

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**ÚLOHA DESETI EKTODOMÉNOVÝCH
CYSTEINOVÝCH ZBYTKŮ VE FUNKCI
P2X₄ RECEPTORU STIMULOVANÉHO
ADENOSIN-5'-TRIFOSFÁTEM**

Diplomová práce studijního oboru
Klinická a toxikologická analýza

P r a h a 2 0 1 0

Vendula Tvrdoňová

1.	ÚVOD	9
1.1.	EXTRACELULÁRNÍ ADENOSIN-5'-TRIFOSFÁT	10
1.2.	LIGANDEM AKTIVOVANÉ IONTOVÉ KANÁLY	12
1.3.	PURINERGNÍ RECEPTORY.....	13
1.3.1.	G-proteinové receptory (P1 a P2Y)	14
1.3.2.	Iontové kanály (P2X)	15
1.4.	STRUKTURA A VLASTNOSTI P2X ₄ RECEPTORU.....	15
1.5.	FYZIOLOGICKÁ ROLE P2X ₄ RECEPTORU	17
1.6.	TVORBA P2X ₄ RECEPTORU V BUŇCE	19
1.6.1.	Gen P2X ₄ receptoru.....	19
1.6.2.	Skládání a kompletace proteinu v buňce	20
1.6.3.	Transport proteinu k membráně a zpět.....	21
1.7.	FARMAKOLOGIE P2X ₄ RECEPTORU	23
1.7.1.	Aktivace.....	23
1.7.2.	Inhibice.....	23
1.7.3.	Modulace	24
1.8.	KINETICKÝ MODEL P2X ₄ RECEPTORU.....	26
2.	CÍLE PRÁCE.....	29
3.	METODIKA.....	30
3.1.	BODOVÉ MUTACE V PROTEINU.....	30
3.1.1.	Polymerázová řetězová reakce	30
3.1.2.	Transformace kompetentních buněk.....	31
3.1.3.	Izolace DNA, sekvence	33
3.2.	PÉČE O BUŇKY.....	33
3.2.1.	Pasážování.....	34
3.2.2.	Transfekce	35
3.3.	ELEKTROFYZIOLOGICKÁ MĚŘENÍ	35
3.3.1.	Roztoky	35
3.3.2.	Snímání signálů z buněk.....	37
3.4.	KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE.....	39
3.4.1.	Příprava buněk pro konfokální mikroskopii	39
3.4.2.	Snímání obrazu	40
3.5.	VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ - VÝPOČTY	41
4.	VÝSLEDKY	42
4.1.	EXPERIMENTÁLNÍ MODEL.....	42
4.2.	VÝSKYT RECEPTORU V MEMBRÁNĚ.....	44
4.3.	TOXIKOLOGICKÉ PARAMETRY	45
4.4.	ZMĚNA ODPOVĚDI RECEPTORU PŘI APLIKACI IVERMEKTINU	47
4.5.	DEAKTIVACE P2X ₄ RECEPTORU	49
5.	DISKUZE.....	50
5.1.	ROLE CYSTEINOVÝCH MŮSTKŮ VE SKLÁDÁNÍ A PŘESUNU P2X ₄ RECEPTORU BUŇKOU	50
5.2.	ROLE CYSTEINOVÝCH MŮSTKŮ V KONTAKTU PODJEDNOTEK.....	51
5.3.	ROLE CYSTEINOVÝCH MŮSTKŮ V AKTIVACI KANÁLU	52
5.4.	ROLE CYSTEINOVÝCH MŮSTKŮ V OTEVÍRÁNÍ KANÁLU	57
6.	ZÁVĚR.....	60
7.	POUŽITÁ LITERATURA	62

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou 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.

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 26. dubna 2010

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc. za zastřešení mé práce na fakultě. Svě školitelce RNDr. Haně Zemkové, CSc. děkuji za pomoc a rady, svým kolegům Mgr. Marii Jindřichové, PhD. a Mgr. Vojtěchu Vávrovi za podporu a předání znalostí. Ostatním laboratorním pracovníkům pak děkuji za pomoc s buněčnými kulturami a zajištění materiálu.

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. Všechny 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, mutageneze, EC₅₀

SUBJECT WORDS

molecular biology, polymerase chain reaction, cell line, passage, transfection, elektrofyziology, patch clamp, confocal mikroskopy

KEY WORDS

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

ABSTRACT

Extracellular adenosine-5'-triphosphate (ATP), released from damaged cells or coreleased as a cotransmitter from synaptic vesicles, acts on its plasma membrane receptors termed purinergic. Purinergic P2X receptors are ATP-gated cation channels. To date seven P2X isoforms designated P2X₁₋₇ have been cloned that are organized as trimeric homomers or heteromers. All P2X subunits share a similar structure consisting of a large extracellular loop, two transmembrane domains and intracellular N- and C- termini. An additional structural feature is conserved aminoacids, these include ten conserved cysteine residues in the extracellular loop. All ectodomain cysteines form disulfide bonds which are organized in two areas: three disulfide bridges are localized in the N-termini half and two in the C-termini half at P2X receptor. ATP binding pocket is apparently localized between two neighbouring subunits. The aim of this Diploma Thesis was to examine the relevance of ectodomain cysteine residue and/or disulfide bonds for the expression, function and ATP binding properties of the P2X receptor. All ten, one by one, ectodomain cysteines were substituted by alanines and ATP-induced currents was recorded in HEK293 cells expressing wild-type P2X₄ receptor and its mutants. Low responsible or nonfunctional mutants (C126A, C149A, C217A, C227A, C270A) were estimated using ivermectin that potentiates maximum current amplitude and prolongs time of deactivation. Results obtained on mutations C116A, C126A, C149A and C165A that disruption of one from by them forming disulfide bonds affects ATP-binding pocket. The third cysteine bridge (Cys¹³²-Cys¹⁵⁹) seems to be dispensable. Fourth cysteine bridge (Cys²¹⁷-Cys²²⁷) is very important for P2X₄ receptor function. Gating or signal conducting is under control of Cys²⁶¹ and Cys²⁷⁰.

POUŽITÉ ZKRATKY

α,β -meATP	α,β -methylenadenosin-5'-trifosfát
ADP	adenosin-5'-difosfát
AMK	aminokyselina
AMP	adenosin-5'-monofosfát
ATP	adenosin-5'-trifosfát
$[Ca^{2+}]_i$	vnitrobuněčná koncentrace vápenatých kationtů
cAMP	cyklický adenosin-5'-monofosfát
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CsCl	chlorid cesný
CsOH	hydroxid cesný
D-MEM	modifikované Eaglovo médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC ₅₀	poloviční efektivní koncentrace
ECS	mimobuněčný roztok
EGFP	zesílený zelený fosforeskující protein
E-NTPDáza	ekto-nukleotidtrifosfát difosfohydroláza
ER	endoplasmatické retikulum
GABA	kyselina γ -aminomáselná
HEK293	lidské embryonální ledvinné buňky z linie č.293
HEPES	N-(2-hydroxyetyl)piperazin- N'-2-etansulfonová kyselina
ICS	vnitrobuněčný roztok
IVM	ivermektin
KCl	chlorid draselný
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
NDP	nukleotid-5'-difosfát
NTP	nukleotid-5'-trifosfát
P2X	ionotropní purinergní receptor
PBS	extracelulární roztok s fosfátovým pufrům
PCR	polymerázová řetězová reakce
PIP ₂	fosfatidylinositol-4, 5-bisfosfát
PIP ₃	fosfatidylinositol-3, 4, 5-trisfosfát
PKA	protein kináza A
rP2X ₄	potkaní P2X ₄

SS	cysteinový můstek
TM	transmembránová doména
τ_{off}	časová konstanta deaktivace
WT	divoký typ
zFP2X ₄	P2X ₄ z ryby <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

Purinergní receptory jsou relativně nově objevená skupina ligandem aktivovaných receptorů, které uvádí v činnost mimobuněčný adenosin-5'-trifosfát (ATP) a produkty jeho rozkladu. Dvě podskupiny purinergních receptorů, P1 a P2Y, tvoří G-proteinové receptory se sedmi transmembránovými doménami (TM). Tato struktura je v organismu široce rozšířena u mnoha typů receptorů a je poměrně dobře prozkoumána. [3-4] Třetí skupina, purinergní P2X receptory, je strukturně i funkčně odlišná, obsahuje podjednotky složené pouze ze dvou TM spojených velkou mimobuněčnou smyčkou, přičemž C- i N-konec jsou umístěny uvnitř buňky. Celý receptor se skládá ze tří podjednotek. Jedná se o unikátní typ ligandem aktivovaného iontového kanálu, jenž má v organismu největší afinitu k mimobuněčnému ATP. [2, 5]

Vazebné místo pro ATP je mezi dvěma podjednotkami ve velké ektodoménové smyčce. Smyčka má napříč všemi podtypy P2X receptorů množství konzervovaných míst, u nichž se předpokládá důležitá role pro funkci receptoru jako je vazba nukleotidu se třemi fosfáty, aktivace, otevírání či modulace iontového kanálu. Mezi tyto vysoce konzervované aminokyseliny (AMK) patří i deset cysteinů, které podle posledních výzkumů tvoří přinejmenším v uzavřeném stavu pět cysteinových můstků (SS). [1, 6-7] Cysteinové můstky jsou významným stavebním a strukturním prvkem každého proteinu a mohou tedy mít zásadní roli v mnoha procesech spojených nejen s funkcí, ale již se samotnou tvorbou purinergního P2X receptoru. [8] Ze sedmi u savců známých podtypů P2X receptoru byla vybrána do této studie čtvrtá varianta, P2X₄, protože ji lze jedinečně modulovat pomocí ivermektinu (IVM) [9], má dobře měřitelné odpovědi na podání ATP a je u ní známa krystalová struktura v uzavřeném stavu [1].

1.1. Extracelulární adenosin-5'-trifosfát

Ještě donedávna se ATP považoval jen a pouze za látku vnitrobuněčnou, používanou v buňce k přenosu energie. Dnes se ukazuje jeho důležitá role signalizační molekuly mimo buňku. Dosah signalizace molekul ATP není velký, protože jsou v mimobuněčném prostoru rozkládány soustavou mimobuněčných a membránových enzymů. Jedná se o přenos informací mezi sousedními buňkami a také zpětně pro buňku, ze které byl ATP sám uvolněn. [4, 10]

Zdá se, že ATP uvolňuje každá buňka a zároveň každá buňka má na svém povrchu alespoň některé z purinergních receptorů. Na počátku evoluce se pravděpodobně signalizace ATP vyvíjela zároveň se signalizací cyklickým adenosin-5'-monofosfátem (cAMP); zatímco cAMP zůstal vnitrobuněčným druhým poslem, z ATP se stal první posel, tj. mimobuněčná signalizační molekula. Koncentrace ATP v buňce je zhruba 5 mM, do mezibuněčného prostoru se dostane jen zlomek dosahující maximálně 200 μM . [10-11]

Signalizace molekulami ATP ovlivňuje množství vnitrobuněčného Ca^{2+} a cAMP, které aktivují protein kinázy (protein kinázu A, protein kinázu C, Ca^{2+} a na kalmodulinu závislou protein kinázu). Výsledkem této signalizace může být změna průtoku krve tkáněmi, transport iontů, regulace objemu buňky, neuronální signalizace, úprava odpovědi na hormony a neurotransmitery či kontrola interakce mezi patogenem a hostitelem. ATP může také ovlivňovat vývoj určitých neuronů a navozovat dělení v některých typech rakovinových buněk. [10]

ATP je uvolňován z poškozených i zdravých buněk. Podnětem může být hypoxie, ischemie, osmotický stres, mechanický stres či patogenní toxiny a obecně změna extracelulárního prostředí (v pokusech výměna media). Mezi hlavní tkáně využívající signalizaci ATP patří srdce, červené krvinky, nervový systém a kosterní svalstvo. Na úrovni zadních kořenů míšních je ATP mediátorem vnímání chronické bolesti. Ze zdravých buněk se ATP dostává connexinovými a pannexinovými polokanály, objem-regulujícím kanálem, kanálem pro velké anionty a purinergním P2X_7 kanálem. Z nebudivé buňky může být ATP uvolněn i exocytózou ze zásobních váčků případně z váčků (endozomů)

s různými receptory. Z neuronů je pak ATP vyléván spolu s neurotransmitery mechanismem „kiss and run“ a exocytózou synaptických váček. [10, 12-14]

Degradace ATP

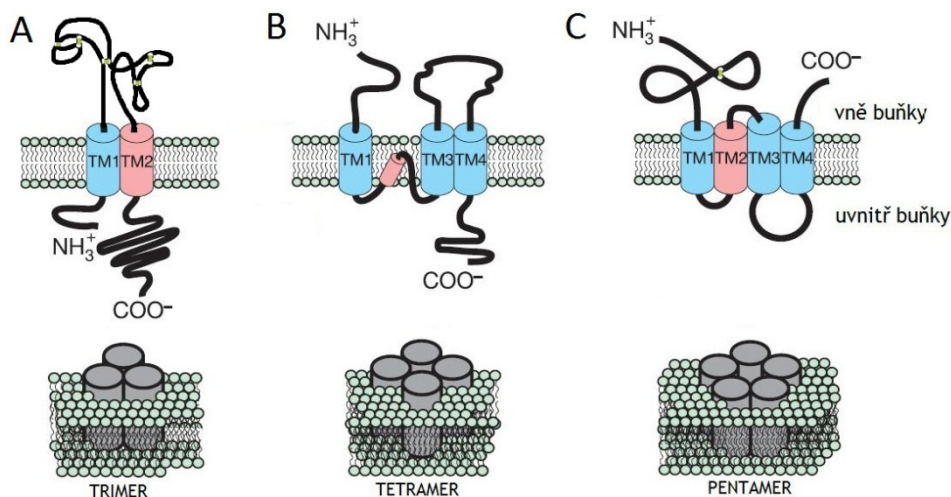
V mezibuněčném prostoru je ATP rozkládán čtyřmi skupinami hydrolytických působících enzymů – ektonukleotidáz. Všechny jsou vázány v buněčné membráně, ale mohou se i odštěpit za vzniku rozpustných forem zvaných exonukleotidázy. Nukleotid-5'-trifosfáty (NTP) a nukleotid-5'-difosfáty (NDP) s různou preferencí jednotlivých nukleotidů degradují ekto-nukleotidtrifosfát difosfohydrolázy (E-NTPDázy). Ze skupiny celkem osmi těchto enzymů se vyskytují na povrchu buňky čtyři: E-NTPDáza 1, E-NTPDáza 2, E-NTPDáza 3 a E-NTPDáza 8. [15-16] Druhou skupinu tvoří ekto-nukleotidpyrofosfatázy s velice širou specifikou. Jsou schopny rozložit nejen NTP a NDP, ale i cAMP či nikotinamidadeninukleotid, produktem degradace je vždy AMP. Navíc mohou hydrolyzovat fosfodiesterovou vazbu v nukleových kyselinách a pyrofosfátovou v nukleotidových cukrech. Produkci anorganického pyrofosfátu jsou důležité také pro kalcifikaci a dekalifikaci kostí. [16-17]

Ekto-fosfomonoesterázy, zařazené do třetí skupiny ektonukleotidáz, vyštěpují z mnoha nejrůznějších substrátů anorganický fosfát. Mohou být, stejně jako další skupina, ukotveny v membráně nebo častěji volně v plazmě. Posledním článkem v pomyslném řetězci degradace NTP je ekto-5'-nukleotidáza. Z nukleotid-5'-monofosfátů vyštěpuje nukleosidy, čímž vzniká například adenosin potřebný pro aktivaci P1 receptorů. Je známa jako marker zrání lymfocytů. [16-17] Degradace mimobuněčného ATP je v odlišných typech tkání různě rychlá. V krvi mohou NTP vydržet 10 až 30 minut, kdežto v plicním epitelu či srdeční tkáni je polovina přítomného množství zlikvidována za 0,2 s. [11] Všechny čtyři skupiny ektonukleotidáz potřebují ke své správné funkci přítomnost dvoumocného kationtu, nejlépe hořečnatého či vápenatého, různé jsou jejich efektivity i dle pH. [15-17]

1.2. Ligandem aktivované iontové kanály

Iontové kanály jsou proteinové makromolekuly, které umožňují ve směru gradientu průchod iontů přes buněčnou membránu. Po stimulaci mají schopnost se otevírat a zavírat, čímž tok iontů přes membránu regulují. Iontové kanály se podílejí na vzniku řady fyziologických funkcí, např. vedení nervového vzruchu, uvolňování neurotransmiterů a hormonů, stahy svalstva, imunitní odpovědi apod. Kanály jsou charakterizovány na základě jejich vodivých vlastností, způsobu regulace toku iontů a podle molekulární struktury. [3]

V organismu lze nalézt iontové kanály závislé buď na změně napětí (napětově řízené kanály) nebo na přítomnosti ligandu. Napětově řízené kanály jsou přítomny hlavně na synapsi, v neuronech a ve svalech, jsou iontově selektivní a struktura jejich napětového senzoru je velmi podobná napříč celou skupinou. Ligandem aktivované iontové kanály mění svou konformaci po navázání ligandu. Obecně lze říci, že ligandy buď otevírají nebo zavírají kanál. Ligandem aktivované iontové kanály se dělí do tří velkých skupin: Cys-loop superrodina, glutamátové kationtové kanály a ATP-aktivované kanály (viz Obrázek 1) [18-20].



Obrázek 1: Základní typy ligandem aktivovaných iontových kanálů.
(Převzato z [2] a upraveno.)

A) P2X receptorová rodina, B) glutamátová rodina, C) Cys-loop superrodina

Nahoře: Schematicky vyjádřená struktura jedné podjednotky receptoru.

Vyznačeny cysteinové můstky (zeleně), růžově označena TM nejbližší středu kanálu.

Dole: Formování homomerů či heteromerů z podjednotek.

