

V aktivovaných mikroglíích mají P2X4R na svědomí uvolňování BDNF (z anglického „brain-derived neurotrophic factor“), což je signál způsobující kolaps transmembránového aniontového gradientu a následnou hyperpolarizaci neuronu. Postupně se vyvíjí allodynia (přecitlivělost na běžné podněty), která přechází až v neuropatickou bolest (Tsuda a kol., 2003; Coull a kol., 2005; Ulmann a kol., 2008). U myší s vyřazeným genem pro P2X4R dochází k akumulaci BDNF v buňkách bez jeho uvolnění (Tsuda a kol., 2009). Jakým mechanismem je zvyšována exprese P2X4R po periferním zranění nervu není přesně známo, pravděpodobně zde hraje roli fibronectin-integrinová síť matrixu. Výsledkem experimentů s inhibicí integrinů echistatinem bylo snížení zraněním zvýšené exprese P2X4R. Nebylo ale dosaženo

úplného odstranění zvýšené exprese P2X4R (Tsuda a kol., 2008a). Důležitým článkem v předání informace o zranění je Lyn kináza (tyrosin-proteinová kináza kódovaná v lidském LYN genu), jejíž vyřazení zablokovalo navýšení P2X4R po stimulaci fibronectinem, ale nezměnilo bazální mechanickou citlivost ani zánětlivé reakce (Tsuda a kol., 2008b). V pokusech s několika typy allodynie byla také testována role P2X4R v zánětlivé bolesti. V modelu zánětlivé bolesti nedocházelo ke zvýšené tvorbě P2X4R a neměla zde ani roli Lyn kináza (Tsuda a kol., 2009). P2X4R byly identifikovány také v makrofázích (Brone a kol., 2007; Sim a kol., 2007). Obdobně jako aktivované mikroglie uvolňují BDNF, je z makrofágů s aktivovanými P2X4R uvolňován prozánětlivý prostaglandin E2 (Ulmann a kol., 2010).

V posledních letech se studie zaměřují také na efekty chybějících či modulovaných P2X4R v chování. Podnětem pro tyto výzkumy je fakt, že P2X4R mají významnou roli v oblastech mozku, které definují chování každého jedince. Výzkumy s modulací P2X4R pomocí ivermektinu, specifického pozitivního alosterického modulátoru, ukazují na změny v senzomotorických reakcích (Bortolato a kol., 2013). Další studie, kde byly využity kmeny P2X4^{-/-}, tento výsledek potvrdila a navíc ukazuje na možné ovlivňování vývoje nervové soustavy skrze P2X4R. Výzkum probíhal jen na P2X4^{-/-} samcích, u kterých byly nalezeny změny v rozložení podjednotek různých receptorů, např. AMPA či NMDA, a tito jedinci se projevovali do značné míry autisticky (snížený sociální kontakt atp.). Autoři navíc uvádějí, že předchozí studie autismu ukázaly jeho spjetí s deregulací BDNF, jehož uvolňování je spojeno s činností P2X4R. (Wyatt a kol., 2013)

1.1.1. Jednonukleotidový polymorfismus

V lidském genu P2X4R, který může mít 4 různě dlouhé varianty v závislosti na jeho vystřížení (mění se délka N- i C- konce), bylo nalezeno 708 jednonukleotidových polymorfismů (JNP). Z tohoto množství je 582 polymorfismů situováno v intronech a neovlivňují tudíž finální protein. Ve zbylých 126 JNP se nachází 93 synonymních mutací v nukleotidu a jen u 33 polymorfismů došlo k záměně výsledné aminokyseliny (AMK) v proteinu P2X4R. Část z těchto polymorfismů, 13 z 33, již byla validována, klinické údaje až na výjimku však nejsou známy (dbSNP, 2014). Polymorfismus na

pozici 944 variující mezi adeninem a guaninem, jehož četnost je přibližně 0,7-1,4% populace (Stokes a kol., 2011; dbSNP, 2014), má pravděpodobně vliv na změnu tlaku pulsu způsobenou deregulací tonusu cév epitelem, přičemž vliv mutace se projeví i pokud je zasažena jen jedna alela genu. Vzhledem k tomu, že daná mutace mění Y315 na cystein a takto mutovaný protein je téměř nefunkční, jsou tato pozorování ve shodě se studiemi na P2X4^{-/-} zvířatech (Stokes a kol., 2011). Stejný polymorfismus zřejmě hraje roli i v jiných procesech: výrazně snižuje schopnost fagocytózy imunitních buněk (Gu a kol., 2013) a zvyšuje riziko osteoporózy (Wesselius a kol., 2013).

1.2. FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI P2X4 RECEPTORU

P2X4 podjednotky jsou schopny formovat homomerní i heteromerní receptory; dosud byly popsány heteromery P2X4+P2X1 (Nicke a kol., 2005) a P2X4+P2X6 (Le a kol., 1998). Kromě toho, trimerní P2X4R mohou interagovat s trimerními P2X2 a P2X7 receptory (Antonio a kol., 2011). Existence heteromeru P2X4+P2X7 je stále sporná (Guo a kol., 2007; Nicke, 2008). Stejně jako u všech ostatních P2XR je kanál tvořený třemi P2X4 podjednotkami propustný především pro Na⁺ a K⁺. Významná je také propustnost pro Ca²⁺, poměr propustností P_{Ca2+}/P_{Na+} je přibližně 4,2. Tok vápenatých iontů skrz kanál tvoří přibližně 11% proudové odpovědi. Při krátké aplikaci agonisty je odpověď P2X4R velmi rychlá. Vodivost kanálu, která odpovídá rychlosti přesunu iontů, je poměrně malá, přibližně 9 pS (Evans, 1996).

Při delší aplikaci agonisty (50-100 s) se pór kanálu ještě dále rozšiřuje a je schopen propouštět i velké organické kationty jako je N-methyl-D-glukamin (NMDG) nebo i organické barvivo označované YO-Pro 1 (Khakh a kol., 1999a), ale jev byl popsán jen v nepřítomnosti Ca²⁺ v extracelulárním mediu. Za fyziologických podmínek (tj. v přítomnosti extracelulárního Ca²⁺) se při delší aplikaci agonisty P2X4R projevuje středně rychlou desenzitizací, s rychlostní konstantou nižší než 20 s (Evans, 1996).

1.2.1. Agonisté

P2X4R nemá specifického agonistu a ve srovnání s ostatními P2XR je na tradiční agonisty poměrně málo citlivý (North, 2002; Coddou a kol., 2011). Plným agonistou pro

P2X4R je ATP, následují méně účinní agonisté v pořadí: 2-methylthioadenosin-5'-trifosfát (2-MeSATP), adenosin 5'-O-(3-thiotrifosfát) (ATP γ S), 3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosen-5'-trifosfát (BzATP) a α,β -methylenadenosin-5'-trifosfát (α,β -meATP). Velmi malá odpověď je na β,γ -methylenadenosin-5'-trifosfát, reaguje i na cytidyn-5'-trifosfát (Coddou a kol., 2011). Zatímco na ATP reaguje P2X4R již při podání jednotkových mikromolárních koncentracích, na parciální agonisty až při podání v koncentracích či stovek mikromol. Slabší účinek parciálních agonistů, kteří nejsou schopni vyvolat plnou reakci, se také používá v elektrofyziologických studiích pro odlišení P2X4R od jiných P2XR (Vavra a kol., 2011). Práce se často neshodují v přesných podmínkách pokusu a následně ani v procentuálních odpovědích ortosterických agonistů, proto není možné uvést jejich konkrétní citlivosti pro rP2X4R.

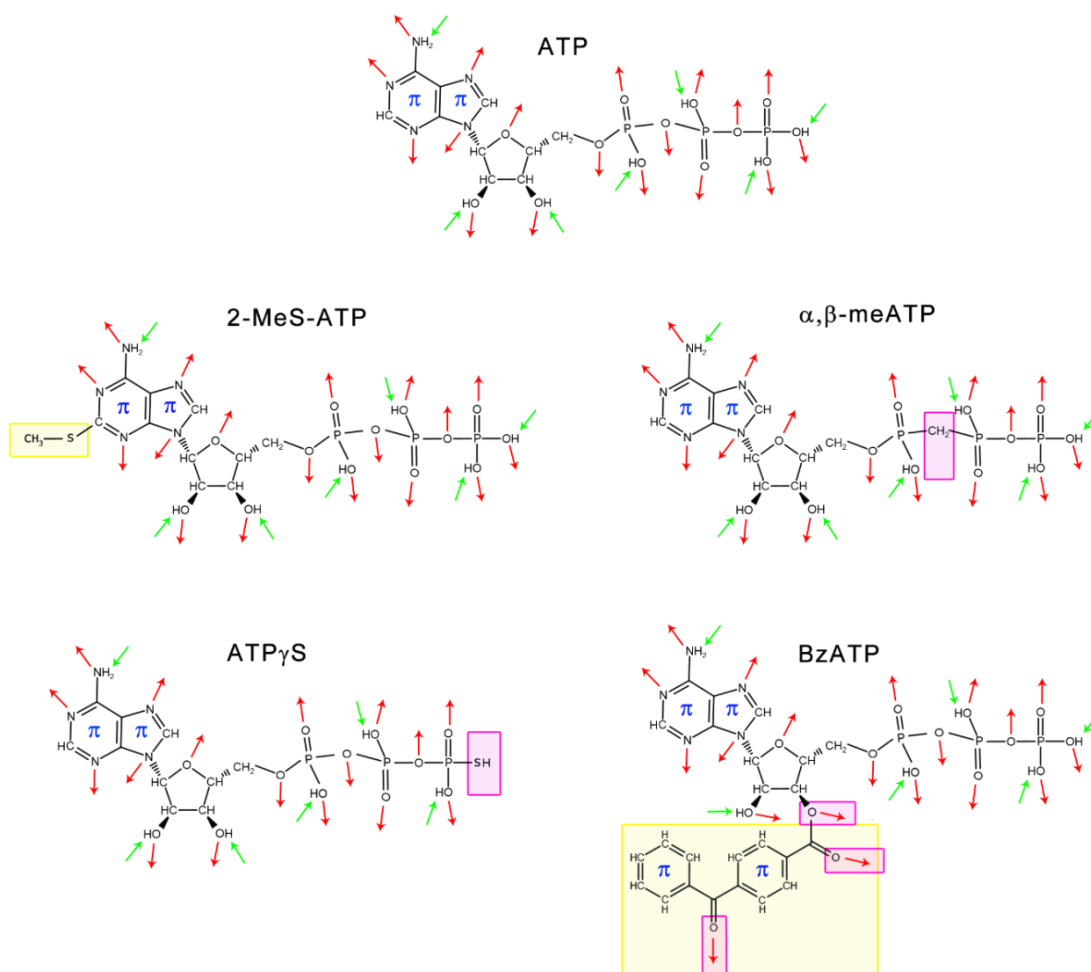
1.2.1.1. Adenosin-5'-trifosfát

ATP je hlavním přenašečem energie v buňce. Je používán pro většinu buněčných procesů, jako stavební kámen pro tvorbu nukleových kyselin a je nositelem fosfátové skupiny při fosforylaci enzymů a jiných proteinů. Většina jeho tvorby u živočichů je založena na přenosu elektronů skrze mitochondriální membrány v dýchacím řetězci. ATP je relativně nestabilní sloučenina. Fosfor netvoří příliš ochotně dvojné vazby a s kyslíkem se váže semipolárně. Navíc na kyslíkových atomech dochází ke kumulaci negativního náboje (Fawaz a Seraidarian, 1947; Kennard a kol., 1970). Proto je nutné k zachování soudržnosti molekuly více energie, čehož se v organismu využívá k jejímu uložení. Rozštěpením ATP vznikají stabilnější látky a velké množství energie se uvolní.

Mimo buňku nefunguje ATP jako přenašeč energie, nýbrž jako signální molekula. Nemá velký dosah, ale funguje jako důležitý autokrinní a parakrinní faktor ve všech tkáních včetně mozku (Nunez a kol., 1997; Gomes a kol., 2009; Corriden a Insel, 2010). ATP je uvolňován excitabilními buňkami a to samotný nebo spolu s neurotransmitery, ale i neexcitabilními, např. gliovými, buňkami. K jeho uvolnění ze sekretujících buněk může dojít exocytózou nebo mechanismem „kiss-and-run“ (letmý kontakt s extracelulární membránou, během kterého je uvolněno množství obsahu, ale váček nezaniká (Alabi a Tsien, 2013; Mellander a kol., 2014)), z neexcitabilních buněk skrze pannexinové či connexinové kanály a ABC transportéry (Lohman a kol., 2012). Velké

množství ATP je také uvolněno při smrti buňky (Ayna a kol., 2012; Martins a kol., 2014). Mimo buňku je ATP rozkládán ektonukleotidázami, rychlost jeho rozložení je v různých tkáních různá, jeho poločas rozpadu se pohybuje mezi 10 až 30 minutami v krvi a pouhými 0,2 sekundami v srdci či plicích (Gordon, 1986).

ATP je schopen akceptovat až 18 vodíkových vazeb a 7 jeho vodíků je schopno nové můstky vytvořit (Obr. 2). Molekula ATP má molekulovou váhu 507 a je výrazně hydrofilní, partiční koeficient oktanol/voda má -5,93 při polárním povrchu rovném 308,56 (Guide to pharmacology, 2014).



Obrázek 2: Schématické znázornění jednotlivých agonistů

Znázornění jednotlivých ortosterických agonistů P2XR s vyznačením donorů (zelené šipky) a akceptorů (červené šipky) vodíkových vazeb. Zvýrazněné obdélníky pak demonstrují rozdíly vůči výchozí struktuře, ATP, s barevným odlišením efektu změny: růžové značí převládající efekt ztráty či nabytí možnosti tvořit vodíkové můstky, žluté pak převládající sterický efekt. Vzorce převzaty z ChemID a upraveny.

1.2.1.1. 2-methylthioadenosin-5'-trifosfát

2-MeSATP je schopen podílet se na stejném počtu vodíkových můstků jako ATP, ale jeho molekulová váha je vyšší (553), stejně jako partiční koeficient (-5,14) i polární povrch (333,86). Nositelem těchto změn je přidáný atom síry s methylenovou skupinou na adeninovém kruhu, který je sice mnohem větší co do hmotnosti i povrchu, ale nepřináší žádné nové elektrony, které by se mohly snadno zapojit do vazeb, a zvyšuje hydrofobicitu agonisty (Guide to pharmacology, 2014). Při aktivaci P2X4R se chová jako agonista nejpodobnější ATP, jenž ale není schopen vyvolat plnou odpověď srovnatelnou s ATP.

1.2.1.2. Adenosin 5'-O-(3-thiotrifosfát)

ATP γ S obsahuje také atom síry, ovšem ve zcela jiné pozici než u 2-MeSATP. Síra je zde umístěna na konci fosfátového řetězce, přičemž fosfátový řetězec je vysoce důležitou součástí agonisty určující vazbu na P2XR, a záleží na přesném náboji každého atomu v řetězci. Protože síra změní rozprostření náboje v agonistovi, je ATP γ S schopen být příjemcem 17 vodíkových můstků a 6 nových aktivně tvořit. Jeho molekulová váha je 519, ale polární povrch je blízký 2-MeSATP (334,9). Takto umístěný atom síry výrazně snižuje rozpustnost látky ve vodě ve srovnání s předchozími agonisty, partiční koeficient je roven -3,97 (Guide to pharmacology, 2014). Účinnost ATP γ S na P2X4R je blízká 2-MeSATP, studie se nicméně liší v tom, jestli a který z těchto agonistů je účinnější (Bo a kol., 1995; Soto a kol., 1996).

1.2.1.3. α,β -methylenadenosin-5'-trifosfát

α,β -meATP je srovnatelně účinný jako ATP u P2X1 a P2X3 receptoru (P2X*R), na P2X4R má ale účinek jen velmi malý (Bo a kol., 1995; Soto a kol., 1996; Sim a kol., 2007). Výměnou jednoho kyslíku za uhlík se sice výrazně nemění struktura agonisty, ale zásadně se mění rozložení elektronů a náboje na okolních fosfátech a k nim navázaných kyslicích. Důsledkem je značné snížení polárního povrchu (299,33) při relativním zachování všech ostatních parametrů: nabízených vodíkových vazeb 17, aktivně vytvářených 7, molekulová váha 505 a partiční koeficient -5,65 (Guide to pharmacology, 2014).

1.2.1.4. 3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosen-5'-trifosfát

Jestli je o vlivu některého agonisty na P2X4R málo informací, je to BzATP. Tento analog ATP se používá jako hlavní agonista pro P2X7R, který je vůči ATP mnohem méně citlivý než ostatní P2XR, avšak na BzATP reaguje již v nízkých koncentracích (od 3 μ M (Gargett a kol., 1997)). Od ATP se liší o benzoylbenzoát připojený ke třetímu kyslíku ribózy. Tato skupina výrazně zvyšuje jeho váhu (715), přidává možnosti akceptovat vodíkové můstky (až 20), ale nemění nijak výrazně jeho polární povrch (331,7). Na druhou stranu benzoylbenzoát snižuje jeho vlastní nabídku vodíkových vazeb (k dispozici 6) a výrazně obrací celou molekulu hydrofobním směrem (partiční koeficient -1,25) (Guide to pharmacology, 2014).

1.2.2. Inhibice a modulace

Obdobně jako na tradiční agonisty, je P2X4R málo citlivý i na tradiční antagonisty P2XR jimiž jsou suramin a pyridoxal fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonová kyselina (PPADS) (North, 2002; Burnstock a Knight, 2004). Poměrně dobře blokuje P2X4R jen 2',3'-O-(2,4,6-trinitro-cyklohexadienylidin)adenosin-5'-trifosfát (TNP-ATP). Ten se také často využívá v mnoha fyziologických pokusech ke zjištění role receptoru ve sledované tkáni (Lewis a kol., 1998). Specifický blokátor stále nebyl objeven, ačkoliv již bylo testováno mnoho nadějných látek (Wilkinson a Kemp, 2011). P2X4R lze modulovat zinkem (pozitivně), protony (kyselé pH receptor blokuje), hořčíkem (Negulyaev a Markwardt, 2000) i mědí (negativně) či Cibacron Blue (North, 2002). Specifickým modulátorem P2X4R je pak ivermektin (Khakh a kol., 1999b).

1.2.2.1. Ivermektin

Ivermektin je derivát přírodní látky vznikající v metabolickém procesu *Streptomyces avermitilis*. Jedná se o velký makrocyclický lakton ze skupiny avermektinů mající systematický název 22,23-dihydroavermektin B12. Při aplikaci ivermektinu o koncentraci 3 μ M na buňky nesoucí P2X4R dojde až ke dvojnásobnému navýšení maximální ATP-stimulované proudové odpovědi mechanismem zvýšení frekvence otevírání iontového kanálu a snížení úrovně desenzitizace (Priel a Silberberg,

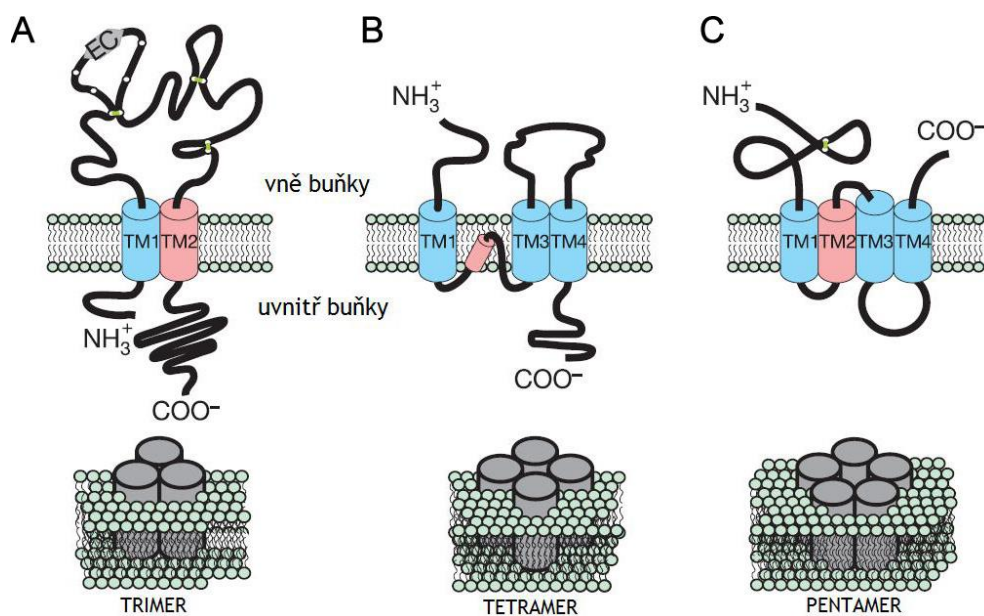
2004). Ivermektin je schopen zesilovat účinek nejen ATP, ale i slabého agonisty, např. α, β -meATP. Při delším přísunu Ivermektinu do mezibuněčného prostoru se navíc prodlužuje doba deaktivace, tedy doba nezbytná pro uzavření iontového kanálu po odmytí agonisty (Khakh a kol., 1999b; Priel a Silberberg, 2004; Jelinkova a kol., 2006). Vazebné místo pro ivermektin není dosud přesně známo, pokusy s chimérami a jednobodovými mutacemi však prokázaly, že se váže v oblasti TM, kde interferuje s pohybem TM1 a TM2 při otevírání iontového kanálu (Jelinkova a kol., 2006; Silberberg a kol., 2007; Rokic a kol., 2013), působí tedy jako alosterický modulátor P2X4R. Schopností zvyšovat citlivost receptoru k agonistovi a stabilizovat kanál v otevřeném stavu se ivermektin řadí k důležitým nástrojům výzkumu P2X4R, kdy jím vyvolaný pozitivní modulační účinek pomáhá dále zkoumat mutace, které se jeví jako nefunkční (Zemkova a kol., 2007). Ivermektin vzniká selektivní hydrogenací avermektinu B1 a je směsí dvou izomerů B1a (>80%) a B1b (<20%). Jedná se o silně lipofilní látku o velikosti molekuly cca 20 Å. Počátky jeho využití v lidské i veterinární medicíně jako antiparazitická látka se datují na přelom 70./80. let (Campbell a kol., 1979; Armour a kol., 1980; Barth a Brokken, 1980; Paul a kol., 1980; Wescott a kol., 1980). Působí ve svalech a nervech bezobratlých živočichů aktivaci glutamátového receptoru propustného pro chloridové ionty, čímž dojde k hyperpolarizaci a následné svalové paralýze (Eldefrawi a Eldefrawi, 1987). Ivermektin působí i v organismu obratlovců, otevírá či mění konformaci GABA_AR (Supavilai a Karobath, 1981; Krusek a Zemkova, 1994), $\alpha 7$ -nikotinového (Krause a kol., 1998) a glycinového receptoru (Graham a kol., 1982). Jeho účinek na P2X4R byl objeven roku 1999 (Khakh a kol., 1999b) a pro P2X4R je specifický, na ostatní P2XR nepůsobí.

1.3. STRUKTURA A FUNKCE P2X4 RECEPTORU

Ve velké rodině ligandem aktivovaných iontových kanálů (Obr. 3) jsou P2XR strukturně výjimečné. Jednu podjednotku tvoří pouze dvě TM, velká mimobuněčná klička a N- i C- konce, které jsou orientovány dovnitř buňky. Každý receptor je pak složen ze tří podjednotek, a to buď stejných (homomerní receptory) nebo různých (heteromerní receptory). Strukturně-funkční vztahy P2XR byly řadu let zkoumány

rozličnými technikami bez znalosti terciární struktury. Byly využívány především molekulární metody spojené s mutací jednotlivých AMK či celých úseků a vytváření chimér. Následně byla na takto mutovaných receptorech prováděna měření, nejčastěji elektrofyzilogická, spolu s dalšími podpůrnými metodami jako přímé fluorescenční značení, fotoafinitní experimenty, western bloty a imunocytochemie či monitorování změn $[Ca^{2+}]_i$ pomocí fluorescenčních sond.

Byly zkoumány především konzervované části receptorů, protože, jak už se mnohokrát v minulosti ověřilo, nejdůležitější části receptorů patřících do jedné rodiny by měly být shodné. Vědci se soustředili především na nalezení ATP-vazebného místa a na oblast TM.



Obrázek 3: Rodiny ligandem aktivovaných iontových kanálů

A) P2X receptorová rodina: Purinergní P2X iontové kanály jsou tvořeny trimery, přičemž každá podjednotka má pouze dvě TM. Nejbližší podobnost má s pH-citlivým kanálem (ASIC; z anglického „acid-sensing ion channel“), který je také jediný další trimerní iontový kanál. **B)** Glutamátová rodina skládaná z tetramerů, kde každý monomer má 4 TM a N-konec vně buňky. **C)** Cys-loop superrodina charakterizovaná cysteinovým můstkem v extracelulární doméně, oběma konci vně buňky a čtyřmi TM. Receptory jsou skládány z pěti podjednotek. Patří sem například: nikotinové, glycinové, $GABA_A$ a další receptory. Převzato z (Khakh a North, 2006) a upraveno.

1.3.1. Vazba adenosin-5'-trofosfátu

Vazbu ATP ve své aktivitě využívají i mnohé další proteiny, často je z něj získávána energie. Jedná se ale vždy o vazbu intracelulárního ATP. Pro vazbu extracelulárního ATP byly poznatky o již známých motivech pro vazbu intracelulárního ATP důležitou inspirací. Takových motivů bylo identifikováno několik, o různé míře důležitosti. Nejdůležitějším motivem pro intracelulární ATP-vazebné oblasti je v každém případě P-loop. Dále jsou známy motivy A-loop, Q-loop a D-loop (Matte, 2010). ATP-vazebné motiv jsou poskládány na dvou stranách ATP-vazebné kapsy. Proteiny často mívají více ATP-vazebných míst, neřídka i nesymetrických (Ambudkar a kol., 2006; He, X. a kol., 2011).

1.3.1.1. Porovnání s motivy v enzymech

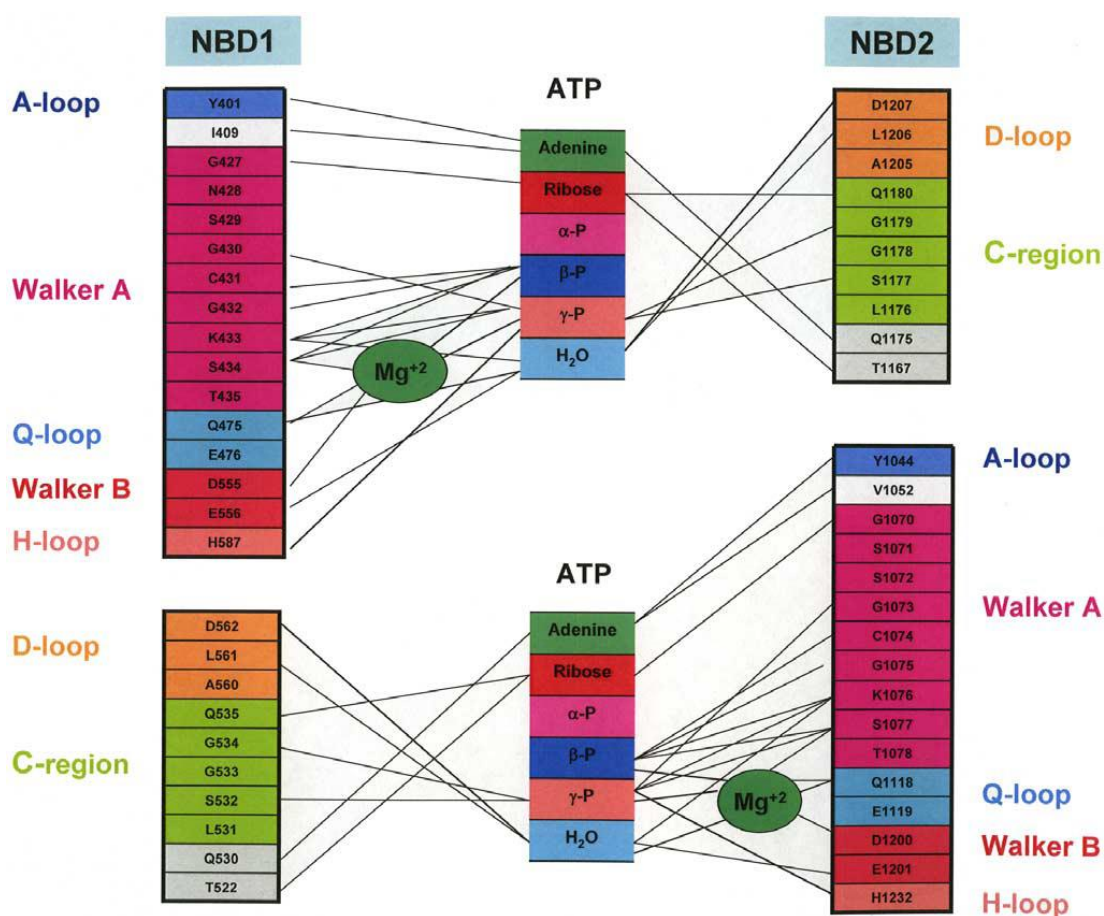
Charakteristickou oblastí vážící ATP v enzymech je P-loop. Jedná se o velkou skupinu motivů, které jsou v kontaktu s fosfátovým řetězcem ATP - patří zde Walker A, Walker B ale i H-loop či C-region a další nepojmenované motivy, které jsou spíše jejich analogiemi. Významné, dobře definované a široce diskutované jsou především Walker A a Walker B (Obr. 4). C-region je část ATP-vazebného místa, která je pro každou rodinu proteinů specifická, jedná se o „otisk prstu“ bílkoviny ve vztahu k ATP (Ambudkar a kol., 2006).

