

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

MEZIBUNĚČNÁ A VNITROBUNĚČNÁ  
ÚLOHA ADENOSIN-5'-TRIFOSFÁTU

Bakalářská práce studijního oboru  
Klinická a toxikologická analýza

P r a h a 2 0 0 8

Vendula Tvrdoňová

**UNIVERZITA KARLOVA v Praze**  
Přirodovědecká fakulta  
Oborová knihovna chemie  
Albertov 6, 128 43 Praha 2  
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208  
UK 22

*pr.č. 81b/08 stud  
(biochemie ?)*

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>6</b>
<b>2. ATP .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Historie .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. ATP uvnitř buňky.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Cesta ATP do extracelulárního prostoru .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Proteiny reagující na extracelulární ATP .....</b>	<b>10</b>
2.4.1. Degradace ATP v extracelulárním prostoru .....	11
2.4.2. Receptory pro extracelulární nukleotidy .....	14
<b>3. P2X RECEPTORY.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Molekulární fyziologie P2X receptorů.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Dilatace póru iontového kanálu .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Charakteristiky jednotlivých podjednotek P2X receptorů .....</b>	<b>18</b>
3.3.1. P2X <sub>1</sub> receptor.....	18
3.3.2. P2X <sub>2</sub> receptor.....	19
3.3.3. P2X <sub>3</sub> receptor.....	20
3.3.4. P2X <sub>4</sub> receptor.....	21
3.3.5. P2X <sub>5</sub> receptor.....	21
3.3.6. P2X <sub>6</sub> receptor.....	22
3.3.7. P2X <sub>7</sub> receptor.....	23
<b>4. VAZEBNÉ MÍSTO P2X RECEPTORŮ PRO ATP.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Obecné principy vazby ATP v proteinu .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2. Vytipované aminokyseliny ATP vazebného místa P2X proteinu.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3. Důležitá místa ve struktuře agonisty .....</b>	<b>26</b>
4.3.1. Adeninová struktura .....	26
4.3.2. Fosfátový řetězec .....	27
4.3.3. Role ribosového kruhu .....	29
<b>4.4. Porovnání s motivy v enzimech .....</b>	<b>29</b>
4.4.1. Walker A.....	30
4.4.2. Vazba $\alpha$ -fosfátu .....	30
4.4.3. Walker B.....	32
4.4.4. A-loop, role aromatických AMK.....	32
<b>4.5. Počet a umístění vazebných míst na P2X receptoru.....</b>	<b>33</b>
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>34</b>
<b>6. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>35</b>

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou 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 30.05.2008

*Trudnová Květa*  
.....  
podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc., který zprostředkoval kontakt s mou školitelkou. Své školitelce RNDr. Haně Zemkové, CSc. děkuji za její ochotu, trpělivost a především pomoc při orientaci v problematice.

## ANOTACE

ATP je nepostradatelná molekula uvnitř všech buněk, kde plní funkci univerzálního zdroje energie. Méně již je známo, že ATP je také mimobuněčná signalizační molekula, která působí na purinergní receptory na povrchu buněk. Purinergní signalizace je klíčový mechanismus ve vnímání bolesti, při poranění mozku, v zánětlivých a mnoha jiných fyziologických procesech. Cílem práce je popsat typy purinergních P2X receptorů, jejich funkci, agonisty, antagonisty a shrnout nejnovější poznatky o molekulární struktuře vazebného místa pro ATP .

## POUŽITÉ ZKRATKY

A-438079.0	3-{{5-(2,3-dichlorofenyl)-1H-tetrazol-1-yl}methyl}pyridin
A-740003.0	N-(1-{{(E)-(kyanoimino)(5,8-dihydroquinolin-5-ylamino)methyl}amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyfenyl)acetamid
$\alpha\beta$ meATP	$\alpha\beta$ -methylenadenosin-5'-trifosfát
$\beta\gamma$ meATP	$\beta\gamma$ -methylenadenosin-5'-trifosfát
2-meSATP	2-methylthioadenosin-5'-trifosfát
ADP	adenosin-5'-difosfát
AMP	adenosin-5'-monofosfát
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosin-5'-trifosfát
ATP $\gamma$ S	adenosine 5'-O-(3-thiotrifosfát)
BzATP	3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5'-trifosfát
CDP	cytidin-5'-difosfát
CTP	cytidin-5'-trifosfát
deoxyATP	3'-deoxyadenosin-5'-trifosfát
E-NPPáza	ekto-nukleotidpyrofosfatáza
E-NTPDáza	ekto-nukleotidtrifosfát difosfohydroláza
GABA	kyselina g-aminomáselná
GDP	guanidin-5'-difosfát
Gln	glutamin
GTP	guanidin-5'-trifosfát
IDP	inositol-5'-difosfát
KN-62	1-[N,O-bis-(5-isoquinolinsulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-fenylpiperazin
Lys	lysin

MRS2219	1,5-dihydro-3-hydroxy-8-methyl[1,3,2]dioxafosfepino[5,6-c]pyridin-9-ol-3-oxid
MRS2220	cyklický pyridoxin-a-4,5-monofosfát-6-azo-fenyl-2',5'-disulfonát
NBD	nukleotid vázající doména
NDP	nukleosid-5'-difosfát
NF023	8,8'-(karbonylbis(imino-3,1-fenylen))bis-(1,3,5-naftalentrifosfonová kyselina)
NF279	8,8'-(karbonylbis(imino-4,1-fenylenkarbonylimino-4,1-fenylencarbonylimino)) bis-(1,3,5-naftalentrifosfonová kyselina)
NTP	nukleosid-5'-trifosfát
Phe	fenylalanin
P <sub>i</sub>	monofosfát - anorganický
PPADS	pyridoxal fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonová kyselina
PP <sub>i</sub>	difosfát/pyrofosfát - anorganický
PPNDS	pyridoxal-5'-fosfát-6-(2'-nafthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonát) tetrasodný
TM	transmembránová doména
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-trinitro-cyklohexadienylidin)adenosin-5'-trifosfát
Trp	tryptofan
UDP	uridin-5'-difosfát
UTP	uridin-5'-trifosfát
Val	valin

## 1. ÚVOD

Adenosin-5'-trifosfát (ATP) je multifunkční molekula, která má v buňce zásadní roli. Nedávno se ukázalo, že důležitý význam má i v procesech mimo buňku. V buňce je ATP hlavním energetickým oběživem a je také jedním z pěti nukleotidů potřebných pro syntézu klíčových vnitrobuněčných organických makromolekul, jako jsou nukleové kyseliny. Je základním stavebním kamenem ribonukleové kyseliny, po přeměně na deoxyATP se stává základním kamenem deoxyribonukleové kyseliny. Ve vnitrobuněčných signalizačních drahách je ATP používán jako zdroj fosfátu pro protein kinázové reakce a tím se podílí na regulacích mnoha biochemických procesů. ATP je zdrojem energie pro iontové pumpy, které slouží k udržení elektrického membránového potenciálu buňky [1].

Mimo buňku má ATP roli signalizační molekuly: je uvolňován z jedné buňky a váže se na specifická místa membránových purinergních receptorů (P1 a P2 receptory) na buňce druhé. Signalizační úloha extracelulárního ATP je velkou měrou založena na efektu zvýšení intracelulárního vápníku, ke kterému dochází vstupem extracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  (aktivací ionotropních P2X receptorů) nebo uvolňováním z intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  zásob (aktivací metabotropních P2Y receptorů) [2].

Základní rozdíl mezi proteiny reagujícími s ATP je způsob, jakým jej využívají. Enzymy či membránové přenašeče, které získávají z ATP energii, jej musí hydrolyzovat [1]. Receptory, pro něž je ATP signalizační molekulou, jej neštěpí. Extracelulární ATP hraje roli v nervovém, kardiovaskulárním, respiračním, imunitním, urogenitálním, nervosvalovém a gastrointestinálním systému a také ve funkci specializovaných smyslů. Bylo prokázáno, že je důležité ve vnímání bolesti, při buněčné apoptóze a ve vývoji organismu [2-4]. Purinergní receptory jsou v poslední době také cílem farmak proti různým nemocem.

## 2. ATP

### 2.1. Historie

ATP byl objeven v roce 1929 Karlem Lohmannem z Meyerhofovy pracovní skupiny, který jej izoloval z masového výtažku. Současně byl stejný objev učiněn i týmem Cyruse Hartwella Fiska a Yellagapada SubbaRowa [5]. O deset let později Fritz Lipmann objasnil i úlohu ATP v buněčném metabolismu a postuloval ATP do funkce univerzálního přenašeče energie [6]. Přesný mechanismus syntézy ATP v organismu byl poměrně dlouho záhadou, přestože výzkumy týkající se této problematiky probíhaly velmi intenzivně. Již roku 1931

dostal Otto Warburg Nobelovu cenu za výzkum dýchacího řetězce. V rámci citrátového cyklu popsal syntézu ATP v roce 1937 sir Hans Adolf Krebs [7]. Roku 1940 byla upřesněna i glykolýza. Dvacet let poté izoloval Efraim Racker ATP-syntázu z dýchacího řetězce. Již od padesátých let se syntéze ATP věnoval doktor Paul Boyer a vytvořil teorii, která byla roku 1994 definitivně potvrzena Johnem Walkerem [8].