Cys-loop superrodina je velmi rozsáhlá, patří do ní receptory nikotinové, serotoninové kationtové kanály (5-HT₃), receptory typu A pro γ -aminomáselnou kyselinu (GABA), glycinové, některé glutamátové, histaminové a serotoninové aniontové receptory. Základní charakteristikou Cys-loop superrodiny je složení jedné podjednotky ze čtyř TM a tvoření homomerních kanálů pěti podjednotkami.

Glutamátové kationtové kanály zahrnují receptory aktivované N-methyl-D-aspartátem, α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole propionovou kyselinou či kainátové receptory. Všechny tyto receptory jsou tvořeny čtyřmi podjednotkami, jedna podjednotka pak třemi TM. [18-19] ATP-aktivované kanály jsou nejnovější skupinu iontových kanálů, purinergních P2X receptorů, které se skládají ze tří podjednotek, z nichž každá má dvě TM.[2]

1.3. Purinergní receptory

Purinergní receptory jsou zvláštním typem membránových receptorů, u kterých jako signalizační molekula slouží mimobuněčný ATP a některé produkty jeho rozkladu. Objev purinergních receptorů je datován do 70. let 20. století a zasloužil se o něj britský profesor Geoffrey Burnstock, který objev publikoval v časopisu *Pharmacological Review* v článku s názvem „Purinergic nerves.“ [5]

Purinergní receptory byly dosud objeveny u mnoha obratlovců, některých (převážně mořských) bezobratlých i u několika zástupců rostlinné říše. Zatím nejsou žádné známky o výskytu u prokaryot, kvasinek, *Drosophila melanogaster* či *Caenorhabditis elegant*, což znesnadňuje objasnění jejich evolučního vývoje [7, 21].

Purinergní receptory byly postupně nalezeny téměř ve všech tkáních člověka, od mozku přes srdce, cévy, svalstvo, plíce, ledviny, játra až po močový měchýř. Vyskytují se v neuronech i mimo ně, na smyslových buňkách, buňkách zajišťujících imunitu a také na červených krvinkách. [14] Purinergní receptory se podílejí nejen na řadě normálních fyziologických procesů, ale uplatňují se i při mnohých projevech nemocí (artritida [22], mužská neplodnost [23], křehkost kostí

[24] aj.) a zejména u chronické a zánětlivé bolesti [25]. Purinergní receptory dělíme podle jejich struktury a funkce do dvou velkých skupin: G-proteinové receptory a iontové kanály. [7]

1.3.1. G-proteinové receptory (P1 a P2Y)

Purinergní receptory G-proteinového typu se dále dělí podle aktivující látky na dvě skupiny: P1 a P2Y. Shodně s jinými G-proteinovými receptory jsou složeny ze sedmi TM, N-konce umístěného v mimobuněčném prostoru a C-konce uvnitř buňky. [2, 4, 26]

P1 (nebo také A) receptory jsou aktivovány především adenosinem. Aktivace adenosinových receptorů má za následek mnoho buněčných procesů zprostředkovaných změnou hladiny cytoplazmatického cAMP. Nepřímo jsou jimi ovládány také iontové kanály. V současné době jsou známy čtyři podtypy adenosinových receptorů: A₁, A_{2a}, A_{2b} a A₃. Podílejí se na regulaci vasodilatace či stahů srdečního svalu, v mozku regulují uvolňování neuropřenašečů na synapsi a hrají roli například ve spánku. [26-27]

P2Y receptory jsou aktivovány především ADP, ATP či jinými tri/difosfonukleotidy. K jejich aktivaci stačí velmi malá koncentrace látky (v řádech nM), proto mohou reagovat i na výlev ATP ze vzdálenějších míst. V současné době je u savců známo osm různých podjednotek (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ a P2Y₁₄). Jejich stimulace vede k uvolnění vápníku z vnitrobuněčných zásob. Iontové kanály ovládají jen nepřímo prostřednictvím dalšího posla uvnitř buňky. Receptory skupiny P2Y mají roli v procesu srážení krve, stahu hladkých svalů, regulace tvorby osteoklastů či kontroly epiteliální sekrece. [4, 26-27]

1.3.2. Iontové kanály (P2X)

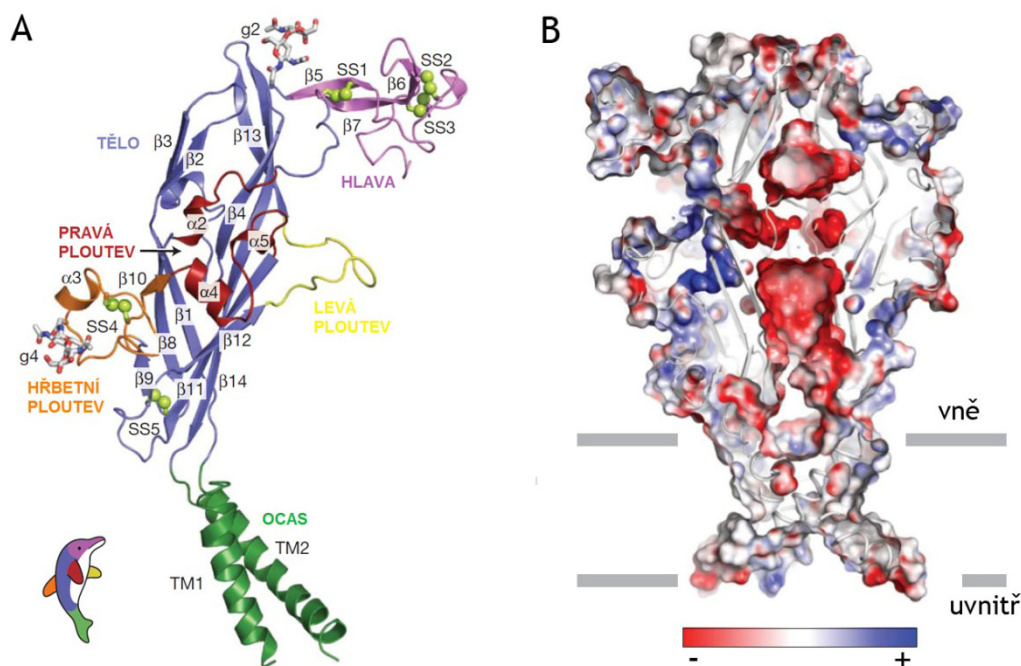
Purinergní receptory fungující jako iontové kanály nesou označení P2X. Od jiných purinergních receptorů i ostatních ligandem aktivovaných iontových kanálů se značně liší: jedna podjednotka je složena pouze ze dvou TM a velké mimobuněčné smyčky. N- i C-konec směřuje dovnitř buňky. V organismu jsou aktivovány převážně ATP. U savců bylo identifikováno sedm podtypů P2X receptorů označovaných P2X₁ až P2X₇. Podtypy se liší délkou aminokyselinového řetězce (od 379 aminokyselin (AMK) u receptoru P2X₆ po 595 AMK u receptoru P2X₇), umístěním v buňce (P2X₅ a P2X₆ nevystupují na cytoplazmatickou membránu, ale zůstávají v endoplasmatickém retikulu), citlivostí k ATP a jiným agonistům (např. P2X₁ a P2X₃ receptory jsou citlivé k α,β -methylenadenosin-5'-trifosfátu (α,β -meATP), P2X₇ receptor k 3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5'-trifosfátu) a antagonistům, průběhem odpovědi na podnět i reakcí na různé modulační látky. [3, 9]

1.4. Struktura a vlastnosti P2X₄ receptoru

V nervové soustavě se nejčastěji vyskytuje purinergní receptor P2X₄. Tento receptor je složen z 389 AMK, z toho 28 tvoří N-konec, 21 každá TM, 289 mimobuněčná smyčka a 30 AMK C-konec. V loňském roce byla vyřešena jeho struktura v uzavřeném stavu pomocí krystalu upraveného P2X₄ z ryby *Danio rerio*, zvané mezi akvaristy zebřička (zfP2X₄) [1]. Potvrdily se předchozí domněnky o dlouhých α -helixech tvořících obě TM i několika β -listech nad druhou TM [28].

V mimobuněčné smyčce silně převažují β -listy doplněné několika nedefinovatelnými úseky a čtyřmi kratičnými α -helixy. Publikovaná struktura jasně ukazuje na mezipodjednotkovou strukturu ATP-vazebného místa. Celý protein byl rozdělen do několika částí a popsán na základě jisté podobnosti s tvarem těla delfína (viz obr. 2A). Mimoto byla označena tři místa, kde mohou

podjednotky navzájem interagovat („hlava“-„tělo“, „tělo“-„tělo“ a „levá ploutev“-„hřbetní ploutev“). [1] Dle presentovaného obrázku se na tvorbě „hřbetní ploutev“ a „hlavy“ výrazně podílejí cysteinové můstky (Cys¹¹⁶-Cys¹⁶⁵, Cys¹²⁶-Cys¹⁴⁹, Cys¹³²-Cys¹⁵⁹ a Cys²¹⁷-Cys²²⁷).



Obrázek 2: Krystal zfp2X₄. (Převzato z [1] a upraveno.)

- A:** Schéma struktury zfp2X₄ podle nalezených struktur. Struktury ektodomény označeny písmeny s číslem: β₁- β₁₄ β- listy, α₂- α₅ α-helixy. Barevnost dle podobnosti s delfínem: fialově „hlava“, modře „tělo“, žlutě „levá ploutev“, červeně „pravá ploutev“, oranžově „hřbetní ploutev“, zeleně „ocas“. Vyznačeny a popsány cysteinové můstky SS1-SS5 (žluté kuličky).
- B:** Průřez zfp2X₄ se znázorněním náboje přítomných AMK. Červeně negativně nabitě (kyselé) AMK, modře pozitivně nabitě (bazické) AMK. Negativně nabitě AMK se soustřeďují hlavně kolem pravděpodobného místa průniku iontů – formují pór. Pozitivně nabitě AMK v ektodomě jsou pravděpodobně součástí vazebného místa pro ATP.

Pomocí výzkumu mutovaných forem receptoru byly již dříve označeny také AMK, které se podílejí na tvorbě ATP-vazebné kapsy a na interakci s modulátory či antagonisty. Tyto informace byly konfrontovány s krystalovou strukturou receptoru v uzavřeném stavu. Vytipované AMK vazebné kapsy pro ATP se nachází hlouběji v dutině, kterou uzavírá „hřbetní ploutev“ jedné podjednotky a „hlava“ sousední podjednotky (viz obrázek 13). [29-30]

P2X₄ receptor je neselektivní kationtový kanál, který propouští především jednovazné ionty sodné a draselné. Prochází skrz něj i relativně velké množství vápenatých iontů, poměr propustností $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}} = 4,2$. Srovnatelný poměr má i P2X₁ receptor, ostatní P2X receptory mají poměr nižší nebo nepropouští vápenaté ionty vůbec. Tok vápenatých iontů skrz kanál tvoří přibližně 11% proudové odpovědi. Při krátké aplikaci agonisty je odpověď P2X₄ receptoru velmi rychlá. Rychlost přesunu iontů (vyjádřená jednotkovou vodivostí kanálu) je poměrně malá, přibližně 9 pS. [7, 20, 31]

Pór se tvoří pravděpodobně skrze celý receptor (viz obrázek 2B). Průměr nerozšířeného póru se pohybuje mezi 1,6 a 1,9 nm. [32] 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 (195 kg/mol; 1,0 x 0,76 x 0,53 nm) nebo i organické barvivo označované YO-Pro 1 o velikosti molekuly 1,9 x 1,0 x 0,55 nm (629 kg/mol)¹. Stejně jako P2X₂, P2X₅ a P2X₇ receptory, vyznačuje se také P2X₄ receptor při delší aplikaci agonisty pomalou desenzitizací, s rychlostní konstatnou vyšší než 20 s. Bodovými mutacemi s následnými elektrofyzilogickými pokusy byla jako důležitá pro tuto vlastnost P2X₄ receptoru určena AMK glycin na pozici 347 (druhá TM). [7, 20, 31]

1.5. Fyziologická role P2X₄ receptoru

Purinergní P2X₄ receptor se vyskytuje hojně po celém organismu od centrální nervové soustavy, přes periferní nervovou soustavu, plíce a bronchiální epitel, slinné žlázy, pankreatické buňky, nadledvinky až po močový měchýř a chánovody [7, 20]. V organismu má celou řadu funkcí, z nichž většina je založena na ovlivňování vápníkových signalizačních drah [33]. Zvýšená exprese P2X₄ receptorů byla zaznamenána v modelu ischemie [27] a u mikroglíí po zranění míchy [34-35].

¹ Přičemž uvedené rozměry jsou bez hydratačního obalu.

Zvýšením hladiny intracelulárního vápníku ($[Ca^{2+}]_i$) P2X₄ receptory ovlivňují parasympatickou aktivaci slinných žláz odrážející se ve změně produkce a vylučování slin [20]. Aktivace P2X₄ receptorů, pravděpodobně také skrze ovlivnění $[Ca^{2+}]_i$, napomáhá dlouhodobé potenciaci buněk v hipocampu [27]. V hypofýze způsobuje aktivace P2X₄ receptorů depolarizaci, která zvyšuje frekvenci i velikost akčního potenciálu v klidových buňkách a usnadňuje tok Ca^{2+} přes vápníkové napěťové kanály. Výskyt P2X₄ receptoru v laktotropech potvrzuje jejich podíl na prolaktinové sekreci. [36]

Důležitá role P2X₄ receptoru ve funkci cévního endotelia byla prokázána na modelu myši bez genu pro P2X₄ podjednotku. Tato pokusná zvířata trpěla zvýšeným krevním tlakem a měla menší průměr tepen než plně geneticky vybavení jedinci. P2X₄ receptory v cévních stěnách mají také vliv na produkci oxidu dusného. [35] P2X₄ receptory snižují propustnost membrán buněk vystélajících rozmnožovací cesty, což naznačuje ATP-závislou regulaci plodnosti a možnou roli v procesech zabraňujících oplodnění [20]. Pokusy in vitro na lidských monocytických dendritických buňkách ukazují na možnost ovlivnění produkce či účinku cytokinů skrze P2X₄ receptory [37].

Patofyziologie P2X₄ receptoru

Vzhledem k fyziologické roli P2X₄ receptorů v cévních stěnách se uvažuje o antagonistech P2X₄ receptorů jako o potenciálních lécích proti ateroskleróze [35]. Mimoto mohou mít P2X₄ receptory vliv na vývoj amyotrofické laterální sklerózy [38]. Zvýšení exprese P2X₄ receptorů v aktivovaných mikroglíích po zranění míchy je spojováno s neuropatickou bolestí [27, 34, 39-40].

P2X₄ receptory v mikroglíích mají 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 [41]), která přechází až v neuropatickou bolest. Jakým mechanismem je zvyšována exprese

P2X₄ receptoru po periferním zranění nervu není známo, pravděpodobně zde hraje roli fibronectin-integrinová síť. Výsledkem experimentů s inhibicí fibronectinových receptorů bylo oslabení zraněním zvýšené exprese P2X₄ receptorů. [34, 39-40]

1.6. Tvorba P2X₄ receptoru v buňce

Osud purinergního P2X₄ receptoru v buňce od přepisu jeho genu až po degradaci receptorového proteinu je stále intenzivně zkoumán. Nejasnosti jsou nejen v mechanismech skládání podjednotky samotné, podjednotek k sobě, v možnostech skládání vyšších celků, jejichž existenci výzkumy naznačují, ale i v dalších procesech včetně degradace receptoru. Pro P2X₄ receptor je charakteristická velice specifická cesta transportu v buňce.

1.6.1. Gen P2X₄ receptoru

U lidí je gen pro P2X₄ receptor umístěn na dvanáctém chromozomu, přesněji v úseku 12q24.32. Gen o celkové velikosti přibližně 50 kb je složen ze dvanácti exonů. [42] Protein kódujících exonů je jen devět. O pouhých 23,8 kb před P2X₄ genem se nachází gen pro P2X₇ receptor. [43] Do této chvíle bylo identifikováno jediné promotorové místo v P2X₄ genu, nacházející se 20 až 29 bází před start-kodonem. Váže se na něj protein z rodiny GATA (jedná se o proteiny vázající sekvenci GATA, je známo šest členů rodiny). Bylo doloženo, že mutacemi v tomto místě je míra transkripce P2X₄ receptoru výrazně snížena. Vzhledem k tomu, že distribuce proteinů rodiny GATA je odlišná v různých tkáních, nabízí se možnost regulace přepisu pomocí stability a výskytu GATA proteinů v buňce. [42]

Polymorfismus

V genu P2X₄ receptoru bylo zjištěno mnoho míst s mutacemi, ale převážně se jedná o mutace v intronech. V exonech je známo 9 míst s jednobodovými mutacemi. Čtyři z těchto mutací nemají na vývoj proteinu vliv, protože se jedná o synonymní mutace, kdy nedochází ke změně přepisované aminokyseliny. Pátá mutace způsobuje posun, protože je zde jeden nukleotid vynechán. [44]

U zbylých čtyř mutací dochází ke změně přepisované aminokyseliny. V malé míře se vyskytují mutace v prvním exonu (T → G; Ser → Ala), ve čtvrtém exonu (G → A; Val → Ile) a v devátém exonu (G → A; Cys → Tyr). Až u téměř třiceti procent populace se vyskytuje mutace v exonu 7, kde záměnou adeninu za guanin dochází ke změně v přepisu aminokyseliny na pozici 242 z glycinu na serin. Několik polymorfických míst se nachází také v nepřepisovaném regionu, ať už před (6 míst) či za (2 místa) kódem proteinu. Tyto mutace mohou mít potenciálně vliv na míru přepisu genu pro P2X₄ receptor. U žádné z uvedených mutací dosud nebyl zjištěn dopad v klinické praxi. [43-45]

1.6.2. Skládání a kompletace proteinu v buňce

Dle obecného modelu je po spojení ribozomu s mediátorovou ribonukleovou kyselinou kódující membránový protein rozpoznána směřující sekvence a transkripce započne až po nasednutí ribozomu na endoplazmatické retikulum (ER). Jakmile je mechanismem kontroly kvality odsouhlasena správnost sekundární a terciární struktury (tzn. včetně cysteinových můstků), je protein odeslán z ER dále. Klíčovou roli v tomto mechanismu pravděpodobně mají glykany, které rozpoznají motiv Asn-X-Ser/Thr na právě syntetizovaném polypeptidovém řetězci, jakmile vstoupí do ER. [8]

Dle typu připojeného glykanu jsou pak prováděny další akce: interakce s různými chaperony (calnexin, calreticulin), translocony či opuštění ER [46]. Cysteinové můstky se tvoří výhradně v ER, protože je zde ideální prostředí. Vznikají spontánně, ale mohou být vytvořeny či změněny působením protein

disulfid isomerázy. V redukčním prostředí jsou cysteinové můstky bez další enzymatické účasti štěpeny. [47]

V pokusech s jinými membránovými kanály se ukazuje samoskládací schopnost receptorových proteinů. Ke složení receptoru by tedy nemusely být potřeba žádné další pomocné proteiny či lipidy jako jsou translocony či chaperony. Ale receptor použitý v uvedených pokusech nemá ve svém řetězci žádné cysteiny. [48] V protikladu k acetylcholinovému receptoru, kde je pro složení podjednotek nejdůležitější N-konec, hraje ve skládání podjednotek P2X receptoru do trimeru hlavní roli druhá transmembránová doména, která ukotvuje receptor v plazmatické membráně [49].