1.3.1.1.1. Walker A

Ve vazebném motivu nazvaném Walker A jsou jako stěžejní AMK uváděny glyciny. Obecně je Walker A definován jako GxxxxGK[T/S]. Motiv Walker A je důležitý pro vazbu α - a β -fosfátu ATP (Walker a kol., 1982). Variace na tento motiv obsahují na pozici T/S i jiné AMK, například další glycin, kyselinu asparagovou (Leipe a kol., 2003) či asparagin (Nagy a kol., 2009). Některé motivy mají zaměněn lysin za cystein (Jha a kol., 2003; Rai a kol., 2008). Pro důležitost glycinů bývá motiv někdy také označován jako G-loop (Bossemeyer, 1994), pak je motiv uváděn jen jako GxGxxG.

Důležitost glycinů je ale přinejmenším zpochybněna, protože srovnávací studie na virech ukázala, že jen velmi malá skupina (4 ze 41 zkoumaných) má krátkou verzi

motivu Walker A (GKT/S), ostatní obsahují nějakou jeho variaci, přičemž je vždy přítomen aspoň jeden lysin a aspoň jedna AMK s hydroxylovou skupinou. A to ne nutně těsně za sebou, nýbrž právě s oním čtyřaminokyselinovým rozestupem (Mitchell a Rao, 2004). Studie epimerázy také vyzdvihuje důležitost lysinů, její modifikace motivu je KxxxxGKxTK, přičemž motiv se vyskytuje v oblasti bez výrazné sekundární struktury s poměrně velkou variabilitou (Liao a kol., 2012). Na druhou stranu krystalizace heat shock proteinu 70 zjistila podíl až 4 glycinů na vazbě ATP, jsou ale spíše roztroušeny po celé sekvenci a je tedy těžké z nich získat jakýkoli motiv. Na vazbě se v tomto krystalu podílejí také dva threoniny, cystein a asparagin (Misra a kol., 2012).



Obrázek 4: Znárodnění AMK podílejících se na vazbě ATP v lidském P-glykoproteinu

ATP je v P-glykoproteinu sendvičově uzavřen mezi dvěma nukleotid vázajícími doménami tvořenými motivy Walker A, Walker B a A-, Q- a H-loop jedné domény a D-loop spolu s C-regionem v druhé doméně. Čarami jsou znázorněny příslušné vazby. Převzato z (Ambudkar a kol., 2006).

Pokud tedy pomineme důležitost glycinů, můžeme říci, že v P2XR využívajících extracelulární ATP lze nalézt obdobný motiv. Nachází se těsně nad TM1 a obsahuje rovnou dva lysiny: T⁶⁶KxKG⁷⁰ (číslováno podle P2X₄). V tomto motivu je nepostradatelný první lysin (Lys⁶⁷) – jeho náhrada za jakoukoli jinou AMK, včetně argininu, způsobila nefunkčnost kanálu (Roberts a Evans, 2004; Zemkova a kol., 2007). Při substitucích druhého lysinu byl procházející proud významně snížen (cca 1000x), ale kanál byl stále funkční (Roberts a Evans, 2004).

1.3.1.1.2. Walker B

Další ATP-vazebný motiv známý u enzymů je Walker B. Jeho esenciální AMK je kyselina asparagová nebo glutamová. Krátce bývá definován jako hhhhD/E, kde h je hydrofobní AMK (Walker a kol., 1982). V rP2X₄R se nachází několik kyselin asparagových či glutamových v adekvátní konfiguraci s hydrofobními kyselinami. Nikdy se ale nejedná o motiv, který by byl konzervovaný napříč všemi podtypy. Existuje ještě podvarianta tohoto motivu definovaná jako hhhDxTN (Walker a kol., 1982). Ovšem kombinace threoninu a asparaginu se v P2XR vyskytuje jen málo a už vůbec ne v blízkosti D nebo E. Další alternativou tohoto motivu je DxD (Aravind a Koonin, 1999). U všech variant motivu Walker B se zároveň uvádí interakce se serinem nebo threoninem v motivu Walker A. Funkcí motivu Walker B je fixace γ -fosfátu přes ion Mg²⁺, případně ještě skrze molekulu vody. S největší pravděpodobností se podílí na hydrolýze ATP (Ambudkar a kol., 2006).

Podobný motiv lze nalézt u ektonukleotidáz, které degradují ATP v extracelulárním prostoru. Jejich motiv EF hand (DxDxDGxxDxxE) je takřka nabit asparagovými kyselinami, vyskytuje se zde i kyselina glutamová. Dle již publikovaných výzkumů se tento motiv podílí na regulaci funkce – tzn. hydrolýzy – ektonukleotidázy pomocí interakce s vápenatými nebo hořečnatými kationty (Zimmermann, 2000). U receptorů pro extracelulární ATP k hydrolýze nedochází. Žádná obdoba motivu Walker B se zde tudíž nemusí vůbec vyskytovat. Model P2X₄R, založený na podobnosti s aminoacyl t-RNA synthetázou, však s Asp280 a koordinací vazby k ATP prostřednictvím hořčíku počítá. Tento model se ale ukázal jako velmi nedokonalý (Yan a kol., 2005).

1.3.1.1.3. Další motivy

Zbylé motivy, ačkoli jich není málo, jsou většinou velmi málo definované. Motiv, který váže adeninový kruh, nazývaný A-loop je definován výskytem aromatické AMK, nejraději tyrosinu (Ambudkar, 2006). Patří zde také skupina motivů, které interagují s vodou či hořčíkovým kationtem – H-loop (obsahuje histidin), Q-loop, D-loop (Dhh). Jedná se spíše o jednotlivé AMK vhodně orientované do vazebné kapsy proteinu, různě rozmístěné v jeho struktuře. Ačkoli víme o důležitosti takovýchto bodů, je téměř nemožné je specifičtěji vyhledat v neznámých proteinech. Navíc pojem „loop“ nespecifikuje žádnou strukturu, může se stejně dobře jednat o β -list, α -helix nebo nestrukturovanou smyčku.

1.3.1.2. Vazba ATP v P2X receptorech

V P2XR byly zpočátku zkoumány především konzervované nabitě a aromatické AMK v extracelulární doméně, protože ATP se váže na receptor z vnější strany membrány. V těchto studiích bylo vytipováno několik AMK, které by měly být v přímém kontaktu s ATP, především K⁶⁷xK⁶⁹ a N²⁹³FR²⁹⁵ (rP2X4R; pro detailnější přehled původních studií viz např. (Chataigneau a kol., 2013)) Bližší určení polohy daných úseků v terciální struktuře receptoru ale nebylo známo. Přesněji zasadit zkoumanou oblast do struktury receptoru umožnila až krystalizace P2X4R ze zebřičky („zebra fish“; zP2X4R) v uzavřeném stavu (Kawate a kol., 2009).

Kawate nejen dodal vědecké obci krystal zP2X4R, ale navíc jej dle tvaru přirovnal k delfínu, rozdělil na oblasti (hlava, levá ploutev, pravá ploutev, hřbetní ploutev, tělo a ocas; schematicky Obr. 5) a označil všechny části s příslušnými sekundárními strukturami. Vytyčil také tři styčné plochy podjednotek některé více, jiné méně, přesně definované. Přestože se nejednalo o krystal v otevřeném stavu, vyřešil tento článek jeden ze sporů, které vědce rozdělovaly. Bez jakýchkoli pochybností bylo možné určit, že ATP-vazebné místo, pozitivně nabitá kapsa, je mezi podjednotkami, nikoli uvnitř podjednotek (Kawate a kol., 2009).

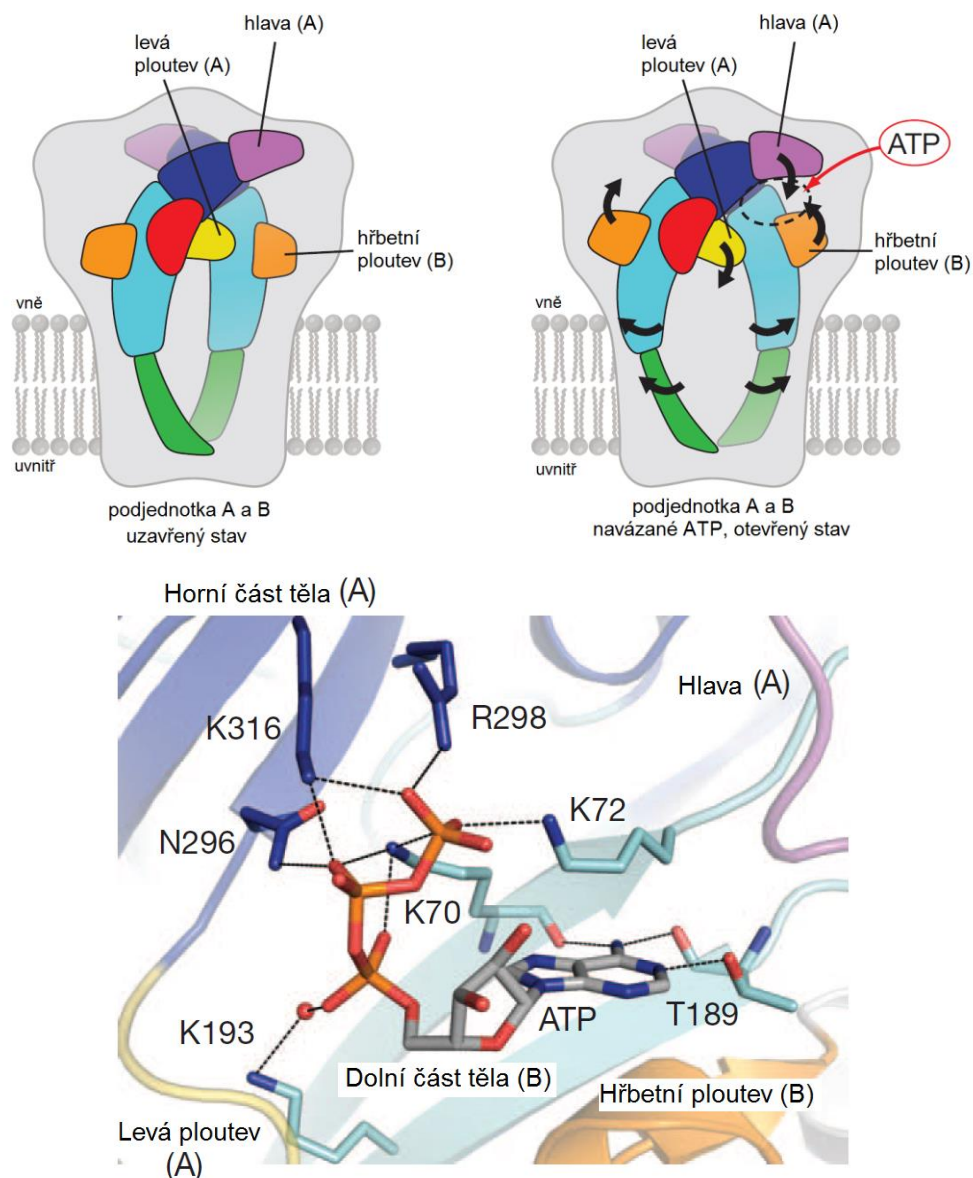
Na základě krystalu v uzavřeném stavu bylo vypracováno několik studií, především elektrofyzilogické studie kombinovaná s fluorescenčním měřením a následně dokovací matematická studie pro různé agonisty, jež ověřily i kanonické vazebné AMK

pro P2X3R (Bodnar a kol., 2011; Riedel a kol., 2012). Další studie ukázala na důležitost hlavy při celkovém formování a zejména uzavírání ATP-vazebné kapsy (Jiang, R. a kol., 2011). Všechny tyto studie zároveň přinesly nové informace ohledně možné polohy ATP ve vazebné kapse.

Přesné umístění ATP ve struktuře P2XR bylo definitivně objasněno až při vyřešení struktury krystalu zfP2X4R s navázaným ATP (Hattori a Gouaux, 2012). Druhá krystalová studie potvrdila mnoho dat získaných v dřívějších elektrofyzilogických pokusech na receptorech s jednobodovými mutacemi, především kontakt s ATP motivy K⁷⁰xK⁷² a N²⁹⁶FR²⁹⁸ (zfP2X4). Označila také další AMK, které by měly přijít do kontaktu s ATP, přičemž některé z nich byly očekávané a do jisté míry predikované (T186, K190 a K313; Obr. 5), jiné nikoli (I229, L188). Velmi neočekávaná byla identifikace leucinu 214 (L217 v zfP2X4), který je nekonzervovaný a navíc se vyskytuje ve variabilním úseku (Hattori a Gouaux, 2012).

Přestože známe krystalovou strukturu zfP2X4R s navázaným ATP a AMK, které s ním reagují, a další, které s ním pravděpodobně v kontaktu jsou, přesná poloha ATP ve vazebné kapse není jasná. Máme mnoho indicií, které indikují jiné možné polohy ATP v kapse (Jiang, R. a kol., 2011; Valente a kol., 2011; Du a kol., 2012; Huang a kol., 2014). Navíc je zde důvodná pochybnost o to, ve kterém kinetickém stavu se krystalizovaný receptor nachází (viz kapitola 1.4), protože se prakticky nemůže jednat jen o změny stavu vyvolané krátkým kontaktem s ATP.

V každém případě, po navázání ATP následují výrazné změny ve struktuře hlavy, horní části těla a levé ploutvi jedné podjednotky a spodní části těla a hřbetní ploutve podjednotky sousední, které vyústí v uzavření kapsy pro ATP na jedné straně a otevření póru na straně druhé (Hattori a Gouaux, 2012; Huang a kol., 2014). Během všech těchto pohybů se k sobě levá (LF; z anglického „left flipper“) a hřbetní ploutev (DF; „dorsal finn“) ještě více přibližují (Hattori a Gouaux, 2012; Huang a kol., 2014) a zároveň se rozšiřují vestibuly, především pak extracelulární vestibul těsně nad cytoplazmatickou membránou (Obr. 5, horní panel).



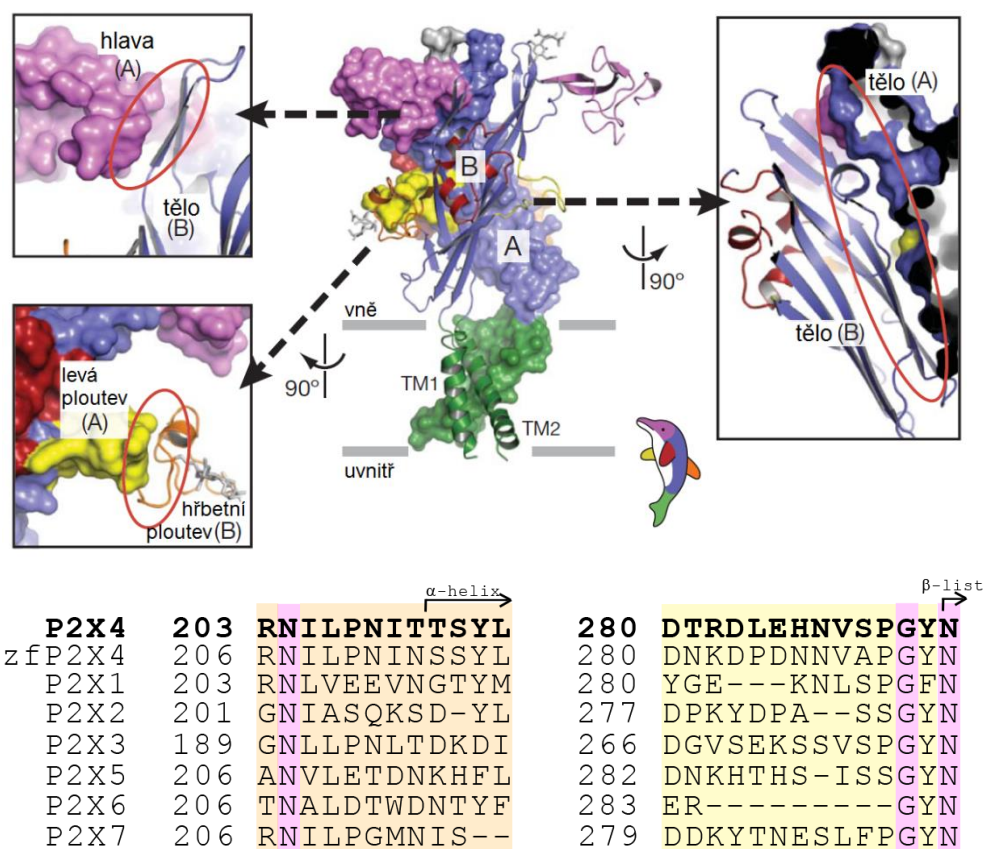
Obrázek 5: ATP-vazebné místo dle krystalu zFP2X4R a změny následující po navázání ATP

Nahoře: Schématické znázornění pohybů v proteinu po navázání ATP. Zatímco hlava (fialová) a levá ploutev (žlutá) jedné podjednotky jdou dolů, pohybuje se hřbetní ploutev (oranžová) druhé podjednotky směrem nahoru k hlavě. Zároveň dochází k pohybu spodní části těla (světle modrá) a TM (zelená) obou podjednotek. **Dole:** Detail vazby ATP v zFP2X4R podle publikované krystalové struktury s vyznačenými vazebnými AMK: R298, N296, K316, K70, K72, K193 a T189. Čárkované čáry znázorňují vodíkové můstky, barevné odlišení struktur stejné jako u horního obrázku. Hydrofobní interakce a k nim příslušná residua (I229, L188 a L217) nejsou označena. Převzato z (Hattori a Gouaux, 2012)

1.3.2. Styčné plochy podjednotek

Oblast styčných ploch mezi LF a DF, u rP2X4R vymezených sekvencemi D280-N293 (LF) a R203-L214 (DF), se nachází těsně pod ATP-vazebnou kapsou (Obr. 6, horní

panel). Zároveň se jedná o řetězce s vysokou variabilitou napříč jednotlivými podtypy P2XR (Obr. 6, dolní panel). Třetí specifikum této styčné plochy je absence větších sekundárních struktur. Vyskytuje se zde jen malý α -helix, jinak jsou struktury definovány svou návazností na β -listy. Variabilní úseky mohou skrývat mnohá tajemství, zejména mohou být zodpovědné za specifické vlastnosti jednotlivých podjednotek.



Obrázek 6: Styčné plochy podjednotek a jejich variabilita

Nahoře: Krystalová struktura zfP2X4R v uzavřeném stavu (Kawate *a kol.*, 2009) s vyznačením styčných ploch v extracelulární doméně mezi podjednotkami. Jedna podjednotka vyznačena povrchem (A), druhá schematickou strukturou (B); třetí podjednotka pro lepší viditelnost chybí. Barevně odlišené části receptoru: fialově „hlava“, modře „tělo“, žlutě „levá ploutev“, oranžově „hřbetní ploutev“, červeně „pravá ploutev“, zeleně TM představující „ocas“. Cytoplazmatické domény musely být pro účely krystalizace z receptoru odstraněny. Zvětšené orámované části znázorňují tři styčné plochy mezi dvěma podjednotkami. **Dole:** Srovnání sekvence AMK, které tvoří rozhraní mezi oblastmi DF (R203-L214; oranžově) jedné podjednotky a LF (D280-N293; žlutě) druhé podjednotky, napříč jednotlivými potkaními formami P2XR a srovnání se zfP2X4R. Konzervované AMK jsou v boxech (N204, G291, N293), sekundární struktura (α -helix či β -list) je označena šipkou.

Díky svému umístění může mít rozhraní LF a DF velký vliv na formování kapsy, výběr či identifikaci agonisty i jeho samotnou vazbu. Skrze převod signálu může také ovlivňovat kinetické vlastnosti podjednotek. Už pouhé srovnání příslušných sekvencí vychází zajímavě: P2X6 podjednotce, která je nefunkční, chybí celý jeden řetězec styčné plochy (Obr. 6, dolní panel). Vzhledem k tomu, že se jedná o variabilní oblast, nebyla v dřívějších studiích příliš v popředí zájmu (Tabulka 1). Lze dohledat jen několik málo dat z P2X4R či jiných podjednotek. Levá ploutev, na kterou plynule navazuje ATP-vazebný motiv NFR byla zkoumána více.

Tabulka 1: Přehled již známých dat o oblasti levé a hřbetní ploutve napříč receptory.

První řádek tabulky A a B odpovídá sekvenci levé (A: LF-P2X4) a hřbetní (B: DF-P2X4) ploutve v rP2X4, číslo ve druhém svislém sloupci pak počáteční AMK v řetězci v potkaní formy uvedeného receptoru. Citace v barevném poli se týkají zjištěného účinku záměny AMK v ekvivalentní pozici v daných podjednotkách a to ať už v potkaní, lidské či myší formě receptoru.

A: LF-P2X4		D280	T281	R282	D283	L284	E285	H286	N287	V288	S289	P290	G291	Y292	N293
P2X4	280	1,2						1, 3, 4, 5	1, 2	6					
P2X1	280										7	7	7, 8	7, 9	10
P2X2	277	11				11									12
P2X3	266	13	14		14, 15	13					16				17
P2X5	282														
P2X6	283														
P2X7	279						18								

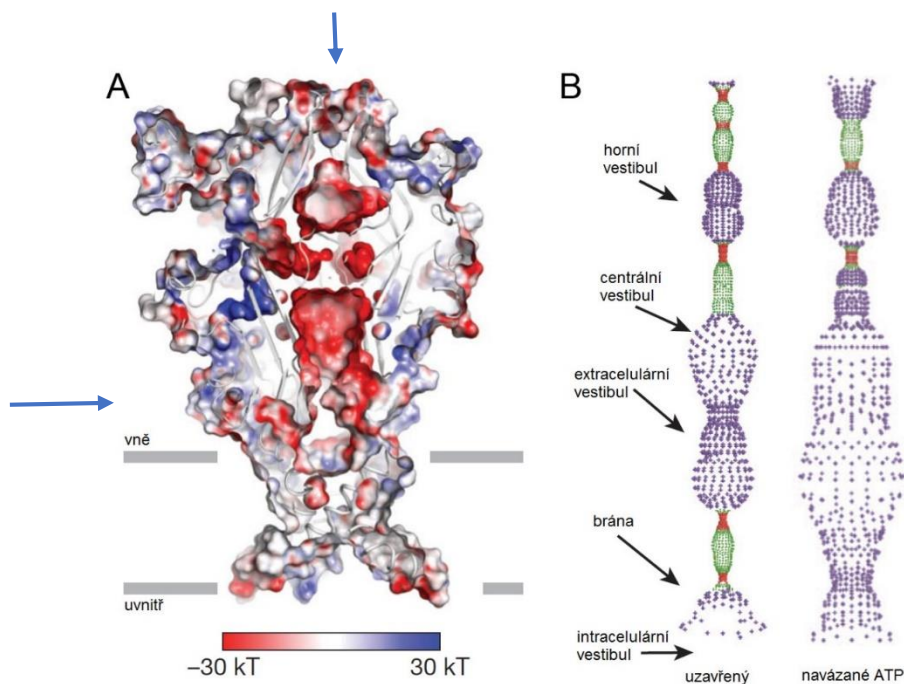
B: DF-P2X4		R203	N204	I205	L206	P207	N208	I209	T210	T211	S212	Y213	L214
P2X4	203			6			19						6, 20
P2X1	203		10										
P2X2	201		12							11			
P2X3	189						21		14,15	13, 22	23	13	23
P2X5	206												
P2X6	206												
P2X7	206	24				25			18				

Legenda: chybí v rP2X nezkoumáno beze změny či nesignifikantní signifikantní

¹(Zemkova a kol., 2007); ²(Yan a kol., 2005); ³(Coddou a kol., 2003); ⁴(Xiong a kol., 2004a); ⁵(Xiong a kol., 2004b); ⁶(Zhao a kol., 2014); ⁷(Roberts a Evans, 2007); ⁸(Digby a kol., 2005); ⁹(Roberts a Evans, 2004); ¹⁰(Roberts a Evans, 2006); ¹¹(Friday a Hume, 2008); ¹²(Jiang, L. H. a kol., 2000); ¹³(Fabbretti a kol., 2004); ¹⁴(Wirkner a kol., 2005); ¹⁵(Stanchev a kol., 2006); ¹⁶(Petrenko a kol., 2011); ¹⁷(Bodnar a kol., 2011); ¹⁸(Lenertz a kol., 2010); ¹⁹(Valente a kol., 2011); ²⁰(Zhang a kol., 2014); ²¹(Vacca a kol., 2011); ²²(Serrano a kol., 2012); ²³(Kowalski a kol., 2014); ²⁴(Adriouch a kol., 2008); ²⁵(Worthington a kol., 2002)

1.3.3. Cesta iontů kanálem

Stejně jako nebylo před vyřešením krystalové struktury možné věnovat se přesněji vazebnému místu, nebylo ani možné nijak blíže zkoumat cestu průchodu iontů receptorem. Kawate vyznačil v krystalu čtyři vestibuly (horní, centrální, extracelulární a intracelulární), o jejichž existenci se dříve prakticky nic nevědělo. Vestibuly (Obr. 7B) jsou odděleny úzkými, sevřenými místy, jedním z nich je i brána mezi extracelulárním a intracelulárním vestibulem důležitá pro otevření iontového kanálu (Kawate a kol., 2009). Již z předchozích pozorování bylo známo, že se při aktivaci receptorové podjednotky „rozestupují“ (Shinozaki a kol., 2009), vznikly proto dvě hypotézy, kudy mohou ionty pronikat skrze receptor do buňky – shora průchodem skrze celý receptor nebo z boku skrze extracelulární vestibul. Možnost průchodu shora naznačovalo i zobrazení povrchu receptoru dle náboje přítomných AMK (Obr. 7A), kde jsou v oblasti



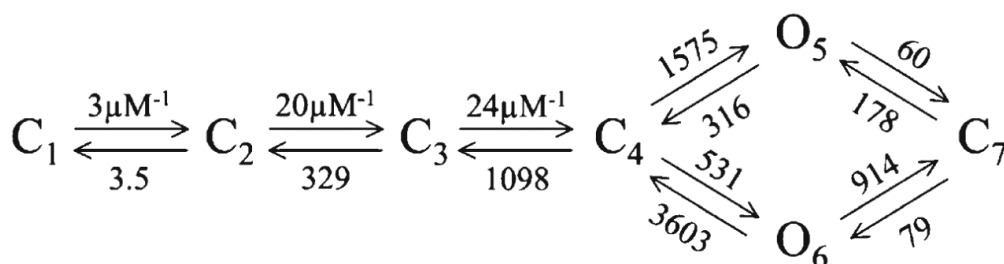
Obrázek 7: Průřez zfp2X4R.

A) Průřez zfp2X4R s vyznačením náboje aminokyselinových zbytků, ve spektru od silně negativně (červeně) až silně pozitivně (modré) nabitě. Bílá barva zobrazuje neutrální, hydrofobní a aromatické zbytky. Modré šipky naznačují dva možné směry toku iontů do kanálu. Převezato a upraveno z (Kawate a kol., 2009). **B)** Znárodnění vestibulů v zfp2X4R a jejich změn po navázání ATP. Barevně a hustotou teček, které je vykreslují, jsou odlišeny oblasti podle jejich šířky – velmi úzké omezující oblasti, kde není možný průchod iontů (červeně), středně úzké oblasti (zeleně) a široké oblasti dovolují volný pohyb iontů (fialová). Převezato z (Hattori a Gouaux, 2012).

vestibulů koncentrovány negativně nabitě AMK, které by mohly přitahovat kationty (Kawate a kol., 2009). Nicméně průchod iontů ze strany extracelulárního vestibulu se jeví jako pravděpodobnější a snadnější (Allsopp a Evans, 2011; Samways a kol., 2011), třebaže je limitován rozšířením extracelulárního vestibulu a může tak obsahovat četné kritické body pro funkci receptoru.