V roce 1947 byla molekula ATP poprvé uměle nasyntetizována, tým v Manchesteru vedl profesor Alexandr Robertus Todd [9]. V padesátých letech 20. století se studovaly především enzymy využívající ATP. Důležitým objevem byla  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza, která funguje jako membránová sodíko-draslíková pumpa. Spojitost mezi transportem iontů a potřebou ATP objasnil v roce 1957 dánský vědec J.C. Skou zjištěním, že nízké koncentrace srdečních glykosidů (ouabain, digoxin a j.) inhibují transport  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  a současně i membránovou ATPázu. Ve stejné době se rolí ATP začal zabývat také Geoffrey Burnstock. Jako první začal mluvit o fyziologickém významu extracelulárního ATP, což bylo do té doby nemyslitelné. V roce 1972 přišel s pojmem „purinergní receptory“, v prvních letech 21. století založil časopis „Purinergic signalling“ a stále se tomuto tématu věnuje [2, 10]. První purinergní receptor,  $\text{P2X}_4$  receptor, byl naklonován v roce 1994 v Anglii, v laboratoři Alana Northa.

## 2.2. ATP uvnitř buňky

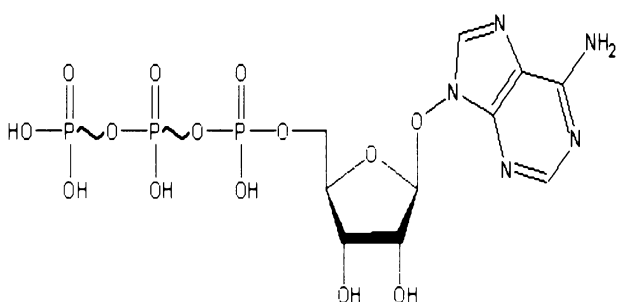
V buňce jsou neustále vytvářeny na membránách mitochondrií rozdíly v nábojích/potenciálech. Vznikají při zpracování živin, hlavně cukrů a tuků, případně i bílkovin. Potenciálové rozdíly se srovnávají při přenosu náboje (protonu/elektronu) přes membránu, čímž buňka získává energii. Tato energie je ukládána do makroergických vazeb v různých sloučeninách, nejčastěji do ATP (Obr. 1). ATP je pouze nejobvyklejší sloučeninou s makroergickými vazbami, nikoli však jedinou. Významnou roli v uchování či předávání energie hrají také acetyl-CoA, fosfoenolpyruvát a další látky. I ostatní nukleosidy (uridin, guanin a cytidin) vytvářejí s fosfáty energeticky bohaté trifosfátové molekuly: uridintrifosfát (UTP), guanosintrifosfát (GTP) a cytidintrifosfát (CTP). Ty jsou však v buňce pro přenos a uchování energie méně důležité, vyskytují se méně a v náročném buněčném metabolismu nemohou ATP zastoupit. Ukládání energie do makroergických sloučenin se neděje při jakémkoli zisku energie. V průběhu zpracování živin se energie postupně ukládá především do koenzymů, které ji odevzdávají v dýchacím cyklu, čímž se zároveň i regenerují.

V buňce je ATP syntetizován na několika místech: (i) v cytoplazmě při glykolýze vzniká velmi malé množství, (ii) v mitochondriích při Krebsově cyklu a následně v dýchacím



řetězci vzniká 98% celkového ATP a (iii) u rostlin ATP vzniká v chloroplastech při fotosyntéze.

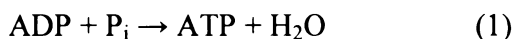
ATP je relativně nestabilní sloučenina. Fosfor netvoří příliš ochotně dvojné vazby a s kyslíkem se váže semipolárně. Navíc na kyslíkových atomech dochází ke kumulaci negativního náboje. Proto je nutné k zachování soudržnosti molekuly více energie, čehož se v organismu využívá k jejímu uložení. Rozštěpením ATP vznikají stabilnější látky a velké množství energie se uvolní.



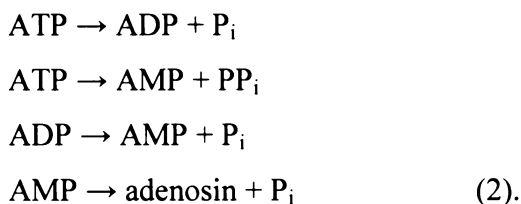
**Obrázek 1: molekula ATP**

vlevo 2D struktura: modře – fosfátové skupiny; zeleně – ribosa; černě – adenosin; červeně – makroergické vazby  
vpravo 3D struktura: oranžově – fosfor; červeně – kyslík; modře – dusík; šedě – uhlík; bíle - vodík

ATP vzniká fosforylací ADP připojením anorganického fosfátu ( $P_i$ ) (1). Reakce může probíhat několika způsoby. V organismu je nejvíce využívána oxidativní fosforylace pomocí enzymu ATP-synthasy. Neoxidativní formy tvorby ATP jsou energeticky méně výhodné.



Role ATP uvnitř buněk je již velmi dobře prozkoumána. ATP je zdrojem energie pro většinu buněčných procesů, stavebním kamenem, nositelem fosfátové skupiny pro aktivaci nejrůznějších látek a funguje jako regulátor nejrůznějších procesů. Jsou využívány i produkty rozkladu ATP hydrolázami: adenosin-5'-difosfát (ADP), adenosin-5'-monofosfát (AMP), adenosin i odštěpené anorganické fosfáty (monofosfát  $P_i$  a pyrofosfát/difosfát  $PP_i$ ) (2).

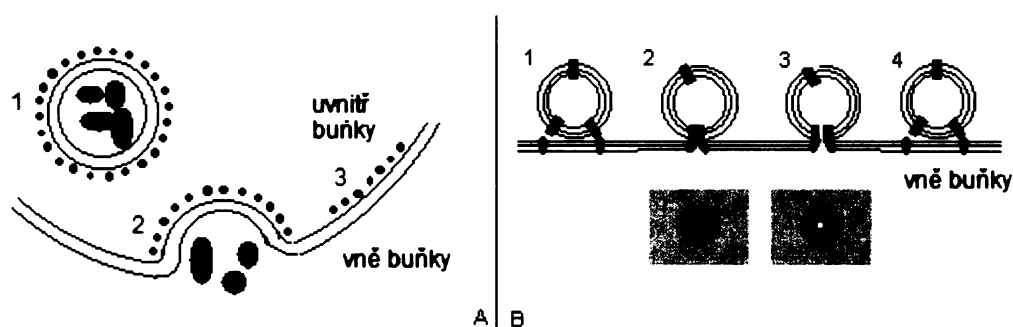


ADP a fosfáty se používají především ke zpětné syntéze ATP. AMP, respektive jeho cyklická forma (cAMP), funguje v buňce jako druhý posel signalizační kaskády, kde předává informace z povrchu do jiných míst v buňce. Role ATP mimo buňky již tak dobře prozkoumána není.

### 2.3. Cesta ATP do extracelulárního prostoru

Jak se ATP dostává ze zdravých buněk do mezibuněčného prostoru, nebylo ještě dostatečně objasněno. Nebyly objeveny žádné kanály nebo přenašeče, které by tuto molekulu transportovaly z buňky ven. Jednoznačným zdrojem ATP jsou poškozené buňky, jejichž obsah se volně vylévá do mezibuněčného prostoru [11, 12]. Nicméně to nemůže být jediný zdroj.

ATP je v buňkách uložen v zásobních granulích, různých váčcích nebo se nachází volně v cytoplasmě. Zásobní granula i váčky mohou být přisunuty k membráně a jejich obsah může být uvolněn z buňky do extracelulárního prostoru dvěma způsoby: exocytózou [11] nebo mechanismem „kiss and run“.



**Obrázek 2: Mechanismy uvolňování ATP ze zásobních váčků a granul ven z buňky**

**A.** Exocytóza. Váček s obsahem určeným k vyloučení z buňky (1) se přiblíží k cytoplazmatické membráně a po splynutí membrány váčku s cytoplazmatickou membránou dojde k uvolnění jeho obsahu (2). Následuje recyklace membrány váčku (3). **B.** Mechanismus „kiss and run“. Váček s obsahem určeným k vyloučení z buňky se přiblíží k cytoplazmatické membráně (1), následuje nasednutí váčku na membránu a vytvoření póru (2), po otevření póru dojde k uvolnění látky (3) a odloučení váčku od membrány (4). Podle [13].

Při exocytóze (Obr. 2A) dochází k dočasnému splynutí membrány váčku s plazmatickou membránou a obsah váčku se vylíje mimo buňku. Následuje endocytóza, při které se membrána váčku vchlípí, váček se znovu vytvoří a putuje zpět do cytoplasmy, kde je znovu naplněn. Dojde-li k uvolnění mechanismem „kiss and run“ (Obr. 2B), vytvoří se dočasně pór přes membránu váčku i plazmatickou membránu, kterým je obsah váčku

transportován do mimobuněčného prostoru, a celý váček se potom navrací do cytoplazmy k dalšímu naplnění. Exocytóza je ovládána pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, které jsou nezbytné pro splynutí membrány váčku a plazmatické membrány [11].

Exocytózou se ATP vylévá ze synaptických váčků neuronů spolu s neurotransmitery, jakými jsou například glutamát, kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) nebo acetylcholin. ATP se uvolňuje do extracelulárního prostoru také z neuroendokrinních buněk (např. z buněk hypofýzy), z krevních destiček při aktivaci kaskády vedoucí ke srážení krve, z buněk imunitního systému a z epiteliálních buněk.