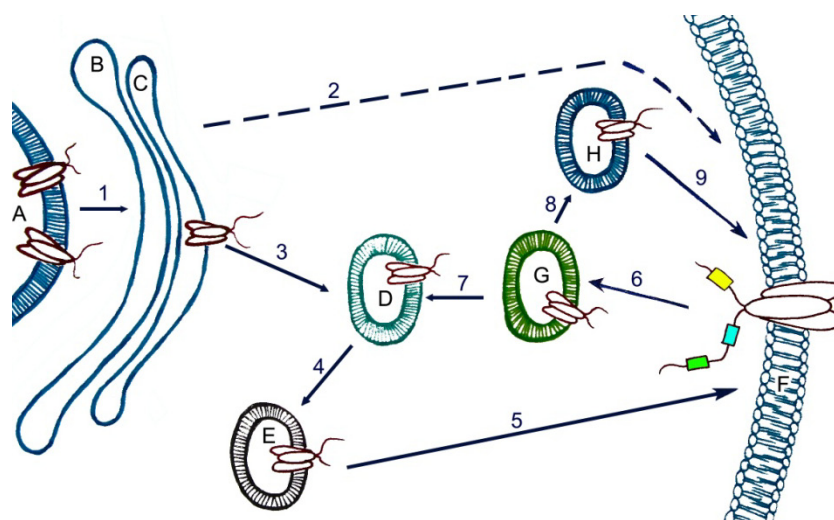
Receptory mohou interagovat se svým okolím, shlukovat se do větších skupin a to buď se stejnými receptory či s odlišnými skupinami, ať už receptorů nebo jiných proteinů [50]. Výzkumy na příkladu $\rho 1$ /GABA a P2X₂ receptorů ukazují, že k tvorbě shluků nedochází až na povrchu plazmatické membrány buňky, ale již v ER. Odsud jsou pak společně přeneseny na cílové místo v buňce. [51]

1.6.3. Transport proteinu k membráně a zpět

Kompletně složený P2X₄ receptor může být na základě (zatím neznámé) směřující sekvence dopraven z ER přes Golgiho aparát do plazmatické membrány. Zde je stabilizován pomocí motivu YxxxK umístěném na C-konci. [8] Primárně je však P2X₄ receptor směřován do lysozomu. Výskyt P2X₄ receptoru na povrchu buňky je velmi jemně regulován. Nejdynamičtější pohyb receptorů byl zaznamenán u mikroglíí. [50]

Přesuny a umístění P2X₄ receptoru jsou řízeny endocytickou cestou pomocí adaptorových proteinů, dynaminem a cytokininy. V lysozomech nedochází k degradaci P2X₄ receptoru, ale jen k jeho uložení. Je chráněn N-glykosylací na N-konci. Je možné, že je zde receptor i do jisté míry funkční, například propouští vápník, který může být v lysozomu uložen. [52-54]

Internalizaci, tedy rychlé stažení receptorů z membrány do vaku – endozomu, provádí adaptorové proteiny. Podjednotka $\mu 2$ adaptorového proteinu AP-2 se váže na netypický motiv YxxGL vyskytující se na C-konci P2X₄ receptoru. [53] Signálem pro internalizaci je například i aplikace ATP [55]. Z endozomu může být P2X₄ receptor navrácen zpět do plazmatické membrány. Pokud navrácen není, zůstává v endozomu, který postupně uzraje v lysozom (viz Obrázek 3). Tento cyklus může být několikrát opakován. P2X₄ receptory se navrací na povrch buňky exocytózou lysozomu, jako odpověď na aktivaci fagocytózy či při zvýšení [Ca²⁺]_i. [8, 53-54]



Obrázek 3: **Transport P2X₄ receptoru v buňce** (podle [8])

V endoplasmatickém retikulu (A) zformovaný kompletní P2X₄ receptor je následně (1) přesunut před cis Golgiho aparát (B) do trans Golgiho aparátu (C). Odtud směřuje buď (2) přímo do membrány nebo, přednostně, (3) do pozdního endozomu (D), z něhož (4) se stane lysozom (E). Z membrány (F) je receptor (6) stahován do časného endozomu (G), který může být (8) recyklován (H), čímž se receptor (9) navrátí do membrány, nebo (7 a 4) se přemění postupně na lysozom. Z lysozomu (E) může být receptor opět (5) navrácen do membrány.

P2X₄ podjednotka je zobrazena bílé, na N- a C-konci jsou zvýrazněny motivy podílející se na přesunech receptoru (žlutá IL motiv, zelená YxxGL) a jeho stabilizaci v membráně (světle modrá motiv YxxxK).

Stahování P2X₄ receptorů z povrchu buňky může být zablokováno zvýšením aktivity protein kinázy A (PKA). Navýšená koncentrace cAMP blokuje konstitutivní endocytózu, pravděpodobně na úrovni fosforylace AP-2 proteinu pomocí PKA. Existuje také možnost přímého ovlivnění P2X₄ receptoru, ale

protože víme, že ten sám není fosforylován, musel by zde být přítomen ještě nějaký další interagující protein. Zablokováním internalizace P2X₄ receptorů se zvyšuje účinnost ATP-závislé signalizace, což může mít dalekosáhlé následky v nejrůznějších tkáních. [52]

1.7. Farmakologie P2X₄ receptoru

1.7.1. Aktivace

P2X₄ receptor nemá specifického agonistu. Nejúčinnější aktivační látkou je ATP, v těsném závěsu za ním je cytidin-5'-trifosfát s 2-methylthioadenosin-5'-trifosfátem. Oproti jiným podtypům purinergních receptorů je zde téměř neaktivní α,β -meATP (potkaní forma je dokonce úplně necitlivá). P2X₄ receptor nelze aktivovat ani mnohými z tradičních agonistů purinergních receptorů: ADP, AMP, adenosinem, β,γ -methylenadenosin-5'-trifosfátem ani guanidin-5'-trifosfát. V účinku 3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5'-trifosfátu na P2X₄ receptor se zdroje poněkud rozcházejí. [7, 20, 31]

1.7.2. Inhibice

Ke klasickým blokátorům purinergních receptorů, ke kterým se řadí pyridoxal fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonová kyselina a suramin, je lidská forma P2X₄ receptoru citlivá jen minimálně, potkaní forma není citlivá vůbec. Specifický antagonist pro P2X₄ receptor zatím nebyl objeven. [7, 20, 31] Poměrně dobře blokuje P2X₄ receptor jen 2',3'-O-(2,4,6-trinitro-cyklohexadienylydin)adenosin-5'-trifosfát (TNP-ATP). Ten se také často využívá v mnoha fyziologických pokusech ke zjištění role receptoru ve sledované tkáni. [31]

1.7.3. Modulace

Modulátorů pro P2X₄ receptor byla objevena celá řada, včetně jednoho naprosto specifického: ivermektinu. Z tradičních modulátorů pro skupinu purinergních receptorů lze na P2X₄ receptor použít cibacron blue, který v koncentracích 3-30 μM zvyšuje účinek podávaného agonisty, při vyšších koncentracích už se stává blokátorem. [7, 20] Je možné, že zde dochází k částečnému překryvu vazebných míst.

Modulační vliv na P2X₄ receptor má i řada fyziologicky se vyskytujících iontů. Zinek při koncentraci 10 μM přibližně 3x zvyšuje účinnost agonisty, aniž by při tom měnil maximální proud nebo strmost křivky. Pro interakci se zinkem byly elektrofyziologickými metodami u zkoumaných mutantů receptoru určeny kritické AMK v řetězci: Cys¹³² a Thr¹³³. [6, 20]

Ukázalo se také, že nahrazení příslušné AMK za alanin v místech His¹⁴⁰ a Asp¹³⁸ vede k dalšímu zvýšení účinnosti agonisty v přítomnosti zinku. Tato místa pravděpodobně také váží měď, která při koncentraci 300 μM nesnižuje citlivost agonisty, ale snižuje maximální vyvolanou odpověď zhruba o 60%. P2X₄ receptor s mutací D129A již nebyl tolik inhibován mědí, ale zároveň se nezměnila modulační schopnost zinku. Existuje zde tedy určitý předpoklad o vzájemném působení míst určených k vazbě zinečnatých a měďnatých iontů. [6, 41]

Na funkci P2X₄ receptoru má vliv i pH okolí. Jak je zmíněno výše, je v buňce P2X₄ receptor uchováván v lysozomu. Lysozom může také obsahovat poměrně velkou zásobu ATP či vápenatých iontů. Jeví se tedy poměrně logické blokování receptoru vlivem nízkého pH. Kyselé prostředí snižuje účinnost agonisty, při pH 6,5 o 50% a dále se snižuje, ale nemění jeho maximální odpověď. Inhibice je zajištěna protonizací histidinu v poloze 286. [6, 20, 54]

Ivermektin

IVM 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. Vzniká selektivní hydrogenací avermektinu B1, je směsí dvou izomerů B1_a (>80%) a B1_b (<20%). Jedná se o silně lipofilní látku o velikosti molekuly cca 20 Å. Využívá se v lidské i veterinární medicíně jako antiparazitická látka. IVM působí ve svalech a nervech aktivací glutamátového receptoru propustného pro chloridové ionty, specifického pro bezobratlé živočichy, čímž dojde k hyperpolarizaci a následné svalové paralýze. IVM působí i v organismu obratlovců, otevírá či mění konformaci GABA_A, α7-nikotinového, glycinového a P2X₄ receptoru. Pro P2X₄ receptor je naprosto specifický, na ostatní P2X podjednotky působí při řádově vyšších koncentracích či vůbec. [9, 56]

IVM ovlivňuje P2X₄ receptor na dvou odlišných úrovních, zřejmě se jedná o vazbu na dvě různá místa receptoru. AMK důležité pro vazbu IVM dosud nebyly identifikovány. Dle současných poznatků má jedno vazebné místo větší afinitu než druhé. IVM je účinný jen při podání do mezibuněčného prostoru, s N- ani C-koncem nereaguje. Jedno z vazebných míst je zanořeno z mezibuněčného prostoru do membrány, IVM zde interaguje s hydrofobními částmi obou TM. [9, 56]

Při podání IVM o koncentraci 3 μM dojde až ke dvojnásobnému navýšení maximální odpovědi receptoru na aplikaci agonisty mechanismem snížení úrovně desenzitizace. IVM je schopen zesilovat účinek nejen ATP, ale i slabého agonisty, např. α,β-meATP. Při delším přísunu IVM do mezibuněčného prostoru se navíc prodlužuje doba deaktivace. [9, 56] Schopností zvyšovat citlivost receptoru k agonistovi a stabilizovat kanál v otevřeném stavu se IVM řadí k důležitým nástrojům výzkumu P2X₄ receptoru, kdy jím vyvolaný pozitivní modulační účinek pomáhá dále zkoumat mutace, které se jeví jako nefunkční. [56-57]

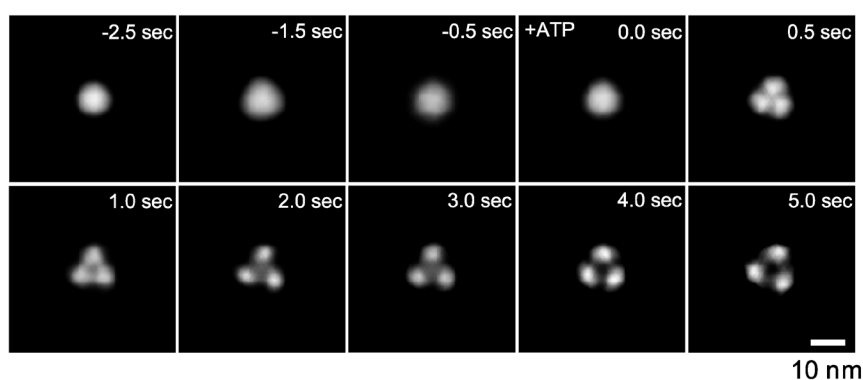
² Plný název: (2aE,4E,8E)-(5'S,6S,6'R,7S,11R,13R,15S,17aR,20R,20aR,20bS)-3',4',5',6,6',7,10,11,-oxospiro(11,15-methano-2H,13H,17H-furo(4,3,2-pg)(2,6)benzodioxacyklooktadecin-13,2'(2H)pyran)-7-yl 2,6-dideoxy-4-O-(2,6-dideoxy-3-O-methyl-alfa-L-arabino-hexopyranosyl)-3-O-methyl-alfa-L-arabino-exopyranosid (zdroj: ChemID)

1.8. Kinetický model P2X₄ receptoru

Iontové kanály mohou mít několik funkčních stavů: klidový, aktivovaný, inaktivovaný, desenzitizovaný aj. Kinetické modely iontových kanálů popisují počet funkčních stavů a rychlosti, jakými dochází k přechodům. Kompletní kinetický model pro samotný P2X₄ receptor není znám, definici ztěžuje nejen jeho pomalá desenzitizace a možnost modulace, ale i nejasnost v počtu a možném ovlivnění potřebných molekul agonisty. Jednoduchý lineární Markovův model pro P2X receptory předpokládá čtyři uzavřené stavy, které odpovídají postupnému navazování ATP do všech tří vazebných míst receptoru, a jeden otevřený stav. [58]

V modelu pro P2X₇ receptor se již odráží možnost otevření receptoru po navázání pouze dvou molekul ATP. Zároveň P2X₇ receptor nedesenzitizuje, takže i jeho kinetický model je lineární. Oba zmíněné modely nepředpokládají allosterické ovlivnění uzavřeného receptoru ve směru zvýšení afinity pro vazbu další molekuly ATP, jak tomu bývá u jiných ligandem aktivovaných kanálů, ale naopak nezávislost vazby jednotlivých molekul ATP. [58]

Vzhledem k tomu, že krystalová struktura receptoru v otevřeném stavu není známa, máme jen několik vodítek, jak si představit otevírání iontového kanálu receptoru. Aktivací receptoru dochází ke konformačním změnám, podjednotky se rozestupují a pravděpodobně sklánějí za tvorby vodivého póru. Pohyb podjednotek

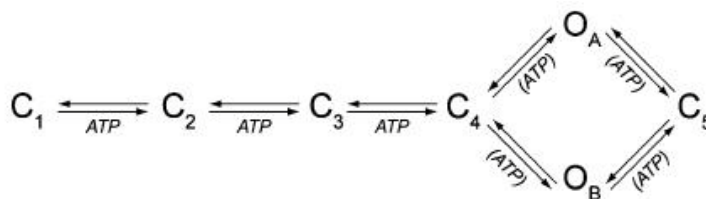


Obrázek 4: Otevírání kanálu P2X₄ receptoru po aktivaci ATP. Převzato z [29]

Přímé snímání P2X₄ receptoru umístěného v micelle metodou mikroskopie atomárních sil. ATP podáno v čase 0, po podání lze sledovat postupné rozestupování jedné kompaktní struktury na tři menší - podjednotky receptoru. Na snímcích lze odlišit dva otevřené stavy, hranice mezi nimi je mezi časy 1,0 s a 2,0 s.

a konformační změny po aktivaci můžeme sledovat na obrázku 4. Je zde vidět, že se nejprve otevírá pór a poté se podjednotky receptoru ještě dále rozestupují. [32] Z toho lze usoudit, že existují minimálně dva otevřené stavy receptoru.

Kinetický model pomalu desenzitizujícího P2X₂ receptoru již zahrnuje pět uzavřených stavů a dva otevřené, které navíc netvoří jednu linii (viz obrázek 5). Stav C₅ zde charakterizuje uzavřený stav, kdy receptor není schopen reagovat na aplikaci agonisty, což je stav desenzitizovaný. Ani tento model ale není schopen popsat složitou kinetiku P2X₄ receptoru a dilataci póru. [58-59]



Obrázek 5: **Kinetický model P2X₂ receptoru.** Převzato z [59].

