

P2~ receptor je iontový kanál, jehož ligandem je ATP. Je to jediný savčí purinergní receptor, který může být modulován působením extracelulárně aplikovaného ivermektinu (IVM). IVM je alosterický modulátor, který zvyšuje citlivost P2~ receptoru k agonistům, potencuje maximální proudové odpovědi a prodlužuje dobu deaktivace kanálu po odmytí agonisty. V této studii jsme se pokusili lokalizovat vazebné místo pro IVM a pomocí jeho pozitivního alosterického účinku získat nové informace o vztahu struktury a funkce P2~ receptoru.

Nejdříve jsme se zaměřili na identifikaci oblastí P2X4 receptoru a jednotlivých aminokyselinových zbytků, které se podílejí na účincích IVM na otevírání kanálu. K tomuto účelu jsme využili různé chimérické receptory P2X2 a P2~ receptorů a dále také řadu bodových mutantních receptorů. Experimenty s chimérickými receptory ukázaly, že extracelulární sekvence V49-V61, ale ne sekvence V64-Y315, je důležitá pro účinek IVM na deaktivaci kanálu. Receptor-specifické mutace v oblasti transmembránových domén G29-V61 a N338-L358 ukázaly, že také zbytky W50, V61 a V357 hrají roli v účinku IVM na deaktivaci kanálu. Následně jsme také testovali význam všech zbytků v oblasti transmembránových domén. Výsledky cysteinové skenovací mutagenese potvrdily naši domněnku o významu zbytku W50 a dále také odhalily důležitost zbytků G29, R33, Q36, L40, V43, V47, N338, G342, L346, A349 a I356 pro vazbu IVM na P2~ receptor.

V této studii jsme využili IVM také jako farmakologický nástroj k určení pořadí důležitosti vybraných reziduí v extracelulární doméně pro vazbu ATP a funkci iontového kanálu. Vytvořili jsme alaninové či záchranné mutace zbytků K67, F185, K190, F230, R278, D280, F294, R295 a K313, které jsou považovány za klíčové pro vazbu ATP. Většina těchto mutantních receptorů odpovídala jen velmi málo nebo vůbec na stimulaci ATP, avšak modulační účinek IVM byl u těchto receptorů zachován.