ATP je ale uvolňován i z nesekretujících buněk [11]. Koncentrace cytoplazmatického ATP v buňkách je běžně více než 5mM, přičemž značná část může být uvolněna mimo buňku, aniž by byla ohrožena její životaschopnost [12]. Pokusy jasně ukázaly, že k uvolňování cytoplazmatického ATP z nepoškozené buňky nedochází narušením membrány, ale jedná se o aktivní proces. Tento mechanismus ovládají i některé sekretující buňky. Např. lidské astrocyty, mohou uvolňovat ATP ze zásobních granúl a váčků i z cytoplazmy. Přesný mechanismus uvolňování cytoplazmatického ATP zatím není znám [11].

ATP může v extracelulárním prostoru také vznikat, například vnitřní přeměnou jiných nukleotidů. Vytváří se působením enzymů přítomných jak v séru, tak na cytoplazmatické membráně buněk. Jako příklad lze uvést ekto-nukleosid difosfokinázu ( $\text{ADP} + \text{UTP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{UDP}$ ) či ekto-ATP:AMPfosfotransferázu ( $2\text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ ). Takto vzniklé množství ATP ale není příliš velké, podílí se na aktivaci receptorů jen velmi malou měrou [14].

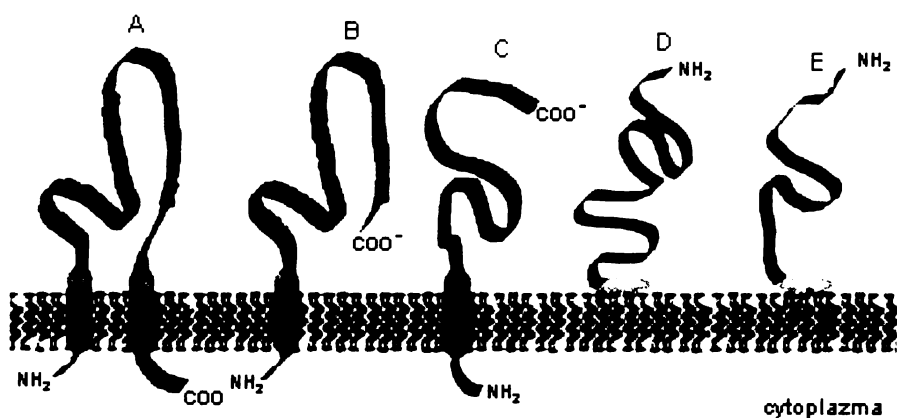
#### **2.4. Proteiny reagující na extracelulární ATP**

V mezibuněčném prostoru se nalézá ATP a jiné purinové nukleotidy v koncentraci mnohem menší, než je koncentrace intracelulární (v rozmezí 1-200  $\mu\text{M}$ ). Na povrchu buněk jsou totiž přítomny enzymy (Obr. 3), které se starají o metabolismus ATP. Poločas rozkladu extracelulárního ATP se v různých tkáních liší. V krvi se jedná o 10-30 minut, v srdci či v plicích probíhá degradace mnohem rychleji, polovina přítomného množství ATP je degradována za pouhých 0,2 s [12]. Extracelulární koncentrace ATP a jiných purinových nukleotidů je však postačující k tomu, aby mohly aktivovat membránové proteiny na povrchu buněk, purinoreceptory (Obr. 4), které slouží k mezibuněčné signalizaci.

### 2.4.1. Degradace ATP v extracelulárním prostoru

Dřívější modely předpokládaly v mezibuněčném prostoru výskyt 3 enzymů podílejících se na degradaci ATP. Každý z nich měl být úzce specifický. ATP na  $\text{ADP} + \text{P}_i$  degradovala dle původních představ ekto-ATPáza. Po ní převzala iniciativu ekto-ADPáza, která rozštěpila ADP na  $\text{AMP} + \text{P}_i$ . Celý proces degradace pak zakončovala 5'-nukleotidáza štěpící AMP na adenosin a  $\text{P}_i$ , která však neměla vliv na katabolismus ATP. Zároveň na metabolismus ATP neměly mít vliv nesespecifické fosfatázy [12].

Další výzkumy ale ukázaly, že tato představa je poměrně nepřesná. V extracelulárním prostoru se nalézají 4 velké skupiny ektonukleotidáz: E-NTPDázy, E-NPPázy, alkalické fosfatázy a ekto-5'-nukleotidáza (Obr. 3). Většinou jsou vázány v cytoplazmatické membráně buněk, mohou se ale i odštěpit a vytvořit tak své rozpustné isoformy – exonukleotidázy. Pro svou maximální aktivitu vyžadují přítomnost dvoumocného kationu, nejlépe  $\text{Ca}^{2+}$  či  $\text{Mg}^{2+}$ , případně alkalické pH [15].



**Obrázek 3: Ektonukleotidázy – schématické znázornění molekulární struktury**

A. NTPDázy 1,2,3,4,7,8; B. NTPDázy 5,6; C. NPPázy 1,2,3; D. Alkalické fosfatázy; E. ekto-5'-nukleotidáza; Žlutě vyznačen je glykosylfosfatidylinositolový krček, kterým jsou bílkoviny uchyceny v membráně (D a E). Převzato z [15], upraveno.

#### 2.4.1.1. E-NTPDázy

Ekto-nukleotidtrifosfát difosfohydrolázy (E-NTPDázy), označované také jako „ekto-apyrázy“, „NTPázy“ nebo „E-ATPázy“, hydrolyzují nukleosid-5'-trifosfáty a nukleosid-5'-difosfáty s různou preferencí jednotlivých nukleotidů. Tyto enzymy mají nejen obratlovci, ale i bezobratlí, rostliny, kvasinky a protozoa. Všechny E-NTPDázy obsahují 5 konzervativních domén, které mají pravděpodobně největší vztah ke katalytickým místům. Vyskytuje se

u nich tzv. „action-hsp 70-hexokinase  $\beta$ - a  $\gamma$ -phosphate“ vazebný motiv: A[IL]DLGG[TS] [15, 16].

Ve skupině bylo dosud identifikováno 8 členů, které lze rozdělit do dvou skupin podle počtu transmembránových domén. Pro svou funkci vyžadují milimolární koncentraci dvoumocných iontů, hlavně  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{Mg}^{2+}$ . V jejich nepřítomnosti ektonukleotidázy nepracují. Ektonukleotidázy této skupiny mají odlišnou afinitu k různým nukleotidům (viz tabulka 1) [16, 17].

ektonukleotidáza	T M	umístění v buňce	preferenze nukleotidů	poznámka
<b>E-NTPDáza 1</b>	2	povrch	NTP $\approx$ NDP	
<b>E-NTPDáza 3</b>	2	povrch	NTP > NDP	přednostně aktivována pomocí iontů $\text{Ca}^{2+}$ nebo $\text{Mg}^{2+}$
<b>E-NTPDáza 5</b>	1	primárně na ER, může sekretovat na povrch	UDP > GDP > CDP	
<b>E-NTPDáza 7</b>	2	vnitřní membránové struktury	NTP mimo ATP	

**Tabulka 1: Přehled E-NTPDáz [16, 17]**

TM: počet transmembránových domén; NTP: nukleotid-5'-trifosfát; NDP: nukleotid-5'-difosfát;  
GDP: guanidin-5'-difosfát; CDP: cytidin-5'-difosfát; IDP: inosin-5'-difosfát.

#### 2.4.1.2.E-NPPázy

Ekto-nukleotidpyrofosfatázy (E-NPPázy), nebo také „ekto-nukleotidifosfohydrolázy“ nemají žádný fylogenetický vztah k E-NTPDázám. Jednotlivé lidské enzymy této skupiny mají od 110 do 125 kDa. Jedná se o typ II transmembránových proteinů s jednou transmembránovou doménou a s N-koncem umístěným v cytoplazmě. Všechny směřují svými oblastmi s katalytickými místy do extracelulárního prostoru. E-NPPázy 1 a 2 jsou rozpustné, odštěpují se těsně nad transmembránovou doménou blízko na cystein bohatého úseku peptidu. Rozpustné NPPázy se vyskytují v synoviální tekutině a v séru [15, 17].

E-NPPázy mají překvapivou substrátovou specifitu. Plní funkci jak alkalických fosfodiesteráz, tak i nukleotidpyrofosfatáz: hydrolyzují cAMP na AMP, ATP na AMP+PP<sub>i</sub>, ADP na AMP+P<sub>i</sub> nebo NAD<sup>+</sup> na AMP a nikotinamidmononukleotid. Jako substráty jim slouží puriny i pyrimidiny, mohou hydrolyzovat i fosfodiesterovou vazbu v nukleových kyselinách a pyrofosfátovou vazbu v nukleotidových cukrech. Jejich katalytická aktivita závisí na přítomnosti dvouvalných iontů, pH optimum se nachází v alkalické oblasti [15, 17].

Obsahují ve svém řetězci motiv EF hand (DxDxDGxxDxxE), což je pravděpodobně oblast vazby Ca<sup>2+</sup>. NPP2 a NPP3 jej mají mírně pozměněný. Posledně zmíněné ektonukleotidázy obsahují navíc ještě RGD-tripeptidový motiv, který se opět podílí na korekci funkce pomocí iontů vápníku. E-NPP1 hraje zásadní roli v mechanismu kontroly kalcifikace a dekalifikace kostí pomocí produkce PP<sub>i</sub>. E-NPP3 se vyskytuje hlavně na bazofilních leukocytech [15, 17].

#### 2.4.1.3.Alkalické fosfatázy

Jedná se o nespecifické ekto-fosfomonoesterázy, které mají širokou substrátovou specifitu: uvolňují anorganický fosfát z nejrůznějších organických sloučenin obsahujících nukleotidy. Hydrolyzují i PP<sub>i</sub>. Jeden enzym tak může štěpit celý nukleotidový řetězec. Alkalické fosfatázy jsou buď volně v séru, nebo kotveny v cytoplazmatické membráně pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy. Dosud jim v problematice signalizace extracelulárním ATP byla věnována jen malá pozornost [15, 17].

