

ABSTRAKT (CZ)

Purinergní P2X receptory jsou ATP-aktivované iontové kanály, které mají mnoho fyziologických rolí a nově představují důležité terapeutické cíle v řadě nemocí. P2X podjednotky se skládají ze dvou transmembránových α -helixů (TM1 a TM2), extracelulární ATP-vazebné domény a intracelulárních N- a C- konců. Sedm různých P2X podjednotek (P2X1-7) se může složit a vytvořit homotrimerní nebo heterotrimerní iontové kanály propustné pro monovalentní kationty a vápník. P2X receptory se vyskytují prakticky ve všech tkáních, v mozku mají největší zastoupení podjednotky P2X2, P2X4 a P2X7. Aktivita P2X nezávisí jen na přítomnosti ATP, ale také alosterických modulátorů, které mohou inhibovat nebo zvyšovat aktivitu těchto kanálů. Naším cílem bylo identifikovat nové molekuly, které mohou interagovat s alosterickými vazebnými místy na P2X receptorech, navrhnout a syntetizovat nové analogy neurosteroidů a určit kritické receptorové domény nebo aminokyseliny, které jsou důležité pro vazbu neurosteroidu. Pomocí patch-clamp elektrofyziologické techniky jsme snímali ATP-evokované proudy z HEK293T buněk transfekovaných potkaními P2X2, P2X4 a P2X7, a z buněk předního laloku hypofýzy nebo hypotalamických neuronů, které tyto receptory přirozeně exprimují. Nalezli jsme, že 17β -ester deriváty testosteronu, především testosteron butyrát a testosteron valerát, selektivně potencují P2X2 a P2X4, nikoliv ale P2X7. Tyto látky alostericky modulují otevírání P2X iontového kanálu pravděpodobně vazbou mezi transmembránové helixy. Také jsme ukázali, že sekundární žlučové kyseliny, lithocholová kyselina a 4-dafachronová kyselina, jsou silné inhibitory P2X2, ale pozitivní alosterické modulátory P2X4 a v menší míře také P2X7. Modulace ATP-evokovaných proudů zprostředkovaných endogenně exprimovanými P2X2 a P2X4 receptory byla po aplikaci neurosteroidů potvrzena v nativních buňkách. Navíc jsme detailně popsali strukturní požadavky na tyto látky pro modulační účinek. Jak testosteronové deriváty tak lithocholová kyselina byly schopny částečně inhibovat účinek ivermektinu, P2X4-specifického pozitivního alosterického modulátoru. Ukázali jsme, že potenciační účinek lithocholové kyseliny byl inhibován u Y42A, a významně snížen u F48A and V43A mutací, které jsou součástí vazebného místa pro ivermektin u P2X4. Znamená to, že vazebné místo pro námi identifikované neurosteroidy se překrývá s vazebným místem pro ivermektin, který interaguje s transmembránovou doménou receptoru.