1.4. KINETICKÉ MODELY P2X RECEPTORŮ

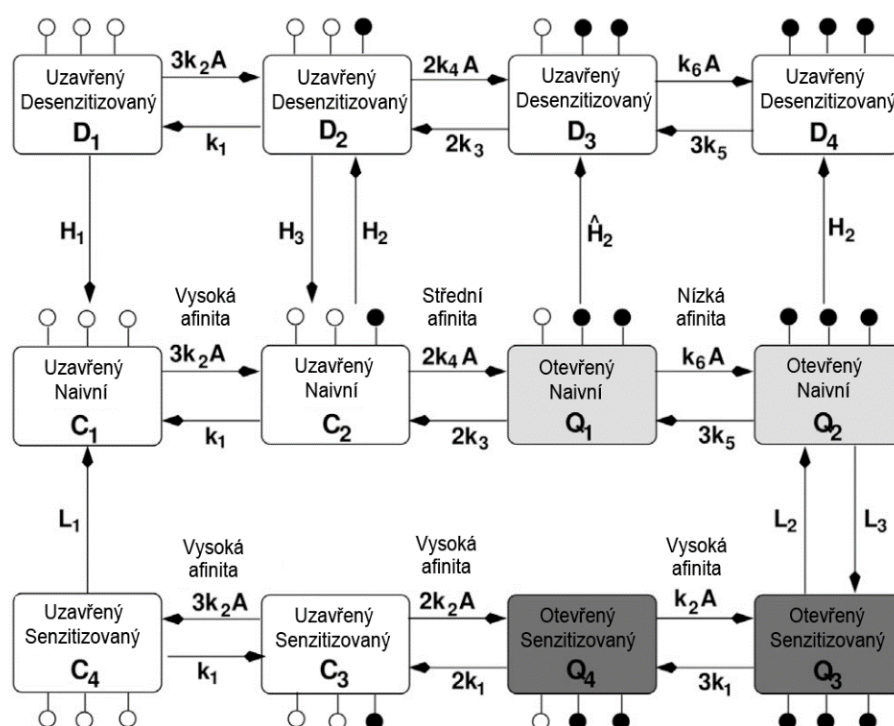
Protein každého ligandem aktivovaného iontového kanálu prochází složitým procesem, jenž vede po navázání agonisty až k otevření brány a tvorbě póru, což umožní průchod iontů kanálem. Nejedná se o jednu změnu, nýbrž o sérii postupných změn, kdy je pečlivě předávána informace prostřednictvím konformační změny v proteinu. Teorie říká, že kanál se může otevřít až ve chvíli, kdy je změněna konformace dostatečného počtu podjednotek. Zároveň se může otevírat tím širěji, čím více podjednotek konformační stav změní (Colquhoun, 1998). Rychlost těchto změn lze popsat kinetickými modely, ve kterých lze zohlednit mnoho specifických parametrů receptoru, například počet molekul agonisty potřebných k aktivaci receptoru, typy a počet konformačních stavů (senzitivovaný, desenzitivovaný, dilatovaný atd.) a rychlosti přechodu receptoru z jednoho stavu do druhého (Obr. 8). K aktivaci P2XR dle nejnovějších modelů stačí obsazení dvou ze tří vazebných míst pro agonistu (Yan a kol., 2010). V kterémkoli kroku ale může receptor přejít do desenzitivovaného stavu, kdy bude k podávaným dávkám agonisty necitlivý a neotevře se ani, pokud bude agonista



Obrázek 8: Kinetický model P2X2R.

Jednoduchý kinetický model pro P2X2R zahrnující dva typy uzavřeného stavu (C_{1-4} a C_7), a rozlišující dva stavy otevřené (O_5 , O_6). Hodnoty ukazují afinitu receptoru po navázání/odvázání jedné, respektive dvou nebo tří molekul agonisty, přičemž otevření receptoru je umožněno až po obsazení všech tří ATP-vazebných míst. Převzato z (Markwardt, 2007).

navázán. Podle rychlosti desenzitizace rozlišujeme rychle desenzitizující (< 300 ms; P2X1R a P2X3R) či pomalu desenzitizující (> 10 s; P2X2R, P2X4R) (North, 2002). P2XR může přejít také do stavu „senzitivizovaného“, kdy reaguje na podání aktivující látky citlivěji. Tento stav se vyskytuje například u P2X7R, u kterého dochází k rozšíření póru iontového kanálu při opakované nebo dlouho trvající stimulaci agonistou, takže se stává propustný pro molekuly o molekulové hmotnosti až 800 Da (Hibell a kol., 2000). Předpokládá se, a některé jednobodové mutace to dokládají, že P2X7R také může desenzitizovat, u divokého typu však dilatace póru dominuje a desenzitizovaný stav zcela překryje. Revidovaný Markovův model P2X7R (Khadra a kol., 2013) dokáže popsat rovnováhu mezi skrytou desenzitizací a dominující dilatací póru (Obr. 9). Podobný model popisuje také chování P2X2R (Khadra a kol., 2012), avšak kinetický model, který by postihl chování P2X4R, či univerzální kinetický model pro všechny P2XR dosud vypracován nebyl.



Obrázek 9: Revidovaný Markovův kinetický model pro P2X7R.

Prostřední řádek představuje naivní, agonistou dosud nestimulovaný, receptor. Horní řádek představuje desenzitizovaný stav nezávislý na Ca^{2+} , spodní pak senzitivizovaný stav. Prázdná kolečka značí volná vazebná místa pro ATP, plná pak již s navázaným agonistou. Stavy Q_i jsou otevřené stavy receptoru, C_i uzavřené a D_i uzavřené desenzitizované stavy. Konstanty H_i a L_i značí rychlost přechodu mezi jednotlivými stavy receptoru, konstanty k_i popisují afinitu vazebného místa k agonistovi. Převzato z (Khadra a kol., 2013) a upraveno.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této dizertační práce bylo přispět k objasnění role styčných ploch mezi dvěma podjednotkami v bezprostřední blízkosti ATP-vazebného místa ve funkci rP2X4R. Dále prozkoumat vztah mezi strukturou a funkcí extracelulárního vestibulu rP2X4R a analyzovat kinetické chování receptoru pod vlivem pozitivního alosterického modulátoru ivermektinu. Konkrétně byly řešeny tyto úkoly:

1. Postupnou záměnou všech AMK v oblastech R203-L214 (DF) a D280-N293 (LF) v extracelulární doméně P2X4R za alaniny a pomocí specifických účinků alosterického modulátoru ivermektinu zjistit:
 - a. které AMK mají vliv na velikost ATP odpovědí, a zda jsou důležité pro formování a transport proteinu nebo pro funkci receptoru.
 - b. zda AMK, které mají vliv na citlivost receptoru vůči ATP, ovlivňují účinek ortosterických agonistů a strukturu ATP-vazebné kapsy anebo se podílí na předávání informace z ATP-vazebného místa směrem k TM doménám.
 - c. zda některé AMK nebo skupiny AMK hrají roli v desenzitizaci receptoru.
 - d. pokusit se o mechanistické vysvětlení naměřených dat pomocí homologního modelu rP2X4R.
2. Identifikovat možná kritická místa v extracelulárním vestibulu skrze záměnu všech AMK jeho řetězců (V47-V61 a F324-N338) za alaniny a cysteiny.
3. Vysvětlit pozitivní účinky alosterického modulátoru ivermektinu, a vytvořit kinetický model chování P2X4R v jeho přítomnosti.

3. METODY

Zadané cíle této práce byly řešeny pomocí molekulárně biologických, biochemických a elektrofyziologických metod, a pomocí homologního modelování receptorového proteinu. V proteinu rP2X4R byly vytvářeny jednobodové mutace. Divoký typ (WT) či mutovaný receptor byl následně exprimován v buněčné linii lidských embryonálních ledviných buněk č. 293 se zvýšenou citlivostí k transfekci (HEK293T; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) a měřen elektrofyziologicky.

3.1. BODOVÉ MUTACE V PROTEINU

K mutacím byla použita potkaní forma genu kódujícího podjednotku P2X4R, kde každá jednotlivá AMK ve vybraných řetězcích byla zaměněna za alanin, případně za jinou AMK. Základem byl WT rP2X4R (*GenBank accession no. NM_031594*; (Bo a kol., 1995)) klonovaný ve vektoru pIRES2 obsahujícím gen pro zesílený fluorescenční protein (EGFP; *Clontech, Mountain View, CA, USA*). Vektor v sobě nesl rezistenci na kanamycin.

3.1.1. Polymerázová řetězová reakce

DNA kódující sekvence P2X4R byla modifikována použitím polymerázové řetězové reakce (PCR) a primeru, navrženého pro každou mutaci individuálně. Primery o délce 33-45 bází (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA nebo VBC-Biotech, Vídeň, Rakousko*) byly přidány do kitu QuickChange II site-directed mutagenesis (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*) spolu s templátovou DNA, WT rP2X4R ve vektoru pIRES2-EGFP. Reakční směs byla na ledu připravena do mikroeppendorfek.

Složení reakční směsi:

10x <i>PfuUltra</i> pufr	5 µl
templát (300 ng/µl)	1 µl
směs dinukleotidů (50 mM)	1,2 µl
primer DO (100 pm/µl)	2 µl
primer UP (100 pm/µl)	2 µl
deionizovaná voda	37,8 µl
<i>PfuUltra</i> DNA polymerasa	1 µl

Eppendorfka se směsí byla zvortexována a stočena, aby byl roztok co nejvíce homogenní, a umístěna do Mastercycleru personal (*Eppendorf, Hamburg, Německo*). Zde proběhla PCR dle následujícího schématu: krok 1 → $T = 95^{\circ}\text{C}$, $t = 1\text{ min}$; krok 2 → $T = 55^{\circ}\text{C}$, $t = 1\text{ min}$; krok 3 → $T = 68^{\circ}\text{C}$, $t = 10\text{ min}$; kroky 1-3 opakovat 19krát; krok 4 → $T = 68^{\circ}\text{C}$, $t = 12\text{ min}$, dále udržovat při $T = 4^{\circ}\text{C}$. Druhý krok byl dle potřeby upravován v rozsahu $50 - 57^{\circ}\text{C}$. Po skončení celého cyklu PCR byl ke směsi přidán $1\text{ }\mu\text{l}$ enzymu Dpn I, který má za úkol rozštěpení templátové DNA. Obsah eppendorky byl jemně promíchán špičkou pipety a inkubován 1 hod při 37°C . Výsledná směs byla použita při transformaci kompetentních buněk či uchována zamražením v -20°C .

3.1.2. Transformace kompetentních buněk

K transformaci byly použity kompetentní buňky *Escherichie coli* TOP10 (*Promega, Madison, WI, USA*). Transformace byla provedena metodou teplotního šoku. K $50\text{ }\mu\text{l}$ kompetentních buněk bylo přidáno $10\text{ }\mu\text{l}$ výsledné směsi z PCR, obsah eppendorfky byl jemně promíchán a ponechán 20-30 minut na ledu. Během této doby byl suchý blok Thermomixeru comfort $1,5\text{ ml}$ (*Eppendorf*) a tekuté LB medium předeřhřátý na 42°C . Po uplynutí stanoveného času byly eppendorfky s transformační směsí přemístěny na 45 s do Thermomixeru a následně zchlazeny na ledu po dobu 2-3 minut, načež bylo ke směsi přidáno $170\text{ }\mu\text{l}$ předeřhřátého LB media. Poté byly eppendorfky s transformační směsí za stálého třepání (350 rpm) inkubovány 1 hod při 37°C . Po inkubaci byly transformované buňky vysety na Petriho misky s LB agarem obsahujícím kanamycin ($30\text{ }\mu\text{g/ml}$; *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo*) a uloženy na 16-20 hod do termostatu Binder (*BINDER GmbH, Tuttlingen, Německo*) nastaveného na teplotu 37°C . Z narostlých kolonií bylo vybráno několik dobře ohraničených, samostatných a pokud možno vzdálených. Ty byly odpíchnuty a samostatně inkubovány za stálého třepání (200 rpm) v 5 ml tekutého LB media s přídavkem kanamycinu ($30\text{ }\mu\text{g/ml}$). Po 12-16 hodinách byly buňky připravené ve vyhovující koncentraci pro izolaci plazmidu.

3.1.2.1. Tekuté LB medium

Bakterie jsme pěstovali v LB médiu se složením: 1% tryptonu (*ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA*), 0,5% kvasinkového extraktu (*Serva*), 1% NaCl (*Sigma-Aldrich*). Směs byla rozpuštěna v deionizované vodě a pH bylo pomocí hydroxidu sodného (NaOH) upraveno na 7,4. Medium bylo sterilizováno 20 min při 121°C a dále uloženo v lednici (cca 4°C).

3.1.2.2. LB agar s kanamycinem

Při přípravě agarových ploten jsme do LB média přidali agar (1,5-2,0%; (*Difco, Detroit, USA*), sterilizovali 20 min při 121°C a ihned po sterilizaci jsme směs nechali vychladnout na 50°C. Po ochlazení byl přidán kanamycin (30 µg/ml), čímž bylo umožněno namnožení pouze těch bakterií, které obsahovaly námi vložený vektor kódující rezistenci vůči antibiotiku. Takto připravený agarový roztok byl rozlit v boxu Jouan MSC 12 (*Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA*) na Petriho misky a ponechán při pokojové teplotě (RT) ztuhnout. Hotové misky byly uloženy do lednice (cca 4°C).

3.1.3. Izolace DNA a sekvenace

Izolace plazmidu byla provedena pomocí kitu High-Speed Plasmid Mini (*Geneaid, New Taipei City, Taiwan*). Suspenze s buňkami byla postupně stočena, 2 min při 13000 rpm a RT, v eppendorfci. Tekutina byla odstraněna a peleta byla resuspendována ve 250 µl roztoku PD1 obsahujícím RNAsu. Ke směsi bylo přidáno 200 µl roztoku PD2 a obsah eppendorfky byl jemně promíchán obracením dnem vzhůru. Směs byla inkubována minimálně 2 min za RT až k dosažení zdánlivé homogenity. Dále bylo přidáno 300 µl roztoku PD3. Směs byla opět jemně promíchána obracením dna vzhůru. Eppendorfky se směsí byly následně stočeny 3 min při 14000 rpm a RT. Odstředěná tekutina byla slita do speciálních kolonek a při centrifugaci (30 s, 14000 rpm, RT) byla v ní obsažená DNA zachycena na filtru. Následně byla DNA čištěna 400 µl roztoku W1 a po jeho odstranění stočením (30 s, 14000 rpm, RT) ještě 600 µl promývacího pufru (Wash Buffer) obsahujícím etanol. Pufr byl odstraněn stočením

(30 s, 14000 rpm, RT) a po vylití obsahu sběrné eppendorfky byla kolonka znovu stočena až do vysušení (3 min, 14000 rpm, RT) pro odstranění stop etanolu. Nakonec bylo na střed terčíku kolonky aplikováno 50 µl elučního pufru (Elution Buffer) pro uvolnění DNA z kolonky a po 2 minutách stání při RT byla DNA stočena (2 min, 14000 rpm, RT). U suspenze byla změřena koncentrace DNA na přístroji NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (*Thermo Fisher*) pomocí programu NanoDrop/Nucleic acid/DNA-50. Vzorky byly odneseny na sekvenaci do komerční laboratoře (Mikrobiologický ústav AVCR, v.v.i.), kde byla na přístroji ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (*Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA*) ověřena správnost jejich sekvence.

3.2. PÉČE O BUŇKY

Vytvořené plazmidy divokého nebo mutovaného typu receptoru byly vnášeny do buněk HEK293T. Buňky byly pěstovány v médiu skládajícím se z Dulbeccova modifikovaného Eaglova média (D-MEM; *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), 10% tepelně inaktivovaného hovězího plodového séra (*Sigma-Aldrich*), 50 U/ml penicilinu (*Invitrogen*) a 50 µg/ml streptomycinu (*Invitrogen*). Buňky rostly v 75 cm² plastových kultivačních lahvích (*NUNC, Rochester, NY, USA*). Lahve s buňkami byly umístěny v inkubátoru IR SENSOR (*Sanyo E&E Europe BV Medical Division, Az Etten Leur, Holandsko*) při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% CO₂. Buňky byly ponechány v tomto prostředí přibližně 48 až 72 hodin, jakmile pokryly 80% až 95% plochy lahve, byly přepasážovány.

3.2.1. Pasážování

V boxu bylo z kultivačních lahví odsáto médium a buňky byly opláchnuty 3 ml Versenova roztoku (*Invitrogen*) ohřátého na teplotu 37°C. Aby došlo k uvolnění buněk od povrchu kultivační lahve, byly následně inkubovány přibližně 30 s až 1 min při RT v 1 ml Versenova roztoku s 0,5% trypsinu předeřátého na 37°C. Potom byl trypsin inaktivován 5 ml předeřátého D-MEM media a celý obsah lahve byl jemně promíchán nasátím a vypuštěním z pipety. Obsah lahve byl přemístěn do zkumavky a stočen po dobu 5 min při 800 rpm a 26°C. Tekutina byla slita a peleta byla resuspendována v 5 ml

předehřátého D-MEM media. Pro udržení buněčné linie bylo do nové lahve s 8 ml předehřátého D-MEM media nasazeno 0,3-0,5 ml suspenze buněk (obsahuje $1,5-2,0 \cdot 10^6$ buněk). Celkový počet pasáží se pohyboval mezi 30-45. Nové buňky byly získány rozmrazením zásob (2. – 3. pasáž originálních buněk) uchovávaných v tekutém dusíku. Pro transfekci se buňky nasazovaly do 35 mm plastových kultivačních misek (*Sarstedt, Newton, NC, USA*) se třemi 12 mm sklíčky pokrytými poly-L-lysinem (*Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sandheim, Německo*). Do misky se 2 ml předehřátého D-MEM media bylo na každé sklíčko nasazeno 7 μ l buněčné suspenze. Pro účely kvantifikace exprese receptorů v membráně, se buňky nasazovaly do 100 mm plastových kultivačních misek s objemem média 12,5 ml (*BioLite, Thermo Scientific, UK*) a v nich se také transfekovaly.

3.2.2. Transfekce

Transfekce byla provedena 24 hod po nasazení buněk na sklíčka podle transfekčního protokolu jetPRIME (*Polyplus-transfection, Illkirch, Francie*). V eppendorfce bylo smícháno 200 μ l pufru jetPRIME se 2 μ g DNA a směs byla homogenizována po 10 s vortexováním s následným krátkým stočením. Ke směsi pufru a DNA byly přidány 2 μ l jetPRIME a transfekční směs byla po dalším 10 s vortexování inkubována 20 min při RT. Mezitím bylo z misek odsáto staré kultivační medium a nahrazeno 2 ml čerstvého předehřátého D-MEM media. Po uplynutí potřebné doby bylo do media k buňkám přidáno 200 μ l transfekční směsi. Před měřením byly buňky v této směsi inkubovány dalších 20-48 hod. Účinnost transfekce buněk byla vyšší než 95%.

3.3. ELEKTROFYZIOLOGICKÁ MĚŘENÍ

Elektrofyzilogická měření byla prováděna patch-clamp technikou. Po dobu měření byly buňky udržovány v minimálním médiu bez séra, napodobujícím iontové prostředí uvnitř organismu, tj. v extracelulárním roztoku (ECS). Membránové proudy byly vyvolávány aplikací agonisty rozpuštěného v ECS do těsné blízkosti buňky. Vodivé

spojení s vnitřním prostorem buňky zajišťoval po protržení membrány vnitrobuněčný roztok (ICS) ve skleněné mikropipetě-elektrodě.

3.3.1. Roztoky

Veškeré chemikálie na roztoky byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich. Osmolarita byla kontrolována na osmometru Vapro 5520 (*Wescon, Logan, UT, USA*), pH na pH metru JENWAY (*model 3505, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK*).

3.3.1.1. Extracelulární roztok

Složení ECS: 8,298 g NaCl (142 mM), 0,223 KCl (3mM), 2 ml 1M CaCl₂ (2mM), 1 ml 1M MgCl₂ (1 mM), 2,383 g N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-2-etansulfonové kyseliny (HEPES; 10 mM) a 1,8 g D-glukózy (10 mM) rozpuštěných v 1 litru deionizované vody. Po rozpuštění všech chemikálií bylo pH upraveno na 7,3 použitím hydroxidu sodného (NaOH). Výsledný roztok měl osmolaritu 290-300 mOs/l. Zásobní ECS byl uložen v plastových lahvích k tomu určených v -20°C, připravené množství bylo obvykle do měsíce spotřebováno. Pro „ramp protokol“ byl použit ECS s nahrazeným NaCl: N-methyl-D-glukamin (NMDG; 155 mM), KCl (3 mM), CaCl₂ (2 mM), MgCl₂ (1 mM), HEPES (10 mM), D-glukóza (10 mM), pH bylo upraveno na 7,3 použitím HCl.

3.3.1.2. Intracelulární roztok

Složení ICS: 2,592 g CsCl (154 mM), 0,238 g HEPES (10 mM), 0,418 g EGTA (11 mM) rozpuštěných ve 100 ml deionizované vody. Přídavkem CsOH bylo pH roztoku upraveno na 7,3. Roztok byl rozpipetován do eppendorfek a uložen při -80°C. Pro „ramp protokol“ byl místo CsCl použit NaCl (145 mM) a pH upraveno použitím NaOH na 7,3.

3.3.1.3. Aplikační roztoky

Jako aplikační roztok byl používán ATP či ortosterických agonistů (2-MeSATP, ATP γ S, α,β -meATP a BzATP) o koncentracích 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 a 1000 μ M. Aplikační roztoky byly připravovány před každým pokusem čerstvé ze zásobních roztoků rozpuštěním v ECS. Aplikačním roztokům s vysokou koncentrací agonisty

(100 až 1000 μM) bylo kontrolováno pH a v případě potřeby upraveno NaOH na hodnotu 7,3. Zásobní roztoky ATP a ortosterických agonistů v deionizované vodě o koncentracích 100 mM a 10 mM byly uchovávány v -80°C .

V některých pokusech byl aplikován také ivermektin o koncentraci 3 μM . Roztok ivermektinu v ECS byl také před každým pokusem připravován čerstvý. Jako zásobní roztok byl při 4°C uchováván 20 mM roztok ivermektinu v dimetylsulfoxidu (DMSO). Vzhledem k nestabilitě ivermektinu byl roztok připravován 2x měsíčně. Koncentrace DMSO v aplikačním roztoku ivermektinu nepřesáhla 1%. V této koncentraci nemá DMSO vliv na odpovědi P2X4R stimulovaného ATP (Khakh a kol., 1999b).

3.3.2. Snímání signálů z buněk

Při aktivaci P2X4R a otevření jeho póru se mění iontová rovnováha v buňce a lze tak snímat odpovědi na podnět ve formě miniaturního elektrického proudu (řádově v jednotkách pA až nA). Proudové odpovědi byly snímány z celých buněk po stimulaci ATP patch-clamp technikou. Měření bylo prováděno na HEK293T buňkách 20-48 hodin po transfekci. Jedno 12 mm poly-L-lysinové sklíčko s buňkami bylo umístěno ve stále proudícím ECS (cca 1ml/min) v komůrce o objemu cca 3 ml. Proudění ECS bylo zajištěno aplikačním systémem RSC-200 Rapid Solution Changer System (*BIO-LOGIC, Claix, Francie*) a odsáváním pomocí vodní vývěvy.

V měřicí komůrce byla umístěna referenční argentchloridová elektroda a vodivé spojení s vnitřním prostředím buňky bylo zajištěno druhou argentchloridovou elektrodou ponořenou do ICS ve skleněné mikropipetě. Mikropipety byly vyrobeny z trubiček z borosilikátového skla (*World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA*) s vnějším průměrem 1,65 mm a tloušťkou stěny 0,2 mm. Do potřebného tvaru byly formovány pomocí horizontálního tahače (*model P-97, Sutter Instruments, Novato, CA, USA*). Jejich ostrá špička byla nakonec otavena pomocí „mikrokovárny“ (*model MF-830, Narishige, Tokyo, Japonsko*). Výsledný průměr špičky elektrody se pohyboval mezi 1 a 2 μm . Po naplnění ICS a připojení k systému měly tyto elektrody odpor 3-5 M Ω . Pohyby skleněné elektrody byly při pokusu ovládány pomocí mikromanipulátoru (*model MP-285, Sutter Instrument*).

Špička mikropipety byla lehce přitisknuta k povrchu buňky a jemným podtlakem stabilizována vtažením části buňky do elektrody. Nasátá část membrány byla následně protržena změnou tlaku či působením krátkého elektrického impulsu. Při spojení s vnitřním prostředím buňky bylo napětí na membráně nastaveno na -60 mV, hodnotu blízkou přirozenému membránovému potenciálu buňky. Toto konstantní napětí bylo kontrolováno přes převodník pomocí měřící elektrody.

Odpovědi byly stimulovány aplikačními roztoky s ATP či analogickými agonisty, jejichž přítok byl regulován pomocí ventilového systému BioLogic EVH-9 (*BIO-LOGIC, Claix, Francie*). Vyústění aplikačního systému bylo přibližně 500 μm od a 50 μm nad snímanou buňkou. Výměna celého objemu ECS v okolí buněk trvala 100-300 ms. Odpovědi byly nahrávány pomocí programu Clampex 9.0 (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*) a zesilovače Axopatch-200B (*Axon Instruments, Union City, CA, USA*) přes Besselův filtr na 1kHz. K zesilovači byl připojen drátek měřící argentchloridové elektrody ponořený v ICS a referenční argentchloridová elektroda ponořená v ECS. Snímané proudy byly převedeny na napěťový signál pomocí sondy zesilovače s proudovo-napěťovým převodníkem. Napěťový signál byl zesílen, filtrován a digitalizován (*Digidata 1200, Axon Instruments*).

K měření, které probíhalo za pokojové teploty, byly vybírány buňky o přibližně stejné velikosti, tvaru a míry exprese. K detailnímu pohledu na buňky byl použit mikroskop Olympus (*model IX71, Olympus, Melville, NY, USA*) s objektivy se zvětšením 10 $\times$ a 40 $\times$ a přídavnou lupou zvětšující 2 $\times$. Protože exprese proteinu byla spojena s expresí EGFP, byla míra exprese kontrolována pomocí UV lampy a filtru U-ZWIB2 pro excitační vlnové délky 460-490 nm a emisi při 505 nm.

Vztahy mezi proudem a napětím byly testovány skrze „ramp protokol“ se změnami napětí od -80 mV do +80 mV dvakrát za sekundu a byly použity k určení změn v reverzním potenciálu během 10-30 s aplikace agonisty (Yan a kol., 2008).

3.4. KVANTIFIKACE EXPRESE RECEPTORU

K určení množství mutantních receptorů na povrchu buňky byly všechny membránové proteiny označeny biotinem pomocí PierceH Cell Surface Protein

Isolation Kit podle instrukcí výrobce (*Thermo Fisher Scientific*). Vzorky celkového proteinu byly sbírány po lysi buněk a jejich následné centrifugaci. Membránová frakce byla z lysátu izolována použitím kolonky s navázaným avidinem a následně vymyta pufrem s obsahem dodecylsírany sodného (SDS). Poté byly obě frakce rozděleny elektroforézou v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS, následně přeneseny na PVDF membrány a značeny anti-potkaní P2X4 králičí monoklonální protilátkou (*APR-002; Alomone Labs, Jeruzalém, Izrael*). K detekci byla použita sekundární protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou a luminol. Luminiscenční signál byl snímán luminiscenčním analyzátozem LAS-1000plus (*Fuji Photo Film, Tokyo, Japonsko*). Intenzita bandu byla kvantifikována (denzitometrická analýza) použitím programu Image J (*National Institutes of Health, free public access*). Relativní exprese proteinu na povrchu buňky byla vypočítána jako poměr mezi celkovým signálem P2X4R a signálem z membrány (v arbitrárních denzitometrických jednotkách) s použitím GAPDH jako kontroly pro oba signály.

3.5. HOMOLOGNÍ MODELOVÁNÍ

Identita sekvence mezi rP2X4 (P51577) a zfP2X4.1 (Q6NYR1) je 61%, což umožňuje vytvoření homologního modelu rP2X4R použitím automatizovaného módu SWISS-MODEL serveru (Schwede a kol., 2003). Podklady pro terciární strukturu jsme extrahovali z Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>) pod označením 4DW0 pro receptor v uzavřeném stavu a 4DW1 pro zfP2X4.1 ve stavu s navázaným ATP. Kvalita modelu byla testována programem SWISS-MODEL skrze QMEAN4 skóre, které dosáhlo 0,593 (Benkert a kol., 2008). Schematické obrázky včetně měření vzdáleností mezi AMK byly získány z homologního modelu rP2X4R a zpracovány v programu PyMol v0.99 (*DeLano Scientific LLC; open source*).

3.6. VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ – VÝPOČTY

3.6.1. Maxima a EC_{50}

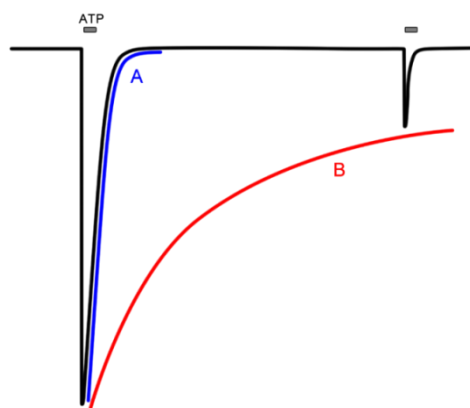
Velikosti vyvolaných odpovědí byly vyhodnocovány v programu ClampFit 9.1 (Axon Instruments). Křivky závislosti odpovědi na podané koncentraci byly získány proložením bodů získaných odpovědí tří parametrickou sigmoidální křivkou v programu SigmaPlot 2000 v9.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) podle rovnice:

$$y = I_{max} \left[\left(\frac{EC_{50}}{x} \right)^h + 1 \right]^{-1}$$

Hodnota y představuje amplitudu proudové odpovědi vyvolané podáním ATP, I_{max} maximální amplitudu proudové odpovědi vyvolané 100 - 1000 μM ATP, EC_{50} koncentraci ATP, při které receptor dosáhne poloviny velikosti maximální amplitudy proudové odpovědi. Proměnná x vyjadřuje podávanou koncentraci ATP. Konstanta h označuje Hillův koeficient, který zde byl pevně stanoven na hodnotu $h = 1,3$. Tato hodnota pro Hillův koeficient byla stanovena experimentálně pro WT rP2X4R v rozsáhlém souboru hodnot měřených v laboratoři Buněčné a molekulární neuroendokrinologie na Fyziologickém ústavu Akademie Věd.