#### 2.4.1.4.Ekto-5'-nukleotidáza a ostatní nukleotidy metabolizující enzymy

Ekto-5'-nukleotidáza je známá jako povrchový protein lymfocytů, je markerem jejich zrání. Katalyzuje poslední krok extracelulární degradace nukleotidů. Hydrolyzuje

nukleotid-5'-monofosfáty na nukleosid a  $P_i$ . Je hlavním enzymem zodpovědným za vznik extracelárního adenosinu z adenosinových nukleotidů. Většinou se vyskytuje jako dimer, monomer mívá 62-75 kDa. Patří do skupiny metaloenzymů; ve své struktuře má navázán ion zinku. Může být ukotvena v cytoplazmatické membráně pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy nebo volně v séru [15].

Buněčný povrch obsahuje i katalytická místa určená pro vnitřní konverzi nukleotidů. Jedním z takových enzymů je například ekto-nukleosid difosfokináza vyskytující se v astrocytech či dýchacím epitelu. Mění UTP a ADP na UDP a ATP. Dalším příkladem může být myokináza (ekto-ATP:AMPfosfotransferáza) katalyzující přeměnu  $AMP + ATP \leftrightarrow 2ADP$ . Výsledkem takových reakcí může být postupná aktivace a inaktivace receptorů pro různé nukleotidy [15].

#### 2.4.2. Receptory pro extracelulární nukleotidy

Kromě proteinů pro degradaci nukleotidů jsou na povrchu buněk také purinergní receptory. Ty reagují jak na ATP, tak na produkty jeho degradace: ADP, AMP a adenosin. Navázání některé z těchto molekul je pro receptor signálem k aktivaci, která většinou vede ke zvýšení koncentrace intracelulárního vápníku. Bylo identifikováno několik druhů receptorů využívajících extracelulární nukleotidy k signalizaci. Jedná se o skupinu purinergních P1 a P2 receptorů.

##### 2.4.2.1.P1 receptory

Purinergní P1 receptory využívají především samotný nukleotid bez navázaných fosfátů, ale mohou být aktivovány i nukleotidy s jedním, dvěma či třemi fosfáty. P1 receptory jsou proto nazývány adenosinovými. Jedná se o receptory spojené s G-proteinem (Obr. 4A). Jsou složeny ze sedmi transmembránových domén (TM), N-konec je umístěn v extracelulárním prostoru, C-konec pak v intracelulárním [2, 18].

Aktivace adenosinových receptorů má za následek mnoho jevů zprostředkovaných nejčastěji cyklickým AMP. Nepřímo jsou jimi ovládány také iontové kanály. V současné době jsou známy čtyři podtypy adenosinových receptorů:  $A_1$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$  a  $A_3$ . Podílejí se na regulaci vasodilatace či stahů srdečního svalu, v mozku regulují uvolňování neuropřenašečů na synapsi a hrají roli například ve spánku [18]. Vazebné místo pro ligand je u adenosinových

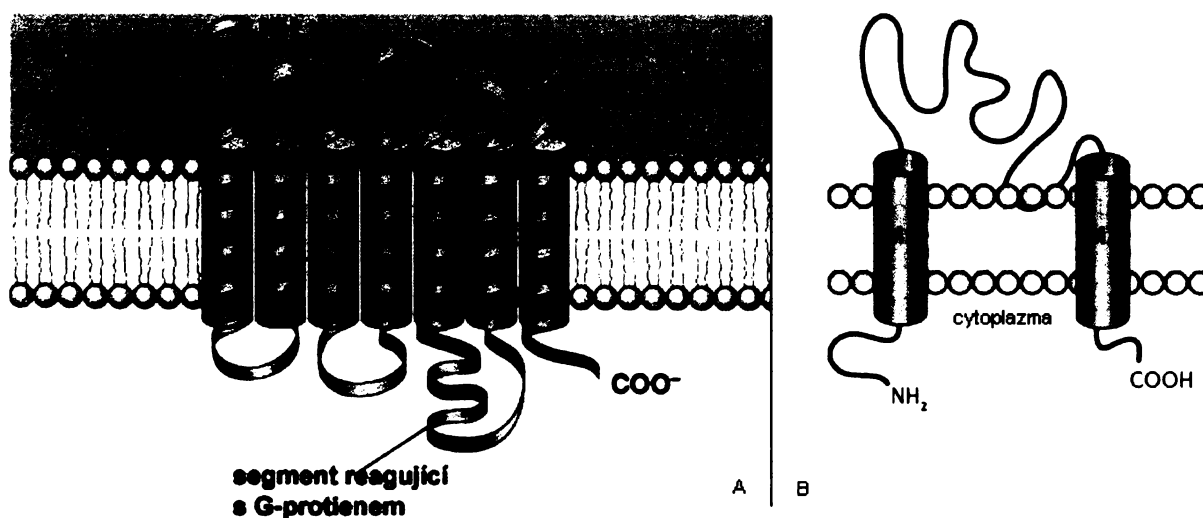
receptorů umístěno pravděpodobně alespoň částečně uvnitř transmembránových domén, zejména mezi segmenty TM1, TM3 a TM7 [19, 20].

#### 2.4.2.2.P2 receptory

Purinergní P2 receptory preferují vícefosfátové nukleotidy. Tato skupina se dále dělí na dvě velké podskupiny – P2X a P2Y – s rozdílnými požadavky na nukleotidy a velmi rozdílným mechanismem intracelulární signalizace.

Receptory P2Y jsou stejně jako P1 receptory metabotropní, spolupracují s G-proteinem (Obr. 4A). Jejich stimulace vede k uvolnění vápníku z intracelulárních zásob. Iontové kanály ovládají jen nepřímo prostřednictvím dalšího posla uvnitř buňky. Jsou také složeny ze sedmi transmembránových domén. K jejich aktivaci je využíván ATP, ADP ale také UTP a UDP, přičemž stačí jen velmi malá koncentrace látky (v řádech nM). Proto mohou reagovat i na výlev ATP ze vzdálenějších míst [21]. Pro interakci s ATP je důležitá extracelulární oblast a transmembránové domény 3, 6 a 7 [22].

V organismu se vyskytují v několika variacích, rozeznáváme 8 podtypů P2Y receptorů (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> a P2Y<sub>14</sub>), které jsou v organismu běžné a podílejí se na mnoha funkcích. Z nejdůležitějších uveďme jejich účast na procesu srážení krve, kontrakce hladkých svalů, regulace osteoklastů či regulace epiteliální sekrece [2, 3, 18].



**Obrázek 4: Purinergní receptory – schématické znázornění molekulární struktury**

A: G-proteinový receptor (P1, P2Y), extracelulární prostor je znázorněn modře, převzato z [23], upraveno;

B: Struktura P2X receptoru se dvěma transmembránovými doménami (M1 a M2), převzato z [18]



Receptory P2X jsou ionotropní, po aktivaci u nich dochází ke konformační změně a tvorbě vodivého póru, kterým procházejí ionty přes plazmatickou membránu. Po navázání agonisty reagují v řádu milisekund. Některé P2X receptorové kanály zůstávají otevřeny, dokud není ATP enzymaticky degradován. Jiné, které desensitizují, se uzavírají i v přítomnosti agonisty. Pokud by zde žádné degradační nebo desensitizační mechanismy nebyly a kanál by zůstal po navázání ATP stále otevřený, došlo by k buněčné smrti. Případně by ATP mohl být vytlačen antagonistou aplikovaném ve vyšší koncentraci než agonista [2, 3, 18].

P2X receptory jsou iontové kanály s nepříliš dobrou selektivitou pro jednomocné kationty. Propouštějí  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ , signifikantně pak také  $\text{Ca}^{2+}$ . Při aktivaci preferují ATP, ale vyžadují poněkud vyšší koncentraci než P2Y receptory (v řádech  $\mu\text{M}$ ). [21] Všechny receptory P2X se skládají ze dvou transmembránových domén, C- i N-konec je v intracelulárním prostoru, ATP se váže v extracelulární smyčce (Obr. 4B) [24]. Celkem bylo u savců identifikováno 7 podtypů, označovaných P2X<sub>1-7</sub>. P2X receptory lze najít také u rostlin a bezobratlých živočichů. Nacházejí se ve všech tkáních, hlavně na povrchu buněk nervové soustavy či imunitního systému, vyskytují se i na vnitrobuněčných membránách [2, 4].

### 3. P2X RECEPTORY

Tato práce je zaměřená na P2X receptory a ATP vazebné místo, jehož přesná struktura nebyla dosud popsána. P2X receptory představují strukturálně nový typ ligandem aktivovaného iontového kanálu. Jsou aktivovány ATP uvolněným z poškozených buněk nebo sekretovaným do extracelulárního prostoru procesem exocytosy či mechanismem „kiss and run“ (viz výše). Hrají roli v mnoha buněčných procesech, mimo jiné i ve vnímání bolesti [3]. ATP vazebné místo je proto z farmakologického hlediska zajímavé jako potenciální místo působení bolest tišících léků.

#### 3.1. Molekulární fyziologie P2X receptorů

Jak jsem se již zmínila, podjednotka P2X receptoru je složena ze dvou transmembránových domén, které mají formu  $\alpha$ -helixu, extracelulární kličky a N- a C-konce. Celý protein má délku od 379 (P2X<sub>6</sub>) až po 595 (P2X<sub>7</sub>) aminokyselin. Každá transmembránová doména čítá 21 aminokyselin. N-konec složený z 20-30 aminokyselin je podstatně kratší než C-konec, který má podle podjednotky 28-242 aminokyselin. Na N-konci

je vazebné místo pro C-kinasu (TXK/R). Změny na C-konci mají vliv na kinetiku otevírání a zavírání iontového kanálu a na jiné vlastnosti receptoru [2, 4, 18, 21, 24].