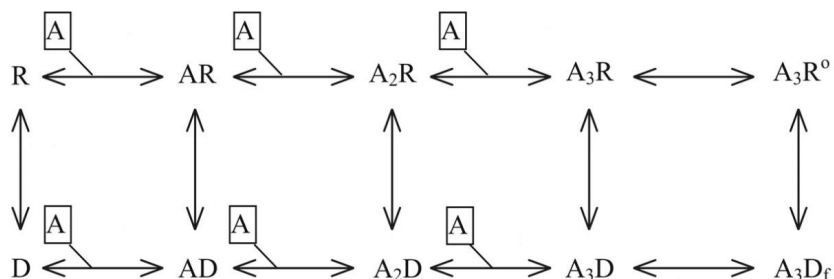
C₁ uzavřený stav, C₂ uzavřený stav s jednou navázanou molekulou ATP, C₃ uzavřený se dvěma ATP, C₄ uzavřený se třemi ATP; O_A, O_B otevřený stav; C₅ uzavřený stav neschopný reagovat na další aplikaci ATP, tzn. desenzitizovaný stav.

P2X₄ receptor modulovatelný ivermektinem obsahuje pravděpodobně dvě vazebná místa pro tento modulátor, která různě ovlivňují kinetiku receptoru. Na základě měření změn aktivity jednotlivých kanálů v přítomnosti IVM autoři usuzují, že v kinetice P2X₄ receptoru se musí vyskytovat nejméně pět uzavřených stavů a tři otevřené. [9]

Na kinetiku P2X₄ receptoru mají vliv i další faktory. Přes C-konec je ovlivňován přítomností fosfoinositolfosfátů, které hrají roli v desenzitizaci. Fosfoinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) má vliv na kinetiku aktivace a deaktivace. Dokonce se zdá, že ATP je v jeho nepřítomnosti jen částečný agonista. Fosfoinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP₃) ovlivňuje velikost amplitudy odpovědi na ATP a délku trvání deaktivace. Ovlivnění je zřejmé při toku vápenatých kationtů přes P2X₄ kanál: dojde k aktivaci Ca²⁺-závislé fosfolipázy C, ta sníží koncentraci PIP₂, což následně sníží odpověď kanálu na podnět. [60] Dochází k přímému kontaktu mezi lipidem a kanálem v oblasti mezi Cys³⁶⁰ a Val³⁷⁵. PIP₂ a PIP₃ jsou negativně nabitě molekuly, takže pro interakci s nimi připadají v úvahu kladně nabitě AMK

(lysín a arginín). V oblasti C-konce byly dříve určeny dvě AMK, které mají vliv na desenzitizaci – Lys³⁷³ a Tyr³⁷⁴. [60-61]

Složitější kinetický model byl vytvořen pro P2X₃ receptor (viz obrázek 6). Je zde zahrnuta desenzitizace, která je u tohoto podtypu velmi rychlá, a aktivace až po navázání třech molekul agonisty. Ani tento model neobsahuje možnost aktivace jen dvěma molekulami, ani další možnosti interakcí vazebných míst, podobně jako u modelů uvedených výše. [62] Pro kinetický model P2X₄ receptoru se navíc předpokládá spolupráce podjednotek při navazování dalších molekul agonisty. [58]



Obrázek 6: **Kinetický model P2X₃ receptoru.** Převzato z [62] a upraveno.

R receptor v uzavřeném stavu, A agonista, D pomalu desenzitizující stav, R⁰ otevřený stav, D_f rychle desenzitizující stav. Receptor se v modelu otevírá až po navázání tří molekul ATP, ale pomalu desenzitizující stavy a uzavřené stavy mezi sebou mohou volně přecházet.

Pokud bychom chtěli vytvořit kinetický model zahrnující kromě možnosti aktivace a otevření kanálu při dvou nebo třech navázaných molekulách agonisty i dvě různá vazebná místa pro IVM, museli bychom nutně dospět k trojrozměrnému, poměrně komplikovanému, modelu.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo přispět k objasnění úlohy deseti ektodoménových cysteinových zbytků ve funkci purinergního P2X₄ receptoru. Konkrétně byly řešeny tyto úkoly:

- 1) Klasickými metodami molekulární biologie vytvořit v DNA kodující purinergní P2X₄ receptor 10 mutací, z nichž každá bude mít jeden z deseti ektodoménových cysteinů vyměněn za alanin.
- 2) Takto pozměněnými geny transfekovat modelové buňky a pomocí konfokální mikroskopie zjistit, brání-li záměna cysteinu za alanin transportu receptoru do membrány a potažmo v jeho správném složení.
- 3) Elektrofyziologickou metodou patch clamp studovat vliv jednobodových mutací v ektodoménové smyčce na citlivost receptoru a na maximální amplitudu proudové odpovědi vyvolané aplikací mimobuněčného ATP.
- 4) Pro všech deset mutantů sestavit křivky závislosti odpovědi na dávce a u mutací s nízkou amplitudou sestavit křivku po preinkubaci s IVM, specifickým pozitivním allosterickým modulátorem P2X₄ receptoru.
- 5) V prostředí IVM zjistit vliv mutací na časovou konstantu deaktivace (τ_{off}), tj. poklesu proudové odpovědi po odstranění ATP, který je nepřímo úměrný k poloviční efektivní koncentraci (EC_{50}) agonisty aktivujícího receptoru.

3. METODIKA

V proteinu receptoru P2X₄ byly molekulárně biologickými metodami vytvářeny jednobodové mutace, kdy byly cysteiny vyměňovány za alaniny. Receptor byl následně exprimován v buněčné linii lidských embryonálních ledvinných buněk č. 293 (HEK293; *American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA*). Funkčnost receptoru byla prověřována elektrofyzilogickým měřením a jeho exprese byla zkoumána pomocí konfokální mikroskopie.

3.1. Bodové mutace v proteinu

K mutacím byla použita potkaní forma genu kódujícího podjednotku P2X₄ receptoru (rP2X₄). K dispozici byla zesíleným zeleným fluorescenčním proteinem (EGFP) značená cDNA kódující sekvence, EGFP-rP2X₄ (*GenBank accession no. NM 031594*; [63]), klonovaná ve vektoru pIERS2 (*Clontech, Mountain View, CA, USA*) a neznačená rP2X₄ [29] klonovaná ve vektoru pIERS2-EGFP. Použité vektory v sobě nesly rezistenci na kanamycin. Tyto geny byly poskytnuty laboratoří Dr. S. S. Stojilkoviče (*NIH, Bethesda, MD, USA*).

3.1.1. Polymerázová řetězová reakce

Bodové mutace byly do proteinu vnášeny pomocí pozměněných primerů při polymerázové řetězové reakci (PCR). Primery skládající se z 33-36 bází s mutovaným místem zhruba uprostřed byly objednávány u firmy VBC-Biotech (*Vídeň, Rakousko*). K vytvoření směsi pro PCR byl použit kit QuikChange II site-directed mutagenesis (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*). Reakční směs byla na ledu připravena do mikroependorfek. Jako templát byl použit značený či neznačený cDNA kódující konstrukt divokého typu (WT) rP2X₄ receptoru.

Složení reakční směsi:	10x <i>PfuUltra</i> pufr	5 μ l
	templát (300 ng/ μ l)	1 μ l
	směs dNTP (50 mM)	1,2 μ l
	primer DO (100 pm/ μ l)	2 μ l
	primer UP (100 pm/ μ l)	2 μ l
	deionizovaná voda	37,8 μ l
	<i>PfuUltra</i> DNA polymerasa	1 μ l

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 \rightarrow T = 95 °C, t = 1 min; krok 2 \rightarrow T = 55 °C, t = 1 min; krok 3 \rightarrow T = 68 °C, t = 10 min; kroky 1-3 opakovat 19-krát; krok 4 \rightarrow T = 68 °C, t = 12 min, dále udržovat při T = 4 °C. Po skončení celého cyklu PCR byl ke směsi přidán 1 μ l enzymu Dpn I, který má za úkol rozštěpení templátové DNA. Obsah eppendorfky 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* JM109 (*Promega, Madison, WI, USA*). Transformace byla provedena metodou teplotního šoku.

K 50 μ l kompetentních buněk bylo přidáno 10 μ l výsledné směsi z PCR, obsah eppendorfky byl jemně promíchán a ponechán 20-30 minut na ledu. Během této doby byly suchý blok Thermomixeru comfort 1,5 ml (*Eppendorf, Hamburg, Německo*) a tekuté LB medium předehřáty na 42°C. Po uplynutí stanoveného času byly eppendorfky s transformační směsí přemístěny na 45 s do Thermomixeru. Po zchlazení na ledu v délce 2-3 minuty bylo ke směsi přidáno 170 μ l

předeřátého LB media. Následně 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 µg/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 µg/ml). Po 12-16 hodinách byly buňky připravené ve vyhovující koncentraci pro izolaci plazmidu.

Tekuté LB medium

Složení: 1% tryptonu (*ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA*), 0,5% kvasinkového extraktu (*Serva*), 1% chlorid sodný (NaCl; *Sigma-Aldrich, Ayrshire, UK*). 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).

LB agar s kanamycinem

Složení: 1% tryptonu, 0,5% kvasinkového extraktu, 1% NaCl, 1,5-2,0% agaru (*Difco, Detroit, USA*). Směs byla rozpuštěna v deionizované vodě, sterilizována 20 min při 121 °C a po ochlazení na 50 °C byl přidán kanamycin (30 µg/ml). 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 ztuhnout. Hotové misky byly uloženy do lednice (cca 4°C).

3.1.3. Izolace DNA, sekvence

Izolace plazmidu byla provedena pomocí kitu JETquick Plasmid Miniprep (*Genomed, Löhne, Německo*). Suspenze s buňkami byla postupně stočena, 2 min při 13000 rpm a pokojové teplotě, v eppendorfci. Tekutina byla odstraněna a peleta byla resuspendována ve 250 μ l roztoku G1. Ke směsi bylo přidáno 250 μ l roztoku G2 a obsah eppendorfky byl jemně promíchán obrácením dnem vzhůru. Směs byla inkubována 5 min za pokojové teploty. Dále bylo přidáno 350 μ l roztoku G3. Směs byla opět jemně promíchána až k dosažení zdánlivé homogenity. Eppendorfky se směsí byly následně stočeny 10 min při 13000 rpm a pokojové teplotě.

Odstředěná tekutina byla slita do speciálních kolonek a při centrifugaci (1 min, 13000 rpm, pokojová teplota) byla v ní obsažená DNA zachycena na filtru. Následně byla DNA čistěna 500 μ l roztoku GX a po jeho odstranění stočením (1 min, 13000 rpm, pokojová teplota) ještě 500 μ l roztoku G4. Přebytečná kapalina byla odstraněna dvakrát provedenou centrifugací (1 min, 13000 rpm, pokojová teplota) pro odstranění stop etanolu. Nakonec byla DNA z kolonky vymyta při stočení (2 min, 13000 rpm, pokojová teplota) 60 μ l TE pufru předehřátého na 70°C v Thermomixeru.

U suspenze byla změřena koncentrace DNA na přístroji NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (*Thermo Fisher Scientific Inc*) 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

Buňky HEK293 byly pěstovány v médiu skládajícím se z Dulbeccova modifikovaného Eaglova média (D-MEM; *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*),

10% tepelně deaktivovaného 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 a 95% vzduchu. 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 při 37°C se 3 ml Versenova roztoku s 0,25% trypsinu. Trypsin byl 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 předeřátého D-MEM media.

Pro udržení buněčné linie bylo do nové lahve se 7,5 ml předeřátého D-MEM media nasazeno 0,3-0,5 ml suspenze buněk (obsahuje 1,5-2,0.10⁶ buněk). Buňky byly vždy pěstovány ve dvou nezávislých lahvích (obvykle jedna s vyšší koncentrací buněk, druhá s nižší), z nichž jen jedna byla vybrána k pasážování. Celkový počet pasáží se pohyboval mezi 30-50. 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 poly-L-lysinovými sklíčky (*Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sandheim, Německo*). Do misky se 2 ml předeřátého D-MEM media byly na každé sklíčko nasazeny 4 µl buněčné suspenze.

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 µl pufru jetPRIME se 2 µg DNA a směs byla homogenizována po 10 s vortexováním s následným krátkým stočením. Ke směsi pufru a DNA byly přidány 2 µl jetPRIME a transfekční směs byla po dalším 10 s vortexování inkubována 10 min při pokojové teplotě. Mezitím bylo z misek odsáto staré kultivační medium a nahrazeno 2 ml čerstvého předeřhátého D-MEM media. Po uplynutí potřebné doby bylo do media přidáno 200 µl 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

Elektrofyziologická měření byla prováděna patch-clamp technikou. Po dobu měření byly buňky udržovány v minimálním médiu bez séra, napodobujícím iontové prostředí uvnitř organismu, tj. v mezibuněčném roztoku (ECS). Membránové proudy byly vyvolávány aplikací agonisty do ECS v těsné blízkosti buňky. Vodivé spojení s vnitřním prostorem buňky zajišťoval po protržení membrány vnitrobuněčný roztok (ICS) ve skleněné mikropipetě-elektrodě.

3.3.1. Roztoky

Mezibuněčný roztok

V průběhu měření byly buňky ponořeny v proudícím ECS, který byl složen z chloridu sodného, chloridu draselného, chloridu vápenatého, chloridu hořečnatého, N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-2-etansulfonové kyseliny a D-glukózy rozpuštěných v deionizované vodě. Všechny chemikálie pocházely

od firmy Sigma-Aldrich. Příslušná množství a výsledné koncentrace naleznete v **tabulce I**.

Tabulka I: Složení mezibuněčného roztoku.

chemikálie	zkratka	množství na 1 l ECS	výsledná koncentrace [mM]
chlorid sodný	NaCl	8,298 g	142
chlorid draselný	KCl	0,223 g	3
chlorid vápenatý (1 M roztok)	CaCl ₂	2 ml	2
chlorid hořečnatý (1 M roztok)	MgCl ₂	1 ml	1
D-glukosa	-	1,8 g	10
N-(2-hydroxyetyl)piperazin- N'-2-etansulfonová kyselina	HEPES	2,383 g	10
deionizovaná voda	-	1 l	-

Po rozpuštění všech chemikálií bylo NaOH upraveno pH na 7,3. Výsledný roztok měl osmolaritu 290-300 mOs/l. Její hodnoty byly kontrolovány na osmometru Vapro 5520 (*Wescon, Logan, UT, USA*). Zásobní ECS byl uložen v plastových lahvích k tomu určených při -20°C. Obvykle bylo připravené množství spotřebováno nejpozději za měsíc.

Vnitrobuněčný roztok

Skleněná elektroda, kterou byly snímány ATP-stimulované odpovědi z transfekovaných HEK293 buněk, byla naplněna ICS připraveným z 2,592 g chloridu cesného (CsCl), 0,238 g HEPES a 0,418 g etylen glykol-bis(2-aminoetyler)-*N,N,N',N'*- tetraoctové kyseliny. Po rozpuštění ve 100 ml deionizované vody bylo roztoku upraveno pH na hodnotu 7,2 hydroxidem cesným (CsOH). Roztok byl rozpipetován do 1 ml eppendorfek a uložen do -80°C. Všechny chemikálie pro přípravu ICS byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich.

Aplikační roztoky

Jako aplikační roztok byl používán ATP o koncentracích 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 a 1000 μM . Aplikační roztoky byly připravovány před každým pokusem čerstvé ze zásobního roztoku ATP rozpuštěním v ECS. Aplikačním roztokům s vysokou koncentrací ATP (100, 300 a 1000 μM) bylo kontrolováno pH a v případě potřeby upraveno NaOH na hodnotu 7,3. Zásobní roztoky ATP v deionizované vodě o koncentracích 100 mM a 10 mM byly uchovávány v -80°C .

V některých pokusech byl ATP aplikován po 2-6 minutové preinkubaci buněk s IVM o koncentraci 3 μM . Roztok IVM v ECS byl také před každým pokusem připravován čerstvý. Jako zásobní roztok byl při 4°C uchováván 10 mM roztok IVM v dimetylsulfoxidu (DMSO). Vzhledem k nestabilitě IVM byl roztok připravován 2x měsíčně. Koncentrace DMSO v aplikačním roztoku IVM nepřesáhla 1%. V této koncentraci nemá DMSO vliv na odpovědi P2X_4 receptoru stimulovaného ATP [64].

3.3.2. Snímání signálů z buněk

Při aktivaci P2X_4 receptoru 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 HEK293 buňkách 20-48 hodin po transfekci. Jedno 12 mm poly-L-lysinové sklíčko s buňkami bylo umístěno ve stále proudícím ECS 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.

Vodivé spojení s vnitřním prostředím buňky bylo zajištěno ICS ve skleněné elektrodě. Elektroda byla vyrobena 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 zatavena 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 $\text{M}\Omega$. Pohyby skleněné elektrody byly při pokusu ovládány pomocí mikromanipulátoru (*model MP-285, Sutter Instrument*).

Skleněná mikropipeta byla spojena s měřícím systémem argentchloridovou elektrodou ponořenou v ICS. 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, 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 asi 1 hod 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

exprimovaný protein byl přímo spojen s fluoreskujícím EGFP, byla míra exprese kontrolována pomocí UV lampy a filtru U-ZWIB2 pro excitační vlnové délky 460-490 nm a emisi při 505 nm.

3.4. Konfokální mikroskopie

Ke zjištění výskytu receptoru v membráně byla použita technika konfokální mikroskopie. Nebylo třeba používat žádné protilátky, protože k transfekci byly využité formy mutací spojené s EGFP. Na konfokální mikroskopii byly používány buňky pěstované shodně jako buňky určené k elektrofyziologickým měřením.

3.4.1. Příprava buněk pro konfokální mikroskopii

Z misek se třemi 12 mm poly-L-lysinovými sklíčky s transfekovanými HEK293 buňkami bylo opatrně odsáto médium a buňky byly opláchnuty 3× 1 ml roztoku PBS. Buňky byly fixovány na ledu 2 ml ledového metanolu po dobu 5 minut. Následně byl zbylý metanol odsán a sklíčka byla ponechána 10-20 minut oschnout. Mezitím byla podložní sklíčka očištěna, odmaštěna etanolem a popsána. Na kapku Vectashieldu (s obsahem DAPI; *Vector Laboratories, inc., Burlingame, CA, USA*) byla po osušení papírovou utěrkou přiložena buňkami dovnitř poly-L-lysinová sklíčka. Sklíčka spojená Vectashieldem byla ponechána schnout 1 hodinu za pokojové teploty přikrytá filtračním papírem a v temnotě (šuplíku). Po uschnutí byla sklíčka přesunuta do speciálních desek a umístěna do lednice.