3.6.2. Deaktivace a desenzitizace

Pokles odpovědi po odmytí nízké (nedesenzitizující) koncentrace agonisty (obvykle 1-3 μM ATP) charakterizuje deaktivaci receptoru a pokles odpovědi při dlouhodobé aplikaci vysoké koncentrace (100 - 300 μM ATP) jeho desenzitizaci (Obr. 10). Průběh deaktivace a desenzitizace byl vyhodnocován proložením jedno nebo



Obrázek 10:

Deaktivace a desenzitizace.

Fiktivní trasa ukazuje kinetické faktory chování P2X4R. Po krátké aplikaci agonisty (2 s; ATP) následuje deaktivace (zavírání receptoru; modrá křivka), další odpověď na 2 s aplikaci vyvolá menší odpověď, jejíž amplituda odráží míru desenzitizace znečitlivěného receptoru. Dlouhotrvající aplikace agonisty vyvolává kontinuální pokles odpovědi (červená křivka), ze kterého lze zjistit časovou konstantu desenzitizace.

dvojexponenciální funkce nejlépe popisující odpověď v programu ClampFit 10.0.0.61. Časová konstanta deaktivace či desenzitizace pak byla vypočítána z rovnice:

$$y = A_1 \cdot e^{-(t/\tau_2)} + A_2 \cdot e^{-(t/\tau_1)}$$

Hodnota $A_{1,2}$ představuje amplitudu proudové odpovědi první nebo druhé exponenciály a $\tau_{1,2}$ jsou časové konstanty. Proměnná t je čas v bodě y . Takto vypočtená časová konstanta je značena jako τ_{off} pro deaktivaci a τ_{des} pro desenzitizaci (pro deaktivaci byly použity jednoexponenciální funkce, pro desenzitizaci dvojexponenciální; τ_{des} je tedy vážená časová konstanta desenzitizace).

3.6.3. Statistika a zpracování

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka (SEM). Statisticky významné odlišnosti byly vyhodnoceny tabulkou ANOVA a následným Tukeyovým testem na uvedené hladině významnosti v programu SigmaStat 9 (SPSS). Diferenciální rovnice použité pro matematický model kinetického chování byly řešeny použitím XPPAUT (<http://www.math.pitt.edu/~bard/xpp/xpp.html>) a MATLABu (MathWorks, Natick, MA, USA).

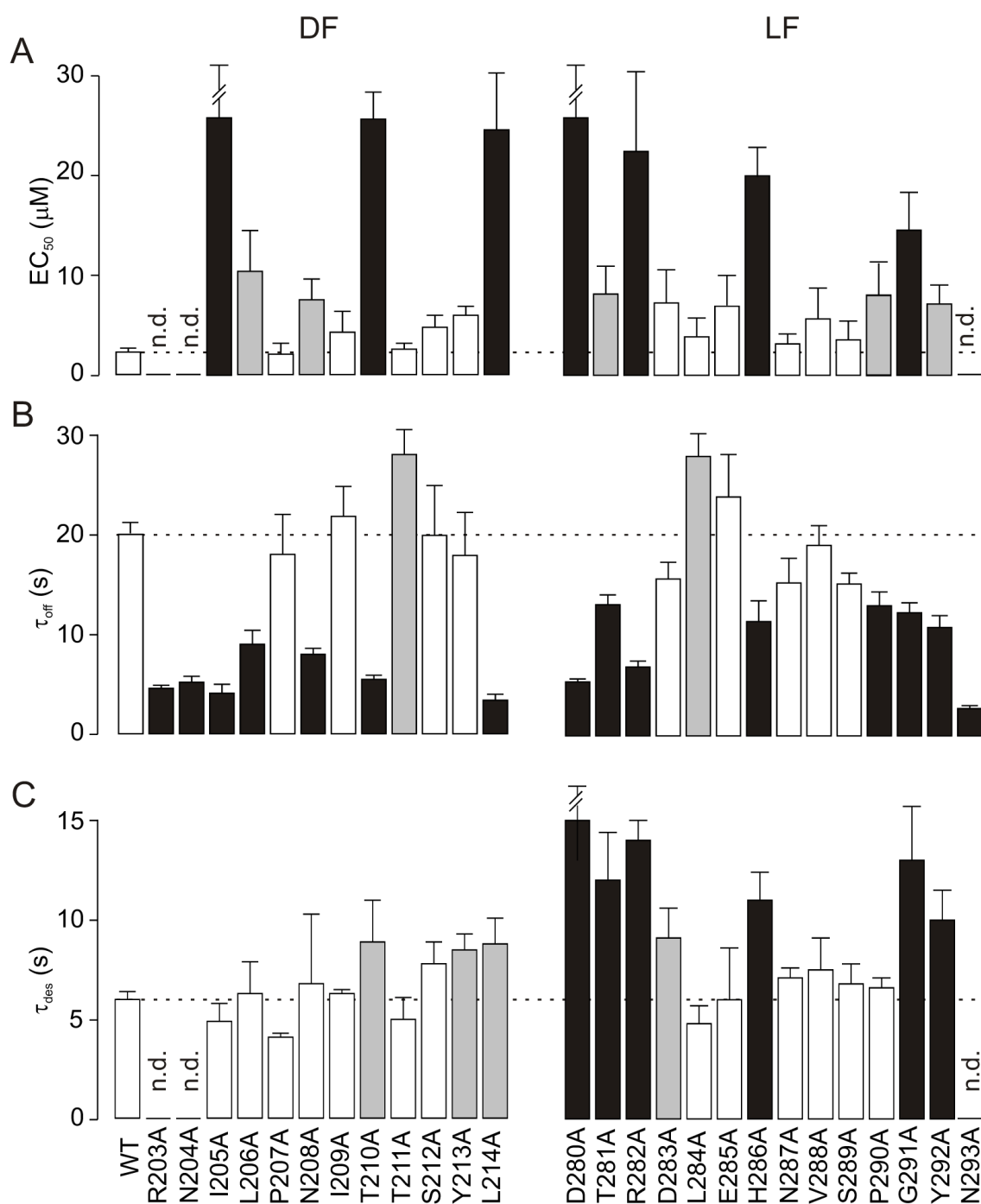
4. VÝSLEDKY

4.1. ROLE AMK FORMUJÍCÍCH STYČNÉ PLOCHY MEZI LEVOU A HŘBETNÍ PLOUTVÍ

Oblast styčných ploch mezi dvěma sousedními podjednotkami, tvořená sekvencemi R203-L214 (DF) a D280-N293 (LF) se nachází v extracelulární doméně P2X4R v těsné blízkosti ATP-vazebné kapsy a formuje její část. Přitom se jedná o vysoce variabilní oblast složenou převážně z řetězců bez definované sekundární struktury. Z celkového počtu 26 AMK, které tvoří styčnou plochu mezi LF a DF, jsou jen tři konzervované: N204, G291 a N293 (Obr. 6B). Několik posledních AMK v řetězci DF formuje α -helix (od T210/T211), na němž je umístěna i leucin 214 (L217 v zřP2X4), který by podle autorů krystalové studie mohl být v kontaktu s molekulou ATP ve vazebné kapse (Hattori a Gouaux, 2012). Pro srovnání jsme do studie zahrnuli i pokračování řetězce LF, kde se na β -listu nachází konzervovaná AMK N293, která byla již dříve označena jako ATP-vazebná (Hattori a Gouaux, 2012), ale elektrofyziologicky dosud nebyla zkoumána. Každou jednotlivou AMK v obou řetězcích jsme zaměnili za alanin, vytvořené konstrukty DNA a WT jsme vnesli do buněk typu HEK293T a elektrofyziologicky jsme zkoumali transmembránové proudy stimulované aplikací ATP. Měřena byla charakteristika závislosti odpovědi na dávce ATP, velikost maximální amplitudy proudu ($I_{\max}$) a jeho potenciace po inkubaci v ivermektinu, časová konstanta deaktivace (τ_{off}) a desenzitizace (τ_{des}). Tyto výsledky shrnuje Tabulka 2 a Obr. 11.

4.1.1. Citlivost alaninových mutací k ATP a maximální proudová odpověď

Charakteristika závislosti odpovědi na dávce ATP byla měřena snímáním odpovědi po podání různých koncentrací ATP, od 1 μM do 100-300 μM . Získaná data byla vynesena do grafu, proložena sigmoidální křivkou a výpočtem byla zjištěna koncentrace ATP, při které bylo dosaženo poloviny velikosti maximální amplitudy proudové odpovědi (EC_{50} ; hodnoty Obr. 11A; v detailu pak Obr. 12C, D).



Obrázek 11: Identifikace klíčových AMK v LF a DF rP2X4R.

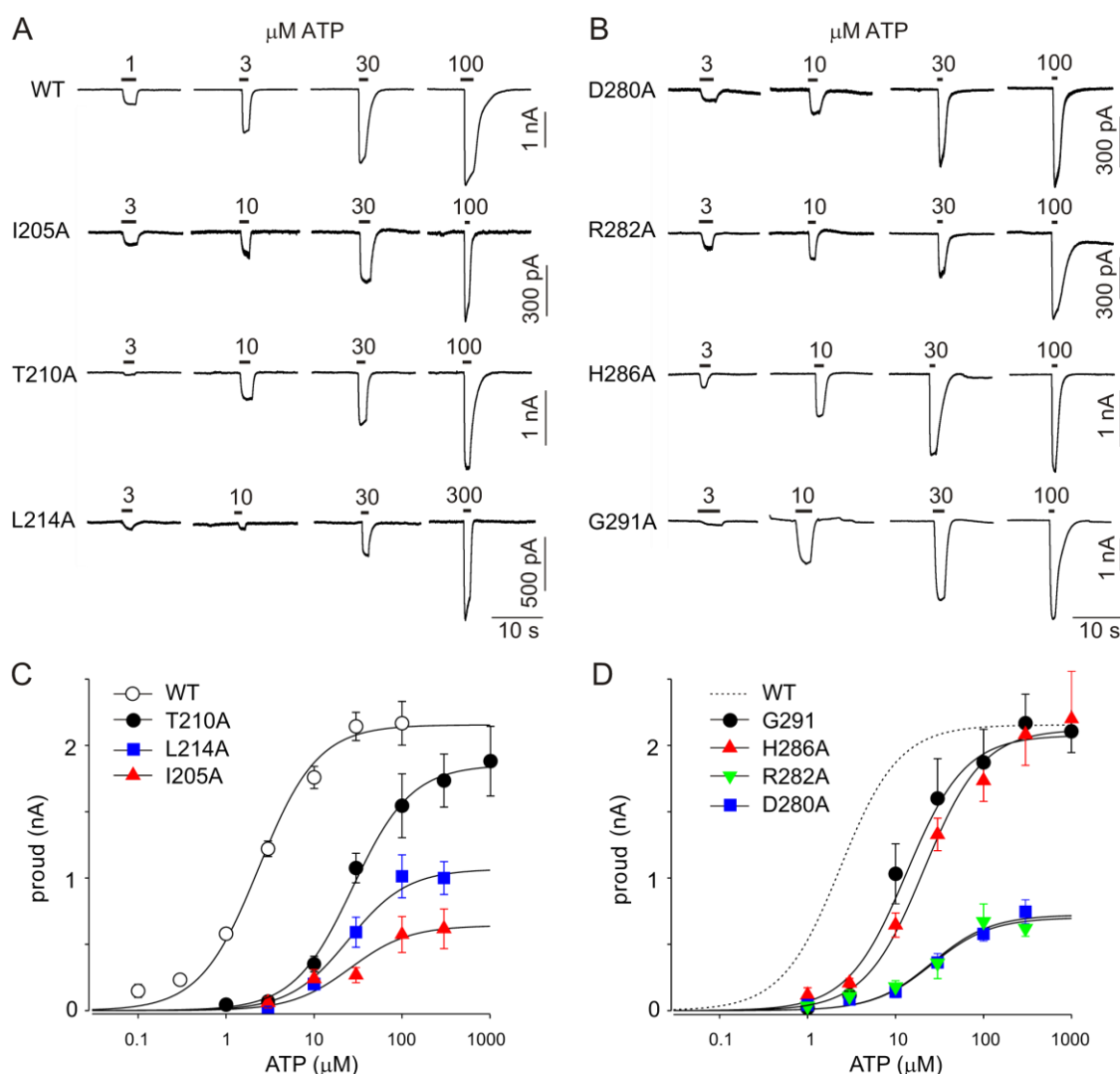
Vliv záměny za alanin na citlivost k ATP (EC₅₀; panel A), časovou konstantu deaktivace (τ_{off}; panel B) a váženou časovou konstantu desenzitizace (τ_{des}; panel C). Hodnoty jsou presentovány jako průměr ± SEM. Signifikantní rozdíly vůči WT byly testovány použitím ANOVY a jsou vyznačeny barvami sloupců, šedou (p < 0,05) a černou (p < 0,01). Tečkovaná linie představuje hodnotu pro WT. Některé hodnoty nemohly být definovány z důvodu příliš nízkých proudů (n.d.).

Tabulka 2: Elektrofyzilogická charakterizace alaninových mutací LF a DF.

U každé mutace jsme zjišťovali citlivost ATP (EC_{50}) a účinnost ATP (I_{max}) podáváním různých koncentrací ATP, maximálně 100-300 μM . Maximální proudy byly vyhodnocovány i po 4-6 minutách preinkubace ivermektinu ($I_{max+IVM}$), následně jsme vypočetli nárůst odpovědi (nárůst I_{max}). Časovou konstantu deaktivace (τ_{off}) jsme vyhodnocovali skrze monoexponenciální fitování odpovědi na nedesenzitizující koncentraci ATP (1-3 μM) po 4-6 minutách preinkubace s ivermektinem. Váženou časovou konstantu desenzitizace (τ_{des}) jsme získali biexponenciálním fitováním trasy získané podáním 100 μM ATP po dobu 60 s. Hodnoty jsou presentovány jako průměr $\pm$ SEM z 21-63 měření u mutace a 267 měření u WT. Signifikantní rozdíly vůči WT byly testovány použitím ANOVY, **p < 0,01; *p < 0,05. n.d. – hodnoty nemohly být definovány

Receptor	EC_{50} [μM]	I_{max} [nA]	$I_{max+IVM}$ [nA]	nárůst I_{max}	$\tau_{off+IVM}$ [s]	τ_{des} [s]
WT-P2X4	2,3 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 1,0	6,0 $\pm$ 0,4
DF						
R203A	n.d.	0,2 $\pm$ 0,1**	2,9 $\pm$ 0,6	16 $\pm$ 5,0**	4,6 $\pm$ 0,3**	n.d.
N204A	n.d.	0,2 $\pm$ 0,2**	2,5 $\pm$ 0,4	15 $\pm$ 5,0**	5,2 $\pm$ 0,6**	n.d.
I205A	26 $\pm$ 7,7**	0,6 $\pm$ 0,13**	4,3 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 0,6**	4,1 $\pm$ 0,9**	4,9 $\pm$ 0,9,
L206A	10 $\pm$ 4,1*	2,4 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,8	1,7 $\pm$ 0,2	9,0 $\pm$ 1,4**	6,3 $\pm$ 1,6
P207A	2,1 $\pm$ 1,1	2,2 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,3	18, $\pm$ 4,0	4,1 $\pm$ 0,2
N208A	6,1 $\pm$ 2,1*	1,7 $\pm$ 0,3	3,6 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,5	9,1 $\pm$ 0,2**	6,8 $\pm$ 3,5
I209A	4,3 $\pm$ 2,1	1,9 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,3	22 $\pm$ 3,0	6,3 $\pm$ 0,2
T210A	26 $\pm$ 2,6**	1,9 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,4**	8,9 $\pm$ 2,1*
T211A	2,6 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 0,3	3,9 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,3	28 $\pm$ 2,5*	5,0 $\pm$ 1,1
S212A	4,8 $\pm$ 1,2	2,1 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 5,0	7,8 $\pm$ 1,1
Y213A	6,0 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 4,3	8,5 $\pm$ 0,8*
L214A	25 $\pm$ 5,7**	1,0 $\pm$ 0,2**	3,9 $\pm$ 0,8	3,7 $\pm$ 0,7**	3,4 $\pm$ 0,6**	8,8 $\pm$ 1,3*
LF						
D280A	26 $\pm$ 8,2**	0,7 $\pm$ 0,1**	3,6 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,5**	5,5 $\pm$ 0,3**	15 $\pm$ 3,7**
T281A	8,2 $\pm$ 2,8*	2,3 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,9	2,1 $\pm$ 0,2	13 $\pm$ 1,0**	12 $\pm$ 2,4**
R282A	23 $\pm$ 8,0**	0,7 $\pm$ 0,1**	4,5 $\pm$ 0,5	9,6 $\pm$ 2,5**	7,0 $\pm$ 0,6**	14 $\pm$ 1,0**
D283A	7,3 $\pm$ 3,4	2,2 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,1	16 $\pm$ 1,7	9,1 $\pm$ 1,5*
L284A	3,9 $\pm$ 1,9	2,4 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,1	28 $\pm$ 2,3*	4,8 $\pm$ 0,9
E285A	7,1 $\pm$ 3,0	2,0 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,4	24 $\pm$ 4,3	6,0 $\pm$ 2,6
H286A	20 $\pm$ 2,9**	2,2 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,3	12 $\pm$ 2,1**	11 $\pm$ 1,4**
N287A	3,2 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,4	16 $\pm$ 2,5	7,1 $\pm$ 0,5
V288A	5,7 $\pm$ 3,1	1,3 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 0,3	19 $\pm$ 2,0	7,5 $\pm$ 1,6
S289A	3,6 $\pm$ 1,9	1,4 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 1,1	3,2 $\pm$ 0,2	15 $\pm$ 1,1	6,8 $\pm$ 1,0
P290A	8,0 $\pm$ 3,4*	0,9 $\pm$ 0,1**	3,3 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,2	13 $\pm$ 1,4**	6,6 $\pm$ 0,5
G291A	15 $\pm$ 3,8**	2,1 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,02	13 $\pm$ 1,0**	13 $\pm$ 2,7**
Y292A	7,2 $\pm$ 1,9*	1,9 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,3	11 $\pm$ 1,2**	10 $\pm$ 1,5**
N293A	n.d.	0,1 $\pm$ 0,02**	2,0 $\pm$ 0,5**	14 $\pm$ 1,1**	2,8 $\pm$ 0,2**	n.d.

$I_{\max}$ byla stimulovaná aplikací 100 μM ATP, u méně citlivých mutací 300 - 1000 μM ATP, na buňku nesoucí naivní (dříve nestimulovaný) receptor. K významným změnám v citlivosti nedošlo u mutací P207A, I209A, T211A, S212A, Y213A, D283A, L284A, E285A, N287A, V288A a S298A. U těchto mutací nedošlo ani k žádné významné změně ve velikosti maximální proudové odpovědi. U tří mutací (R203A, N204A a N293A) jsme nemohli definovat EC_{50} (Obr. 11A) z důvodu velmi nízkých



Obrázek 12: Změna citlivosti mutací v LF a DF.

A,B) Příklady zaznamenaných tras z buněk exprimujících WT receptor a DF mutace zastoupené I205A, T210A a L214A (A) a LF mutace zastoupené D280A, R282A, H286A a G291A (B). Proudly byly vyvolávány krátkým (2-5 s) podáním ATP o různé koncentraci (1, 3, 10, 30 a 100 μM ; indikováno čarami). Experimenty byly prováděny na naivních receptorech, uvedené trasy jsou z různých buněk. **C,D)** Křivky závislosti účinku na podané koncentraci ATP pro WT a DF mutace I205A, T210A a L214A (C) a LF mutace D280A, R282A, H286A a G291A (D). Data jsou prezentována jako průměr $\pm$ SEM ze 7-35 měření pro mutaci a koncentraci a 78 pro WT.

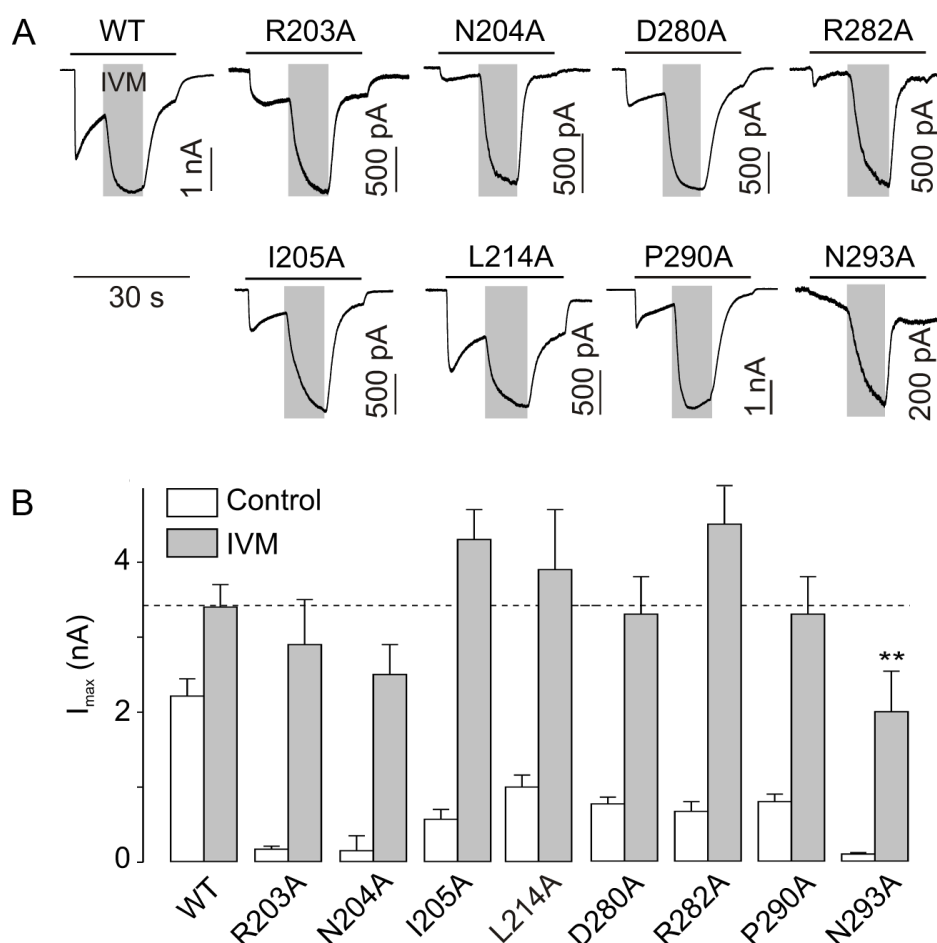
odpovědí ($I_{\max} \leq 0,2$ nA), u těchto mutací jsme mohli pouze konstatovat, že mají sníženou účinnost ATP. Dalších 7 mutací mělo EC_{50} nejméně 7x vyšší než WT (I205A, T210A, L214A, D280A, R282A, H286A a G291A; Obr. 12C, D). Snížená citlivost vůči ATP je často spjata s jeho sníženou účinností, což ale neplatí u mutací T210A, H286A a G291A, kde byla $I_{\max}$ srovnatelná s maximální odpovědí WT receptoru. O něco méně, ale přesto signifikantně ($p < 0,05$), byla snížena citlivost u mutací L206A, N208A, T281A, P290A a Y292A. Ve studovaném souboru 26 alaninových mutací styčné plochy se tak vyskytuje 15 mutací s významně změněnou citlivostí nebo účinností ATP.

4.1.2. Charakterizace nefunkčních a málo funkčních mutací analýzou pozitivního modulačního účinku ivermektinu

P2X4R jsme si vybrali ke studium mimo jiné pro jeho citlivost k ivermektinu. Ivermektin je velká lipofilní molekula, která se na P2X4R váže jako pozitivní alosterický modulátor (Khakh a kol., 1999b). Ivermektin působí skrze kontakt s TM (Jelinkova a kol., 2006; Silberberg a kol., 2007) a není schopen kanál sám otevřít. Jeho efekt se projevuje zvýšením maximální proudové amplitudy a po preinkubaci (4-6 minut) také prodloužením doby deaktivace (Priel a Silberberg, 2004; Jelinkova a kol., 2006; Zemkova a kol., 2014). Může tak být použit pro testování mutací, které se jeví jako nefunkční, protože mají příliš malé odpovědi. Neumí ale navýšit odpovědi mutovaných receptorů, které nevážou ATP, nejsou správně složeny či nebyly transportovány do membrány.

Potenciál ivermektinu jsme plně využili při testování mutací s malými odpověďmi: R203A, N204A, I205A, L214A, D280A, R282A, P290A a N293A. Při akutní aplikaci, kdy byl ivermektin o koncentraci 3 μ M aplikován po 10 s během aplikace 100 μ M ATP, bylo možné $I_{\max}$ všech zmíněných mutací výrazně navýšit (Obr. 13A). Pro statistické vyhodnocení účinku ivermektinu jsme použili dlouhodobý protokol, kdy byly buňky preinkubovány v ivermektinu po 4-6 minut a poté byla měřena hodnota $I_{\max}$. Výsledky uvedené na Obr. 13B a v Tabulce 2 jasně ukazují, že proudové odpovědi všech mutací, vyjma N293A, bylo možné skrze ivermektin navýšit na hodnoty srovnatelné

s hodnotami pro WT. Mutaci N293A nebylo možné do takové míry navýšit, což je ve shodě s rolí asparaginu 293 v kontaktu s ATP.



Obrázek 13: Potenciační efekt ivermektinu na proudy málo funkčních mutací LF a DF.

A) Akutní aplikace 3 μ M ivermektinu po 10 s (šedá oblast) v průběhu aplikace 100 μ M ATP (30 s, horizontála) v buňkách exprimujících WT či mutace LF (R203A, N204A, I205A, L214A) a DF (D280A, R282A, P290A, N293A). Trasy jsou příkladem ze 3-5 podobných záznamů pro mutaci a 30 pro WT. **B)** Graf ukazuje celkový efekt dlouhodobé aplikace (4-6 minut) ivermektinu na navýšení odpovědi receptoru (šrafované sloupce). Při dlouhodobé aplikaci ivermektinu byly navýšeny všechny mutace s nízkými proudy na hodnotu blízkou WT (horizontální tečkovaná čára) s výjimkou mutace AMK, která je v kontaktu s ATP (N293A a K67A). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SEM z 5-8 měření pro mutaci a 15 pro WT. Signifikantní rozdíly vůči WT byly testovány ANOVOU (** $p < 0,01$).

Ivermektin v dlouhodobém protokolu také prodlužoval časovou konstantu deaktivace. Zkrácení časové konstanty deaktivace je spjato se změnou citlivosti mutovaného receptoru vůči ATP. Jedná se o přímou úměru – kratší časová konstanta deaktivace ukazuje na nižší citlivost receptoru a naopak. Toho lze vzhledem

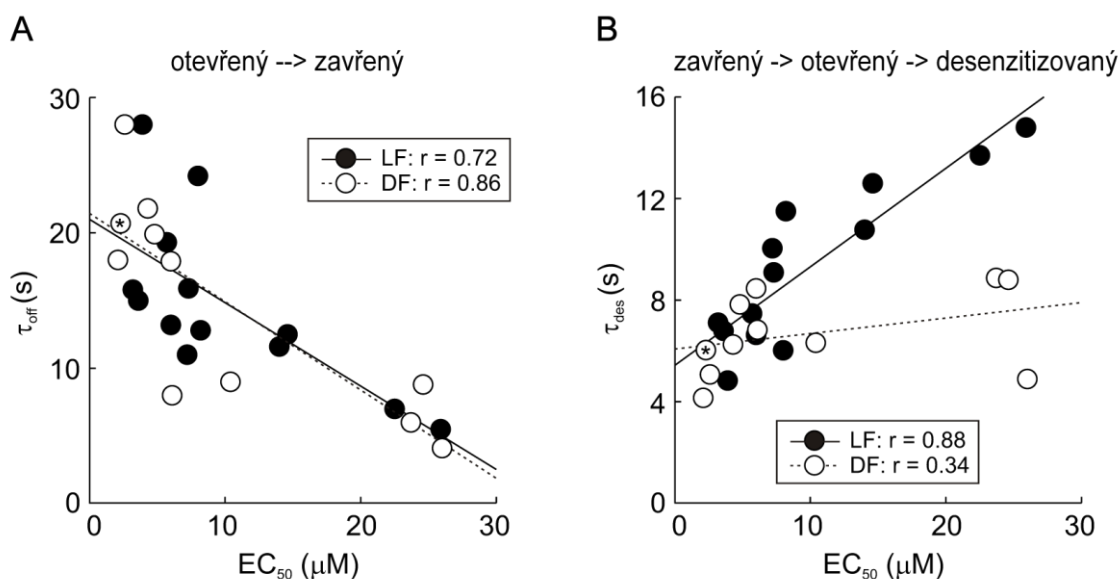
k potenciačním účinkům ivermektinu na výši amplitudy využít i pro mutace, které se jeví jako nefunkční z důvodu nízkých proudových odpovědí (Priel a Silberberg, 2004; Jelinkova a kol., 2006; Zemkova a kol., 2014). Pro otestování změn v citlivosti byly buňky transfekovány mutovanou DNA či WT a preinkubovány po dobu 4-6 minut s 3 μM ivermektinem. Následně byly stimulovány nedesenzitizující koncentrací ATP (1 nebo 3 μM). Pokles odpovědi po odmytí agonisty byl proložen monoexponenciální funkcí, ze které byla určena časová deaktivací konstanta (τ_{off}) daného receptoru (Obr. 11B a Tabulka 2).