Převážnou většinu délky proteinu tvoří extracelulární klička. Její délka se pohybuje mezi 275 a 287 aminokyselinami. Na dvou až šesti místech je glykosylována. Pomocí glykosylace je regulována funkce receptoru a jeho exprese v plazmatické membráně, aspoň dvě glykosylována místa jsou potřebná k tomu, aby se receptor objevil na povrchu buňky. Extracelulární klička je na třech místech spojena sulfidovými můstky [21, 25].

Funkční receptory jsou složeny ze tří podjednotek, které mohou být stejné (homomerní receptory), ale většinou jsou různé (heteromerní receptory). Každá podjednotka je natočena druhou transmembránovou doménou do středu vodivého póru receptoru. Po navázání agonisty a změně její konformace dochází k průchodu iontů. Předpokládá se, že při otevírání iontového se TM1 a TM2 v membráně šroubovitě pohybují a po otevření mají jinou polohu než v uzavřeném stavu. Některé kanály jsou schopny propouštět nejen malé kationty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  nebo  $\text{Ca}^{2+}$ ), ale i velké organické ionty jako N-methyl-D-glutamin. Tato schopnost byla pozorována u podjednotek P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub>. Jedná se o dvě zcela odlišné fáze otevření. První fáze nastupuje za několik milisekund od aplikace agonisty. Kanál je stabilní. Při déle trvající aplikaci agonisty, řádově po stovkách milisekund, se kanál ještě více rozšíří, dojde k další malé změně konformace a destabilizaci kanálu. Změny umožní průnik velkých iontů [4, 21, 25].

### 3.2. Dilatace póru iontového kanálu

Dilatace (roztážení) póru je ojedinělá vlastnost, která se u jiných ligandem aktivovaných iontových kanálů prakticky nevyskytuje. Schopnost propouštět velké organické ionty mají jen některé P2X receptory: neprojevuje se u nich stejně, lze je seřadit podle míry propustnosti – nejvíce propouští velké organické ionty P2X<sub>7</sub>, méně P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>2</sub>, nejméně P2X<sub>1</sub> a P2X<sub>3</sub>. U receptorů P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub> se ale projevují dvě přesně oddělené fáze, u P2X<sub>2</sub> je přechod pozvolný a proto nelze přesně odlišit nástup druhé fáze otevření [4]. Vlastnosti tohoto rázu jsou kódovány na intracelulárním C-konci proteinu [21]. Srovnáme-li kód tří výše jmenovaných receptorů, můžeme definovat motiv podílející se na propouštění velkých organických iontů jako YYYx(x)KK, resp. Yx(x)KK (Obr. 10) [24]. Právě u P2X<sub>2</sub>, jehož schopnost propouštět velké org. ionty je nejmenší, chybí do plného motivu dva tyrosiny.

### 3.3. Charakteristiky jednotlivých podjednotek P2X receptorů

U obratlovců byly dosud nalezeny geny pro sedm podjednotek P2X receptorů: P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub> a P2X<sub>7</sub>. Primární struktura všech P2X receptorů je asi z 30-50% shodná. [4]<sup>1</sup> Receptory se rozlišují hlavně podle svých vlastností, jako například rychlost desenzitizace, propustnost pro vápníkové kationty či propustnost pro velké organické ionty. Další rozlišení je dáno jejich různou citlivostí k agonistům, kteří receptor aktivují, a antagonistům, kteří ho blokují.

Pro P2X receptory jsou typičtí agonisté ATP a jeho analogy:  $\alpha\beta$ -methylenadenosin-5'-trifosfát ( $\alpha\beta$ meATP),  $\beta\gamma$ -methylenadenosin-5'-trifosfát ( $\beta\gamma$ meATP), 2-methylthioadenosin-5'-trifosfát (2-meSATP), 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl adenosin-5'-trifosfát (BzATP) apod. Antagonisté s vysokou specificitou pro P2X receptory neexistují, ale většina receptorů je inhibována pyridoxal fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonovou kyselinou (PPADS) a suraminem. Významným kompetitivním blokátorem je také 2',3'-O-(2,4,6-trinitro-cyklohexadienylidin) adenosin-5'-triphosphate (TNP-ATP) [4, 21].

#### 3.3.1. P2X<sub>1</sub> receptor

Purinergní receptor typu P2X<sub>1</sub> najdeme v hladkých svalech, krevních destičkách, mozečku i míšních neuronech. Od ostatních P2X receptorů, vyjma P2X<sub>3</sub>, jej lze odlišit především podle rychlé aktivace a rychlé desenzitizace (časová konstanta <300 ms) (Obr. 5). Receptorový kanál P2X<sub>1</sub> propouští značné množství iontů vápníku, přičemž extracelulární vápník jej inhibuje jen velmi málo nebo vůbec. Těto vlastnosti se používá k odlišení P2X<sub>1</sub> a P2X<sub>2</sub> receptorů [4, 21, 25].

Specifickým agonistou pro P2X<sub>1</sub> receptor je  $\alpha\beta$ meATP, který je stejně účinný jako ATP. Z běžně používaných agonistů P2X receptorů je pro P2X<sub>1</sub> nejúčinnější 2-meSATP, účinný je také BzATP. Agonista  $\beta\gamma$ meATP má menší účinnost než  $\alpha\beta$ meATP, čehož se využívá se k odlišení P2X<sub>1</sub> a P2X<sub>3</sub> receptoru. Pro aktivaci P2X<sub>1</sub> receptoru stačí 30x nižší koncentrace této látky než jaká je potřeba pro aktivaci receptoru P2X<sub>3</sub> [4, 21, 25].

Selektivním antagonistou pro P2X<sub>1</sub> receptor je diinosin pentafosfát. Z dalších antagonistů má důležitý efekt cyklický pyridoxin- $\alpha$ -4,5-monofosfát-6-azo-fenyl-2',5'-

---

<sup>1</sup> V použitých pramenech není vždy dobře rozlišitelné, zda jsou popisovány odezvy krysích, lidských či jiných P2X receptorů. Rozdíly mezi P2X receptory z různých organismů většinou nejsou významné. Bylo-li to možné, jsou uvedeny charakteristiky pro lidské P2X receptory.

disulfonát (MRS2220), které neinhibuje P2X<sub>2</sub> ani P2X<sub>4</sub>. Větší vliv než suramin a PPADS mají na P2X<sub>1</sub> receptor jejich analogy (pyridoxal-5'-fosfát-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonát) tetrasodný (PPNDS), 8,8'-(karbonylbis(imino-4,1-fenylenkarbonylimino-4,1-fenylenkarbonylimino))bis-(1,3,5-nafthalentrisulfonová kyselina) (NF279) a 8,8'-(karbonylbis(imino-3,1-fenylen))bis-(1,3,5-nafthalentrisulfonová kyselina) (NF023)). Nejúčinnějším antagonistou P2X<sub>1</sub> receptoru je TNP-ATP. Řada účinnosti antagonistů P2X<sub>1</sub> receptoru je následující: TNP-ATP > PPNDS > NF279 > NF023 > suramin/PPADS [25].

Allosterické modulátory nemají přímý inhibiční účinek, ale ovlivňují konformaci receptoru. U P2X<sub>1</sub> receptoru se jako modulátory chovají ionty zinku, Cibacron Blue a 1,5-dihydro-3-hydroxy-8-methyl[1,3,2]dioxafosfepino[5,6-c]pyridin-9-ol-3-oxid (MRS2219). Funkci receptoru ovlivňuje i pH extracelulárního roztoku: s klesajícím pH klesá odpověď receptoru jako reakce na protonizaci bazických aminokyselin v řetězci. P2X<sub>1</sub> receptor nekompetitivně inhibují trojvalné ionty [25].

### 3.3.2. P2X<sub>2</sub> receptor

Purinergní P2X<sub>2</sub> receptor se vyskytuje v centrální nervové soustavě, najdeme jej v hypofýze na povrchu gonadotropních buněk či v hladkých svalech. Pravděpodobně hraje důležitou roli v autonomním a senzorigním systému, vysoká koncentrace P2X<sub>2</sub> receptorů je v sítnici [4, 21].

Receptory P2X<sub>2</sub> jsou částečně propustné pro Ca<sup>2+</sup>, propouští jej méně než P2X<sub>1</sub> či P2X<sub>4</sub>, ale více než P2X<sub>3</sub>. S delším časem aplikace agonisty přecházejí tyto receptory do druhé fáze otevření iontového kanálu, kdy pórem procházejí i velké organické ionty. Mechanismus této dilatace vodivého póru v současné době není znám, pravděpodobně na něm mají podíl dvouvalné ionty. P2X<sub>2</sub> receptory se vyznačují pomalou desenzitizací (Obr. 5), její časová konstanta je delší než 10 s. Jsou schopny usměrňovat proud [4, 21].

Pro P2X<sub>2</sub> receptor zatím nebyl nalezen žádný selektivní agonista. Narozdíl od P2X<sub>1</sub> a P2X<sub>3</sub> receptorů tato podjednotka reaguje na  $\alpha\beta$ meATP a  $\beta$ meATP jen pokud jsou aplikovány ve velmi vysokých koncentracích. Nejvyšší citlivost má k ATP, jen o málo menší k 2-meSATP a adenosin-5'-O-3-thiotrifosfátu (ATP $\gamma$ S), částečným agonistou je BzATP [4, 25].

