

ABSTRAKT

Mimobuněčný adenosin-5'-trifosfát (ATP), uvolňovaný z poškozených buněk nebo sekretovaný ze synaptických váčků, působí na své membránové receptory nazývané purinergní. Purinergní P2X receptory jsou iontové kanály aktivované ATP. Dosud bylo u savců identifikováno sedm P2X podjednotek, označených jako P2X₁₋₇. Všechny podjednotky mají podobnou strukturu, kterou tvoří velká ektodoménová klička, dvě transmembránové domény a vnitrobuněčné N- a C- konce. Dalším společným rysem jsou konzervované aminokyseliny, mezi něž patří i deset cysteinových zbytků v ektodoménové kličce. Všechny ektodoménové cysteiny tvoří disulfidické můstky, které jsou uspořádány do dvou polovin, tři disulfidické můstky jsou v N-koncové části a dva jsou v C-koncové části ektodomény. P2X receptory jsou organizovány jako homoméry nebo heteroméry tří podjednotek. ATP vazebná kapsa se nachází mezi dvěma sousedními podjednotkami. Cílem diplomové práce bylo prozkoumat úlohu ektodoménových cysteinů nebo disulfidických můstků ve funkci a tvorbě P2X₄ receptoru a jeho citlivosti k ATP. Všech deset cysteinů, jeden po druhém, bylo nahrazeno alaniny a ATP-stimulované proudy byly snímány z HEK293 buněk nesoucích divoký typ P2X₄ receptoru a jeho mutanty. Pro další výzkum nefunkčních nebo málo funkčních mutací (C126A, C149A, C217A, C227A, C270A) byl využit ivermektin a jím prodloužený čas deaktivace receptoru. Výsledky získané u mutací C116A, C126A, C149A a C165A naznačují poruchu ATP-vazebné kapsy při narušení jednoho z jimi tvořených disulfidických můstků. Třetí cysteinový můstek (Cys¹³²-Cys¹⁵⁹) se jeví jako postradatelný. Velmi důležitý pro funkci P2X₄ receptoru je čtvrtý cysteinový můstek (Cys²¹⁷-Cys²²⁷). Na převodu signálu z ektodomény k transmembránovým doménám či otevírání iontového kanálu se podílí Cys²⁶¹ a Cys²⁷⁰.

PŘEDMĚTOVÁ SLOVA

molekulární biologie, polymerázová řetězová reakce, buněčné linie, pasážování, transfekce, elektrofyziologie, patch clamp, konfokální mikroskopie

KLÍČOVÁ SLOVA

HEK293 buňky, purinergní receptory, P2X₄ receptor, mimobuněčný adenosin-5'-trifosfát, ivermektin, aktivace iontového kanálu, otevírání iontového kanálu, vazebné místo pro ATP, zelený fluorescenční protein, mutagenese, EC₅₀