Mutace v oblasti DF ukázaly velké změny v deaktivaci ve srovnání s WT, více než polovina mutací tohoto řetězce měla τ_{off} významně zkrácenou: R203A, N204A, I205A, L206A, N208A, T210A a L214A. V oblasti LF byla hodnota τ_{off} významně snížena ($p < 0,01$) u D280A, T281A, R282A, H286A, P290A, G291A, Y292A a N293A. Tato data potvrzují u jmenovaných mutací jejich sníženou citlivost vůči ATP. U dvou mutací, T211A a L284A, jsme zaznamenali s nižší signifikancí ($p < 0,05$) zvýšenou časovou konstantu deaktivace. Při vynesení τ_{off} do grafu proti EC_{50} je vidět dobrá korelace hodnot v obou řetězcích (Obr. 14A). Tato data potvrdila sníženou citlivost vůči ATP u mutací, u kterých byla naměřena zvýšená hodnota EC_{50} , a prokázala sníženou citlivost u nefunkčních a málo funkčních mutací, u kterých EC_{50} nemohla být změřena.

4.1.3. Rychlost desenzitizace alaninových mutací a rozdíly mezi levou a hřbetní ploutví

Dále jsme studovali vliv záměny jednotlivých AMK v LF a DF za alanin na kinetiku desenzitizace. V přítomnosti 100 μM ATP po dobu 60 s, proud WT receptoru klesal biexponenciálně s $\tau_{\text{des1}} = 1,3 \pm 0,2$ s a $\tau_{\text{des2}} = 9,0 \pm 0,7$ s; pomalejší komponenta se podílela na poklesu $63 \pm 3,0$ %. U všech mutací byl pokles odpovědi v průběhu měření také biexponenciální, ale v některých případech bylo možné pokles lépe popsat monoexponenciální funkcí, proto jsme pro srovnání mezi mutacemi a WT počítali s váženou konstantou desenzitizace (WT $\tau_{\text{des}} = 6,0 \pm 0,4$ s; Obr. 11C a Tabulka 2). Mutace D280A, T281A, R282A, D283A, H286A, G291A a Y292A (LF) vykazovaly 1,5-2,6x

zpomalenou desenzitizační kinetiku. Méně signifikantně ($p < 0,05$) pak byly prodloužené desenzitizace některých mutací v DF (T210A, Y213A a L214A).



Obrázek 14: Závislost deaktivace a desenzitizace na citlivosti k ATP.

Korelace závislosti deaktivace (A) a desenzitizace (B) na citlivosti receptoru k ATP. Mutace levé ploutve (LF) jsou zobrazeny jako plné kruhy, hřbetní ploutev (DF) pak prázdnými kruhy. WT je označen hvězdičkou. Ke korelaci byly použity hodnoty uvedené v Tabulce 2 a výpočet byl proveden v programu SigmaPlot (viz metody).

U zbylých mutací (I205A, L206A, I207A, N208A, I209A, T211A, S212A, L284A, E285A, N287A, V288A, S289A a P290A) jsme nenašli žádnou výraznější změnu rychlosti desenzitizace. Při vynesení hodnot τ_{des} proti hodnotám EC_{50} jednotlivých receptorů do grafu jsme našli silnou korelaci mezi hodnotami pro LF, nikoli pro DF (Obr. 14B). Tyto výsledky ukázaly, že na kontrole desenzitizace se podílí významně oblast LF, nikoli ale DF, a odpovědné jsou skupiny AMK, spíše než jednotlivé, AMK.

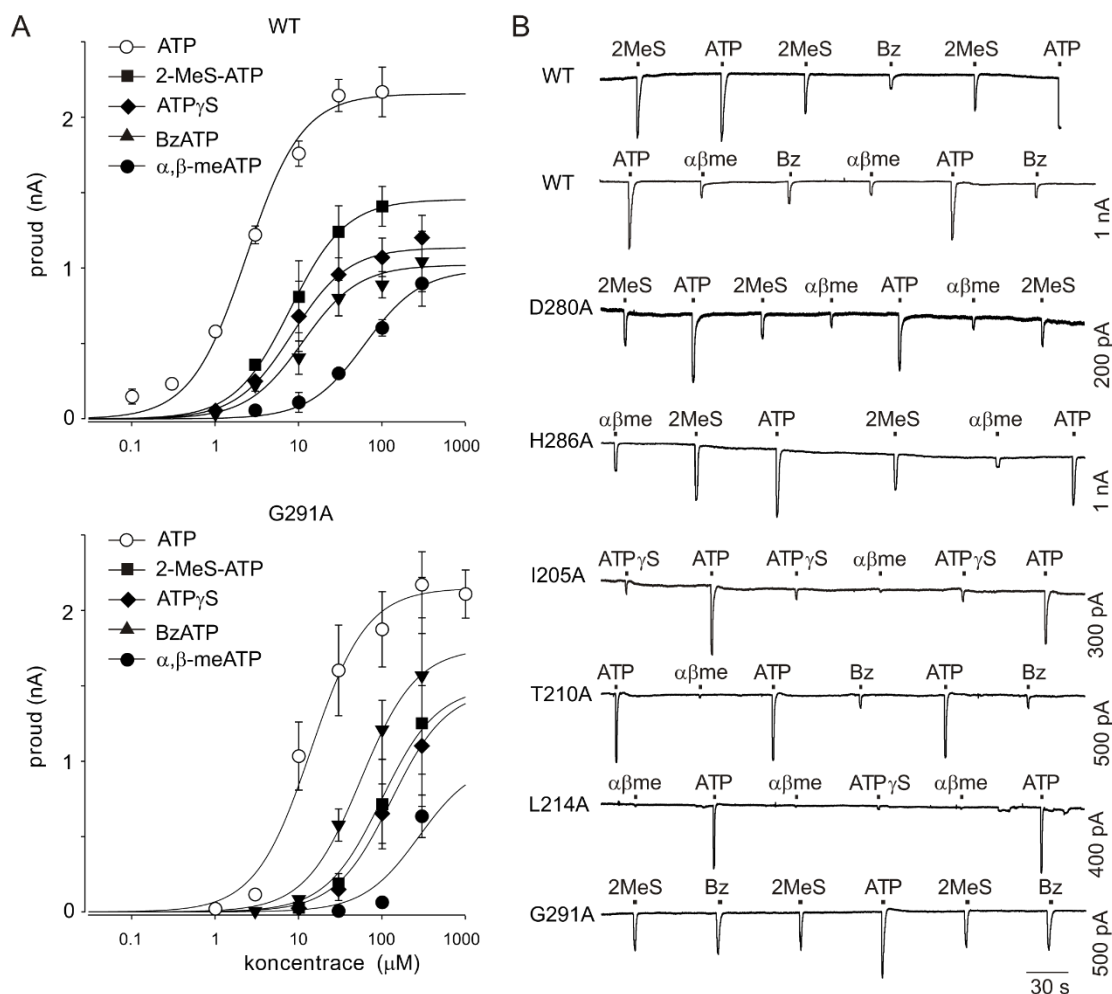
4.1.4. Změny v odpovědích ortosterických agonistů u mutovaných receptorů

Jak již bylo zmíněno výše, řetězce LF a DF částečně formují ATP-vazebnou kapsu. Zároveň se jedná o variabilní řetězce bez výraznější sekundární struktury. Lze tedy očekávat, že budou mít vliv na přesné formování ATP-vazebné kapsy a že záměny jednotlivých AMK za alanin mohou vyvolat změny ve tvaru kapsy, které budou mít za následek změny v účinnosti různých agonistů. Pro tato měření jsme použili čtyři

ortosterické analogy ATP, které působí jako parciální agonisté P2X4R: 2-MeSATP, ATP γ S, BzATP a α,β -meATP (EC_{50} pro WT: 2-MeS-ATP = $7,9 \pm 1,0 \mu\text{M}$; ATP γ S = $8,4 \pm 1,8 \mu\text{M}$; BzATP = $11,1 \pm 2,9 \mu\text{M}$; α,β -meATP = $62 \pm 18 \mu\text{M}$; Obr. 15A, horní panel). Agonisté a ATP byli aplikováni v koncentraci $100 \mu\text{M}$ a následně byl počítán poměr mezi odpovědí vyvolanou ATP a odpovědí vyvolanou analogickým agonistou. Ačkoli tato koncentrace není pro všechny mutace maximálně účinná, je z křivek závislosti vyvolané odpovědi na podané koncentraci u mutace G291A s výrazným posunem EC_{50} (Obr. 15A, dolní panel) jasně vidět, že $100 \mu\text{M}$ koncentrace je stále ideální k rozlišení rozdílu jejich odpovědí na ATP a na parciálního agonistu. Výsledné poměry pak byly porovnávány s poměry naměřenými stejným postupem u WT receptoru (ATP (100 %) > 2-MeS-ATP (67 %) > ATP γ S (50 %) > BzATP (38 %) > α,β -meATP (32 %)). Pro pokusy s ortosterickými agonisty jsme vybrali všechny mutace, u kterých byla významně změněna EC_{50} nebo τ_{off} (I205A, L206A, N208A, T210A, L214A, D280A, T281A, R282A, H286A, P290A, G291A, Y292A). Vzhledem k nižší účinnosti parciálních agonistů nemohly být takto testovány mutace s nízkými proudovými odpověďmi. Jako kontrolu jsme do pokusu zahrnuli i několik dalších mutací, které nevykazovaly změněnou citlivost k ATP (T211A, S212A, Y213A a L284A).

Získaná data můžeme rozdělit do tří skupin uvedených v Tabulce 3. Ve skupině I jsou mutace, u kterých jsme zachytili významné změny v odpovědích na agonisty ve srovnání s WT receptorem: I205A, T210A, L214A, P290A, G291A a Y292A. U mutací I205A a L214A se jednalo o komplexní snížení odpovědí všech agonistů při přetrvávající dominanci 2-MeSATP. U dalších čtyř mutací, T210A, P290A, G291A a Y292A, došlo k ojedinělým propadům či navýšením u některého z agonistů.

Mutace na pozici 210 a 291 ale výrazně ovlivnily i pořadí agonistů: u T210A přeskočilo BzATP účinnějšího agonistu ATP γ S (ATP > 2-MeSATP (59%) > BzATP (24%) > ATP γ S (17%) > α,β -meATP (9%)). Výměna glycinu na pozici 291 za alanin pak vedla k úplně novému profilu agonistů: ATP > BzATP (53%) > 2-MeSATP (37%) > ATP γ S (32%) > α,β -meATP (3%), kde navíc byla odpověď na podání α,β -meATP silně utlumená. Tato data ukázala možné ovlivnění formování ATP-vazebné kapsy skrze variabilní řetězce LF a DF.



Obrázek 15: Odpovědi WT a vybraných mutovaných receptorů na analogické agonisty ve srovnání s ATP.

A) Křivky závislosti odpovědi na podanou koncentraci ATP a jeho analogů pro WT a mutaci G291A.

B) Ukázky odpovědi na ATP a ortosterické agonisty 2-MeS-ATP (2MeS), ATP γ S, BzATP (Bz) a α,β -meATP ($\alpha\beta$ me), aplikované vždy v koncentraci 100 μ M nahrané z buněk exprimujících WT a vybrané mutace ze skupiny I (D280A, H286A) a skupiny II (I205A, T210A, L214A a G291A). Každá trasa představuje nepřetržitý záznam z jedné buňky. Krátké (2 s) aplikace agonistů (100 μ M) byly střídání s promýváním ECS (60 s).

Ve skupině II jsou soustředěny mutace, u kterých jsme zjistili změny v EC_{50} a/nebo τ_{off} , ale odpovědi ortosterických agonistů v poměru k ATP u nich nebyly změněny (L206A, N208A, D280A, T281A, R282A, H286A). Změny v odpovědi na ATP, ale zachování veškerých poměrů dalších agonistů vůči ATP ukazují na neúčast v procesu rozlišení agonisty a na možnost ovlivnění předávání informace skrze protein.

Tabulka 3: Percentuální odpovědi ortosterických agonistů ve srovnání s ATP pro WT a vybrané mutované receptory.

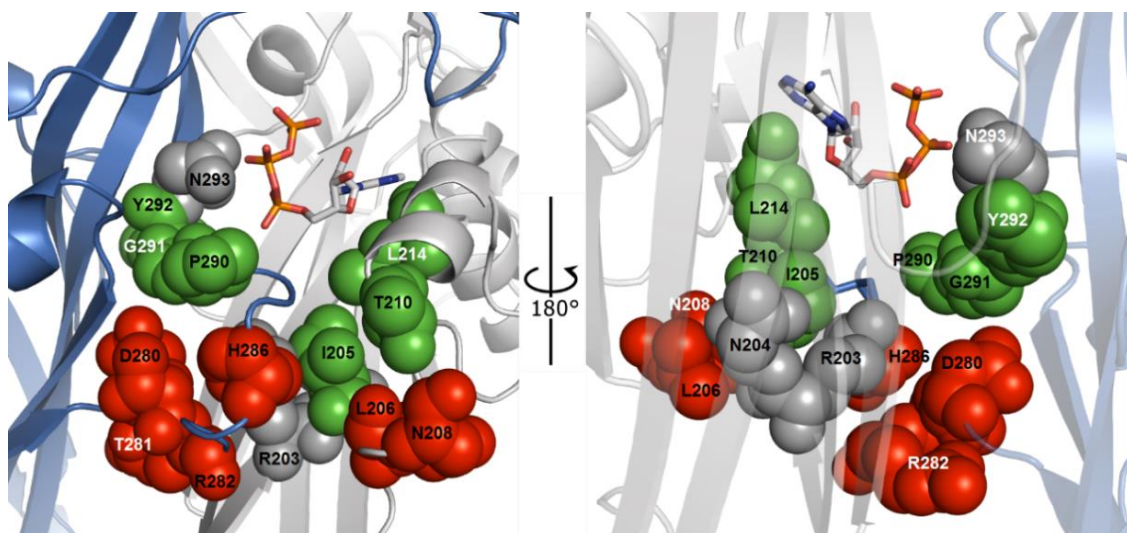
Hodnoty, relativní odpověď ku ATP (100%), jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SEM pro 26-37 měření pro WT a 3-18 měření pro mutaci. *Skupina I:* Mutace vykazují změny v citlivosti/účinnosti ATP a také v odpovědích ortosterických agonistů. *Skupina II:* Mutace vykazující změny v citlivosti/účinnosti ATP, ale ne v percentuálních odpovědích ortosterických agonistů. *Skupina III:* Mutace bez signifikantních změn v citlivosti/účinnosti ATP. Statistická signifikance byla vyhodnocovaná ANOVOU srovnáním odpovědí agonistů mezi WT a mutacemi. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Receptor	doména	2-MeS-ATP	ATP γ S	BzATP	α,β -meATP
WT		67.3 $\pm$ 4.6	49.6 $\pm$ 3.5	38.2 $\pm$ 3.4	31.8 $\pm$ 3.3
<i>skupina I</i>					
I205A	DF	35.6 $\pm$ 1.9**	11.3 $\pm$ 2.2**	4.4 $\pm$ 2.6**	4.6 $\pm$ 1.0**
T210A	DF	59.2 $\pm$ 6.9	27.2 $\pm$ 3.2**	23.9 $\pm$ 3.2**	8.8 $\pm$ 2.3**
L214A	DF	21.4 $\pm$ 1.7**	7.9 $\pm$ 2.0**	5.9 $\pm$ 0.5**	6.5 $\pm$ 1.5**
P290A	LF	50.7 $\pm$ 3.7	37.0 $\pm$ 11.0	16.9 $\pm$ 3.2**	17.8 $\pm$ 2.4**
G291A	LF	36.9 $\pm$ 8.8**	31.6 $\pm$ 6.1*	53.0 $\pm$ 4.0**	2.8 $\pm$ 0.5**
Y292A	LF	49.8 $\pm$ 8.6	42.3 $\pm$ 7.0	28.9 $\pm$ 8.2	16.2 $\pm$ 4.4**
<i>skupina II</i>					
L206A	DF	68.3 $\pm$ 6.5	39.6 $\pm$ 8.4	33.7 $\pm$ 8.0	27.5 $\pm$ 2.5
N208A	DF	60.0 $\pm$ 11.2	42.2 $\pm$ 5.2	33.4 $\pm$ 5.4	28.5 $\pm$ 2.3
D280A	LF	56.3 $\pm$ 7.8	55.7 $\pm$ 3.8	25.4 $\pm$ 1.5	33.1 $\pm$ 6.0
T281A	LF	69.6 $\pm$ 5.1	50.2 $\pm$ 5.9	26.7 $\pm$ 3.9	28.2 $\pm$ 5.5
R282A	LF	55.1 $\pm$ 12.9	45.5 $\pm$ 5.2	25.7 $\pm$ 3.7	27.3 $\pm$ 7.9
H286A	LF	67.9 $\pm$ 1.2	39.8 $\pm$ 6.2	25.6 $\pm$ 4.0	30.0 $\pm$ 6.8
<i>skupina III</i>					
S212A	DF	65.1 $\pm$ 19.7	61.7 $\pm$ 3.9	47.5 $\pm$ 5.2	19.2 $\pm$ 6.2
Y213A	DF	63.8 $\pm$ 16.4	37.1 $\pm$ 5.5	27.3 $\pm$ 5.5	31.3 $\pm$ 6.7
T211A	DF	79.3 $\pm$ 6.7	61.8 $\pm$ 6.1	23.4 $\pm$ 4.7*	39.1 $\pm$ 7.2
L284A	LF	69.0 $\pm$ 3.0	32.4 $\pm$ 8.2	20.6 $\pm$ 0.2**	22.2 $\pm$ 3.9

Kontrolní *skupina III*, tj. skupina mutací, které neměly změněnu účinnost ani velikost odpovědi na ATP, nevykazovala ani změny v odpovědích na ostatní agonisty. Drobnou výjimkou je nižší účinnost BzATP na mutace T211A a L284A, u kterých jsme zachytili s nižší významností ($p < 0,05$) prodlouženou časovou konstantu deaktivace (Tabulka 2).

4.1.5. Předpokládaná pozice identifikovaných reziduí v levé a hřbetní ploutvi

Na základě krystalu zFP2X4R o rozlišení 2,8-3,2 Å (Hattori a Gouaux, 2012) jsme vytvořili homologní model potkaní P2X4 podjednotky. Tyto dvě formy P2X4R mají podobnost sekvence AMK 61%. Rozlišení a podobnost obou forem umožňují vytvoření poměrně přesného modelu s nízkým počtem chyb. Obrázek 16 ukazuje data uvedená v Tabulce 3 z pohledu na strukturu rP2X4R.



Obrázek 16: Struktura LF a DF ve světle dat z měření ortosterických agonistů.

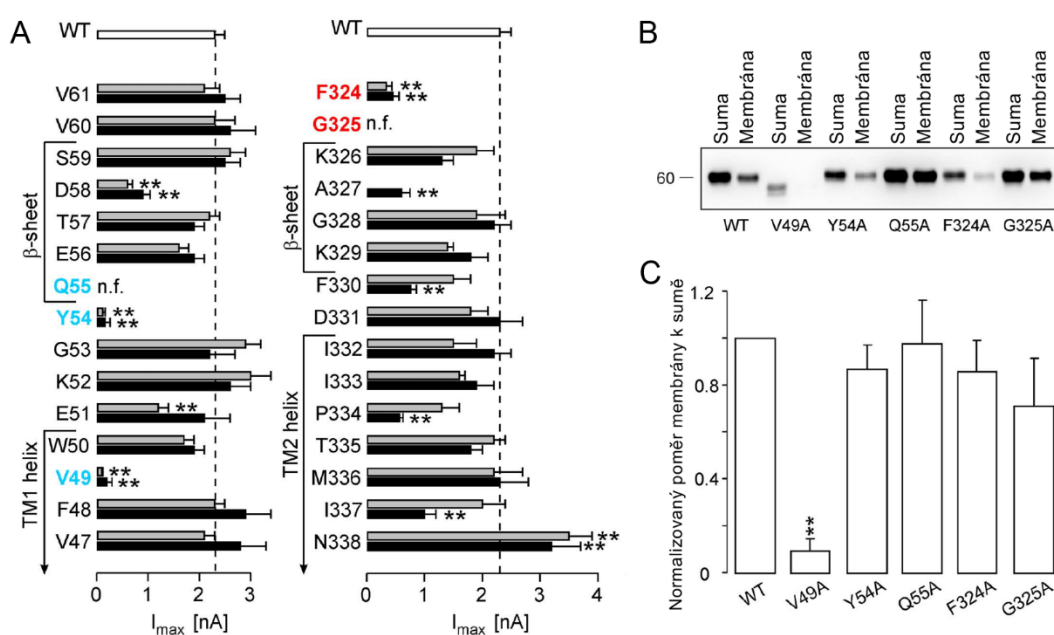
Čelní a zadní pohled (otočeno o 180°, průhlednost sekundárních struktur zvýšena na 80%) na styčnou plochu mezi LF a DF, která formuje část ATP-vazebné kapsy. ATP je zobrazeno skeletovým modelem, barevnost dle prvků. Kalotové modely ukazují jednotlivé pozice AMK zasažených mutací rozdělených do skupin v Tabulce 3 – červeně jsou označeny residua *skupiny II*, zeleně pak *skupina I*. Šedé sféry ukazují pozice AMK, jejichž záměna za alanin měla největší dopad na citlivost a účinnost ATP (R203, N204 a N293).

Zelené glóby zobrazující pozici nativních residuí ze *skupiny I*, jejichž mutace měly změněnu citlivost na ATP i odpovědi ortosterických agonistů, jsou soustředěny v blízkosti navázaného ATP, podobně jako ATP-vazebné residuum N293. Níže, v dolní části obou zkoumaných řetězců, jsou pak seskupeny AMK ze *skupiny II*, jejichž mutace nijak nezměnila procentuální odpověď ortosterických agonistů, ačkoli změnila charakteristiky ve vztahu k ATP. Domníváme se proto, že tato residua hrají roli v převodu signálu z ATP vazebného místa k TM. Pohled zezadu ukazuje šedými glóby polohu R203 a N204, jejichž alaninové mutace byly téměř nefunkční.

4.2. IDENTIFIKACE KRITICKÝCH AMK VE STRUKTUŘE EXTRACELULÁRNÍHO VESTIBULU

Důležitou strukturou, na jejíž funkci závisí vstup iontů a jejich usměrněný tok do otevřeného iontového kanálu receptoru po navázání agonisty, jsou struktury v oblasti extracelulárního vestibulu. Oblast V47-V61 (horní část TM1 a celý řetězec nad TM1) a F324-N338 (horní část TM2 a celý řetězec nad TM2) jsme zkoumali pomocí alaninové a cysteinové skenovací mutagenézy s následným využitím pozitivního alosterického účinku ivermektinu při testování nefunkčních či málo funkčních mutací.

Pokud bylo možné u mutace definovat EC_{50} , nebyla tato hodnota nijak významně odchylena od hodnoty pro WT a to jak u alaninových, tak u cysteinových mutací. Proto jsme mohli funkci mutantních receptorů dobře definovat skrze amplitudy maximálního proudu (Obr. 17A).



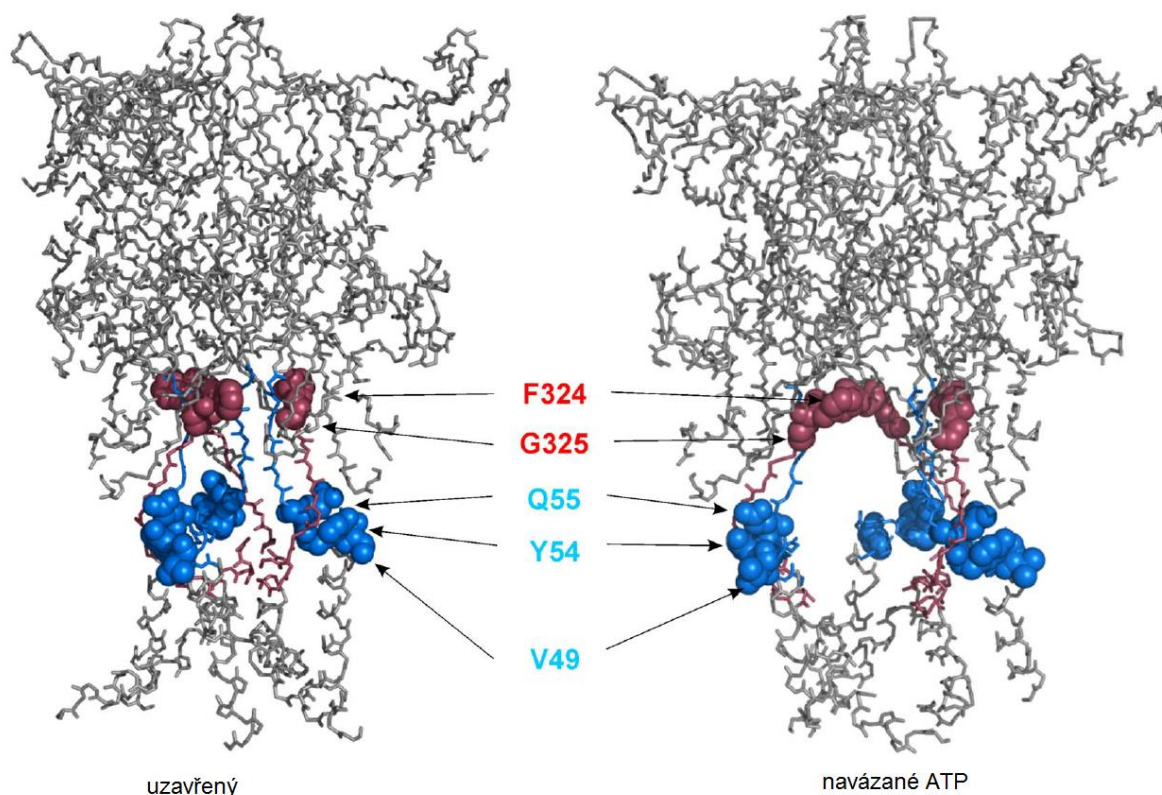
Obrázek 17: Vliv mutací v extracelulárním vestibulu na funkci P2X4R

A) I_{max} vyvolaná aplikací 100 μ M ATP na HEK293T buňky nesoucí P2X4R s alaninovými (šedě) a cysteinovými (černě) mutacemi v oblasti V47-V61 a N338-F324. Nefunkční (n.f.) a málo funkční mutace zobrazeny v závislosti na umístění nad TM1 modře a nad TM2 červeně. Sekundární struktura je zobrazena šipkami. Statisticky významné rozdíly mezi mutantními a WT receptory byly testovány použitím ANOVY a jsou vyznačeny ** ($p < 0,01$). **B)** Western blot málo funkčních mutací extracelulárního vestibulu. **C)** Graf poměru výskytu receptoru na povrchu vůči celkovému množství receptoru v buňce. Normalizováno k WT receptoru.

V extracelulárním vestibulu jsme našli 11 AMK (D58, Q55, Y54, E51, V49, F324, G325, A327, F330, P334 a I337), jejichž alaninová a/nebo cysteinová mutace se projevovala signifikantně sníženými maximálními proudy. V šesti z těchto případů (D58, E51, A327, F330, P334 a I337) jsme mohli definovat EC_{50} , ale, jak již bylo uvedeno, nezaznamenali jsme žádný významný posun citlivosti k ATP. U zbylých pěti AMK (Q55, Y54, V49, F324 a G325) jsme otestovali přítomnost jejich alaninových mutací v membráně za použití techniky western blot. Tyto pokusy ukázaly, že mimo V49A byly všechny mutace v membráně přítomny (Obr. 17B, C).

Pro zjištění, jaké chemické vlastnosti pěti kritických AMK jsou důležité pro funkci nebo expresi receptoru, jsme vytvořili několik dalších mutací a využili možnost modulace P2X4R ivermektinem. Mutace V49D, V49W i V49L byly v membráně přítomny a jejich odpovědi se blížily divokému typu. Tyto pokusy ukázaly, že velikost a hydrofobicita AMK na pozici 49 je důležitá pro transport receptoru na povrch buňky. U tyrosinu na pozici 54 se ukázal být stěžejním aromatický kruh, neboť mutace Y54W a Y54F byly plně funkční, ale mutace Y54L byla nefunkční. U AMK Q55 se nám dlouho nedařilo najít žádnou funkční mutaci, na aplikaci ATP ani po preinkubaci s ivermektinem neodpovídaly Q55N, Q55T ani Q55K. Částečně návratová byla mutace Q55E.