Mezi antagonisty v současné době také není pro P2X<sub>2</sub> receptor k dispozici žádný selektivní. Pro zablokování receptoru je nejúčinnější Reactive blue 2. Nižší efekt vykazuje TNP-ATP či PPADS, nejméně účinný blokátor je suramin. Pomocí allosterických modulací

blokují kanál také extracelulární ionty vápníku, konkrétně několik různých dvouvalentních iontů s účinností v tomto pořadí:  $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+}$ . Mohou blokovat kanál dvěma rozdílnými způsoby: buď blokují fázi otevření nebo stabilizují kanál ve fázi uzavření. Naopak přítomnost extracelulárního  $Zn^{2+}$  a  $Cu^{2+}$  účinnost agonisty posiluje. Vyšší koncentrace  $H^+$  iontů otevření kanálu také podporuje [25].

### 3.3.3. P2X<sub>3</sub> receptor

V neuronech reagujících na bolest se vyskytují především P2X<sub>3</sub> podjednotky. Další jejich významnou doménou jsou aferentní chuťové vlákna [21]. Jinde je jejich výskyt jen velmi omezený. Tyto receptory se vyznačují rychlou aktivací a rychlou desenzitizací (časová konstanta <100 ms) (Obr. 5). Propouštějí  $K^+$ ,  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  přibližně se stejnou účinností. Na blokádu extracelulárním vápníkem jsou značně necitlivé [2, 4].

Jejich odpovědi na agonisty jsou v mnohém podobné reakcím P2X<sub>1</sub> receptorů. Specifickým agonistou pro P2X<sub>3</sub> receptor je také  $\alpha\beta$ meATP, který je plným agonistou, stejně jako ATP. Od sebe se P2X<sub>1</sub> receptor a P2X<sub>3</sub> receptor rozlišují citlivostí k  $\beta$ meATP, receptor P2X<sub>3</sub> potřebuje k aktivaci větší koncentraci této látky než P2X<sub>1</sub> (viz kapitola P2X<sub>1</sub> receptor). Nejlépe reagují P2X<sub>3</sub> receptory na aktivaci 2-meSATP, jen o málo hůře na adenosin pentafofát [2, 4, 21].

Mezi antagonisty byl pro P2X<sub>3</sub> receptor nalezen jako selektivní A-317491, který je u všech ostatních podjednotek mnohem méně účinný. P2X<sub>3</sub> receptor lze blokovat také pomocí TNP-ATP, suraminu či PPADS, ale ani jedna z těchto látek nepomůže k odlišení P2X<sub>1</sub> a P2X<sub>3</sub> podjednotek. [4] V allosterických modulacích mají u P2X<sub>3</sub> zvláštní vliv Cibacron blue a  $Ca^{2+}$ , které snižují dobu potřebnou na desenzitizaci receptoru. Kationy zinku podporují otevření kanálu, snižující se pH naopak odpověď receptoru tlumí [25].

P2X<sub>3</sub> podjednotky se vyskytují nejen jako homomery, ale také jako heteromery společně s P2X<sub>2</sub> podjednotkami. P2X<sub>2/3</sub> receptor má některé vlastnosti společné s P2X<sub>2</sub>, některé s P2X<sub>3</sub>, jiné zcela unikátní. Vyskytují se zejména v určitých sensorických neuronech, sympatických gangliových buňkách a mozkových neuronech. Vyznačují se pomalou desenzitizací (>10 s) a při delší aplikaci agonisty propouští stejně jako P2X<sub>2</sub> receptory i větší organické ionty [4].

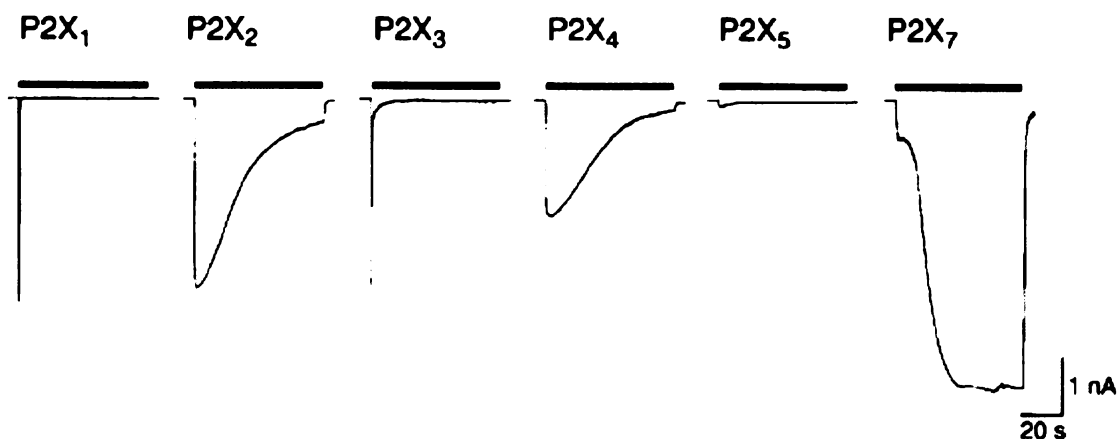
Z agonistů jsou pro P2X<sub>2/3</sub> receptor nejvýznamnější  $\alpha\beta$ metATP a adenosin pentafofát, které jsou přibližně stejně účinné. Tento heteromerní receptor je citlivý na antagonisty typické pro skupinu purinergních P2X receptorů – suramin a PPADS, stejně tak

i na TNP-ATP. K rozlišení mezi P2X<sub>2/3</sub> a P2X<sub>3</sub> se využívá působení inositol pentafosfátu, který neblokuje kanál složený pouze z P2X<sub>2</sub> podjednotek. Vyšší koncentrace H<sup>+</sup> efekt agonisty zvyšuje, zatímco extracelulární Ca<sup>2+</sup> se projevuje jako allosterický inhibitor [4].

### 3.3.4. P2X<sub>4</sub> receptor

Další purinergní receptory, které se vyskytují hlavně v centrální nervové soustavě, jsou P2X<sub>4</sub> receptory. Vyskytují se také ve varlatech a střevu. V hypofýze se podílejí na Ca<sup>2+</sup> závislé signalizaci a prolaktinové sekreci. Podobně jako P2X<sub>2</sub> receptory mají dlouhou dobu desenzitizace (časová konstanta >10 s) (Obr. 5) a časem propouštějí i velké organické ionty [2, 4, 21].

Na tradiční agonisty, jakými jsou αβmeATP, βγmeATP i BzATP, P2X<sub>4</sub> receptor reaguje velmi málo či vůbec. Nejvyšší aktivační potenciál má nepozměněný ATP, poněkud nižší pak 2-meSATP a CTP. P2X<sub>4</sub> receptor je relativně necitlivý k blokádě suraminem a PPADS [4, 21]. Pozitivní modulační vliv má Zn<sup>2+</sup>, negativní vliv zvyšující se koncentrace H<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> i Cu<sup>2+</sup>. Dalším dobrým modulátorem je Cibacron Blue. Pro P2X<sub>4</sub> receptor byl nalezen velmi specifický modulátor podpodující akci agonisty: ivermectin [25].



**Obrázek 5: Srovnání rychlosti desenzitizace homomerních P2X receptorů.**

Srovnání bylo provedeno na základě poklesu proudových odpovědí a jejich velikosti při dlouhodobé aplikaci ATP o koncentraci 30 μM (u P2X<sub>7</sub> 1 mM) po dobu 60 s. P2X<sub>1</sub> a P2X<sub>3</sub> receptory mají rychlou desenzitizaci; P2X<sub>5</sub> receptor dává signifikantně velmi malou odpověď; pro P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub> receptor je charakteristická pomalá desenzitizace a možnost přechodu do druhé fáze otevření (tato fáze odpovědi zde není ukázána); P2X<sub>6</sub> receptor uveden není, protože jeho homomer je nefunkční. Podle [4]

### 3.3.5. P2X<sub>5</sub> receptor

Velmi malou odpověď na jakékoli podněty dává purinergní receptor složený výlučně z podjednotek P2X<sub>5</sub> (Obr. 5). V savčím organismu se nalézá především ve středním mozku [21], proliferujících buňkách kůže, vnitřnostech, močovém měchýři, brzlíku a míše. Lidskému

P2X<sub>5</sub> receptoru chybí exon 10 kódující část druhé transmembránové domény [4]. Vápenaté kationty tento kanál nepropouští vůbec, za žádných podmínek jím neprochází ani velké organické ionty [4, 25].

Nejúčinnějším agonistou homomerního P2X<sub>5</sub> receptoru je ATP, případně 2-meSATP. Slabší efekt má BzATP a  $\alpha\beta$ meATP. Minimální odpověď vyvolává ADP a  $\beta\gamma$ meATP. Selektivní ani specifický agonista zatím nalezen nebyl, ale receptor je velmi dobře odlišitelný od ostatních P2X podle malé odpovědi i na vysoké koncentrace agonisty. Další zvláštností P2X<sub>5</sub> receptoru je jeho relativní necitlivost k inhibici TNP-ATP. Blokování suraminem a PPADS je u něj podobně účinné jako u P2X<sub>2</sub> receptoru, PPADS je o něco méně účinnější než suramin [4, 21, 25].