Extracelulární roztok s fosfátovým pufrem (PBS)

Roztok byl připraven rozpuštěním 8,591 g NaCl, 0,201 g KCl, 0,200 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) a 0,610 g hydrogenfosforečnanu sodného (Na_2HPO_4) v 1 litru deionizované vody. Všechny chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich. U roztoku bylo pH upraveno na 7,3 pomocí NaOH.

3.4.2. Snímání obrazu

Ke snímání obrazu byl použit konfokální mikroskop Leica SP2 (*Leica Microsystems, Wetzlar, Německo*). Laser byl nastaven na excitační vlnovou délku EGFP $\lambda = 488$ nm. Orientace na sklíčku a vyhledání skupiny buněk bylo zajištěno pomocí filtru zobrazujícího zbarvení jader DAPI. Signál z buněk byl snímán v rozmezí vlnových délek 500-510 nm, což odpovídá emisnímu pásmu EGFP. Snímání standardně probíhalo za jednotně nastavených podmínek (jas aj.) tak, aby mohl být jednoznačně porovnáván divoký typ s mutantem. Pro výsledné obrázky ale musela být u mutantů z důvodu nižší svítivosti nastavena vyšší citlivost (divoký typ 632 V, mutace 709 V). Všechny výsledné obrázky se skládaly ze 4 horizontálních a 4 vertikálních vrstev.

3.5. Vyhodnocování výsledků - výpočty

Velikosti odpovědí vyvolaných ATP byly vyhodnocovány pomocí programu Clampfit 9 (*Axon Instruments*). Body získané při elektrofyziologických měřeních byly prokládány v programu SigmaPlot 10 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*) Hillovou tří parametrickou sigmoidální křivkou 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 μ M 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 $h = 1,3$. Hillův koeficient se vztahuje k počtu vazebných míst pro agonistu v proteinu a při usnadňování navazování další molekuly je nižší než počet vazebných míst [65]. Tato hodnota pro Hillův koeficient byla stanovena experimentálně pro divoký typ rP2X₄ receptoru v rozsáhlém souboru hodnot měřených v laboratoři Buněčné a molekulární neuroendokrinologie na Fyziologickém ústavu Akademie Věd.

Časová konstanta deaktivace byla určena proložení exponenciální funkce nejlépe vystihující skutečnou naměřenou odpověď. Časové konstanty deaktivace byly vypočítávány programem Clampfit 9 dle rovnice:

$$y = A \cdot e^{-(t/\tau_{off})}$$

Hodnota A představuje amplitudu proudové odpovědi, proměnná t je čas v bodě y , časovou konstantu deaktivace vyjadřuje hodnota τ_{off} .

Všechny hodnoty v textu jsou uváděny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Statisticky významně odlišné hodnoty byly vyhodnoceny pomocí programu SigmaStat 9 tabulkou ANOVA s následným Tukeyovým testem na úrovni významnosti 99% ($p < 0,01$).

4. VÝSLEDKY

4.1. Experimentální model

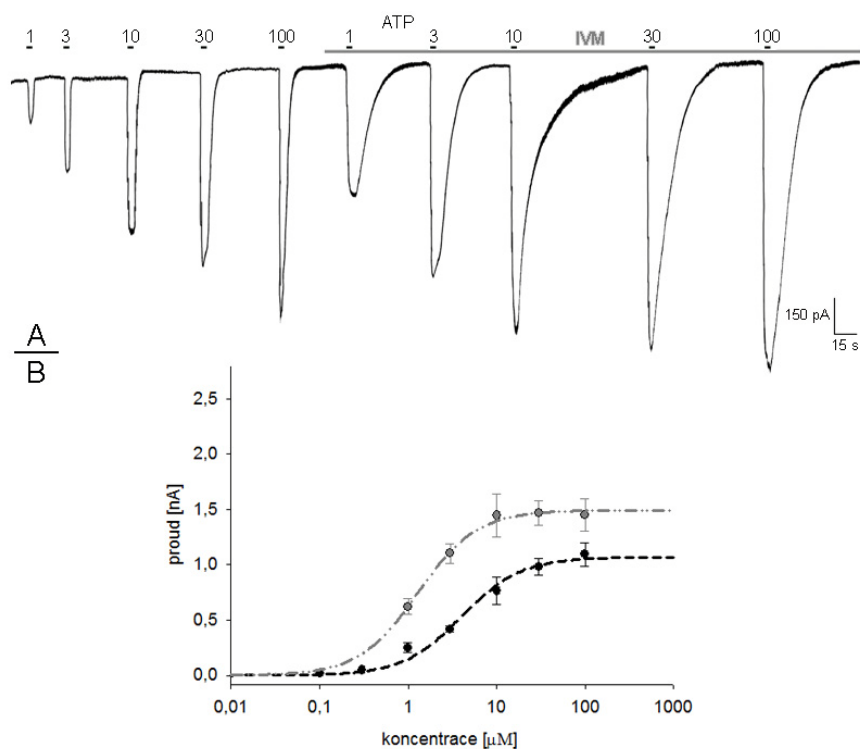
Deset cysteinů v ektodoménové smyčce P2X₄ receptoru bylo, jeden po druhém, nahrazeno alaniny. Náhrada za malý alanin je základní metodou, jíž se zjišťuje vliv polarity, náboje či jiných vlastností původní AMK na strukturu a funkci receptoru. Alaninová substituce ektodoménových cysteinů byla použita i v analogických pracích na jiných purinergních P2X receptorech vnesených do žabích oocytů (viz tabulka II).

Tabulka II: Výsledky dosud publikovaných prací o cysteinech v ektodoméně P2X receptorů.

P2X ₁ [66]		P2X ₂ [67]		P2X ₄ [68]	
EC ₅₀ (μM)	amplituda	EC ₅₀ (μM)	amplituda	EC ₅₀ (μM)	amplituda
WT	~ 1	WT	32	WT	8.2
C117A	3.2 *	C113A	990* ↓	C116A	22.8* ↓
C165A	2.7 *	C164A	869* ↓	C165A	47.2* ↓
C126A	4.6 *	C124A	462* ↓	C126A	28.5* ↓
C149A	5.1 *	C147A	459* ↓	C149A	19.6* ↓
C132A	4.8 * ↓	C130A	359* ↓	C132A	11.1 ↓
C159A	2.0 ↓	C158A	411* ↓	C159A	10.2 ↓
C217A	9.8 **	C214A	303* ↓↓	C217A	16.5* ↓
C227A	54 **	C224A	n. f. ↓↓	C227A	22.5* ↓
C261A	1.4 ↓↓	C258A	30 ↓↓	C261A	8.8 ↓
C270A	2.3 * ↓↓	C267A	30 ↓↓	C270A	10.4 ↓

Šipky u amplitudy značí snížení (↓) či významné snížení (↓↓) maximální amplitudy proudové odpovědi u mutovaného receptoru. Hvězdičky u polovičních efektivních koncentrací (EC₅₀) značí statisticky významnou změnu hodnoty oproti divokému typu. Všechny uvedené výzkumy byly prováděny na žabích oocytech (kromě amplitudy mutací receptoru P2X₂, které byly měřeny také na HEK293 buňkách). Mutace jsou seřazeny podle můstků, jak k sobě patří dle publikované krystalové struktury zfP2X₄ [1].

V této práci byla změněná DNA vnesena do buněk HEK293 a po expresi receptoru byly z těchto buněk snímány proudové odpovědi vyvolané mimobuněčnou aplikací ATP. V každém pokusu byl kromě mutovaného receptoru současně měřen také divoký typ receptoru. Porovnání naměřených hodnot amplitud vyvolaných různými koncentracemi ATP mělo sloužit k sestavení křivky závislosti účinku na dávce a určení hodnoty EC_{50} , ale u některých mutací byly proudy tak malé, že určení EC_{50} nebylo možné. K dalšímu hodnocení vlivu mutace byl proto využit pro $P2X_4$ receptor specifický modulátor: ivermektin. Jeho účinkem dochází ke zvýšení citlivosti receptoru na ATP, zvýšení maximální odpovědi a prodloužení doby deaktivace (viz obrázek 7).

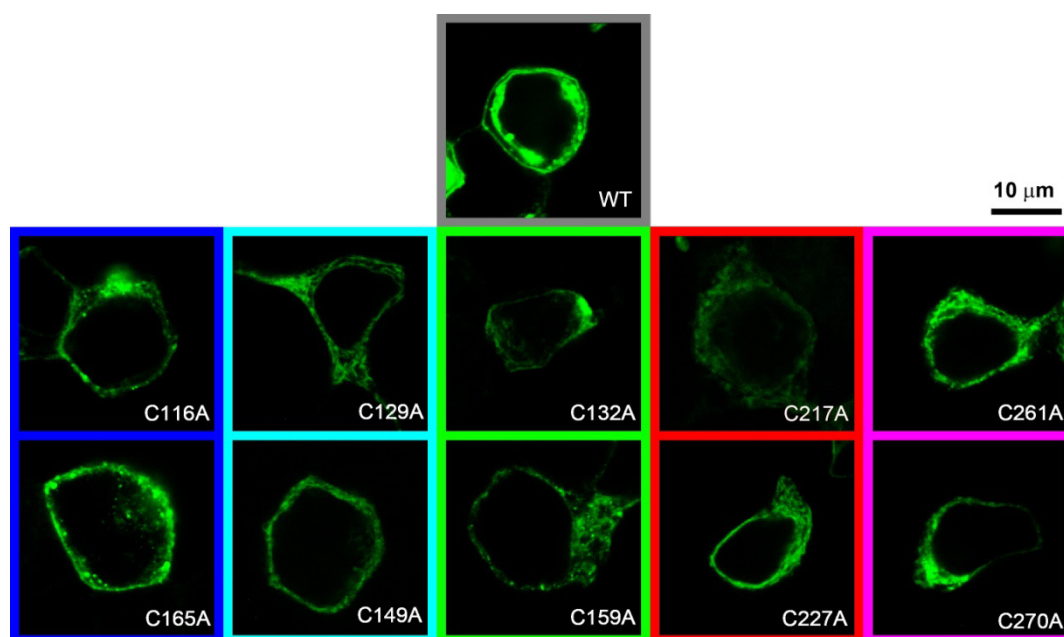


Obrázek 7: Chování divokého typu $P2X_4$ receptoru.

- A:** Odpověď receptoru na aplikaci různých koncentrací ATP (černá úsečka nad odpověďmi), šedá čára značí aplikaci IVM. Po aplikaci IVM je jasně viditelné prodloužení doby deaktivace a zvýšení amplitudy odpovědi.
- B:** Křivka závislosti odpovědi na podané dávce ATP. Čárkovaná křivka bez přítomnosti IVM, čerchovaná křivka v přítomnosti 3 μM IVM. Jednotlivé body představují hodnoty získané ze 114 buněk, měřených ve 43 pokusech. Naměřenými body byla v programu SigmaPlot proložena křivka (viz „Metodika“).

4.2. Výskyt receptoru v membráně

Jak bylo popsáno v úvodní kapitole, P2X₄ receptor podléhá velmi dynamickému mechanismu přesunu do membrány a stahování z membrány do endozomů či lysozomů. Pro zjištění, zda vnesení příslušné mutace ovlivnilo přesun P2X₄ receptoru z ER do membrány, byl gen pro receptor přímo spřažen s genem pro EGFP (viz „Metodika“) a po transfekci byla přítomnost receptoru v membráně HEK293 buněk zkoumána metodou konfokální mikroskopie (viz obrázek 8).



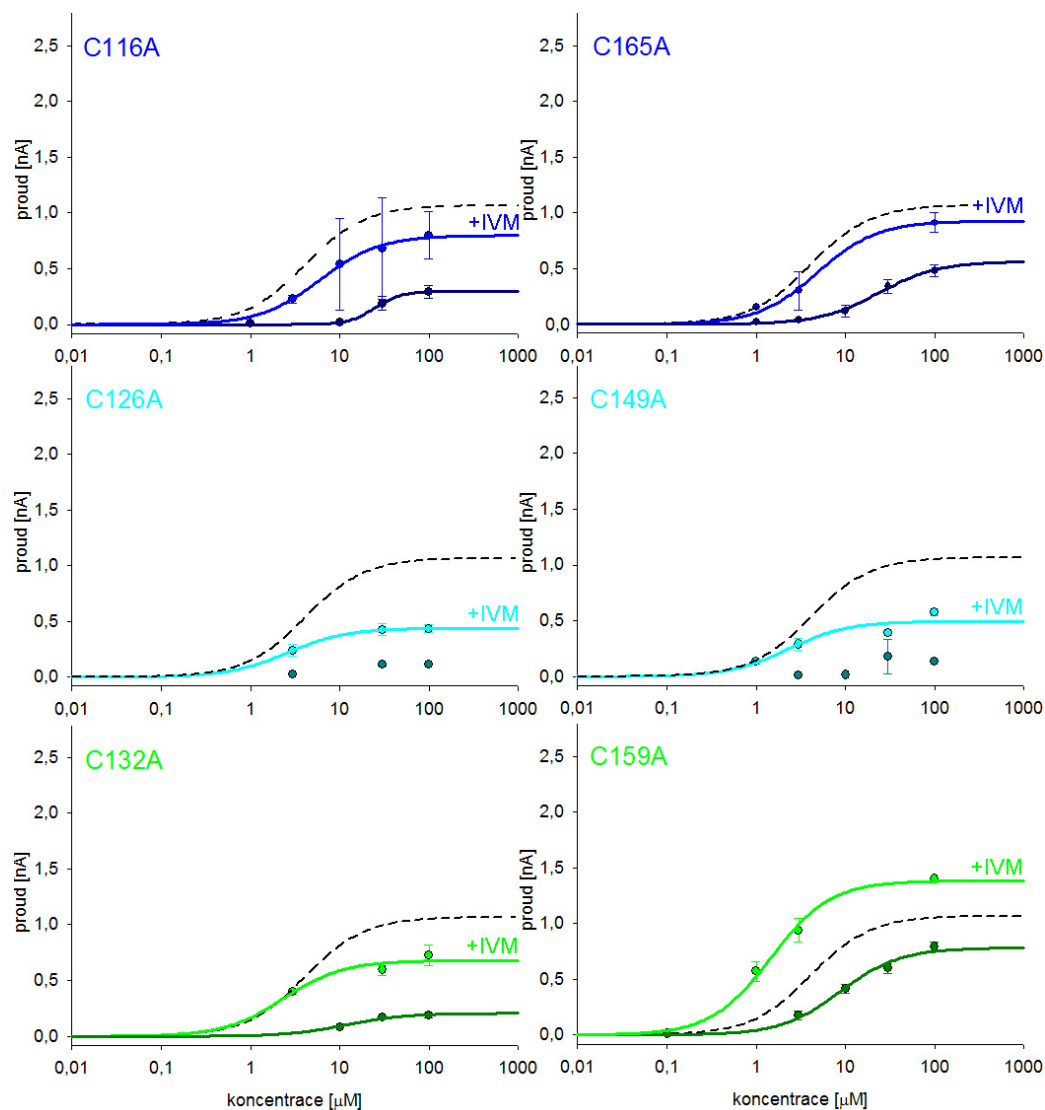
Obrázek 8: Výskyt receptoru v plasmatické membráně HEK293 buňky.

Receptorový protein byl spojen s EGFP a následně zviditelněn v buňce excitací EGFP za využití konfokální mikroskopie. V dolním pravém rohu označení mutace.

Ačkoli výsledky předcházejících měření na receptorech P2X₁, P2X₂ a P2X₄ vnesených do žabích oocytů (viz tabulka II) silně naznačovaly možnost porušení tohoto mechanismu již na počátku před přesunem do plasmatické membrány, ukázalo se, že u P2X₄ receptoru exprimovaném v systému HEK293 buněk tomu tak není. Všechny mutace shodně vykazovaly nižší svítivost oproti divokému typu, ale všechny bez výjimky se v membráně vyskytovaly.

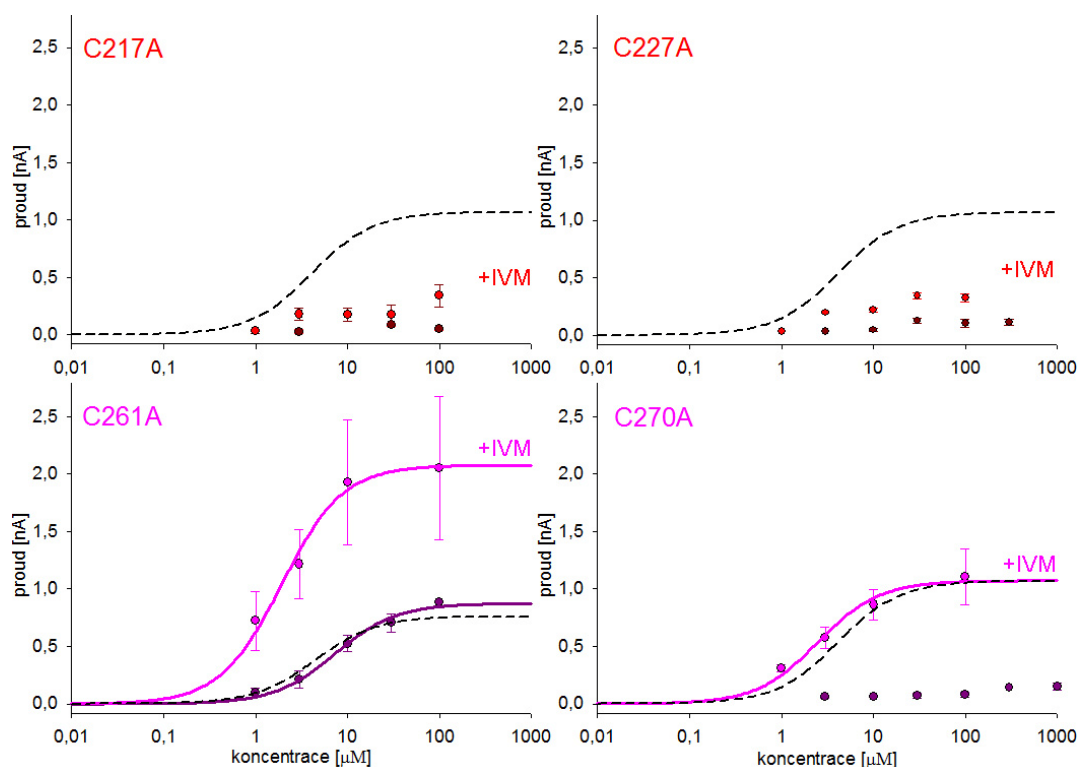
4.3. Toxikologické parametry

Pro získání závislosti odpovědi na dávce byly z HEK293 buněk s vneseným mutovaným či původním P2X₄ receptorem snímány proudy vyvolané aplikací ATP v koncentracích od 0,1 μM po 1 mM.