Ve druhé polovině zkoumaného úseku, v blízkosti druhé TM, jsme obdobně testovali alternativní mutace fenylalaninu 324. Mutace F324L, F324Y a F324W byly navýšitelné ivermektinem na odpovědi srovnatelné s WT, mutace F324W měla i nemodulované odpovědi blízké WT. Sousední AMK (G325) jsme nahradili prolinem a ten navrátil mutovanému receptoru všechny funkce. Z rozložení nejvíce postižených mutací je vidět jejich kumulace na dolním a horním okraji extracelulárního vestibulu (Obr. 18). Nativní residua AMK zasažených mutací v blízkosti TM1 se soustředí u spodního okraje extracelulárního vestibulu (modré glóby), kdežto AMK zasažené mutací v řetězci u TM2 tvoří určitou „střechu“ vestibulu, která jej odděluje od centrálního vestibulu.



Obrázek 18: Rozložení zasažených mutací v extracelulárním vestibulu P2X4R.

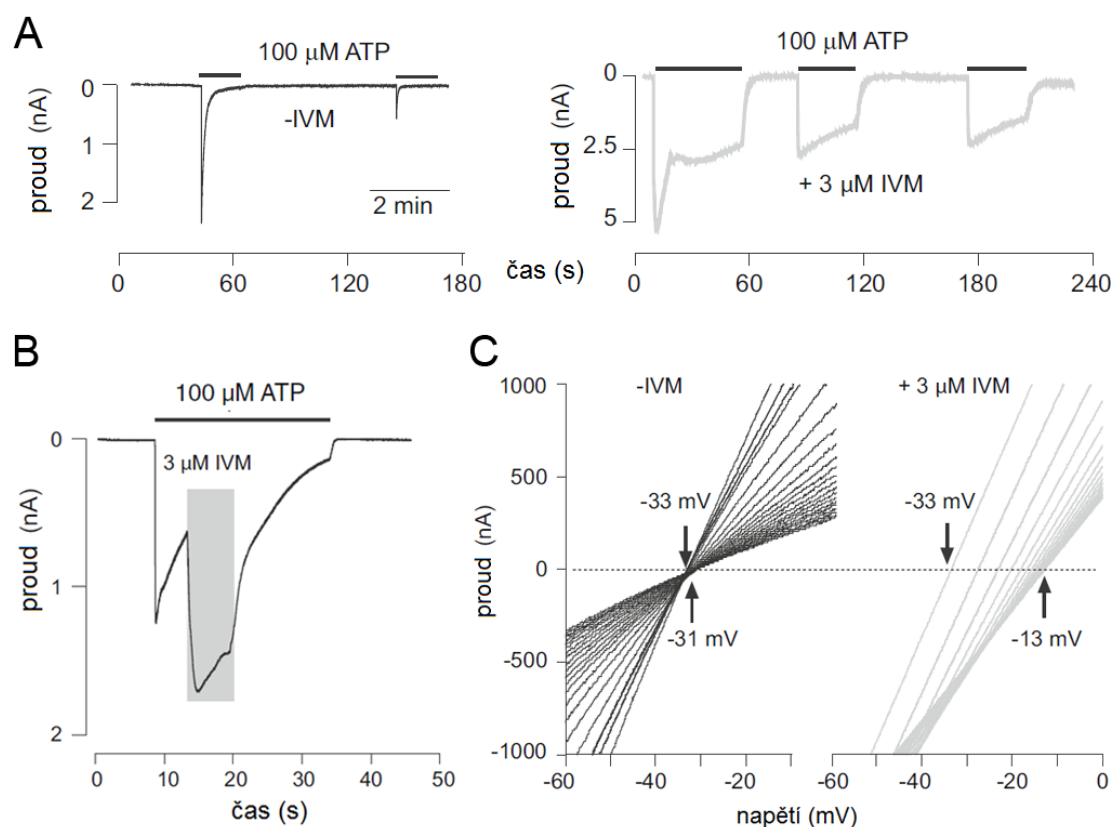
Rozložení identifikovaných klíčových reziduí na uzavřeném (vlevo) a otevřeném (vpravo) struktuře zřP2X4R (číslováno dle rP2X4R). Červeně je zobrazen řetězec nad druhou TM, modře nad první. Kalotové modely označují residua, jejichž mutace byly málo funkční.

4.3. KINETICKÝ MODEL CHOVÁNÍ P2X4 RECEPTORU

Ve spolupráci s laboratoří biologického modelování (Laboratory of Biological Modeling, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) jsme na základě našich dat získaných pro divoký typ potkaního P2X4R vytvořili jeho kinetický model. Model vznikl modifikací nedávno publikovaného komplexního modelu pro P2X7R, který v sobě zahrnuje aktivaci dvěma i třemi molekulami agonisty, desenzitizaci a paralelní dilataci póru iontového kanálu.

Všechny tyto prvky chování byly pozorovány také u P2X4R, u kterého jsme objevili schopnost dilatace póru za fyziologických podmínek (tj. v přítomnosti extracelulárního Ca^{2+}) po aplikaci ivermektinu. Zjistili jsme, že v přítomnosti ivermektinu dochází ke změně reverzního potenciálu pro velké organické ionty, konkrétně pro NMDG^+ , kterým

jsme nahradili extracelulární Na^+ (Obr. 19C). Těmito pokusy jsme prokázali, že P2X4R je schopen zvětšení průměru póru iontového kanálu. Navržený model P2X4R lze rozdělit na tři části (Obr. 20). Prostřední řádek ukazuje naivní stav receptoru s proměnlivou afinitou k agonistovi, v horním řádku je afinita pro agonistu obdobná, ale receptor je již v desenzitizovaném stavu, kdy na aplikaci agonisty neodpovídá vůbec nebo jen velmi málo.

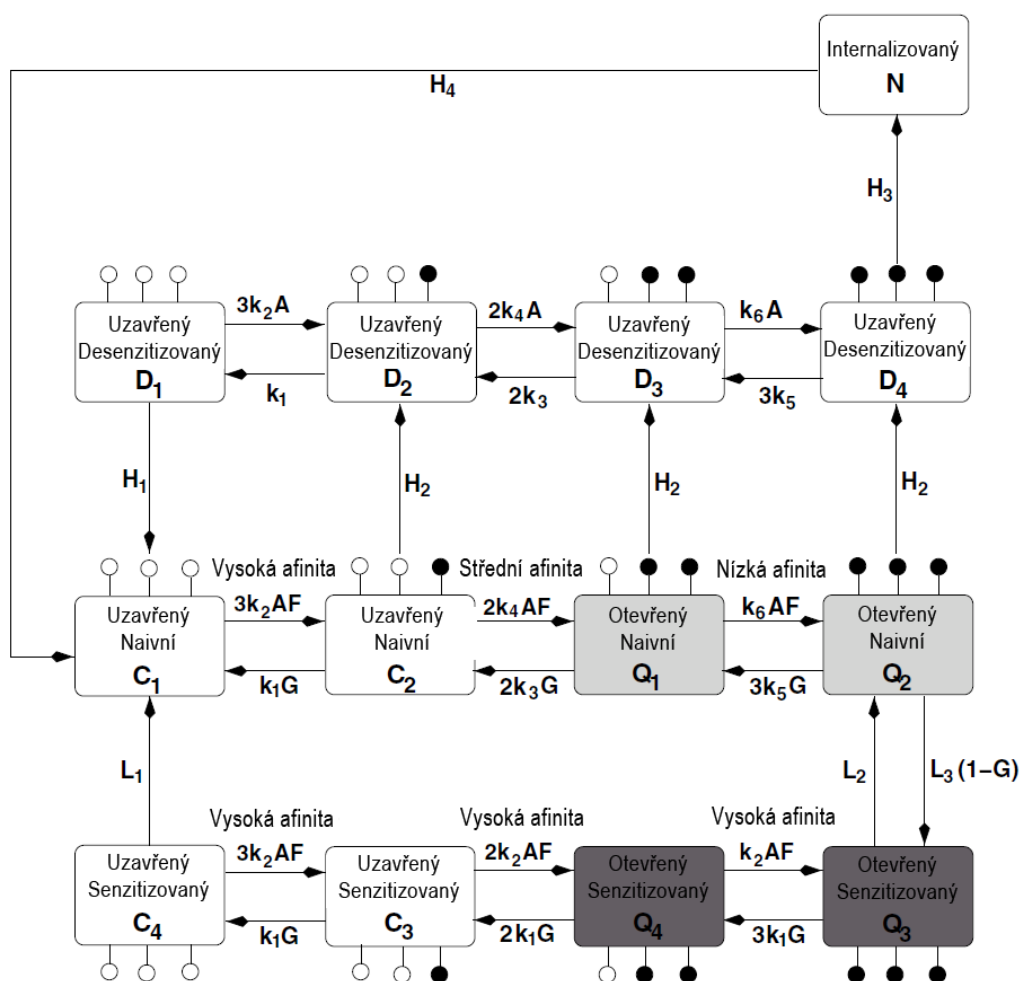


Obrázek 19: Vztah mezi desenzitizací a permeabilitou P2X4 kanálu.

A) Pokles odpovědi po opakovaném dlouhotrvající podání 100 μM ATP v nepřítomnosti (nahore) a v přítomnosti (dole) 3 μM ivermektinu. **B)** Akutní aplikace ivermektinu (3 μM , 10 s) v průběhu aplikace ATP (100 μM , 30 s). **C)** Posun reverzního potenciálu pozorovaný během aplikace ATP (100 μM , 10 s) u buněk v extracelulárním roztoku se Na^+ nahrazeným NMDG $^+$ v nepřítomnosti (vlevo) a v přítomnosti (vpravo) 3 μM ivermektinu.

Receptor může kdykoli přejít z nativního stavu do stavu desenzitizovaného. V desenzitizovaném stavu může být receptor také stažen zpět pod membránu (internalizován) a uložen v endosomech či lysosomech, aniž by byl degradován, přičemž za určitý čas (definovaný rychlostí H_4) může být takovýto receptor navrácen do membrány. Dolní řádek představuje senzitivizovaný stav P2X4R, který je vypočten dle

dat naměřených při aplikaci ivermektinu v různých protokolech (Obr. 19). Z našich měření a kinetického modelování je jasně vidět, že aplikace ivermektinu potlačuje vliv desenzitizace a odkrývá proces dilatace póru iontového kanálu, který je charakteristický i pro jiné P2XR (P2X2R a P2X7R). Dilatace póru je provázána komplexními konformačními změnami v celém receptoru, které mají za následek zvýšení jeho citlivosti k agonistům. Modelové propočty pak ukázaly, že afinita vazebných míst P2X4R v senzitivovaném módu je pro všechny tři molekuly agonisty vyrovnaná a že kinetické vlastnosti senzitivovaného P2X4R se blíží kinetice P2X7R.



Obrázek 20: Kinetický model P2X4R.

Prostřední řádek představuje naivní, agonistou dosud nestimulovaný, receptor. Horní řádek představuje desenzitizovaný stav nezávislý na Ca^{2+} , spodní pak senzitivovaný stav. Prázdná kolečka značí volná vazebná místa pro ATP, plná pak již s navázaným agonistou. Stavy Q_i jsou otevřené stavy receptoru, C_i uzavřené a D_i uzavřené desenzitizované stavy. Konstanty H_i a L_i značí rychlost přeměny receptoru, konstanty k_i popisují afinitu vazebného místa k agonistovi. Model P2X4R zahrnuje také internalizovaný stav receptoru (N), který trvá desítky minut, a který zatím nebyl uveden v žádném jiném modelu P2XR.

5. DISKUZE

Předcházející studie zabývající se tématem ATP vazebného místa, jejího bezprostředního okolí (vazebné kapsy) a tokem iontů extracelulárním vestibulem se soustřeďovaly hlavně na identifikaci jednotlivých aminokyselin, které byly vytipovány na základě své konzervované polohy v primární struktuře a svých charakteristických vlastností. Kladně nabitě a aromatické AMK v ektodoméně byly testovány kvůli možné interakci s molekulou ATP (Jiang, L. H. a kol., 2000; Roberts a Evans, 2004; Zemkova a kol., 2007), polární a záporně nabitě AMK v blízkosti TM domén byly zkoumány kvůli možné interakci s kationty, především Ca^{2+} (Coddou a kol., 2003; Fabbretti a kol., 2004; Roberts a Evans, 2006; Stanchev a kol., 2006; Friday a Hume, 2008). Tato dizertační práce je založena na dvou studiích, které se poprvé zabývaly systematickým vyhledáváním kritických nekonzervovaných AMK v uvedených oblastech P2X4R metodami skenovací mutagenese. Využívali jsme také specifického alosterického modulátoru ivermektinu, který navyšoval malé odpovědi. Třetí práce se zabývala mechanismem účinku ivermektinu a vedla k vytvoření prvního kinetického modelu P2X4R.

5.1. ROLE OBLASTI STYČNÝCH PLOCH MEZI LEVOU A HŘBETNÍ PLOUTVÍ

Oblast styčných ploch mezi LF (D280-N293) a DF (R203-L214) je jedna z nejvariabilnějších oblastí P2XR. V celé sekvenci jsou pouze dvě AMK, N204 a N293, plně konzervované ve všech P2XR a jedna, G291, přítomná ve všech savčích P2XR. Několik dalších AMK je konzervovaných částečně – hydrofobní AMK valin, leucin a isoleucin na pozicích 205, 206 a 288, přičemž jejich hydrofobicita je konzervována plně. Navíc nemá oblast styčných ploch definovanou sekundární strukturu, z velké části se jedná o volné kličky vymezené α -helixy či β -listy, které sem zasahují jen minimálně (Obr. 6B).

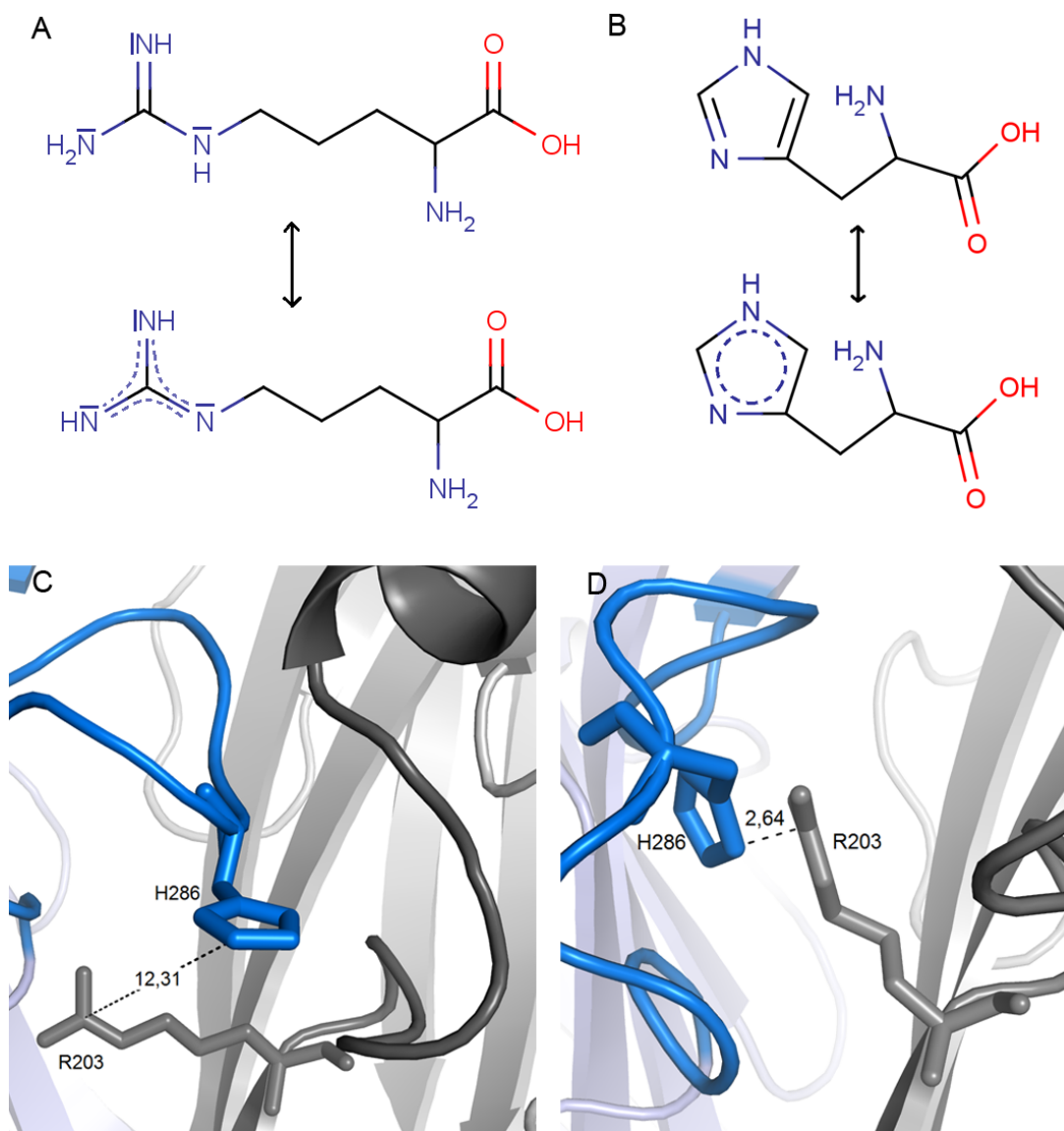
Každá podjednotka P2XR má své specifické vlastnosti. Z principu nemohou být za tyto vlastnosti zodpovědné konzervované části proteinu, protože ty definují především vlastnosti, které jsou všem podjednotkám společné. Proto je na místě hledat původce specifických vlastností v nekonzervovaných částech receptoru. Umístění LF-DF

variabilního úseku v těsné blízkosti ATP-vazebného místa a zároveň na rozhraní dvou podjednotek nám dávalo velkou šanci nalezení alespoň několika reziduí, jejichž rolí v receptoru je ovlivňování některé z jeho specifických vlastností. Vyměnili jsme každou jednotlivou AMK v řetězci LF a DF za alanin a následně jsme studovali takto vytvořené mutantní receptory exprimované v HEK293T buňkách elektrofyziologickými metodami.

Při základní charakterizaci mutací ve vybrané styčné oblasti jsme narazili na několik mutací, které se jevily nefunkční. Tyto mutace (R203A, N204A a N293A) měly velmi nízké maximální proudové odpovědi, a proto nemohla být definována jejich EC_{50} . Nicméně skrze ivermektin se nám funkci mutací podařilo obnovit, odpověď na ivermektin byla rychlá a okamžitá, a díky tomu je jisté, že se v případě těchto mutací nejedná o chybu ve složení nebo v transportu proteinu do membrány a snížení počtu receptorů na povrchu buňky, ale o ztrátu funkčnosti. Další měřený ukazatel, časová konstanta deaktivace, již měly tyto mutace velmi krátkou, ukazoval na rychlé odmývání agonisty a na výrazný posun v citlivosti k ATP. Ačkoli mutace R203A a N204A měly velmi výrazně zkrácený čas deaktivace, musíme jejich přímý vliv na vazbu ATP vyloučit, protože jejich maximální odpověď po aplikaci ivermektinu byla srovnatelná s odpovědí WT receptoru. Důležitost těchto dvou AMK pro funkci receptoru bude pravděpodobně spočívat v předávání informace receptorovým proteinem, konkrétně v přenosu signálu z ATP vazebné kapsy po navázání ATP směrem k TM. Tento předpoklad potvrzuje i práce na mutaci N204A v P2X1R, kde byla nalezena signifikantní změna EC_{50} bez výraznější změny v proudové odpovědi (Roberts a Evans, 2006), a obdobné mutaci v P2X2R (N202A), která byla shledána nefunkční (Jiang, L. H. a kol., 2000).

Arginin 203 je na začátku řetězce DF již jen u P2X1 a P2X7 receptoru. Jeho výměna za lysin v P2X7R (R206K) zvýšila citlivost kanálu k ATP (Adriouch a kol., 2008). Na homologním modelu rP2X4R můžeme sledovat, jak se mění pozice některých AMK při změně stavu receptoru. Například v uzavřeném stavu je vzdálenost mezi R203 a jeho možným partnerem, histidinem v pozici 286, velmi velká, kolem 12 Å, ale v otevřeném stavu se R203 dostává velmi blízko k H286 takže obě AMK jsou ve vzdálenosti 2.5 Å (Obr. 21C, D). Postranní řetězce obou AMK obsahují dusíky (Obr. 21A, B) a i přes svou rozdílnou strukturu se oba chovají do velké míry jako aromatické kruhy a mohou spolu

komunikovat skrze π - π interakci elektronů (Heyda a kol., 2010). Zda k interakci mezi R203 a H286A skutečně dochází předmětem našeho dalšího studia.



Obrázek 21: Možná interakce mezi R203 a H286 ve struktuře rP2X4R.

A) Postranní řetězec argininu s vyznačenými nevazebnými elektrony, které se mohou zapojit podobně jako u aromatických sloučenin. **B)** Postranní řetězec histidinu s vyznačenými π -elektrony. **C)** Střední vzdálenost mezi R203 a H286 v uzavřeném stavu, **D)** střední vzdálenost mezi R203 a H286 v otevřeném stavu dle homologního modelu rP2X4R (modře LF, tmavě šedě DF), vzdálenosti získány v programu PyMol použitím nástroje „measurement“.

Asn293 je součástí plně konzervovaného ATP-vazebného motivu NFR, jehož podíl na vazbě ATP byl prokázán i v krystalové struktuře zP2X4R (Hattori a Gouaux, 2012).

V souladu s touto skutečností jsme v našich experimentech pozorovali, že nebylo možné u mutace N293A navýšit plně její proudovou odpověď pod ivermektinem tak, aby byla blízká velikosti odpovědi u WT receptoru, podobně jako bylo dříve nalezeno u R295A nebo K67A, dalších dvou ATP-vazebných mutací (Zemkova a kol., 2007). Významný pokles citlivosti k agonistovi byl zaznamenán i u analogických mutací v dalších P2XR: N290A-P2X1R (Roberts a Evans, 2006), N288A-P2X2R (Jiang, L. H. a kol., 2000) a také u N296A-P2X3R (Bodnar a kol., 2011).

Z celkem 26 AMK, které tvoří styčnou plochu mezi LF a DF, je kromě výše uvedených tří pro normální funkci receptoru potřeba ještě dalších 12 (Tabulka 2 a Obr. 11). Tyto AMK lze na základě odpovědí mutovaných receptorů na stimulaci ortosterickými agonisty rozdělit do dvou skupin (Tabulka 3). *Skupina I* obsahuje mutace, které měly kromě citlivosti či účinnosti ATP, změněny i odpovědi ortosterických agonistů (I205A, T210A, L214A, P290A, G291A a Y292A), tato rezidua by se proto mohla podílet na rozlišovací schopnosti a formování ATP vazebné kapsy. Naproti tomu *skupina II* (L206A, N208A, D280A, T281A, R282A a H286A) žádné změny v odpovědích ortosterických agonistů nevykazovala, třebaže citlivost či účinnosti ATP, deaktivace nebo desenzitizace změněny byly. Předpokládáme, že tato skupina AMK hraje spolu s R203 a N204 úlohu v přenosu signálu z ATP vazebné kapsy k iontovému kanálu.

5.1.1. Formování kapsy pro ATP

Přestože dosud nejsou známy žádné významné shody ATP-vazebných motivů v enzymech a intracelulárních proteinech s motivy v P2XR, a nedá se ani předpokládat, že by jich bylo mnoho nalezeno, protože ATP v P2XR má jinou funkci než v intracelulárních procesech, určitě není sporu o tom, že i v P2XR funguje mechanismus „klíče a zámku“ pro identifikaci agonisty. Tento tradiční mechanismus je založen na přesném formování vazebného místa agonisty a i jeho drobná změna může vést k velkým změnám v receptorové kinetice, citlivosti i dynamice. Přesné formování ATP-vazebné kapsy je tak přímo svázáno s některými specifickými vlastnostmi P2X kanálů, především s receptor-specifickou citlivostí k různým agonistům. Pro příklad α, β –

meATP je plným agonistou pro P2X1 a P2X3 receptor, pro P2X2 a P2X4 jen částečným; pro P2X7R je plným agonistou BzATP. Zároveň si lze jen těžko představit, že by na rozdíly mezi citlivostmi receptorů měly vliv konzervované AMK (nelze ale úplně vyloučit nepřímý vliv, tedy nekonzervované chování konzervovaných AMK). Je tak nasnadě hledat původ těchto rozdílů právě ve variabilních úsecích struktury receptoru.

Při zkoumání rozdílů ve formování ATP-kapsy jsme našli několik AMK (residua skupiny I: I205A, T210A, L214A, P290A, G291A a Y292A) z variabilních řetězců, kterými jsou tvořeny LF a DF, jejichž mutace vykazovaly změny v citlivosti k ATP nebo efektivitě ortosterických agonistů. V blízkosti plně konzervovaného ATP-vazebného N293 jsme identifikovali další důležitou AMK přítomnou ve všech savčích P2XR - G291. Mutace G291A vykazovala sníženou citlivost k ATP a zkrácenou deaktivaci, ale velikost proudových odpovědí zůstala zachována blízka WT. Nezměněná velikost proudů vylučuje, že by se mohlo jednat o přímo ATP-vazebnou AMK, ačkoli vazebné motivy z enzymů, především Walker A, obvykle glyciny obsahují (Walker a kol., 1982; Mitchell a Rao, 2004; Ambudkar a kol., 2006; Nagy a kol., 2009; Matte, 2010), a nemáme k tomu ani žádné jiné indicie ani z krystalové struktury (Hattori a Gouaux, 2012).

Data získaná z měření analogických agonistů podhalují roli G291 – mutace G291A má úplně nový profil agonistů: nejúčinnějším ortosterickým agonistou pro ni je BzATP, až za ním následuje 2-MeSATP a ATP γ S. Odpověď na α,β -meATP, objemem nejmenšího agonisty, je úplně potlačena. Ukazuje se, že glycin v pozici 291 je jedno z citlivých míst pro formování ATP-vazebné kapsy. Výměnou malého glycinu za větší alanin dochází pravděpodobně k jeho interakci se sousedním řetězcem, kde se nachází konzervovaný motiv G²⁵⁰GxxG. Původní glycin s nimi neinteragoval, alanin ale již v kontaktu na principu hydrofobní vazby může být a může tak roztahovat ATP-vazebnou kapsu, která se může stát vhodnější pro interakci s BzATP. Dalšími mutacemi v bodě 291 v jiných savčích P2XR může být toto chování ověřeno.

Na druhé straně ATP-vazebné kapsy, to znamená v oblasti DF sousední podjednotky, se nachází Leu214, který byl v krystalu (Hattori a Gouaux, 2012) označen jako místo potenciálního styku s molekulou ATP. Tato AMK nebyla dříve zkoumána, zejména protože není konzervovaná a také protože obecně hydrofobním

AMK byla věnována jen malá pozornost a efekt hydrofobní interakce byl podceňován. V letošním roce se na ni shodou okolností zaměřily dvě studie: alaninová mutace na zfP2X4R v analogické pozici, L217A, byla shledána nefunkční, protože se nepodařilo vyvolat odpověď ani při podání 1000 μ M dávky ATP, stejně si vedla i mutace L217W (Zhao a kol., 2014). Druhá studie, na rP2X4R, uvádí u mutace L214A zhruba devítinásobný pokles citlivosti k ATP, což je ve shodě s našimi daty (Zhang a kol., 2014). Mutace L214S citlivost receptoru k ATP ještě zhoršila, srovnatelná s WT byla jen mutace L214I (Zhang a kol., 2014). Tyto i naše studie tak podporují myšlenku kontaktu L214 s ATP. Nám se však podařilo ivermektinem navýšit odpověď mutace L214A na velikost srovnatelnou s WT, což u mutace, kde byl prokázán kontakt s ATP (N293), nebylo možné. Odpovědi analogických agonistů jsou u této mutace sice silně snižené, ale pořadí agonistů je víceméně zachováno shodné jako u WT receptoru. Role Leu214 tak bude pravděpodobně mnohem komplexnější a důležitá spíše pro přesné formování ATP vazebné kapsy či iniciaci přenosu signálu než pro primární interakci s ATP či jeho vazbu.

Níže na řetězci DF je situována další AMK, T210, jejíž alaninová mutace měla 10x nižší citlivost k ATP a výrazně změněné pořadí agonistů. Z ortosterických agonistů došlo u mutace T210A ve srovnání s WT k nejvýraznějšímu poklesu odpovědi u ATP γ S a α , β – meATP. Tyto dva agonisty spojuje relativně stejná velikost a nepříliš velké rozdíly v rozložení náboje. Přestože u každého je vyměněna jiná skupina, jejich spojujícím prvkem je oslabení parciálního náboje na kyslíku mezi 1. a 2. fosfátem. Do této oblasti může mířit threonin 210, kterému v případě záměny za alanin chybí právě hydroxylová skupina, která by se na této interakci mohla podílet. Přestože v homologním modelu není T210 (respektive N213 v krystalu zfP2X4R) otočen dovnitř ATP-vazebné kapsy, může do ní směřovat: je uváděn na hranici α -helixu, jehož závit se opakuje po 3,6 AMK, a právě čtvrtá AMK od L214, který do kapsy míří, je T210. Pokud by byl na variabilní kličce, nemůže být jeho přesná orientace potvrzena ani vyvrácena.