P2X<sub>5</sub> podjednotka se častěji vyskytuje ve společnosti P2X<sub>1</sub> podjednotek, tvoří spolu heteromerní P2X<sub>1/5</sub> receptor. Tento receptor Ca<sup>2+</sup> propouští, ale o něco méně než P2X<sub>1</sub> receptor. Vápenaté kationty na něj mají dvojitý vliv: krátkodobé působení podporuje otevření kanálu, delší už jej blokuje a snižuje odpovědi na agonistu. Stejně tak změny pH vyvolávají změny odpovědi pozitivní i negativní. Heteromerní P2X<sub>1/5</sub> receptor na ATP reaguje citlivěji než jiné purinergní P2X receptory. Stejně dobrou odpověď dává i při aktivaci 2-meSATP. Postupně nižší a nižší odpovědi pak vyvolávají ATP $\gamma$ S,  $\alpha\beta$ meATP a ADP. Antagonisté typičtí pro P2X receptory – suramin a PPADS – jej blokuje podobně jako P2X<sub>1</sub> podjednotku. Narozdíl od P2X<sub>5</sub> receptoru je tento heteromer citlivý i k TNP-ATP [4, 25].

### 3.3.6. P2X<sub>6</sub> receptor

V motorických neuronech míchy a obecně v centrální nervové soustavě se hojně vyskytují P2X<sub>6</sub> podjednotky. Jejich funkce je regulována glykosylací řetězce a většinou jsou popisovány jako nefunkční. Homomerní P2X<sub>6</sub> receptory jsou totiž zadržovány v endoplasmatickém retikulu a k jejich transportu do membrány nedojde. Jsou relativně velmi málo citlivé k suraminu. Mnohem častěji než homomerní se vyskytují v heteromerních receptorech spolu s P2X<sub>2</sub> či P2X<sub>4</sub> podjednotkami [4, 21, 25].

Heteromerní P2X<sub>2/6</sub> receptor dává odpovědi jen velmi málo rozdílné od homomerního P2X<sub>2</sub> receptoru. Inhibice suraminem stejně jako aktivace ATP je u něj zřetelně dvoufázová a ukazuje na dominantní postavení P2X<sub>2</sub> receptoru. Zvýšená koncentrace kationtů zinečnatých či snižování pH reakci na agonistu podporují. Podobně i heteromerní P2X<sub>4/6</sub> receptory poskytují odpovědi jen velmi málo odlišné od čistých P2X<sub>4</sub> receptorů. Zároveň jsou mezi

nimi i malé fenotypické rozdíly, což znesnadňuje jejich studium. Oproti P2X<sub>4</sub> receptorům vykazují zvýšenou citlivost k  $\alpha\beta$ meATP a 2-meSATP [4, 21, 25].

### 3.3.7. P2X<sub>7</sub> receptor

Buňky, ve kterých probíhá apoptóza, obsahují na svém povrchu purinergní P2X<sub>7</sub> receptory. Jedná se především o buňky imunitního systému [21], slinivky břišní a kůže. P2X<sub>7</sub> podjednotka má charakteristicky delší C-konec než ostatní P2X podjednotky (o 240 AMK). Na C-konci obsahuje receptorový protein tyroxin fosfatasy, který je aktivován při navázání intracelulárního ATP a má vliv na konformaci iontového kanálu, potažmo na jeho propustnost [3]. P2X<sub>7</sub> receptor je velmi dobře odlišitelný od ostatních purinergních receptorů. Při prodloužení aplikace agonisty propouští velké organické ionty (podobně jako P2X<sub>2</sub> a P2X<sub>4</sub>) [4, 21, 25].

Pro P2X<sub>7</sub> receptor je selektivním agonistou BzATP, který má výrazně větší (přibližně 10-30x) účinek než ATP. Na ATP reaguje vždy až při vyšších koncentracích (>100  $\mu$ M). Stejný účinek jako ATP má i 2-meSATP. Na ATP $\gamma$ S a  $\alpha\beta$ meATP je P2X<sub>7</sub> citlivý jen minimálně. ADP a AMP jsou jen slabí agonisté. Aplikují-li se po vystavení receptoru ATP, je jejich účinnost zvýšená. Efekt ATP i BzATP je umocňován se snižující se koncentrací extracelulárního vápníku a hořčiku [4, 25].

Pro P2X<sub>7</sub> receptor byly nalezeny tři hlavní skupiny antagonistů. První skupina jsou typičtí P2X antagonisté: suramin a PPADS, na které je P2X<sub>7</sub> relativně málo citlivý. Účinnější jsou jejich analogy, hlavně NF279. Ještě efektivněji blokuje Brilliant Blue G. Druhou skupinou jsou velké organické kationty, například calmidazolium a 1-[N,O-bis-(5-isoquinolinsulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-fenylpiperazin (KN-62). Třetí skupinu tvoří monoklonální protilátky. Řada efektivnosti antagonistů pro P2X<sub>7</sub> vypadá následovně: KN-62 = Brilliant Blue G > calmidazolium > NF279 > PPADS > suramin [4, 25]. Byli již také objeveni selektivní antagonisté: A-438079.0 (3-{{5-(2,3-dichlorofenyl)-1H-tetrazol-1-yl}methyl}pyridin) a A-740003.0 (N-(1-{{(E)-(kyanoimino)(5,8-dihydroquinolin-5-ylamino)methyl}amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyfenyl)acetamid)<sup>2</sup> [3].

Allosterický modulační vliv na P2X<sub>7</sub> receptor uplatňují především nejrůznější dvouvazné kationty. Některé (Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> a Cu<sup>2+</sup>) tlumí citlivost receptoru k agonistovi. Stejně tak snižuje odpověď klesající pH prostředí. Dvouvazné ionty také inhibují rozšíření póru, stabilizují jej v první fázi otevření, čímž zabraňují propouštění velkých organických

<sup>2</sup> Názvy generovány programem ACD/ChemSketch 5.08 (freeware version) a upraveny do češtiny.



iontů. Působí jich takto celá řada, účinnost je různá:  $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} \geq \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} >> \text{Mg}^{2+} \geq \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \geq \text{Ba}^{2+} >> \text{Sr}^{2+}$  [4, 25].

#### 4. VAZEBNÉ MÍSTO P2X RECEPTORŮ PRO ATP

Vazebné místo pro extracelulární ATP v purinergních receptorech typu P2X stále není dostatečně objasněno. V současné době jsou pouze vytipovány určité aminokyseliny, které mají vliv na účinek ATP. Některé jen ovlivňují konformaci proteinu, jiné pravděpodobně přímo vážou ATP, zatím nelze rozlišit mezi těmito dvěma možnostmi. Vazebné motivy přesně určeny nebyly. U enzymů a kanálů, které využívají ATP jako zdroj energie pro svou činnost, je situace mnohem lepší. Byly u nich identifikovány shodné motivy pro vazbu ATP, u mnoha byla také určena struktura vazebného místa a jeho specifika [26].

U purinergních P2X receptorů způsobuje problémy nezbytná sounáležitost vazebného místa s transmembránovou doménou. Pokud by pro vazebné místo byla důležitá jen extracelulární klička, byl by problém mnohem jednodušeji řešitelný. Extracelulární klička by byla odštěpena a protein vykrytalizován, což by jeho zkoumání velmi usnadnilo. Bohužel u transmembránových bílkovin nejsou v současné době běžně dostupné metody, které by je dokázaly čistě a bez příměsí jiných proteinů vypreparovat z membrány.

Současné výzkumy se snaží porovnávat vazebná místa a konformace v proteinech využívajících extracelulární ATP s těmi, které využívají ATP intracelulární. Na základě tohoto srovnání pak modelují struktury receptorů, vytyčují v daném modelu důležité aminokyseliny a mutacemi s následnou funkční analýzou zjišťují jejich postradatelnost.

Důležitost aminokyselin, či spíše jejich specifických vlastností jako je polarita, objem a hydrofobicita, se ověřuje záměnou za aminokyseliny, které mají jiné vlastnosti. Stěžejní metodou je alaninová substituce, pomocí níž je zkoumána důležitost polárních a nabitých řetězců. Používá se také záměna za aminokyselinu s velkým postranním řetězcem (tryptofan). Lysin/argininové substituce mají za úkol určit, zda je pro správnou funkci bílkoviny v dané pozici důležitý jen kladný náboj nebo i struktura řetězce aminokyseliny. Další metodou je záměna za cystein, jehož funkce a poloha v sekundární struktuře proteinu může být testována pomocí specifických redukčních činidel (například methanthiosulfonátů). Cysteinová mutagenese se používá na doplnění a upřesnění získaných informací, zejména pro určení  $\alpha$ -helikální struktury transmembránových domén a jejich orientace v lipidové dvojvrstvě.

Výzkum se také zaměřuje na charakterizaci farmakologického profilu ligandů P2X receptorů. Nalezení dostatečně specifických látek, ať už receptor stimuluje či blokuje,

může pomoci při modelování tzv. „farmakoforu“ neboli virtuálního vazebného místa/vazebné kapsy. V neposlední řadě hrají roli také modulátory, jimiž lze zjistit, zda výměna aminokyselin jen významně změnila konformaci kanálu nebo zda se jedná přímo o vazbu či koordinaci s ATP.

#### 4.1. Obecné principy vazby ATP v proteinu

Je známo, že na vazbě ATP k proteinu se obecně podílejí tři skupiny aminokyselin: (i) aromatické, které interagují s adeninovým kruhem, (ii) pozitivně nabitě, koordinující s negativním nábojem na fosfátovém řetězci a (iii) sulfidové a negativně nabitě, které mají vliv na pozitivně nabitě části řetězce ATP, t.j. ribózu či adeninový kruh [26].