Obrázek 9-1: Závislost odpovědi na dávce u mutovaných P2X₄ receptorů.

Text viz následující strana (obrázek 9-2)



Obrázek 9-2: **Závislost odpovědi na dávce u mutovaných P2X₄ receptorů.**

Tmavé křivky značí průběh závislosti velikosti proudové odpovědi na dávce ATP v nepřítomnosti IVM, světlé křivky měření při současném podání 3 μM IVM. Čárkovaně vynesena křivka závislosti odpovědi na dávce pro divoký typ receptoru v nepřítomnosti IVM. Jednotlivé body představují hodnoty získané z 12–55 buněk, měřených v 5–21 pokusech. Naměřenými body byla v programu SigmaPlot proložena sigmoidální křivka (viz „Metodika“).

Z deseti mutací mělo pět (C126A, C149A, C217A, C227A a C270A) tak nízké odpovědi, že nebylo možné u nich vyhodnotit EC_{50} a zjistit citlivost pozměněného receptoru k ATP. Mutace C116A a C165A až šestkrát snížily citlivost receptoru oproti divokému typu. Každá z uvedených sedmi mutací musela způsobit podstatné změny ve struktuře receptoru, a to buď v samotném ATP-vazebném místě nebo v oblastech zodpovědných za spolupráci podjednotek či otevírání póru receptoru.

Zbylé tři mutace nebyly tolik zasaženy. Mutace C132A měla jen menší amplitudu a téměř třikrát nižší citlivost, mutace C159A a C261A se svou citlivostí k ATP blížily divokému typu, stejně tak i jejich maximální odpovědi. Přesné hodnoty jsou uvedeny v tabulce III.

Tabulka III: Hodnoty popisující vlastnosti (ne)mutovaného P2X₄ receptoru.

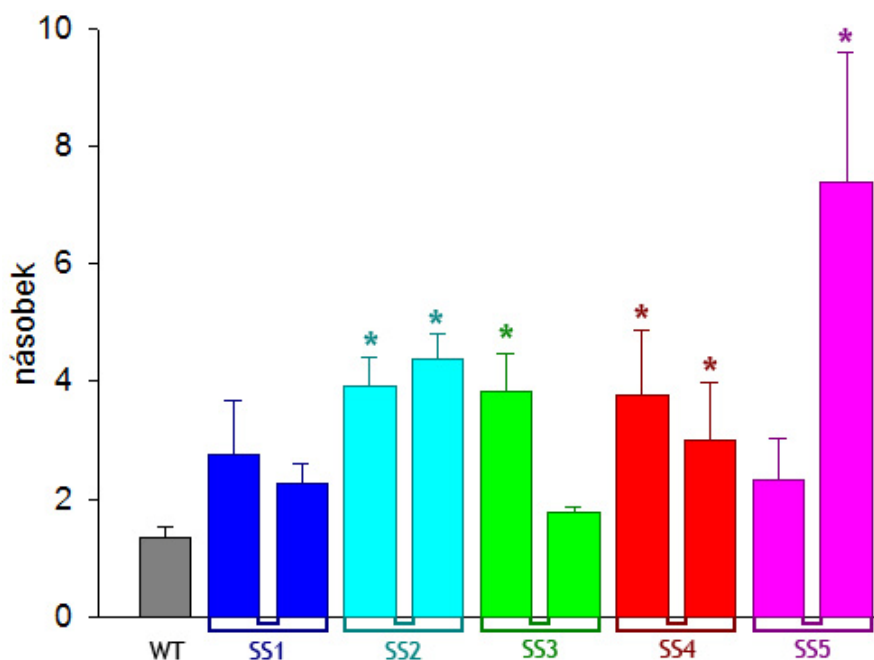
mutace	EC ₅₀ [μM]		I _{max} [nA]		τ _{off} [s]
	bez IVM	s IVM	bez IVM	s IVM	s IVM
WT	4,06±0,78	1,29±0,12	1,09±0,11	1,45±0,14	22,05±1,91
C116A	24,86±1,40*	6,02±1,09*	0,29±0,06*	0,80±0,21	5,59±0,46*
C165A	23,78±5,15*	4,90±0,92*	0,48±0,05*	1,08±0,13	6,56±0,40*
C126A	n.d.	2,63±0,06*	0,11±0,01*	0,43±0,04*	7,45±0,53*
C149A	n.d.	2,81±0,30*	0,13±0,01*	0,57±0,03*	10,67±1,07*
C132A	12,08±3,05*	2,35±0,82	0,19±0,02*	0,73±0,09	12,56±1,86
C159A	9,48±2,31	1,47±0,23	0,79±0,04	1,40±0,01	21,91±1,99
C217A	n.d.	n.d.	0,09±0,01*	0,34±0,09*	5,14±0,43*
C227A	n.d.	n.d.	0,11±0,03*	0,33±0,06*	5,40±0,75*
C261A	7,40±1,61	1,91±0,46	0,88±0,01	2,05±0,62	18,11±2,00
C270A	n.d.	2,51±0,70	0,15±0,03*	1,11±0,24	18,38±1,82

n.d. – nedefinováno (amplituda proudové odpovědi byla příliš nízká na vyhodnocení EC₅₀)
 * označuje statisticky významné odchylení hodnoty od hodnoty pro divoký typ receptoru;
 EC₅₀ – poloviční efektivní koncentrace ATP, I_{max} – maximální amplituda proudové odpovědi,
 τ_{off} – časová konstanta deaktivace

4.4. Změna odpovědi receptoru při aplikaci ivermektinu

Aby bylo možné vyhodnotit citlivost receptorů k ATP u pěti mutantů s velmi nízkými amplitudami odpovědi, byla všechna měření prováděna také v přítomnosti pozitivního allosterického modulátoru ivermektinu, který se váže v oblasti transmembránových domén a sám ektodoménu neovlivňuje. Aplikace IVM o koncentraci 3 μM měla za následek u všech mutací zvýšení citlivosti receptoru k ATP a zvýšení maximální amplitudy proudové odpovědi. U divokého typu receptoru došlo ke zhruba jeden a půlnásobnému navýšení odpovědi receptoru. Ke srovnatelnému navýšení maximální amplitudy došlo u mutací C116A, C165A, C159A a C261A. U zbylých šesti mutací (C132A, C126A, C149A, C217A, C227A a C270A) IVM vyvolal ještě větší zvýšení amplitudy a napravil funkčnost

receptorů. Nejvíce se tento vliv projevil u mutace C270A, kde byla proudová odpověď navýšena více než sedmkrát (viz obrázek 10).



Obrázek 10: Navýšení maximální amplitudy odpovědi v přítomnosti ivermektinu u (ne)mutovaných forem P2X₄ receptoru.

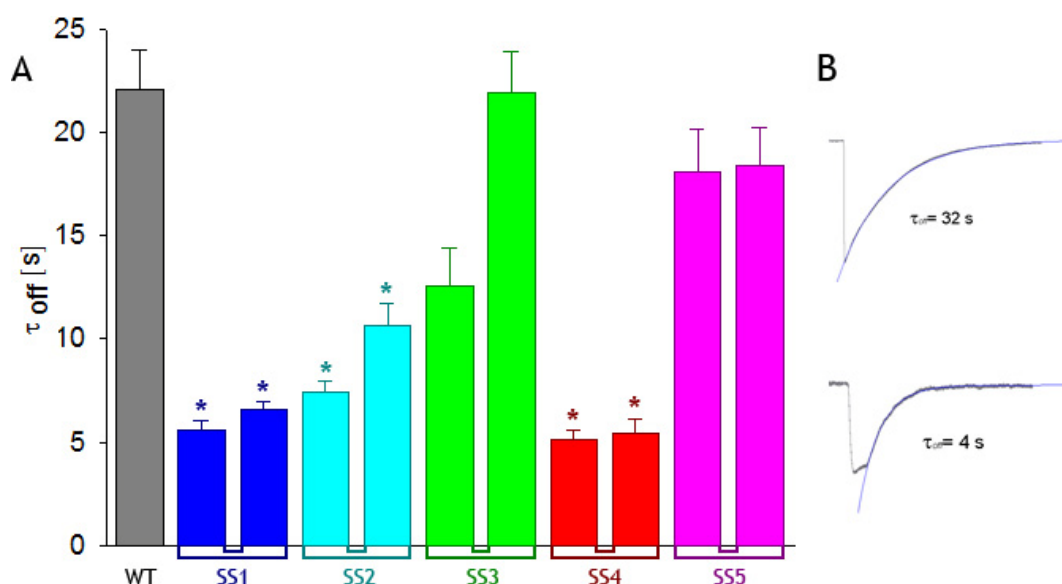
Hvězdičky označují hodnoty významně odlišné od divokého typu podle tabulky ANOVA a Tukeyova testu testované v programu SigmaStat. Barevnost dle můstků: SS₁ složen z Cys¹¹⁶-Cys¹⁶⁵, SS₂ z Cys¹²⁶-Cys¹⁴⁹ a SS₃ z Cys¹³²-Cys¹⁵⁹, SS₄ z Cys²¹⁷-Cys²²⁷, SS₅ z Cys²⁶¹-Cys²⁷⁰.

Porovnáním absolutních hodnot proudových odpovědí (Tabulka III) se ukázalo, že na úroveň odpovědi srovnatelnou s divokým typem se dostaly mutace C132A, C159A, C261A a C270A. Obdobně divoký typ dotahují zmíněné mutace i v citlivosti. Mutace C116A a C165A mají s divokým typem za přísunu IVM blízkou výši maximální odpovědi, ale jejich citlivost stále významně zaostává.

U divokého typu receptoru došlo ke zhruba čtyřnásobnému zvýšení citlivosti (snížení hodnoty EC₅₀) a ke srovnatelnému navýšení citlivosti došlo u mutací C116A, C132A, C165A, C159A a C261A. Také u tří ze zbylých pěti mutací (C126A, C149A a C270A) se podařilo určit podobnou hodnotu EC₅₀, ale u mutací C217A a C227A se hodnotu EC₅₀ nepodařilo změřit ani v přítomnosti IVM.

4.5. Deaktivace P2X₄ receptoru

Po preinkubaci s IVM dojde také k prodloužení doby deaktivace receptoru. Zatímco před aplikací IVM je návrat divokého typu P2X₄ receptoru po odmytí agonisty hotov během jedné sekundy, po aplikaci IVM trvá i více než minutu než se receptor vrátí do původního stavu. Průměrná vypočtená τ_{off} pro divoký typ je zhruba 22 s. Konstanta byla získána pomocí vykreslení křivky exponenciální funkce (viz „Metodika“) nejbližší skutečnému průběhu získaného záznamu měření (viz obrázek 11B) a následným výpočtem parametrů v programu Clampfit. Ze sledovaných mutací se divokému typu plně vyrovnala jen mutace C159A (viz obrázek 11A).



Obrázek 11: Časová konstanta deaktivace u sledovaných mutací.

A: Grafické znázornění časových konstant deaktivace. Hvězdičkou označeny od divokého typu významně odlišné hodnoty. Barevnost dle můstků (viz obrázek 10).

B: Příklady odpovědí s fitovanými exponencielami. Pod křivkou uvedena její konstanta τ_{off} .

Časové konstanty deaktivace mutací C261A a C270A se divokému typu přiblížily, jejich hodnoty byly nižší pouze o 20%. U mutací C217A, C227A, C116A a C165A byla sice časová konstanta deaktivace delší než v měřeních bez podání IVM, ale dosáhla jen zlomku času ve srovnání s divokým typem. Významně byly ovlivněny i mutace C126A a C149A, o něco méně pak C132A (viz obrázek 11A).

5. DISKUZE

Analogicky dle publikovaného krystalu z rP2X₄ se v ektodoméně všech P2X receptorů obratlovců vyskytuje pět cysteinových můstků, do nichž jsou zapojeny všechny cysteiny přítomné v mimobuněčné smyčce. Vytvořené páry nejdu po řadě, ale prvních šest cysteinů tvoří velkou smyčku „hlavy“ (podle autorů krystalu, kterým připomíná P2X podjednotka tělo delfina): u rP2X₄ je SS₁ složen z Cys¹¹⁶-Cys¹⁶⁵, SS₂ z Cys¹²⁶-Cys¹⁴⁹ a SS₃ z Cys¹³²-Cys¹⁵⁹. Zbylé čtyři cysteiny už formují jen malé samostatné smyčky: SS₄ z Cys²¹⁷-Cys²²⁷ vytváří základ „hřbetní ploutve“, SS₅ z Cys²⁶¹-Cys²⁷⁰ spojuje dva β-listy krátkou nepravidelnou otáčku v oblasti „těla“. [1]

5.1. Role cysteinových můstků ve skládání a přesunu P2X₄ receptoru buňkou

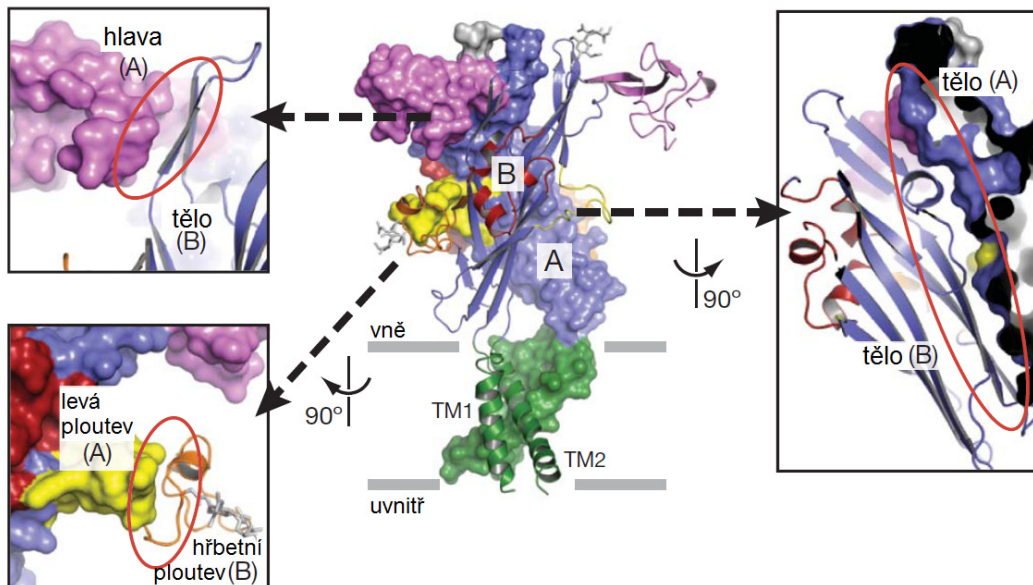
Konfokální mikroskopie jasně ukázala, že všechny z deseti mutovaných forem P2X₄ receptoru jsou ve výsledku dopraveny z ER do plazmatické membrány buňky. Všechny proteiny jsou před opuštěním ER kontrolovány jeho vnitřními mechanismy a dále do buňky se dostanou jen správně sbalené proteiny [46]. Mutace v místech cysteinů rušící cysteinové můstky tedy buď nenarušují významně sekundární a terciární strukturu proteinu, nebo je mutace v ER vyvážena jinými změnami založenými na kontaktu s dalšími proteiny či enzymy, nebo je tato změna v proteinu pod rozlišovací schopností kontrolních mechanismů ER. Rozbitý cysteinový můstek ale nutně musí zasahovat přinejmenším do terciární struktury proteinu. Navíc zde vznikne nespárovaný silný negativní náboj druhého cysteinu, který by mohl vytvořit náhradní vazbu. Ke špatnému spárování cysteinů by ale nemělo dojít, protože to je napravováno protein disulfid isomerázou [47].

Naše měření fluorescence EGFP nebyla zaměřená na přesné hodnoty svítivosti, nelze tedy kvantitativně porovnávat expresi jednotlivých mutací mezi sebou, ale je možné identifikovat jejich výskyt v membráně a porovnat jej vůči divokému typu. Celkově nižší svítivost mutovaných forem receptoru oproti divokému typu (viz „Metodika“) znamená menší výskyt receptorů v buňce. Z ER se do plazmatické membrány dostalo mnohem méně receptorů než u divokého typu a zároveň i v ER je přítomno méně nepřesunutých receptorů. Buď je část receptorových proteinů degradována na základně špatného náhodného složení, na němž se podepsala nepřítomnost některého z SS můstků, nebo je celý proces zpomalen kvůli své náročnosti, kdy mohou být chyby ve složení napravovány.