Ačkoli v tuto chvíli nemůžeme nabídnout uspokojivé vysvětlení, patří do *skupiny I* dle elektrofyziologických dat, procentuálních odpovědí agonistů i polohy také residua I205, Y292 a P290. Účinek záměny I205 pravděpodobně souvisí nejen s jeho

konzervovanými hydrofobními vlastnostmi, ale také s délkou řetězce AMK. Efekt tyrosinu a prolinu bude pravděpodobně navázán na G291, s nímž obě AMK sousedí.

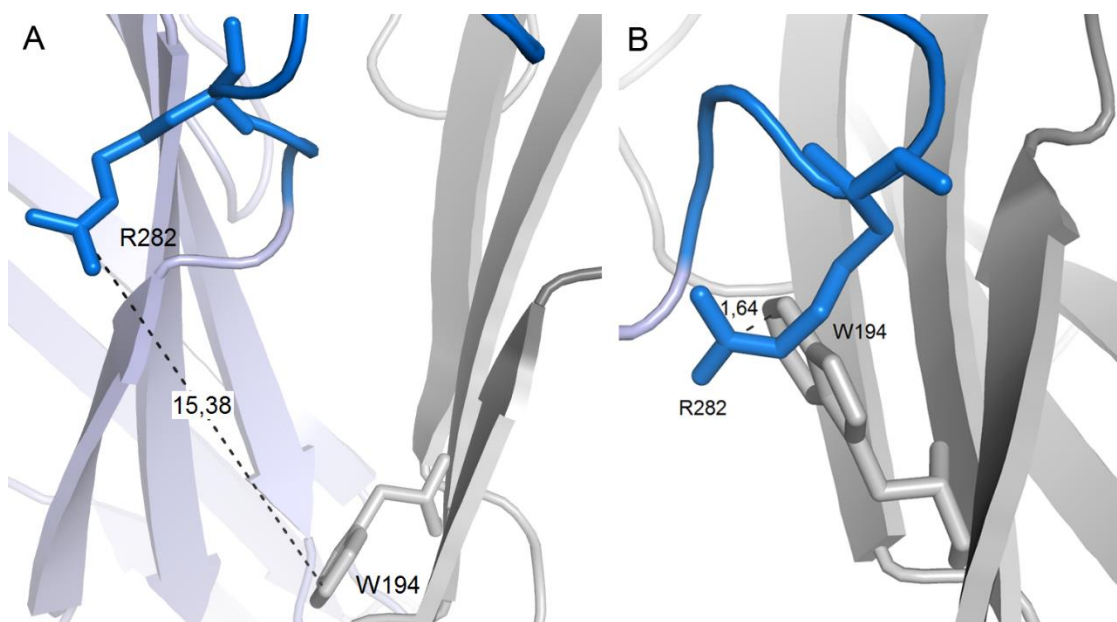
Předpokládáme, že residua ze *skupiny I* ovlivňují celkové formování ATP vazebné kapsy. Je ale zřejmé, že poloha ATP ve vazebné kapse není tak jednoznačná, jak se zdála být v krystalové struktuře. Je evidováno mnoho případů, kde není orientace molekuly ATP ve vazebné kapse stejná jako v krystalu (Jiang, R. a kol., 2011; Valente a kol., 2011; Du a kol., 2012; Huang a kol., 2014), a naše výsledky k nim nepřímo přispívají také. Je možné, že se pozice ATP v kapse mění s časem, respektive s konkrétním kinetickým stavem receptoru.

5.1.2. Převod informace receptorem

Skupina II (D280A, T281A, R282A, H286A, N208A a L206A) je charakterizována signifikantními změnami v citlivosti a/nebo účinnosti ATP, deaktivaci či desenzitizaci při zachování procentuálních odpovědí analogických agonistů, a my předpokládáme, že tato rezidua hrají roli v přenosu signálu z ATP vazebné kapsy k iontovému kanálu. Kyselina asparagová na pozici 280 v P2X4R byla zkoumána s podobnými výsledky již dříve (Yan a kol., 2005; Zemkova a kol., 2007) a také u P2X3R měla mutace D266A zhruba poloviční velikost odpovědí a přinejmenším 10x nižší citlivost k ATP (Fabbretti a kol., 2004). Naproti tomu, v P2X2R nebyly u ekvivalentní mutace (D277A) shledány signifikantní rozdíly vůči WT (Friday a Hume, 2008). Jak ukazují data naměřená v přítomnosti ivermektinu, mutovaný receptor je schopen maximální odpovědi, takže není zasažen přenos receptoru do membrány.

Mutace R282A je ve všech charakteristikách velmi podobná D280A. Ačkoli je to kladně nabitá AMK, nebyl Arg282 v minulosti zkoumán, ani residua k němu analogická v dalších podjednotkách, kde se častěji v této pozici nachází lysin. Nezměněné odpovědi ortosterických agonistů u obou těchto mutací, D280A a R282A, ukazují na roli v předávání informace receptorovým proteinem. Jako všechna residua ze *skupiny II* se R282 nachází ve spodní části styčný ploch LF-DF. V homologním modelu rP2X4R jsme pro R282 našli možného partnera pro převod signálu, W194 v sousední podjednotce (Obr. 22). Obě AMK jsou od sebe vzdálené v uzavřeném stavu, ale dostávají se do

blízkosti v otevřeném stavu receptoru, přičemž obě residua mohou interagovat na základě rozprostření π -elektronů obdobně jako u již zmíněného kontaktu histidinu s argininem.



Obrázek 22: Možný kontakt mezi R282 a W194 ve struktuře rP2X4R.

A) Střední vzdálenost v uzavřeném stavu dle homologního modelu; **B)** střední vzdálenost v otevřeném stavu. Světle modře a světle šedě podjednotky, třetí podjednotka není zobrazena. Sytá modrá řetězec LF, sytá šedá pak DF.

Pozice obou AMK na různých podjednotkách a změna jejich vzdálenosti při přechodu receptorového kanálu z uzavřeného do otevřeného stavu opět demonstruje nutnost spolupráce mezi podjednotkami a předávání informace křížem z jedné na druhou. Dvojici nabitých AMK na začátku LF doplňuje polární threonin (T281), jehož EC_{50} je sice jen třikrát vyšší než u WT, ale významně zkrácená časová konstanta deaktivace, prodloužená časová konstanta desenzitizace a neměnné odpovědi analogických agonistů ho jednoznačně řadí do *skupiny II*, k AMK nejvíce ovlivňujícím desenzitizaci (D280, T281, R282). V dřívějších pracích byla zkoumána ekvivalentní mutace v P2X3R (S267A), jejíž proud vyvolaný aplikací 3 μ M α,β -meATP byl signifikantně vyšší než proud vyvolaný u WT (Wirkner a kol., 2005).

Mutace H286A byla zkoumána už dříve, ale výsledky byly vždy spíše negativní. Bylo zjištěno, že nemá žádnou významnou roli v regulaci P2X4R zinkem ani mědí (Coddou a kol., 2003). U antagonistů se také neobjevila žádná výrazná změna (Xiong a kol.,

2004b). Byly však zaznamenány snížené proudy a významné změny v citlivosti (Xiong a kol., 2004a; Yan a kol., 2005). Tyto změny jsme našli i my, navíc můžeme říci, že použitím ivermektinu lze mutaci H286A bez problémů navyšovat, a jeho procentuálně odpovědi všech ortosterických agonistů jsou shodné s WT. Jak bylo již uvedeno výše, připadá H286 v úvahu jako partner pro R203 při převodu signálu receptorem (Obr. 21). Jeho mutace však není tak silně zasažena jako R203A, což pravděpodobně odráží možnou kompenzaci okolními AMK (není zde žádná definovaná sekundární struktura, všechny tak mohou být orientovány na stejnou stranu), především N287 či S289.

Skupinu II doplňují ještě dvě residua z oblasti DF: N208 a L206, která by mohla hrát roli v intramolekulárním přenosu signálu o přítomnosti ATP ve vazebné kapse. První elektrofyziologické informace o leucinu 206 jsou uvedeny v této práci, účinek jeho záměny za alanin pravděpodobně souvisí, jako u I205, s délkou řetězce AMK a jeho konzervovanou hydrofobicitou. Asparagin 208 byl testován jako potenciální místo glykosylace, ale mutace N208S-P2X4R neukazovala změnu glykosylace (Valente a kol., 2011), stejně jako mutace N194Q-P2X3R měla všechny testované hodnoty blízké WT (Vacca a kol., 2011).

5.1.3. Desenzitizace P2X4 receptoru

Korelační analýza vztahů mezi EC_{50} a deaktivací ukazuje, že obě domény, LF i DF, jsou důležité nejen pro aktivaci receptoru, ale i pro jeho deaktivaci, přičemž deaktivace je ve své podstatě proces opačný k aktivaci: probíhá reverzně, ale stejnou cestou. Naproti tomu ve vztahu k desenzitizaci korelační analýza ukazuje, že LF, mnohem výrazněji než DF, hraje roli v převodu receptoru ze stavu aktivovaného do stavu desenzitizovaného, která vyžaduje signalizaci skrze N293-D280 řetězec; sedm ze 13 testovaných mutací v LF vykazovalo signifikantně sníženou rychlost desenzitizace, zatímco pouze 3 z 10 mutací v DF vykazovalo menší změny (Obr. 11C a Tabulka 2). Změny v desenzitizaci v LF byly již ukázány také na D266A-P2X3R (Fabbretti a kol., 2004) a S275A-P2X3R (Petrenko a kol., 2011). Naše výsledky prokázaly, že ne pouze jedna AMK, ale skupiny AMK levé ploutve kontrolují proces desenzitizace.

5.2. ROLE AMINOKYSELIN FORMUJÍCÍCH EXTRACELULÁRNÍ VESTIBUL

Definovali jsme pět AMK extracelulárního vestibulu, které jsou kritické pro funkci rP2X4R: V49, Y54, Q55, F324 a G325. Tři z těchto residuí jsou plně konzervovány i v dalších P2X podjednotkách – Y54, Q55 a G325 – všechny zmíněné jsou pak přítomny v zfP2X4, přestože F324 je nekonzervovaný a V49 jen částečně konzervovaný. Obecně může být ztráta funkce receptoru u těchto mutací způsobena změnami v expresi proteinu do membrány nebo ztrátou citlivosti k ATP, která je ale ve světle krystalu zfP2X4R s navázaným ATP (Hattori a Gouaux, 2012) velmi nepravděpodobná.

Exprese do membrány byla postižena jen v případě mutace Val49, ale ne v případě dalších residuí. Přesto, V49A byl citlivý k ivermektinu podobně jako WT, což ukazuje, že přes nižší výskyt mutovaného receptoru v membráně nebyly změněny jeho otevírací mechanismy. Navíc, mutace V49D je plně funkční, stejně jako V49W, aniž by zde vznikaly jakékoli repulzní síly. Mutace analogického residua I50A-P2X2R byla funkční (Li a kol., 2004; Khakh a Egan, 2005). Valin 49 tak hraje pravděpodobně důležitou roli v transportu receptoru do membrány spíše než ve stabilizaci receptoru v membráně či v mechanismech otevírání kanálu.

Ve shodě s našimi daty, předchozí studie ukázaly, že cysteinové mutace analogické k Y54C-P2X4R a Q55C-P2X4R v P2X2R také nebyly funkční (Jiang, L. H. a kol., 2001; Kawate a kol., 2011). Naproti tomu v P2X1R byly všechny cysteinové mutace funkční (Roberts a Evans, 2006; Allsopp a Evans, 2011), což ukazuje na různou míru tolerance mutací v extracelulárním vestibulu napříč podjednotkami. Vzhledem k tomu, že ani mutace Q55N, přestože je funkčně a strukturně naprosto nejbližší, nebyla schopna zformovat funkční kanál, musíme nutně uzavřít, že sebemenší změna ve velikosti a geometrii AMK na pozici 55 změní konzervované složení oblasti a vede k nefunkčnosti kanálu.

Úspěšné nahrazení tyrosinu na pozici 54 jinými aromatickými AMK ukazuje na důležitost π -elektronů na této pozici. Možní partneři pro Y54 jsou F48 a F330 ze stejné podjednotky. Ve shodě s touto hypotézou je i nižší proudová odpověď u F330C (Obr. 17). Již dříve byla ukázána důležitost mnoha aromatických AMK nad první TM pro funkci P2X4R (Jindrichova a kol., 2009).

Vysokou funkční důležitost pro P2X₄R mají také Gly325 a Phe324. Mutace G325A a G325C způsobily nefunkčnost kanálu, ale G325P funkce opět obnovila. Vzhledem k tomu, že prolin je malá AMK, která ale řetězci jednoznačně udává směr, je evidentní, že role G325 je právě ve vytváření zlomu, ohybu, na β -listu. Přestože je Gly325 konzervovaný, kritická role se projevuje jen v P2X₄R, ale ne v G321C-P2X₁R (Digby a kol., 2005) ani v G320C-P2X₂R (Rassendren a kol., 1997; Kawate a kol., 2011). Obdobně si vedla i a H319C-P2X₂R (Rassendren a kol., 1997; Kawate a kol., 2011), analogická k F324-P2X₄R, na niž nebyly pozorovány žádné signifikantní změny vůči WT. Obnovit funkci F324 v P2X₄R bylo možné navrácením hydrofobního zbytku. Obě AMK, F324 i G325, se nacházejí ve zlomu β -listu, který vzniká při otevření kanálu (Hattori a Gouaux, 2012). Z toho důvodu se domníváme, že mutace fenylalaninu 324 může blokovat rozšíření vestibulu.

5.3. KINETIKA P2X₄ RECEPTORU

Kinetické chování P2XR v sobě zahrnuje přechod ze stavu uzavřeného do stavu otevřeného anebo desenzitizovaného. V současné době panuje shoda, že P2X kanály jsou při přetrvávajícím obsazení vazebného místa pro agonistu schopny přejít také do stavu dilatovaného, přičemž k dilataci dochází paralelně s ostatními změnami a je provázena senzitivací receptoru (tj. zvýšenou citlivostí receptoru k agonistovi). Jedná se tedy o další z parametrů otevírání iontového kanálu receptoru, který má vliv na celkové chování receptoru během přetrvávající aktivace. Na profil odpovědi P2XR má tedy vliv aktuální bilance mezi mírou desenzitizace a mírou dilatace a senzitivace (Khadra a kol., 2012). Tento komplexní vzorec otevírání receptoru může být vysvětlen skrze Markovův kinetický model zahrnující negativní kooperaci při navazování agonisty do nesenzitizovaného (naivního) receptoru, jsou-li již jedno nebo dvě vazebná místa obsazena, otevírání nízkovodivého póru při navázání dvou molekul agonisty i senzitivaci kanálu s dilatací póru vedoucí k vysokovodivostnímu stavu při obsazení všech tří vazebných míst pro agonistu. Prakticky stejné vzorce chování, jen s jinými poměry pro desenzitizaci a senzitivaci byly nalezeny i u P2X₂R (Khadra a kol., 2012) a P2X₇R (Khadra a kol., 2013) a naše práce je odhalila také u P2X₄R.

Každý z těchto tří receptorů vykazuje, při záměně sodíku za NMDG^+ v ECS, posun reverzního potenciálu indikující dilataci (pro P2X4R Obr. 19C). V případě P2X7R dilatace téměř kompletně maskuje desenzitizaci (Khadra a kol., 2013), kdežto u P2X2R maskuje desenzitizace dilataci (Khadra a kol., 2012). Jak je na obrázku 19 ukázáno, P2X4R je schopen dilatace i v normálním fyziologickém médiu, je-li přítomen ivermektin. Na rozdíl od P2X7R u P2X4R v přítomnosti ivermektinu nedochází k růstu proudu, tj. není zde generován druhý proud, shodně jako u P2X2R. Časová závislost dilatace a dvojfázová odpověď při přetrvávající aplikaci ATP evokují, že dilatace póru se podílí spíše na formování plateau než na sekundárním navýšení proudu. Dilatace je tak dostatečná k omezení rozsahu desenzitizace a internalizace P2X4R, ale nepřevyšuje je.

P2X4R tedy ve fyziologickém roztoku prochází změnami mezi uzavřeným → otevřeným → desenzitizovaným → internalizovaným stavem a míra návratu z desenzitizace k uzavřenému kanálu je velmi nízká. Internalizovaný receptor je v cytosolu umístěn v endosomech či lysozomech, aniž by byl degradován, a může být přenesen zpět do membrány (Murrell-Lagnado a Qureshi, 2008). Pokud je ale obsazeno vazebné místo pro ivermektin, prochází kanál stavy uzavřenými → otevřenými, kdy otevřený kanál může desenzitizovat či dilatovat se srovnatelnými pravděpodobnostmi, přičemž desenzitizační část probíhá stejně v nepřítomnosti ivermektinu. Dilatace je spojena se senzitivací a receptor je pak schopen opakovaných změn stavů uzavřený → otevřený → dilatovaný → uzavřený, aniž by docházelo k velkým ztrátám receptoru skrze internalizaci, což se projevuje zdánlivě sníženou mírou desenzitizace v přítomnosti ivermektinu. U P2X7R je přeměna z otevřeného do dilatovaného stavu kineticky zvýhodněna před přeměnou do stavu desenzitizovaného, což vede při iniciační aplikaci vysoké koncentrace agonisty ke generování dvoufázového proudu (Khadra a kol., 2013). Rychlá internalizace tedy limituje signalizaci skrze P2X4R. Únik ze stavu desenzitizace přes převedení do stavu senzitivace může být farmakologickým nástrojem k navýšení odpovědi P2X4R. U mutací, které nemají internalizující vlastnosti, je tento efekt ivermektinu vyřazen (Toulme a kol., 2006).

6. ZÁVĚR

P2X4R hraje roli v neuropatické bolesti, imunitních reakcích, při poranění mozku i ve správné funkci srdce a oběhového systému. Abychom mohli snáze najít potenciální terapeutické látky za využití co nejnížšího počtu pokusných zvířat, potřebujeme vědět co nejpřesněji, jak receptor funguje. Dokud to nebudeme vědět dostatečně přesně, budou pokusy probíhat do jisté míry na slepo. Budeme-li mít opravdu velké množství přesných informací o kinetice a dynamice receptoru, můžeme část práce svěřit počítačům (in silico) a jejich výsledky ověřovat, čímž se proces značně zrychlí. Kromě času je tu i finanční a etická úspora.

Pomocí molekulárně biologických a elektrofyzilogických technik bylo v této práci řešeno několik otázek strukturně-funkčních vztahů u rP2X4R, a výsledky můžeme shrnout do následujících bodů:

1. Všechny vytvořené alaninové mutace (LF: D280A-N293A; DF: R203A-L214A) byly exprimovány v membráně a správně složeny. Oblast styčné plochy mezi LF a DF má důležitou roli ve funkci P2X4R:
 - a. Její horní část, zastoupená Y292, G291, P290, L214, T210 a I205 je důležitá pro přesné formování ATP-vazebné kapsy, zámku pro klíč tvaru ATP.
 - b. Dolní část tvořená H286, R282, T281, D280, I205, L206, N208 pak má za úkol předávání informace o navázání ATP skrze protein receptoru, výsledkem čehož je reakce brány v transmembránové oblasti na přijatou informaci. Arg203 a Asn204 mají pravděpodobně za úkol informaci z obou těchto řetězců integrovat a předávat dále.
 - c. Aminokyselinové zbytky v LF mají navíc roli i v desenzitizaci, jsou odpovědné za transpozici proteinu ze stavu otevřeného do stavu desenzitizovaného.
2. V extracelulárním vestibulu jsme identifikovali další 4 AMK (Y54, Q55, F324 a G325), které jsou důležité pro správnou strukturu vestibulu po navázání ATP a funkci receptoru. Aminokyselina V49 je důležitá pro transport receptoru do membrány.

3. Přispěli jsme k vypracování kinetického modelu P2X4R, ve kterém desenzitizovaný stav následně přechází z velké části do internalizace, již lze zvrátit převedením receptoru do stavu senzitivizovaného. Tato senzitivizace může být potenciálně farmakologicky využitelná, protože receptor pak stále signalizuje a nepřicházíme o množství signálu kvůli desenzitizaci a internalizaci.

Přestože známe krystalovou strukturu zfP2X4R v uzavřeném a ATP-vázajícím stavu, nemáme žádné indicie, který z otevřených stavů (naivní, senzitivizovaný, desenzitizovaný) to je. Stále zůstává mnoho bílých míst a stále nevíme, jakými konformačními změnami dochází k převodu informace receptorem. Další studie vztahu mezi strukturou a funkcí důležitých oblastí P2X4R by mohly přispět k detailnějšímu pochopení těchto mechanismů.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Adriouch, S., Bannas, P., Schwarz, N., Fliegert, R., Guse, A. H., Seman, M., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2008). "ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **22**(3): 861-869.
- Alabi, A. A. and Tsien, R. W. (2013). "Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission." Annual review of physiology **75**: 393-422.
- Allsopp, R. C. and Evans, R. J. (2011). "The intracellular amino terminus plays a dominant role in desensitization of ATP-gated P2X receptor ion channels." The Journal of biological chemistry **286**(52): 44691-44701.
- Ambudkar, S. V., Kim, I. W., Xia, D. and Sauna, Z. E. (2006). "The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding." FEBS letters **580**(4): 1049-1055.
- Antonio, L. S., Stewart, A. P., Xu, X. J., Varanda, W. A., Murrell-Lagnado, R. D. and Edwardson, J. M. (2011). "P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers." British journal of pharmacology **163**(5): 1069-1077.
- Aravind, L. and Koonin, E. V. (1999). "DNA polymerase beta-like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history." Nucleic acids research **27**(7): 1609-1618.
- Armour, J., Bairden, K. and Preston, J. M. (1980). "Anthelmintic efficiency of ivermectin against naturally acquired bovine gastrointestinal nematodes." The Veterinary record **107**(10): 226-227.
- Ayna, G., Krysko, D. V., Kaczmarek, A., Petrovski, G., Vandenabeele, P. and Fesus, L. (2012). "ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages." PloS one **7**(6): e40069.
- Barth, D. and Brokken, E. S. (1980). "The activity of 22, 23-dihydroavermectin B1 against the pig louse, *Haematopinus suis*." The Veterinary record **106**(17): 388.
- Baxter, A. W., Choi, S. J., Sim, J. A. and North, R. A. (2011). "Role of P2X4 receptors in synaptic strengthening in mouse CA1 hippocampal neurons." The European journal of neuroscience **34**(2): 213-220.
- Benkert, P., Tosatto, S. C. and Schomburg, D. (2008). "QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment." Proteins **71**(1): 261-277.
- Bhattacharya, A., Vavra, V., Svobodova, I., Bendova, Z., Vereb, G. and Zemkova, H. (2013). "Potentiation of inhibitory synaptic transmission by extracellular ATP in rat suprachiasmatic nuclei." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **33**(18): 8035-8044.
- Bo, X., Zhang, Y., Nassar, M., Burnstock, G. and Schoepfer, R. (1995). "A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile." FEBS letters **375**(1-2): 129-133.
- Bodnar, M., Wang, H., Riedel, T., Hintze, S., Kato, E., Fallah, G., Groger-Arndt, H., Giniatullin, R., Grohmann, M., Hausmann, R., Schmalzing, G., Illes, P. and Rubini, P. (2011). "Amino acid residues constituting the agonist binding site of the human P2X3 receptor." The Journal of biological chemistry **286**(4): 2739-2749.
- Bortolato, M., Yardley, M. M., Khoja, S., Godar, S. C., Asatryan, L., Finn, D. A., Alkana, R. L., Louie, S. G. and Davies, D. L. (2013). "Pharmacological insights into the role of P2X4 receptors in behavioural regulation: lessons from ivermectin." The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum **16**(5): 1059-1070.

- Bossemeyer, D. (1994). "The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element." Trends in biochemical sciences **19**(5): 201-205.
- Brone, B., Moechars, D., Marrannes, R., Mercken, M. and Meert, T. (2007). "P2X currents in peritoneal macrophages of wild type and P2X4 $-/-$ mice." Immunology letters **113**(2): 83-89.
- Burnstock, G. (1972). "Purinergeric nerves." Pharmacological reviews **24**(3): 509-581.
- Burnstock, G. (2006). "Purinergeric signalling." British journal of pharmacology **147** Suppl 1: S172-181.
- Burnstock, G. (2013). "Purinergeric signalling: pathophysiology and therapeutic potential." The Keio journal of medicine **62**(3): 63-73.
- Burnstock, G. (2014). "Purinergeric signalling: from discovery to current developments." Experimental physiology **99**(1): 16-34.
- Burnstock, G. and Knight, G. E. (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." International review of cytology **240**: 31-304.
- Campbell, W. C., Blair, L. S. and Lotti, V. J. (1979). "Efficacy of avermectins against *Trichinella spiralis* in mice." Journal of helminthology **53**(3): 254-256.
- Coddou, C., Morales, B., Gonzalez, J., Grauso, M., Gordillo, F., Bull, P., Rassendren, F. and Huidobro-Toro, J. P. (2003). "Histidine 140 plays a key role in the inhibitory modulation of the P2X4 nucleotide receptor by copper but not zinc." The Journal of biological chemistry **278**(38): 36777-36785.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P. and Stojilkovic, S. S. (2011). "Activation and regulation of purinergeric P2X receptor channels." Pharmacological reviews **63**(3): 641-683.
- Colquhoun, D. (1998). "Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors." British journal of pharmacology **125**(5): 924-947.
- Corriden, R. and Insel, P. A. (2010). "Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation." Science signaling **3**(104): re1.
- Coull, J. A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W. and De Koninck, Y. (2005). "BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain." Nature **438**(7070): 1017-1021.
- dbSNP Short Genetic Variations, National Center for Biotechnology Information, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.
- Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P. and Abbracchio, M. P. (2009). "Purinergeric signalling in inflammation of the central nervous system." Trends in neurosciences **32**(2): 79-87.
- Digby, H. R., Roberts, J. A., Sutcliffe, M. J. and Evans, R. J. (2005). "Contribution of conserved glycine residues to ATP action at human P2X1 receptors: mutagenesis indicates that the glycine at position 250 is important for channel function." Journal of neurochemistry **95**(6): 1746-1754.
- Du, J., Dong, H. and Zhou, H. X. (2012). "Gating mechanism of a P2X4 receptor developed from normal mode analysis and molecular dynamics simulations." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(11): 4140-4145.
- Eldefrawi, A. T. and Eldefrawi, M. E. (1987). "Receptors for gamma-aminobutyric acid and voltage-dependent chloride channels as targets for drugs and toxicants." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **1**(4): 262-271.
- Evans, R. J. (1996). "Single channel properties of ATP-gated cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in Chinese hamster ovary cells." Neuroscience letters **212**(3): 212-214.