5.2. Role cysteinových můstků v kontaktu podjednotek

Správné složení podjednotek i celého receptoru je kontrolováno v ER, na povrch buňky by se tedy měly dostat jen funkční a správně složené receptory. Není ovšem vyloučeno, že před aktivací vypadá vše v pořádku a protein je propuštěn konat svou funkci v buňce. V membráně se však projeví receptor jako nefunkční nebo méně funkční. V článku o krystalové struktuře zFP2X₄ receptoru byla vytyčena tři místa kontaktu mezi podjednotkami: „hlava“ - „tělo“, „levá ploutev“ - „hřbetní ploutev“ - „tělo“ - „tělo“ (viz obrázek 12), která jsou důležitá pro funkci receptoru.

Jak bylo uvedeno výše, na tvorbě „hřbetní ploutve“ a „hlavy“ se výrazně podílejí první čtyři cysteinové můstky. Mohou mít tedy vliv i na kontakt podjednotek. Pravděpodobně má největší možnost podílet se na kontaktu „hlava“ - „tělo“ SS₃ tvořený Cys¹³², jehož mutace za alanin se odrazila ve snížení jak maximální odpovědi, tak v citlivosti receptoru k ATP, ale obdobné změny nebyly zaznamenány u jeho vazebného partnera, Cys¹⁵⁹.



Obrázek 12: Místa kontaktu podjednotek. Převzato z [1].

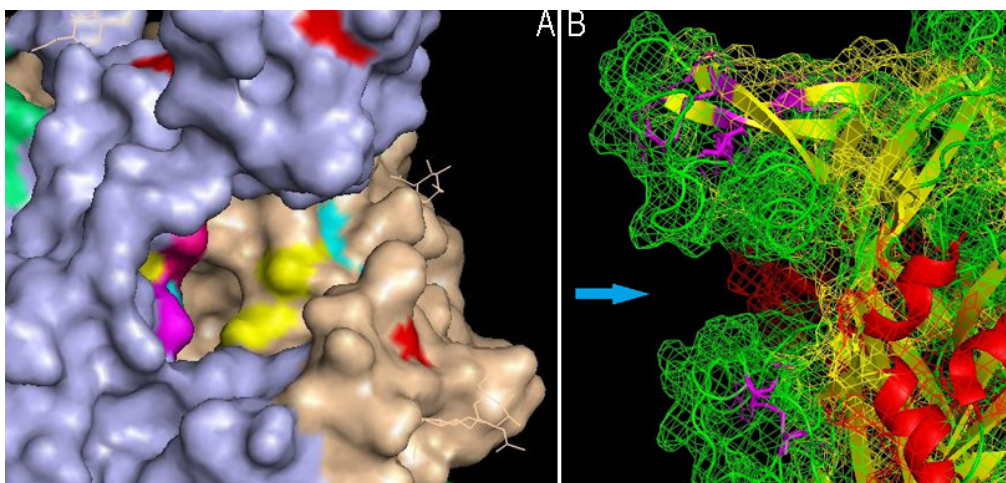
Jedna podjednotka zobrazena povrchem (A), druhá schematicky (B). Tři hlavní kontakty mezi podjednotkami A a B jsou zvětšeny a označeny elipsami v bočních panelech. Podjednotka A obarvena dle barev přiřazeným jednotlivým částem na základě podobnosti s delfinem: fialově „hlava“, modře „tělo“, žlutě „levá ploutev“, červeně „pravá ploutev“, oranžově „hřbetní ploutev“, zeleně „ocas“.

Ve „hřbetní ploutvi“ je přítomen čtvrtý cysteinový můstek, jehož obě mutace za alanin měly dopad na funkci receptoru. Citlivost k ATP nebylo možné u mutací C217A a C217A stanovit, ale na její snížení ukazuje zkrácená časová konstanta deaktivace. Provázanost citlivosti a deaktivace receptoru je prokázána, např. mutace D286A v „levé ploutvi“ P2X₃ receptoru mění zásadním způsobem rychlost návratu receptoru z desenzitizace [69]. Vzhledem k mezpodjednotkovému umístění ATP-vazebného může mít kontakt „hřbetní ploutve“ s „levou ploutví“ zároveň roli ve tvorbě ATP-vazebné kapsy.

5.3. Role cysteinových můstku v aktivaci kanálu

V dřívějších výzkumech byly pomocí jednobodových mutací vytipovány z konzervovaných AMK napříč všemi P2X receptory ty, které se pravděpodobně podílejí na vazbě ATP. Jako nejdůležitější se při vazbě ATP jeví Lys⁶⁹, Lys⁷¹

a Asp²⁹³, o něco méně důležité, ale stále v oblasti vazebné kapsy, jsou Phe²⁹⁴, Arg²⁹⁵ a Lys³¹³ (viz obrázek 13A). [29-30]



Obrázek 13: Předpokládaná ATP-vazebná kapsa P2X₄ receptoru.

A: AMK důležité pro vazbu ATP. První podjednotka modrá, druhá zelená, třetí béžová. Červeně vyznačeny cysteinové můstky. Žlutě Lys, světle modře Phe, fialovou barvou Arg a Asn.

B: Profil ATP-vazebné kapsy. Barevnost dle struktur: žlutě β-listy, červeně α-helixy, zeleně nepravidelné smyčky. Fialově SS můstky. Modrá šipka označuje vstup do ATP-vazebné kapsy.

Krystalová struktura potvrdila umístění ATP-vazebné kapsy mezi dvě podjednotky, podílí se na ní struktury „hlavy“, „hřbetní ploutve“ a „levé ploutve“. [1, 70] ATP-vazebnou kapsu můžeme rozdělit na dvě části: statickou a dynamickou.

Statická část ATP-vazebné kapsy

Statickou spodní část ATP-vazebné kapsy, na jejíž tvorbě se podílí SS₄, tvoří „hřbetní ploutev“ jedné podjednotky (na obrázku 13A béžová s červeně vyznačeným můstkem) a „levá ploutev“ sousední podjednotky (na obrázku 13A světle modře). Dle krystalu zde nejsou žádné pravidelné struktury, ale jen nedefinovatelné řetězce AMK (viz obrázek 13B).

Mutacemi v SS₄ se prokázala naprostá nepostradatelnost cysteinů ve „hřbetní ploutvi“. Odpovědi mutací C217A a C227A byly velmi nízké a nebylo možné vyhodnotit jejich citlivost. Tato data jsou v částečné shodě s výsledky výzkumů na

jiných purinergních receptorech. U P2X₁ receptoru byla výrazně méně citlivá mutace C227A, u změny v Cys²¹⁷ se vliv tolik neprojevil [66]. V receptoru P2X₂ byla mutace C224A prohlášena za nefunkční, mutace C214A měla nízké odpovědi i citlivost [67]. Oba výzkumy byly prováděny na žabích oocytech, které mají díky své velikosti na povrchu více receptorů. Na druhé straně, expresní systém HEK293 buněk, které byly používány v této práci, lépe napodobuje přirozenou expresi purinergních receptorů v organismu savců. Ani preinkubace s IVM nevedla k velkému zlepšení a odpovědi mutací C217A a C227A byly stále nízké. Ačkoli IVM je schopen většinu nefunkčních mutací přivést k životu až sedminásobným navýšením amplitudy maximální odpovědi, zde došlo jen ke trojnásobnému zvýšení. Citlivost k ATP nebylo možné stanovit, ale na její snížení ukazuje zkrácená doba deaktivace.

Správná struktura statické části ATP-vazebné kapsy tvořené „hřbetní ploutví“ je pravděpodobně stěžejní pro aktivaci P2X receptorů. Je možné, že Cys²¹⁷ a/nebo Cys²²⁷ se podílí i přímo na převodu signálu z ATP vazebné kapsy směrem ke druhé transmembránové doméně, což by odpovídalo asymetrii účinků jednotlivých mutací cysteinů tvořících SS₄, která byla nalezena na jiných purinergních receptorech.

Dynamická část ATP-vazebné kapsy

Dynamickou část ATP-vazebné kapsy představuje „hlava“ podjednotky receptoru, která se sklání nad ATP-vazebným místem a dotváří dutinu. Ve struktuře „hlavy“ jsou tři β-listy a mnoho nepravidelných smyček, jejichž propojení mají na starosti první tři cysteinové můstky. Při aktivaci receptoru se kapsa uzavírá přiblížením „hlavy“ ke „hřbetní“ a „levé ploutvi“ a uprostřed trimeru se otevírá se pór pro průchod iontů [32]. Části u sebe zůstávají i při dalším rozšíření póru receptoru.

„Krk hlavy“ vznikající spojením Cys¹¹⁶ a Cys¹⁶⁵ se nachází v oblasti, kde nemůže mít přímý vliv na vazbu ATP. Nahrazením těchto AMK za alaniny se však

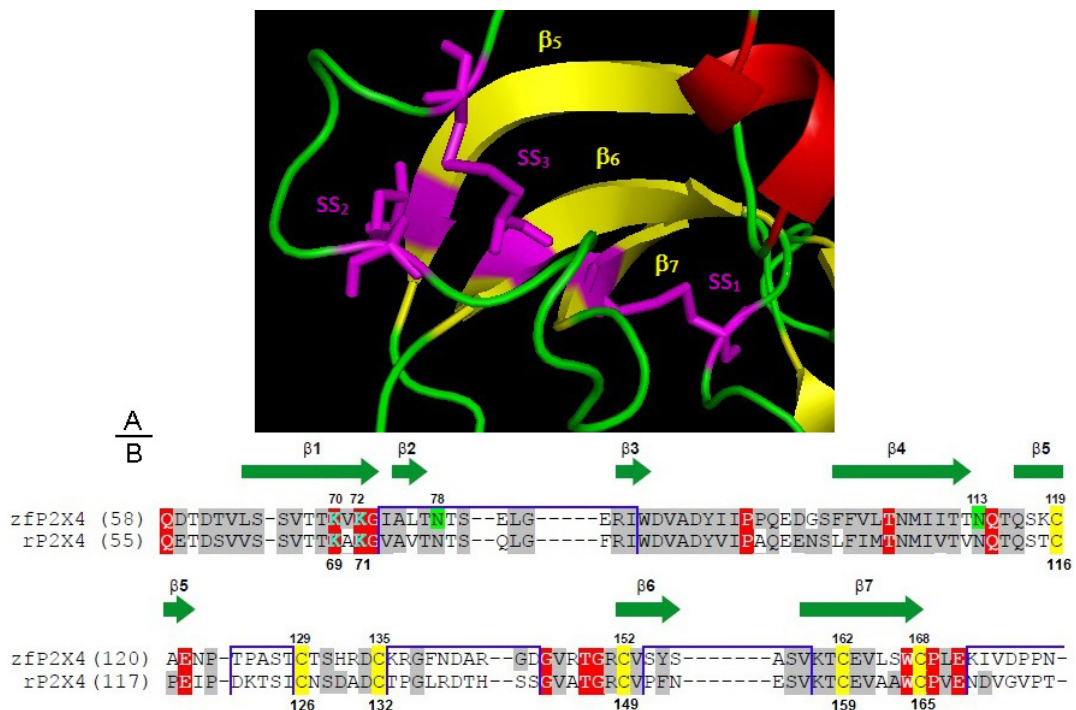
ukázala důležitost můstku SS₁ pro citlivost receptoru k ATP. Ať už se jednalo o C116A nebo o C165A, oba mutanti měli velmi nízkou citlivost oproti divokému typu receptoru, ani jejich proudivé odpovědi nebyly příliš vysoké. Obdobný efekt se ukázal i u receptorů P2X₂ [67] a P2X₄ exprimovaných v oocytech [68], ale nebyl zaznamenán u receptoru P2X₁ [66]. Také dramaticky zkrácené časové konstanty deaktivace, měřené v přítomnosti IVM, vypovídají o deformaci ATP-vazebné kapsy. Spíše než o problémy s uzavíráním kapsy se jedná o špatnou dostupnost ATP-vazebného místa. Rozbití prvního cysteinového můstku by mohlo mít za následek nesoudržnost β-listových struktur, které mohou způsobit částečné blokování přístupové cesty k ATP-vazebnému místu.

Centrální část hlavy je propojena druhým a třetím cysteinovým můstkem: SS₂ tvoří Cys¹²⁶-Cys¹⁴⁹ a SS₃ složený z Cys¹³² a Cys¹⁵⁹. Druhý cysteinový můstek ektodoménové smyčky se ukázal jako vysoce důležitý pro funkci P2X₄ receptoru. Při měření v nepřítomnosti IVM nebylo možné určit citlivost mutantů, jejich proudové odpovědi byly příliš nízké. Výzkumy na jiných purinergních receptorech citlivost vyhodnotily jako mnohonásobně nižší oproti divokému typu a naměřené maximální odpovědi byly jen zlomkem hodnot uváděných pro nemutované receptory [66-68]. V přítomnosti IVM již byly proudové odpovědi mutací C126A a C149A vyšší, ale stále zdaleka nedosahovaly hodnot divokého typu, na rozdíl od citlivosti, ve které se mu znatelně přiblížily.

Jejich snížená citlivost k ATP a krátká časová konstanta deaktivace svědčí o konformačních změnách v oblasti vazebné kapsy. Není příliš pravděpodobné, že by se některý z cysteinů tvořících SS₂ přímo účastnil vazby ATP. Dobrá citlivost, ale nízké proudové odpovědi naznačují poruchu v uzavírání ATP-vazebné kapsy, která může mít za následek nízkou frekvenci otevírání iontového kanálu a upřednostňování uzavřeného stavu receptoru. Přítomnost IVM, který tři až pětkrát zvýšil maximální amplitudy proudových odpovědí, zefektivní otevírání receptoru a dovolí tak průnik většímu množství iontů, což má za následek vyšší proudové odpovědi i při krátkém setrvání ATP ve vazebném místě.

Třetí cysteinový můstek se zdá být postradatelný. Ačkoli záměna Cys¹³² za alanin se odrazila ve snížení jak maximální odpovědi, tak citlivosti receptoru

k ATP, obdobné změny nebyly zaznamenány u jeho vazebného partnera, Cys¹⁵⁹. V prostředí IVM vykazují mutace C132A a C159A citlivost k ATP, maximální proudovou odpověď i časovou konstantu deaktivace shodnou nebo velmi podobnou divokému typu. Z dat vyplývá, že rozbití můstku SS₃ samo o sobě funkci receptoru nezasáhlo, účinná byla pouze záměna cysteinu v pozici 132. Podobné výsledky byly pozorovány i na P2X₄ [68] a P2X₁ [66] receptorech exprimovaných v oocytech. Receptor P2X₂ má obě mutace můstku SS₃ shodně postiženy [67].



Obrázek 14: Překryv působnosti SS₁ a SS₂ s SS₃.

A: Detail struktury hlavy. Barevnost dle struktur: α-helixy červeně, β-listy žlutě, nepravidelné smyčky zeleně. Cysteinové můstky fialově. Zdroj: GenBank

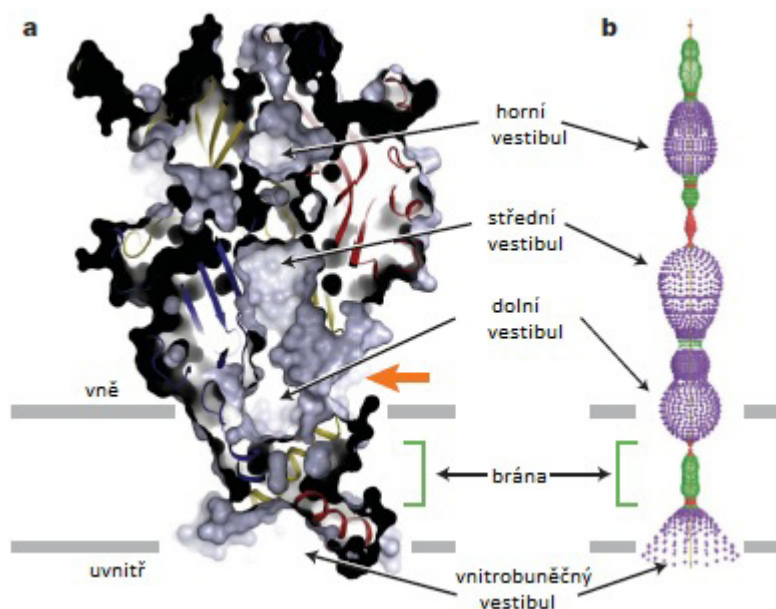
B: Kód hlavy s vyznačenými strukturálními motivy. (Převzato z [1]) Srovnání kódu zfp2X₄ a rP2X₄. Písmena označují AMK kód, červeně vyznačené konzervativní AMK v rámci všech P2X receptorů, žlutě cysteiny, modré rámečky označují variabilní oblasti.

Postradatelnost třetího cysteinového můstku lze vysvětlit náhledem do struktury P2X₄ receptoru. Cys¹³² se nachází na smyčce mezi β-listem 5 a 6 stejně jako Cys¹²⁶, Cys¹⁵⁹ je umístěn spolu s Cys¹⁶⁵ na β-listu 7. Působnost SS₃ se překrývá s druhým cysteinovým můstkem a proto není jeho rozbití pro receptor

příliš velkým problémem (viz obrázek 14). Není ale schopen zastoupit roli druhého cysteinového můstku. Je zde možnost, že při nevytvoření můstku Cys¹²⁶-Cys¹⁴⁹ se nevytvoří ani můstek Cys¹³²-Cys¹⁵⁹. Zda se jedná jen o pomocný cysteinový můstek bez důležitosti ve funkci receptoru, budou muset prokázat další studie.

5.4. Role cysteinových můstků v otevírání kanálu

Po navázání ATP a aktivaci následuje řetěz změn ve struktuře receptoru, kdy jedna strukturální změna vyvolá další. Převod signálu receptorem vyústí až v otevření jeho iontového kanálu. O těchto převodních mechanismech není mnoho známo.



Obrázek 15: Průřez zfp2X₄ receptorem s vyznačenými dutinami. Převzato z [1].

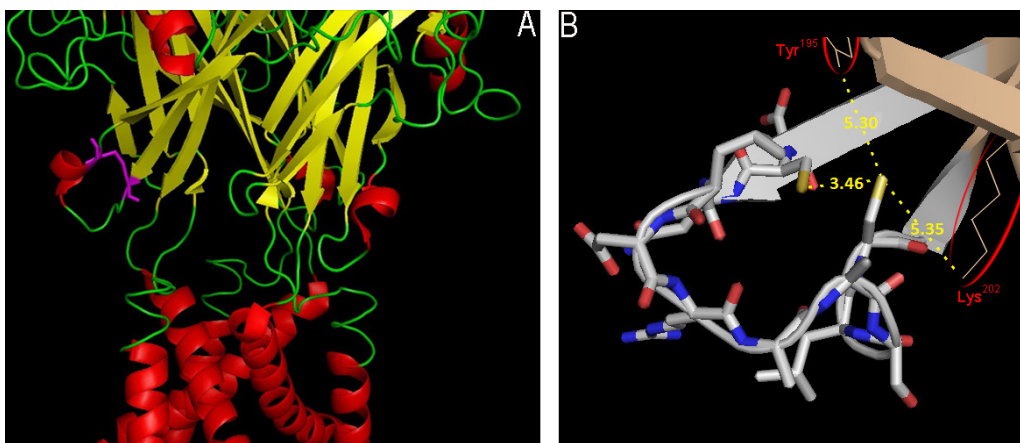
A: Průřez zfp2X₄. Oranžová šipka značí myšlené místo vstupu iontů do receptoru.

B: Vykreslení dutin v zfp2X₄ receptoru. Barva dle velikosti volného prostoru: červeně poloměr méně než 1,15 Å, zeleně průměr 1,15-2,30 Å, fialově průměr více než 2,30 Å.

Ionty dle názoru tvůrců krystalu mohou vstoupit do receptoru dutinou, která se vytvoří podél osy uvnitř ektodomény nebo také dolním vestibulem [1]. Druhá myšlenka je značně zavádějící. Pokud by ionty vstupovaly tímto vestibulem,

proudovou odpověď by mohla vyvolat i samotná aplikace IVM, který se z části zanořuje do cytoplazmatické membrány z mimobuněčné strany a interaguje s transmembránovými doménami [9, 56]. Naopak acidobazický obraz povrchu receptoru (viz obrázek 2B) a přímá pozorování konformačních změn po podání ATP pomocí mikroskopie atomárních sil (viz obrázek 4) ukazují na prostup iontů skrze celou strukturu receptoru. Receptor tak může lépe regulovat poloměr, nepřímo i specifitu, a množství procházejících iontů.

Aby ionty mohly proniknout do buňky, musí být vytvořen v receptoru pór – iontový kanál. Základy póru tvoří dolní vestibul, který se nachází těsně nad transmembránovými doménami (viz obrázek 15). Při aktivaci, kdy se ohýbá „hlava“ receptoru, je uvolněno sevření nad horním vestibulem a mezi horním a středním vestibulem. Dalším převodem signálu se pak otevírá brána a ionty vstupují do iontového kanálu. Předpokládá se, že IVM se vmezeřuje se mezi narovnané TM α -helixy kanálu v otevřeném stavu a brání jejich zpětnému zkřížení, čímž částečně uvolňuje bránu, ale sám iontový kanál neotevírá. Těsně nad dolním vestibulem, v oblasti potenciálně důležité pro převod signálu receptorem, se nachází SS₅ (viz obrázek 16A).



Obrázek 16: Pátý cysteinový můstek.

- A:** Umístění SS₅ v molekule receptoru. Zbarvení dle struktury: červeně α -helixy, žlutě β -listy, zeleně nepravidelné smyčky. Fialově cysteinový můstek.
- B:** Situace při rozpojení SS₅ v rP2X₄ receptoru. Vytvořeno formou virtuálních mutací v původní struktuře zfP2X₄. Původní struktury béžově, mutované struktury barevné dle prvku: uhlík šedě, kyslík červeně, dusík modře, síra žlutě. Od C²⁷⁰ měřeny vzdálenosti k nejbližším nabitým (Lys²⁰²) a polárním (Tyr¹⁹⁵) skupinám. Vzdálenosti uvedeny v Å. Vytvořeno v programu PyMol.

Záměna cysteinů tvořících tento cysteinový můstek se na odpovědích receptoru odrazila různou měrou. Mutace C261A nejevila žádné známky poškození, měla citlivost i maximální proudovou odpověď blízkou divokému typu. Naopak mutace C270A měla velmi nízké odpovědi a její citlivost nemohla být vyhodnocena. Při výzkumech ostatních P2X receptorů produkovaly oba mutované cysteiny velmi nízké odpovědi, ale měly citlivosti blízkou divokému typu [66-68]. IVM zásadně napravil funkci mutace C270A. Její maximální proudové odpovědi vzrostly sedminásobně a dostaly se na úroveň blízkou divokému typu, vyhodnocená citlivost byla jen dvakrát nižší než u divokého typu. Vzhledem k mechanismu účinku IVM na funkci P2X₄ receptoru, kdy napomáhá otevírání brány a stabilizuje kanál v otevřeném stavu, lze říci, že pátý cysteinový můstek má zásadní roli v procesech vedoucích k otevření receptorového póru. Jsou zde také další vodítka, například anomálie v odpovědích mutace C261A.

Cys²⁶¹-Cys²⁷⁰ pravděpodobně nemá přímo vliv na otevření kanálu, ale je důležitý v převodu signálu receptorem. Při záměně cysteinu na pozici 261 za alanin může být uvolněný Cys²⁷⁰ vypárován okolními nabitými či polárními AMK jako jsou tyrosin či lysin (viz obrázek 16B), takže struktura proteinu zůstane zachována i v nepřítomnosti SS₅. Cys²⁷⁰ ve svém okolí na dosah žádné takové AMK nemá.

6. ZÁVĚR

Purinergní P2X receptory aktivované extracelulárním ATP mají ve své extracelulární smyčce deset cysteinů, které tvoří disulfidické můstky. Ve své diplomové práci jsem se zabývala úlohou můstků i jednotlivých cysteinů ve tvorbě a transportu P2X₄ receptoru, jeho citlivosti k ATP a mechanismu otevírání iontového kanálu.

Bylo vytvořeno všech deset mutací postupně nahrazujících každý z cysteinů v ektodoménové smyčce P2X₄ receptoru za alanin. Konfokální mikroskopie prokázala, že cysteiny ani cysteinové můstky jimi tvořené nejsou pravděpodobně příliš důležité pro správné složení receptorového proteinu, zkompletování podjednotek ani transport receptoru do cytoplazmatické membrány. Při elektrofyziologickém měření se pět z deseti mutantů (C129A, C149A, C217A, C227A a C270A) jevílo jako nefunkční. Využitím IVM jako pozitivního allosterického modulátoru, jsem zjistila, že většina uvedených mutantů má pouze sníženou funkčnost. Z naměřených hodnot jsem sestavila křivky závislosti dávky ATP na amplitudě proudové odpovědi receptoru. Na základě získaných dat jsem vyhodnotila roli jednotlivých cysteinů a jimi tvořených můstků ve funkci P2X₄ receptoru následovně:

- První cysteinový můstek nemůže mít dle své pozice přímý vliv na vazbu ATP, ale nachází se v oblasti „hlavy“, která je důležitá při formování a uzavírání vazebné kapsy. Získaná data napovídají, že mutace v Cys¹¹⁶ a Cys¹⁶⁵ způsobují pravděpodobně částečnou blokaci ATP-vazebného místa.
- Druhý cysteinový můstek složený z Cys¹²⁶ a Cys¹⁴⁹ je situován v centrální oblasti „hlavy“. Zjištěné hodnoty ukazují na jeho podstatnou roli v uzavírání ATP-vazebné kapsy. Porucha uzavírání má za následek nízkou frekvenci otevírání receptoru a přednost uzavřeného stavu.
- Mutace ve třetím cysteinovém můstku receptor příliš nepoškodily. Pravděpodobně se jedná jen o doplňkový můstek oblasti „hlavy“, který ale

není schopen zastoupit roli prvního či druhého můstku při jejich poškození.

- Alaninovými mutacemi čtvrtého cysteinového můstku se ukázala jeho nepostradatelnost pro receptor. Může mít roli ve správném formování ATP-vazebné kapsy, ale je také možné, že se přímo podílí na převodu signálu z ATP vazebné kapsy k transmembránovým doménám.
- Poslední pátý cysteinový můstek se nachází těsně nad druhou transmembránovou doménou. Nemá přímo vliv na otevírání kanálu, ale je důležitý při převodu signálu receptorem, v procesech vedoucích k otevření receptorového póru.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Kawate, T., et al., *Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state*. Nature, 2009. **460**(7255): p. 592-8.
2. Khakh, B.S. and R.A. North, *P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease*. Nature, 2006. **442**(7102): p. 527-32.
3. Buehler, L.K. *Ion Channels: Structure and Function*. [article] 1999 13.3.2010 [cited 2010 16.3.]; Available from: <http://www.whatislife.com/reader/channels/channels.html>.
4. Burnstock, G., *Purinergic signalling*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S172-81.
5. Burnstock, G., *Purinergic nerves*. Pharmacol Rev, 1972. **24**(3): p. 509-81.
6. Evans, R.J., *Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors*. Eur Biophys J, 2009. **38**(3): p. 319-27.
7. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 1013-67.
8. Murrell-Lagnado, R.D. and O.S. Qureshi, *Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors (Review)*. Mol Membr Biol, 2008. **25**(4): p. 321-31.
9. Priel, A. and S.D. Silberberg, *Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels*. J Gen Physiol, 2004. **123**(3): p. 281-93.
10. Corriden, R. and P.A. Insel, *Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation*. Sci Signal, 2010. **3**(104): p. re1.
11. Gordon, J.L., *Extracellular ATP: effects, sources and fate*. Biochem J, 1986. **233**(2): p. 309-19.
12. Fitz, J.G., *Regulation of cellular ATP release*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2007. **118**: p. 199-208.
13. Macvicar, B.A. and R.J. Thompson, *Non-junction functions of pannexin-1 channels*. Trends Neurosci, 2009.
14. Burnstock, G. and A. Verkhratsky, *Evolutionary origins of the purinergic signalling system*. Acta Physiol (Oxf), 2009. **195**(4): p. 415-47.
15. Robson, S.C., J. Sevigny, and H. Zimmermann, *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 409-30.
16. Zimmermann, H., *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 299-309.
17. He, M.L., et al., *Release and extracellular metabolism of ATP by ectonucleotidase eNTPDase 1-3 in hypothalamic and pituitary cells*. Purinergic Signal, 2005. **1**(2): p. 135-44.
18. *IUPHAR Database*. [cited 2010 18.02.]; Available from: <http://www.iuphar-db.org/index.jsp>.
19. *Ligand-gated Ion Channel Database*. [cited 2010 18.02.]; Available from: <http://www.ebi.ac.uk/compneur-srv/LGICdb/LGICdb.php>.
20. Sachin, M., *The Independence of Ivermectin Action on the Purinergic P2X4 Receptor Ectodomain*. 2005, Faculty of Natural Sciences at Charles

- University in Prague, Department of Animal Physiology and Developmental Biology, Specialization in Neurobiology.
21. Fountain, S.J. and G. Burnstock, *An evolutionary history of P2X receptors*. Purinergic Signal, 2009. **5**(3): p. 269-72.
 22. Labasi, J.M., et al., *Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6436-45.
 23. Mulryan, K., et al., *Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 86-9.
 24. Ke, H.Z., et al., *Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(7): p. 1356-67.
 25. Donnelly-Roberts, D., et al., *Painful purinergic receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **324**(2): p. 409-15.
 26. Fields, R.D. and G. Burnstock, *Purinergic signalling in neuron-glia interactions*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(6): p. 423-36.
 27. Abbracchio, M.P., et al., *Purinergic signalling in the nervous system: an overview*. Trends Neurosci, 2009. **32**(1): p. 19-29.
 28. Gu, B.J., et al., *An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31287-95.
 29. Yan, Z., et al., *Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(4): p. 1078-88.
 30. Roberts, J.A. and R.J. Evans, *Cysteine substitution mutants give structural insight and identify ATP binding and activation sites at P2X receptors*. J Neurosci, 2007. **27**(15): p. 4072-82.
 31. Jarvis, M.F. and B.S. Khakh, *ATP-gated P2X cation-channels*. Neuropharmacology, 2009. **56**(1): p. 208-15.
 32. Shinozaki, Y., et al., *Direct Observation of ATP-Induced Conformational Changes in Single P2X4 Receptors*. PLoS Biol, 2009. **7**(5): p. e103.
 33. Morley, P., et al., *Purinergic receptor-mediated intracellular Ca²⁺ oscillations in chicken granulosa cells*. Endocrinology, 1994. **134**(3): p. 1269-76.
 34. Jarvis, M.F., *The neural-glia purinergic receptor ensemble in chronic pain states*. Trends Neurosci, 2010. **33**(1): p. 48-57.
 35. Surprenant, A. and R.A. North, *Signaling at purinergic P2X receptors*. Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 333-59.
 36. Zemkova, H., et al., *Characterization of purinergic P2X4 receptor channels expressed in anterior pituitary cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(3): p. E644-51.
 37. Gabel, C.A., *P2 purinergic receptor modulation of cytokine production*. Purinergic Signal, 2007. **3**(1-2): p. 27-38.
 38. Di Virgilio, F., et al., *Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system*. Trends Neurosci, 2009. **32**(2): p. 79-87.
 39. Inoue, K., *Purinergic systems in microglia*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(19): p. 3074-80.

40. Tsuda, M., H. Tozaki-Saitoh, and K. Inoue, *Pain and purinergic signaling*. Brain Res Rev, 2009.
41. Vial, C., J.A. Roberts, and R.J. Evans, *Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(9): p. 487-93.
42. Gu, B.J., et al., *Identification of the promoter region of the P2RX4 gene*. Mol Biol Rep, 2009.
43. Palomino-Doza, J., et al., *Ambulatory blood pressure is associated with polymorphic variation in P2X receptor genes*. Hypertension, 2008. **52**(5): p. 980-5.
44. NCBI. *Database of single nucleotide polymorphism*. May 25, 2006 13:38 [cited 2010; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?locusId=5025.
45. Lucae, S., et al., *P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(16): p. 2438-45.
46. Aebi, M., et al., *N-glycan structures: recognition and processing in the ER*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(2): p. 74-82.
47. Pirneskoski, A., *The significance of the domains of protein disulfide isomerase for the different functions of the protein*, in *Biocenter Oulu, Oulun yliopisto*. 2003, Faculty of Medicine, University of Oulu: Oulu.
48. Barrera, F.N., et al., *Protein self-assembly and lipid binding in the folding of the potassium channel KcsA*. Biochemistry, 2008. **47**(7): p. 2123-33.
49. Torres, G.E., T.M. Egan, and M.M. Voigt, *Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22359-65.
50. Boumechache, M., et al., *Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13446-54.
51. Boue-Grabot, E., et al., *Cross-talk and co-trafficking between rho1/GABA receptors and ATP-gated channels*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 6967-75.
52. Brown, D.A. and D.I. Yule, *Protein kinase A regulation of P2X(4) receptors: Requirement for a specific motif in the C-terminus*. Biochim Biophys Acta, 2009.
53. Stokes, L. and A. Surprenant, *Dynamic regulation of the P2X4 receptor in alveolar macrophages by phagocytosis and classical activation*. Eur J Immunol, 2009. **39**(4): p. 986-95.
54. Qureshi, O.S., et al., *Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 21): p. 3838-49.
55. Bobanovic, L.K., S.J. Royle, and R.D. Murrell-Lagnado, *P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific*. J Neurosci, 2002. **22**(12): p. 4814-24.
56. Jelinkova, I., et al., *Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin*. Pflugers Arch, 2008. **456**(5): p. 939-50.
57. Zemkova, H., et al., *Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions*. J Neurochem, 2007. **102**(4): p. 1139-50.

58. Markwardt, F., *Activation kinetics of single P2X receptors*. Purinergic Signal, 2007. **3**(4): p. 249-253.
59. Egan, T.M., D.S. Samways, and Z. Li, *Biophysics of P2X receptors*. Pflugers Arch, 2006. **452**(5): p. 501-12.
60. Bernier, L.P., et al., *Phosphoinositides regulate P2X4 ATP-gated channels through direct interactions*. J Neurosci, 2008. **28**(48): p. 12938-45.
61. Fountain, S.J. and R.A. North, *A C-terminal lysine that controls human P2X4 receptor desensitization*. J Biol Chem, 2006. **281**(22): p. 15044-9.
62. Sokolova, E., et al., *Experimental and modeling studies of desensitization of P2X3 receptors*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(1): p. 373-82.
63. Koshimizu, T., M. Koshimizu, and S.S. Stojilkovic, *Contributions of the C-terminal domain to the control of P2X receptor desensitization*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37651-7.
64. Khakh, B.S., et al., *Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels*. J Neurosci, 1999. **19**(17): p. 7289-99.
65. Colquhoun, D., *Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors*. Br J Pharmacol, 1998. **125**(5): p. 924-47.
66. Ennion, S.J. and R.J. Evans, *Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface*. Mol Pharmacol, 2002. **61**(2): p. 303-11.
67. Clyne, J.D., L.F. Wang, and R.I. Hume, *Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor*. J Neurosci, 2002. **22**(10): p. 3873-80.
68. Yi, C.L., et al., *Conserved extracellular cysteines differentially regulate the inhibitory effect of ethanol in rat P2X4 receptors*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **381**(1): p. 102-6.
69. Fabbretti, E., et al., *Identification of negative residues in the P2X3 ATP receptor ectodomain as structural determinants for desensitization and the Ca²⁺-sensing modulatory sites*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53109-15.
70. Roberts, J.A., et al., *Cysteine substitution mutagenesis and the effects of methanethiosulfonate reagents at P2X2 and P2X4 receptors support a core common mode of ATP action at P2X receptors*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20126-36.