- Fabbretti, E., Sokolova, E., Masten, L., D'Arco, M., Fabbro, A., Nistri, A. and Giniatullin, R. (2004). "Identification of negative residues in the P2X3 ATP receptor ectodomain as structural determinants for desensitization and the Ca²⁺-sensing modulatory sites." The Journal of biological chemistry **279**(51): 53109-53115.
- Fawaz, G. and Seraidarian, K. (1947). "The structure of adenosine triphosphate." Journal of the American Chemical Society **69**(4): 966.
- Friday, S. C. and Hume, R. I. (2008). "Contribution of extracellular negatively charged residues to ATP action and zinc modulation of rat P2X2 receptors." Journal of neurochemistry **105**(4): 1264-1275.
- Gargett, C. E., Cornish, J. E. and Wiley, J. S. (1997). "ATP, a partial agonist for the P2Z receptor of human lymphocytes." British journal of pharmacology **122**(5): 911-917.
- Gomes, P., Chevalier, J., Boesmans, W., Roosen, L., van den Abbeel, V., Neunlist, M., Tack, J. and Vanden Berghe, P. (2009). "ATP-dependent paracrine communication between enteric neurons and glia in a primary cell culture derived from embryonic mice." Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society **21**(8): 870-e862.
- Gordon, J. L. (1986). "Extracellular ATP: effects, sources and fate." The Biochemical journal **233**(2): 309-319.
- Graham, D., Pfeiffer, F. and Betz, H. (1982). "Avermectin B1a inhibits the binding of strychnine to the glycine receptor of rat spinal cord." Neuroscience letters **29**(2): 173-176.
- Gu, B. J., Baird, P. N., Vessey, K. A., Skarratt, K. K., Fletcher, E. L., Fuller, S. J., Richardson, A. J., Guymer, R. H. and Wiley, J. S. (2013). "A rare functional haplotype of the P2RX4 and P2RX7 genes leads to loss of innate phagocytosis and confers increased risk of age-related macular degeneration." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **27**(4): 1479-1487.
- Guide to pharmacology, IUPHAR/BPS, from <http://www.guidetopharmacology.org/>.
- Guo, C., Masin, M., Qureshi, O. S. and Murrell-Lagnado, R. D. (2007). "Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors." Molecular pharmacology **72**(6): 1447-1456.
- Hattori, M. and Gouaux, E. (2012). "Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors." Nature **485**(7397): 207-212.
- He, M. L., Gonzalez-Iglesias, A. E. and Stojilkovic, S. S. (2003). "Role of nucleotide P2 receptors in calcium signaling and prolactin release in pituitary lactotrophs." The Journal of biological chemistry **278**(47): 46270-46277.
- He, X., Ni, Y., Wang, Y., Romigh, T. and Eng, C. (2011). "Naturally occurring germline and tumor-associated mutations within the ATP-binding motifs of PTEN lead to oxidative damage of DNA associated with decreased nuclear p53." Human molecular genetics **20**(1): 80-89.
- Heyda, J., Mason, P. E. and Jungwirth, P. (2010). "Attractive interactions between side chains of histidine-histidine and histidine-arginine-based cationic dipeptides in water." The journal of physical chemistry. B **114**(26): 8744-8749.
- Hibell, A. D., Kidd, E. J., Chessell, I. P., Humphrey, P. P. and Michel, A. D. (2000). "Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors." British journal of pharmacology **130**(1): 167-173.
- Hu, B., Mei, Q. B., Yao, X. J., Smith, E., Barry, W. H. and Liang, B. T. (2001). "A novel contractile phenotype with cardiac transgenic expression of the human P2X4 receptor." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **15**(14): 2739-2741.
- Huang, L. D., Fan, Y. Z., Tian, Y., Yang, Y., Liu, Y., Wang, J., Zhao, W. S., Zhou, W. C., Cheng, X. Y., Cao, P., Lu, X. Y. and Yu, Y. (2014). "Inherent dynamics of head domain correlates with

- ATP-recognition of P2X4 receptors: insights gained from molecular simulations." PloS one **9**(5): e97528.
- Chataigneau, T., Lemoine, D. and Grutter, T. (2013). "Exploring the ATP-binding site of P2X receptors." Frontiers in cellular neuroscience **7**: 273.
- Jarvis, M. F. (2010). "The neural-glia purinergic receptor ensemble in chronic pain states." Trends in neurosciences **33**(1): 48-57.
- Jelinkova, I., Yan, Z., Liang, Z., Moonat, S., Teisinger, J., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (2006). "Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation." Biochemical and biophysical research communications **349**(2): 619-625.
- Jha, S., Karnani, N., Dhar, S. K., Mukhopadhyay, K., Shukla, S., Saini, P., Mukhopadhyay, G. and Prasad, R. (2003). "Purification and characterization of the N-terminal nucleotide binding domain of an ABC drug transporter of *Candida albicans*: uncommon cysteine 193 of Walker A is critical for ATP hydrolysis." Biochemistry **42**(36): 10822-10832.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Spelta, V., Surprenant, A. and North, R. A. (2001). "Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor." The Journal of biological chemistry **276**(18): 14902-14908.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Surprenant, A. and North, R. A. (2000). "Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor." The Journal of biological chemistry **275**(44): 34190-34196.
- Jiang, R., Lemoine, D., Martz, A., Taly, A., Gonin, S., Prado de Carvalho, L., Specht, A. and Grutter, T. (2011). "Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(22): 9066-9071.
- Jindrichova, M., Vavra, V., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (2009). "Functional relevance of aromatic residues in the first transmembrane domain of P2X receptors." Journal of neurochemistry **109**(3): 923-934.
- Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T. and Gouaux, E. (2009). "Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state." Nature **460**(7255): 592-598.
- Kawate, T., Robertson, J. L., Li, M., Silberberg, S. D. and Swartz, K. J. (2011). "Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels." The Journal of general physiology **137**(6): 579-590.
- Kennard, O., Isaacs, N. W., Coppola, J. C., Kirby, A. J., Warren, S., Motherwell, W. D., Watson, D. G., Wampler, D. L., Chenery, D. H., Larson, A. C., Kerr, K. A. and Di Sanseverino, L. R. (1970). "Three dimensional structure of adenosine triphosphate." Nature **225**(5230): 333-336.
- Khadra, A., Tomic, M., Yan, Z., Zemkova, H., Sherman, A. and Stojilkovic, S. S. (2013). "Dual gating mechanism and function of P2X7 receptor channels." Biophysical journal **104**(12): 2612-2621.
- Khadra, A., Yan, Z., Coddou, C., Tomic, M., Sherman, A. and Stojilkovic, S. S. (2012). "Gating properties of the P2X2a and P2X2b receptor channels: experiments and mathematical modeling." The Journal of general physiology **139**(5): 333-348.
- Khakh, B. S., Bao, X. R., Labarca, C. and Lester, H. A. (1999a). "Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds." Nature neuroscience **2**(4): 322-330.
- Khakh, B. S. and Egan, T. M. (2005). "Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics." The Journal of biological chemistry **280**(7): 6118-6129.
- Khakh, B. S. and North, R. A. (2006). "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease." Nature **442**(7102): 527-532.

- Khakh, B. S. and North, R. A. (2012). "Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS." Neuron **76**(1): 51-69.
- Khakh, B. S., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V., Labarca, C. and Lester, H. A. (1999b). "Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **19**(17): 7289-7299.
- Kim, M. J., Turner, C. M., Hewitt, R., Smith, J., Bhargal, G., Pusey, C. D., Unwin, R. J. and Tam, F. W. (2014). "Exaggerated renal fibrosis in P2X4 receptor-deficient mice following unilateral ureteric obstruction." Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.
- Kowalski, M., Hausmann, R., Dopychai, A., Grohmann, M., Franke, H., Nieber, K., Schmalzing, G., Illes, P. and Riedel, T. (2014). "Conformational flexibility of the agonist binding jaw of the human P2X3 receptor is a prerequisite for channel opening." British journal of pharmacology.
- Krause, R. M., Buisson, B., Bertrand, S., Corringer, P. J., Galzi, J. L., Changeux, J. P. and Bertrand, D. (1998). "Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor." Molecular pharmacology **53**(2): 283-294.
- Krusek, J. and Zemkova, H. (1994). "Effect of ivermectin on gamma-aminobutyric acid-induced chloride currents in mouse hippocampal embryonic neurones." European journal of pharmacology **259**(2): 121-128.
- Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P. G. and Pankratov, Y. (2014). "Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex." PLoS biology **12**(1): e1001747.
- Le, K. T., Babinski, K. and Seguela, P. (1998). "Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **18**(18): 7152-7159.
- Leipe, D. D., Koonin, E. V. and Aravind, L. (2003). "Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins." Journal of molecular biology **333**(4): 781-815.
- Lenertz, L. Y., Wang, Z., Guadarrama, A., Hill, L. M., Gavala, M. L. and Bertics, P. J. (2010). "Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X7 reveals a key residue important for receptor function." Biochemistry **49**(22): 4611-4619.
- Lewis, C. J., Surprenant, A. and Evans, R. J. (1998). "2',3'-O-(2,4,6- trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP)--a nanomolar affinity antagonist at rat mesenteric artery P2X receptor ion channels." British journal of pharmacology **124**(7): 1463-1466.
- Li, Z., Migita, K., Samways, D. S., Voigt, M. M. and Egan, T. M. (2004). "Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **24**(33): 7378-7386.
- Liao, H. F., Kao, C. H., Lin, W. D., Hsiao, N. W., Hsu, W. H. and Lee, Y. C. (2012). "N-Acetyl-D-glucosamine 2-epimerase from *Anabaena* sp CH1 contains a novel ATP-binding site required for catalytic activity." Process Biochemistry **47**(6): 948-952.
- Lohman, A. W., Billaud, M. and Isakson, B. E. (2012). "Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall." Cardiovascular research **95**(3): 269-280.
- Markwardt, F. (2007). "Activation kinetics of single P2X receptors." Purinergic signalling **3**(4): 249-253.
- Martins, I., Wang, Y., Michaud, M., Ma, Y., Sukkurwala, A. Q., Shen, S., Kepp, O., Metivier, D., Galluzzi, L., Perfettini, J. L., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2014). "Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death." Cell death and differentiation **21**(1): 79-91.

- Matte, A. D., LTJ (2010). ATP-binding motifs. Encyclopedia of life science. Chichester, John Wiley & Sons.
- Mellander, L. J., Kurczy, M. E., Najafinobar, N., Dunevall, J., Ewing, A. G. and Cans, A. S. (2014). "Two modes of exocytosis in an artificial cell." Scientific reports **4**: 3847.
- Misra, R. C., Verma, A. K., Verma, S. K., Kumar, V., Siddiqui, W. A., Siddiqui, M. I. and Murthy, P. K. (2012). "Heat shock protein 60 of filarial parasite *Brugia malayi*: cDNA cloning, expression, purification and in silico modeling and analysis of its ATP binding site." Experimental parasitology **132**(2): 257-266.
- Mitchell, M. S. and Rao, V. B. (2004). "Novel and deviant Walker A ATP-binding motifs in bacteriophage large terminase-DNA packaging proteins." Virology **321**(2): 217-221.
- Murrell-Lagnado, R. D. and Qureshi, O. S. (2008). "Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors (Review)." Molecular membrane biology **25**(4): 321-331.
- Nagy, M., Wu, H. C., Liu, Z., Kedzierska-Mieszkowska, S. and Zolkiewski, M. (2009). "Walker-A threonine couples nucleotide occupancy with the chaperone activity of the AAA+ ATPase ClpB." Protein science : a publication of the Protein Society **18**(2): 287-293.
- Negulyaev, Y. A. and Markwardt, F. (2000). "Block by extracellular Mg²⁺ of single human purinergic P2X₄ receptor channels expressed in human embryonic kidney cells." Neuroscience letters **279**(3): 165-168.
- Nicke, A. (2008). "Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X₇ subunits." Biochemical and biophysical research communications **377**(3): 803-808.
- Nicke, A., Kerschensteiner, D. and Soto, F. (2005). "Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X₁ and P2X₄ subunits." Journal of neurochemistry **92**(4): 925-933.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiological reviews **82**(4): 1013-1067.
- Nunez, L., Villalobos, C. and Frawley, L. S. (1997). "Extracellular ATP as an autocrine/paracrine regulator of prolactin release." The American journal of physiology **272**(6 Pt 1): E1117-1123.
- Paul, S. M., Skolnick, P. and Zatz, M. (1980). "Avermectin B1a: an irreversible activator of the gamma-aminobutyric acid-benzodiazepine-chloride-ionophore receptor complex." Biochemical and biophysical research communications **96**(2): 632-638.
- Petrenko, N., Khafizov, K., Tvrdonova, V., Skorinkin, A. and Giniatullin, R. (2011). "Role of the ectodomain serine 275 in shaping the binding pocket of the ATP-gated P2X₃ receptor." Biochemistry **50**(39): 8427-8436.
- Priel, A. and Silberberg, S. D. (2004). "Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X₄ receptor channels." The Journal of general physiology **123**(3): 281-293.
- Rai, V., Gaur, M., Kumar, A., Shukla, S., Komath, S. S. and Prasad, R. (2008). "A novel catalytic mechanism for ATP hydrolysis employed by the N-terminal nucleotide-binding domain of Cdr1p, a multidrug ABC transporter of *Candida albicans*." Biochimica et biophysica acta **1778**(10): 2143-2153.
- Rassendren, F., Buell, G., Newbolt, A., North, R. A. and Surprenant, A. (1997). "Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor." The EMBO journal **16**(12): 3446-3454.
- Riedel, T., Wiese, S., Leichsenring, A. and Illes, P. (2012). "Effects of nucleotide analogs at the P2X₃ receptor and its mutants identify the agonist binding pouch." Molecular pharmacology **82**(1): 80-89.
- Roberts, J. A. and Evans, R. J. (2004). "ATP binding at human P2X₁ receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists." The Journal of biological chemistry **279**(10): 9043-9055.

- Roberts, J. A. and Evans, R. J. (2006). "Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP." Journal of neurochemistry **96**(3): 843-852.
- Roberts, J. A. and Evans, R. J. (2007). "Cysteine substitution mutants give structural insight and identify ATP binding and activation sites at P2X receptors." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **27**(15): 4072-4082.
- Rokic, M. B., Stojilkovic, S. S., Vavra, V., Kuzyk, P., Tvrdonova, V. and Zemkova, H. (2013). "Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor." PloS one **8**(3): e59411.
- Samways, D. S., Khakh, B. S., Dutertre, S. and Egan, T. M. (2011). "Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors)." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(33): 13800-13805.
- Serrano, A., Mo, G., Grant, R., Pare, M., O'Donnell, D., Yu, X. H., Tomaszewski, M. J., Perkins, M. N., Seguela, P. and Cao, C. Q. (2012). "Differential expression and pharmacology of native P2X receptors in rat and primate sensory neurons." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **32**(34): 11890-11896.
- Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K. and Torimitsu, K. (2009). "Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X(4) receptors." PLoS biology **7**(5): e1000103.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. and Peitsch, M. C. (2003). "SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server." Nucleic acids research **31**(13): 3381-3385.
- Silberberg, S. D., Li, M. and Swartz, K. J. (2007). "Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels." Neuron **54**(2): 263-274.
- Sim, J. A., Chaumont, S., Jo, J., Ulmann, L., Young, M. T., Cho, K., Buell, G., North, R. A. and Rassendren, F. (2006). "Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **26**(35): 9006-9009.
- Sim, J. A., Park, C. K., Oh, S. B., Evans, R. J. and North, R. A. (2007). "P2X1 and P2X4 receptor currents in mouse macrophages." British journal of pharmacology **152**(8): 1283-1290.
- Sonin, D., Zhou, S. Y., Cronin, C., Sonina, T., Wu, J., Jacobson, K. A., Pappano, A. and Liang, B. T. (2008). "Role of P2X purinergic receptors in the rescue of ischemic heart failure." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **295**(3): H1191-H1197.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., Gomez-Hernandez, J. M., Hollmann, M., Karschin, C. and Stuhmer, W. (1996). "P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(8): 3684-3688.
- Stanchev, D., Flehmig, G., Gerevich, Z., Norenberg, W., Dihazi, H., Furst, S., Eschrich, K., Illes, P. and Wirkner, K. (2006). "Decrease of current responses at human recombinant P2X3 receptors after substitution by Asp of Ser/Thr residues in protein kinase C phosphorylation sites of their ecto-domains." Neuroscience letters **393**(1): 78-83.
- Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (2013). "P2X receptor channels in endocrine glands." Wiley interdisciplinary reviews. Membrane transport and signaling **2**(4): 173-180.
- Stokes, L., Scurrah, K., Ellis, J. A., Cromer, B. A., Skarratt, K. K., Gu, B. J., Harrap, S. B. and Wiley, J. S. (2011). "A loss-of-function polymorphism in the human P2X4 receptor is associated with increased pulse pressure." Hypertension **58**(6): 1086-1092.

- Supavilai, P. and Karobath, M. (1981). "In vitro modulation by avermectin B1a of the GABA/benzodiazepine receptor complex of rat cerebellum." Journal of neurochemistry **36**(3): 798-803.
- Toulme, E., Soto, F., Garret, M. and Boue-Grabot, E. (2006). "Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin." Molecular pharmacology **69**(2): 576-587.
- Tsuda, M., Kuboyama, K., Inoue, T., Nagata, K., Tozaki-Saitoh, H. and Inoue, K. (2009). "Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays." Molecular pain **5**: 28.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W. and Inoue, K. (2003). "P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury." Nature **424**(6950): 778-783.
- Tsuda, M., Toyomitsu, E., Komatsu, T., Masuda, T., Kunifusa, E., Nasu-Tada, K., Koizumi, S., Yamamoto, K., Ando, J. and Inoue, K. (2008a). "Fibronectin/integrin system is involved in P2X(4) receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury." Glia **56**(5): 579-585.
- Tsuda, M., Tozaki-Saitoh, H. and Inoue, K. (2012). "Purinergic system, microglia and neuropathic pain." Current opinion in pharmacology **12**(1): 74-79.
- Tsuda, M., Tozaki-Saitoh, H., Masuda, T., Toyomitsu, E., Tezuka, T., Yamamoto, T. and Inoue, K. (2008b). "Lyn tyrosine kinase is required for P2X(4) receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury." Glia **56**(1): 50-58.
- Ulmann, L., Hatcher, J. P., Hughes, J. P., Chaumont, S., Green, P. J., Conquet, F., Buell, G. N., Reeve, A. J., Chessell, I. P. and Rassendren, F. (2008). "Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **28**(44): 11263-11268.
- Ulmann, L., Hirbec, H. and Rassendren, F. (2010). "P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain." The EMBO journal **29**(14): 2290-2300.
- Ulmann, L., Levavasseur, F., Avignone, E., Peyroutou, R., Hirbec, H., Audinat, E. and Rassendren, F. (2013). "Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus." Glia **61**(8): 1306-1319.
- Vacca, F., D'Ambrosi, N., Nestola, V., Amadio, S., Giustizieri, M., Cucchiaroni, M. L., Tozzi, A., Velluz, M. C., Mercuri, N. B. and Volonte, C. (2011). "N-Glycans mutations rule oligomeric assembly and functional expression of P2X3 receptor for extracellular ATP." Glycobiology **21**(5): 634-643.
- Valente, M., Watterson, S. J., Parker, M. D., Ford, R. C. and Young, M. T. (2011). "Expression, purification, electron microscopy, N-glycosylation mutagenesis and molecular modeling of human P2X4 and Dictyostelium discoideum P2XA." Biochimica et biophysica acta **1808**(12): 2859-2866.
- Vavra, V., Bhattacharya, A. and Zemkova, H. (2011). "Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices." Neuroscience **188**: 1-12.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." The EMBO journal **1**(8): 945-951.
- Wescott, R. B., Farrell, C. J., Gallina, A. M. and Foreyt, W. J. (1980). "Efficacy of avermectin B1a for treatment of experimentally induced nematode infections in cattle." American journal of veterinary research **41**(8): 1326-1328.

- Wesseliuss, A., Bours, M. J., Jorgensen, N. R., Wiley, J., Gu, B., van Helden, S., van Rhijn, L. and Dagnelie, P. C. (2013). "Non-synonymous polymorphisms in the P2RX (4) are related to bone mineral density and osteoporosis risk in a cohort of Dutch fracture patients." Purinergic signalling **9**(1): 123-130.
- Wilkinson, W. J. and Kemp, P. J. (2011). "The carbon monoxide donor, CORM-2, is an antagonist of ATP-gated, human P2X4 receptors." Purinergic signalling **7**(1): 57-64.
- Wirkner, K., Stanchev, D., Koles, L., Klebingat, M., Dihazi, H., Flehmig, G., Vial, C., Evans, R. J., Furst, S., Mager, P. P., Eschrich, K. and Illes, P. (2005). "Regulation of human recombinant P2X3 receptors by ecto-protein kinase C." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **25**(34): 7734-7742.
- Wixey, J. A., Reinebrant, H. E., Carty, M. L. and Buller, K. M. (2009). "Delayed P2X4R expression after hypoxia-ischemia is associated with microglia in the immature rat brain." Journal of neuroimmunology **212**(1-2): 35-43.
- Worthington, R. A., Smart, M. L., Gu, B. J., Williams, D. A., Petrou, S., Wiley, J. S. and Barden, J. A. (2002). "Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X(7) receptor function." FEBS letters **512**(1-3): 43-46.
- Wyatt, L. R., Finn, D. A., Khoja, S., Yardley, M. M., Asatryan, L., Alkana, R. L. and Davies, D. L. (2014). "Contribution of P2X4 Receptors to Ethanol Intake in Male C57BL/6 Mice." Neurochemical research **39**(6): 1127-1139.
- Wyatt, L. R., Godar, S. C., Khoja, S., Jakowec, M. W., Alkana, R. L., Bortolato, M. and Davies, D. L. (2013). "Sociocommunicative and sensorimotor impairments in male P2X4-deficient mice." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology **38**(10): 1993-2002.
- Xiong, K., Stewart, R. R., Hu, X. Q., Werby, E., Peoples, R. W., Weight, F. F. and Li, C. (2004a). "Role of extracellular histidines in agonist sensitivity of the rat P2X4 receptor." Neuroscience letters **365**(3): 195-199.
- Xiong, K., Stewart, R. R., Weight, F. F. and Li, C. (2004b). "Role of extracellular histidines in antagonist sensitivity of the rat P2X4 receptor." Neuroscience letters **367**(2): 197-200.
- Yamamoto, K., Korenaga, R., Kamiya, A., Qi, Z., Sokabe, M. and Ando, J. (2000). "P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **279**(1): H285-292.
- Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Kobayashi, M., Kawamura, K., Masuda, H., Kamiya, A. and Ando, J. (2006). "Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice." Nature medicine **12**(1): 133-137.
- Yan, Z., Khadra, A., Li, S., Tomic, M., Sherman, A. and Stojilkovic, S. S. (2010). "Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **30**(42): 14213-14224.
- Yan, Z., Li, S., Liang, Z., Tomic, M. and Stojilkovic, S. S. (2008). "The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions." The Journal of general physiology **132**(5): 563-573.
- Yan, Z., Liang, Z., Tomic, M., Obsil, T. and Stojilkovic, S. S. (2005). "Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel." Molecular pharmacology **67**(4): 1078-1088.
- Yang, A., Sonin, D., Jones, L., Barry, W. H. and Liang, B. T. (2004). "A beneficial role of cardiac P2X4 receptors in heart failure: rescue of the calsequestrin overexpression model of cardiomyopathy." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **287**(3): H1096-1103.

- Yang, T., Shen, J. B., Yang, R., Redden, J., Dodge-Kafka, K., Grady, J., Jacobson, K. A. and Liang, B. T. (2014). "A Novel Protective Role of Endogenous Cardiac Myocyte P2X4 Receptors in Heart Failure." Circulation. Heart failure.
- Zemkova, H., Kucka, M., Li, S., Gonzalez-Iglesias, A. E., Tomic, M. and Stojilkovic, S. S. (2010). "Characterization of purinergic P2X4 receptor channels expressed in anterior pituitary cells." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **298**(3): E644-651.
- Zemkova, H., Tvrdonova, V., Bhattacharya, A. and Jindrichova, M. (2014). "Allosteric modulation of ligand gated ion channels by ivermectin." Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca **63 Suppl 1**: S215-224.
- Zemkova, H., Yan, Z., Liang, Z., Jelinkova, I., Tomic, M. and Stojilkovic, S. S. (2007). "Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions." Journal of neurochemistry **102**(4): 1139-1150.
- Zhang, L., Xu, H., Jie, Y., Gao, C., Chen, W., Yin, S., Samways, D. S. and Li, Z. (2014). "Involvement of ectodomain Leu 214 in ATP binding and channel desensitization of the P2X4 receptor." Biochemistry **53**(18): 3012-3019.
- Zhao, W. S., Wang, J., Ma, X. J., Yang, Y., Liu, Y., Huang, L. D., Fan, Y. Z., Cheng, X. Y., Chen, H. Z., Wang, R. and Yu, Y. (2014). "Relative motions between left flipper and dorsal fin domains favour P2X4 receptor activation." Nature communications **5**: 4189.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology **362**(4-5): 299-309.

8. PŘÍLOHY

8.1. SEZNAM AUTORSKÝCH PUBLIKACÍ

I. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

Tvrdonova V., Rokic, M. B., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (2014). "Identification of functionally important residues of the rat P2X4 receptor by alanine scanning mutagenesis of the dorsal fin and left flipper domains." PLoS One, *in print*; **IF = 3,534**

Rokic, M. B., Stojilkovic, S. S., Vavra, V., Kuzyk, P., Tvrdonova, V. and Zemkova, H. (2013). "Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor." PLoS One **8**(3): e59411.; **IF = 3,730**

Zemkova, H., Khadra, A., Rokic, M. B., Tvrdonova, V., Sherman, A. and Stojilkovic, S. S. (2014). "Allosteric regulation of the P2X4 receptor channel pore dilation." Pflugers Arch. *in print*; **IF = 3,073**

II. Další publikace

Rokic, M. B., Tvrdonova, V., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (2010). "Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating." Physiol Res **59**(6): 927-935.; **IF = 1,853**

Petrenko, N., Khafizov, K., Tvrdonova, V., Skorinkin, A. and Giniatullin, R. (2011). "Role of the ectodomain serine 275 in shaping the binding pocket of the ATP-gated P2X3 receptor." Biochemistry **50**(39): 8427-8436.; **IF = 3,226**

Zemkova, H., Tvrdonova, V., Bhattacharya, A. and Jindrichova, M. (2014). "Allosteric modulation of ligand gated ion channels by ivermectin." Physiol Res **63 Suppl 1**: S215-224.; **IF = 1,487**

PODÍL VENDULY TVRDOŇOVÉ NA AUTORSKÝCH PUBLIKACÍCH

TVRDOŇOVÁ V., Rokic, M. B., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (2014). "Identification of functionally important residues of the rat P2X4 receptor by alanine scanning mutagenesis of the dorsal fin and left flipper domains." PLoS One, *in print*

Prováděla všechny elektrofyziologické pokusy, připravovala mutace, analyzovala data, podílela se na homologním modelování, připravovala obrázky a sepsala první verzi rukopisu.

Rokic, M. B., Stojilkovic, S. S., Vavra, V., Kuzyk, P., TVRDOŇOVÁ V. and Zemkova, H. (2013). "Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor." PLoS One **8**(3): e59411

Prováděla elektrofyziologické pokusy a podílela se na přípravě mutací, analýze dat, homologním modelování, přípravě obrázků a na tvorbě rukopisu.

Zemkova, H., Khadra, A., Rokic, M. B., TVRDOŇOVÁ V., Sherman, A. and Stojilkovic, S. S. (2014). "Allosteric regulation of the P2X4 receptor channel pore dilation." Pflugers Arch. *in print*

Podílela se na elektrofyziologických pokusech a na přípravě mutací.

Rokic, M. B., TVRDOŇOVÁ V., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (2010). "Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating." Physiol Res **59**(6): 927-935.

Prováděla elektrofyziologické pokusy, podílela se na přípravě mutací, analýze dat, přípravě obrázků a na tvorbě rukopisu. Práce na tomto tématu byla základem její diplomové práce.

Petrenko, N., Khafizov, K., TVRDOŇOVÁ V., Skorinkin, A. and Giniatullin, R. (2011). "Role of the ectodomain serine 275 in shaping the binding pocket of the ATP-gated P2X3 receptor." Biochemistry **50**(39): 8427-8436.

Připravila mutaci a podílela se na tvorbě rukopisu.

Zemkova, H., TVRDOŇOVÁ V., Bhattacharya, A. and Jindrichova, M. (2014). "Allosteric modulation of ligand gated ion channels by ivermectin." REVIEW Physiol Res **63 Suppl 1**: S215-224.

Podílela se na tvorbě rukopisu.

V Praze dne 24. října 2014

.....
za spoluautory uvedených prací
RNDr. Hana Zemková, CSc.

8.2. SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1: ILUSTRATIVNÍ SNÍMEK AKTIVOVANÉ MIKROGLIE	13
OBRÁZEK 2: SCHÉMATICKÉ ZNÁZORNĚNÍ JEDNOTLIVÝCH AGONISTŮ	17
OBRÁZEK 3: RODINY LIGANDEM AKTIVOVANÝCH IONTOVÝCH KANÁLŮ	21
OBRÁZEK 4: ZNÁZORNĚNÍ AMK PODÍLEJÍCÍCH SE NA VAZBĚ ATP V LIDSKÉM P-GLYKOPROTEINU	23
OBRÁZEK 5: ATP-VAZEBNÉ MÍSTO DLE KRYSTALU ZFP2X4R A ZMĚNY NÁSLEDUJÍCÍ PO NAVÁZÁNÍ ATP	27
OBRÁZEK 6: STYČNÉ PLOCHY PODJEDNOTEK A JEJICH VARIABILITA	28
OBRÁZEK 7: PRŮŘEZ ZFP2X4R.	30
OBRÁZEK 8: KINETICKÝ MODEL P2X2R.	31
OBRÁZEK 9: REVIDOVANÝ MARKOVŮV KINETICKÝ MODEL PRO P2X7R.	32
OBRÁZEK 10: DEAKTIVACE A DESENZITIZACE	43
OBRÁZEK 11: IDENTIFIKACE KLÍČOVÝCH AMK V LF A DF RP2X4R.	46
OBRÁZEK 12: ZMĚNA CITLIVOSTI MUTACÍ V LF A DF.	48
OBRÁZEK 13: POTENCIAČNÍ EFEKT IVERMEKTINU NA PROUDY MÁLO FUNKČNÍCH MUTACÍ LF A DF.	50
OBRÁZEK 14: ZÁVISLOST DEAKTIVACE A DESENZITIZACE NA CITLIVOSTI K ATP.	52
OBRÁZEK 15: ODPOVĚDI WT A VYBRANÝCH MUTOVANÝCH RECEPTORŮ NA ANALOGICKÉ AGONISTY VE SROVNÁNÍ S ATP.	54
OBRÁZEK 16: STRUKTURA LF A DF VE SVĚTLE DAT Z MĚŘENÍ ORTOSTERICKÝCH AGONISTŮ.	56
OBRÁZEK 17: VLIV MUTACÍ V EXTRACELULÁRNÍM VESTIBULU NA FUNKCI P2X4R.	57
OBRÁZEK 18: ROZLOŽENÍ ZASAŽENÝCH MUTACÍ V EXTRACELULÁRNÍM VESTIBULU P2X4R.	59
OBRÁZEK 19: VZTAH MEZI DESENZITIZACÍ A PERMEABILITOU P2X4 KANÁLU.	60
OBRÁZEK 20: KINETICKÝ MODEL P2X4R.	61
OBRÁZEK 21: MOŽNÁ INTERAKCE MEZI R203 A H286 VE STRUKTUŘE RP2X4R.	64
OBRÁZEK 22: MOŽNÝ KONTAKT MEZI R282 A W194 VE STRUKTUŘE RP2X4R.	69