Kromě interakcí protikladných nábojů mají velmi významný vliv vodíkové můstky. Skrze polární vazbu mezi vodíkem a kyslíkem či vodíkem a dusíkem v jedné molekule vzniká na vodíku parciální kladný náboj, na kyslíku parciální záporný náboj. Ty pak společně na základě opačných nábojů mezi různými molekulami vytvářejí slabé vazby.

#### 4.2. Vytipované aminokyseliny ATP vazebného místa P2X proteinu

Byly porovnány řetězce všech sedmi známých podjednotek P2X receptorů. Na základě tohoto srovnání byly vytyčeny konzervativní aminokyseliny, které se vyskytují ve všech podtypech, a ty byly přednostně podrobeny zkoumání. Pomocí bodových mutací byly prověřeny konzervativní aromatické aminokyseliny zejména u lidského P2X<sub>1</sub> receptoru. Bylo zjištěno, že ne všechny tyto aminokyseliny jsou nutné pro funkci receptoru. Například aminokyseliny Phe<sup>191</sup> a Trp<sup>259</sup> jsou důležité pro správný transport receptoru do plasmatické membrány. Nakonec byla vyslovena hypotéza, že na koordinaci vazby adeninového kruhu, který je součástí ATP, se podílejí Phe<sup>185</sup> a Phe<sup>291</sup> [26].

Dále byly identifikovány kladně nabitě aminokyseliny podílející se na vazbě záporně nabitých fosfátových skupin (Lys<sup>68</sup>, Lys<sup>70</sup>, Lys<sup>309</sup>, číslování P2X<sub>1</sub> receptoru) [27]. Tato práce předpokládá, že se na vazbě trifosfátu podílí i kladně nabitý Arg<sup>292</sup>, později však bylo zjištěno, že jeho náboj nemá na účinek ATP vliv [28]. Nicméně Arg<sup>292</sup> je součástí vysoce konzervativního motivu všech P2X podjednotek (Asp<sup>290</sup>-Phe<sup>291</sup>-Arg<sup>292</sup>), který se podle nejnovějších studií podílí na tvorbě vazebného místa pro ATP na lidském P2X<sub>1</sub> receptoru [28]. Model založený na podobnosti struktury poloviny extracelulární smyčky P2X s aminoacyl t-RNA synthetázou předpokládá, že Asp<sup>280</sup> koordinuje vazbu ATP

prostřednictvím hořčíku, Phe<sup>230</sup> koordinuje vazbu adeninového kruhu, a Lys<sup>190</sup>, His<sup>286</sup> a Arg<sup>278</sup> koordinují účinek fosfátových skupin (číslování podle P2X<sub>4</sub> receptoru) [29].

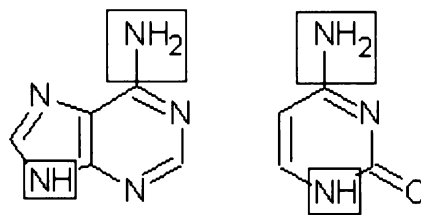
Jiná hypotéza předpokládá, že oblast vazby ATP v P2X receptorech se nachází v oblasti bohaté na cysteiny (cca 110-183, číslováno dle P2X<sub>7</sub> receptoru). Za ní následuje segment se šesti antiparalelními β-skládanými listy (Phe<sup>188</sup> až Val<sup>321</sup>), ve kterém je umístěna část ATP-vazebného místa vážící fosfáty [30].

### 4.3. Důležitá místa ve struktuře agonisty

K aktivaci P2X receptoru lze kromě samotného ATP použít i jeho analogy. Vznikají nahrazením prvku v molekule jiným (např. náhrada kyslíku uhlíkem), přidáním větších či menších postranních řetězců, odštěpením části molekuly apod. Každý analog má ve své struktuře určitá specifika, od nichž se odvíjejí jeho schopnosti aktivovat receptor. Nejpoužívanější agonisté P2X receptorů jsou: 2-meSATP, BzATP, αβmeATP, βγmeATP a ATP<sub>γ</sub>S. Agonistou je také ADP a ostatní trifosfonukleosidy [2, 4, 18, 21, 25].

#### 4.3.1. Adeninová struktura

Adeninová struktura je pro správně fungujícího agonistu velmi důležitá. Výzkumy s ostatními trifosfonukleosidy jasně ukázaly, že aktivovat receptor není schopna molekula GTP ani UTP. CTP je schopno kanál aktivovat, ale v porovnání s efektem ATP jen slabě [4, 21, 25]. ATP i CTP mají proti místu, kde se molekula váže k ribóze, postaven aminový zbytek (Obr. 6). Žádná další báze nemá aminovou skupinu v této poloze.



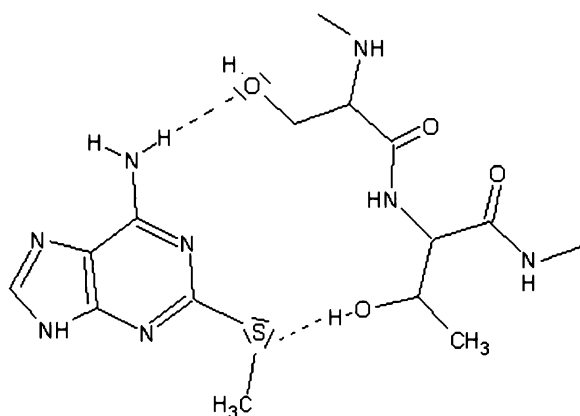
**Obrázek 6: Srovnání struktury adeninu a cytosinu**

Vlevo je adenin, vpravo cytosin; rámečky označují místo vazby k ribóze (modrý) a kritickou aminoskupinu (červený).

Adenin i cytosin jsou planární molekuly. Nicméně cytosin má jen jeden aromatický kruh a proto pravděpodobně není aminová skupina v takové pozici, aby mohl být receptor plně aktivován. Aminové skupiny se mohou vázat ke skupině polárních nenabitých

aminokyselin receptorového proteinu, zejména serinu, tyrosinu a threoninu. Možná je i interakce s kladně nabitými aminokyselinami jako například kyselinou asparagovou a glutamovou. Je zřejmé, že vyznačená aminoskupina je pro vazbu nukleosidu k receptoru důležitá. Pokud by hrála roli především aromaticnost adeninové skupiny, byl by receptor aktivovatelný i GTP či UTP.

2-meSATP nabízí v přidané skupině  $-SCH_3$  3 volné elektronové páry, které mohou tvořit vodíkové můstky (Obr. 7). Atom síry napomáhá fixaci 2-meSATP do struktury proteinu, proto je tento agonista většinou vysoce účinný. Tvorba disulfidové vazby není možná, protože ji blokuje  $-CH_3$  skupina připojená za síru. Adeptů na interakci s volnými elektronovými páry je více, než u vazby  $-NH_2$  skupiny. V úvahu připadá lysin, arginin, asparagin, glutamin, tyrosin, threonin a serin.



**Obrázek 7: Možnost fixace 2-methylthioadeninu v řetězci proteinu**

Na pravé straně je část řetězce proteinu s aminokyselinami threoninem a serinem; na levé straně 2-methylthioadenin; čárkovaně vodíkové můstky; u síry a kyslíku, které by se v tomto příkladu podílely na tvorbě slabých interakcí, jsou zobrazeny volné el. páry

#### 4.3.2. Fosfátový řetězec

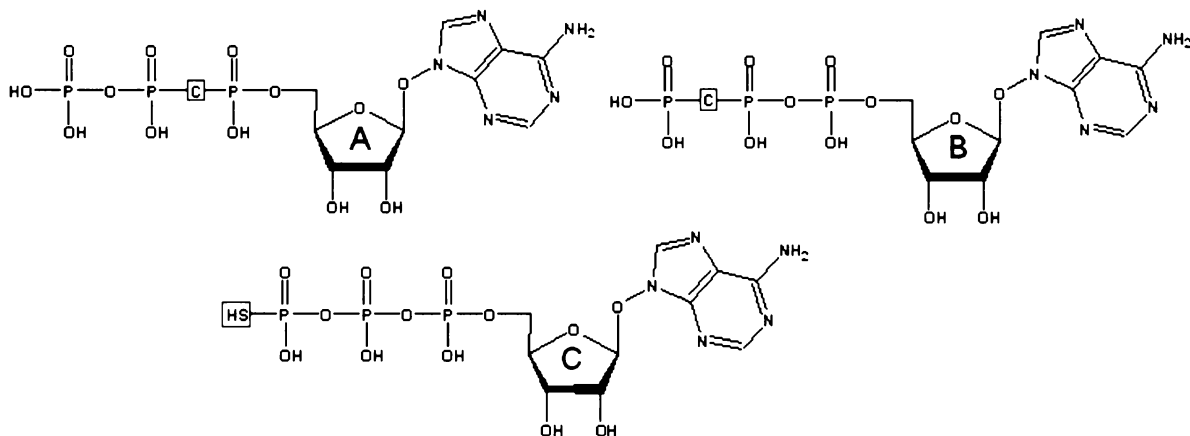
Další signifikantní strukturou v molekule agonisty je fosfátový řetězec. Jak ukázaly pokusy s ADP, k plné aktivaci kanálu jsou potřeba v řetězci všechny tři fosfátové skupiny. Často používanými agonisty jsou  $\alpha\beta$ meATP a  $\beta\gamma$ meATP (Obr. 8) Jejich účinnost je pro různé receptory různá, většinou nižší. V případě  $P2X_1$  a  $P2X_3$  podjednotek je jedna z těchto sloučenin ( $\alpha\beta$ meATP) schopna aktivovat receptor plně [25].

Jeden jejich kyslík je nahrazen uhlíkem. Kyslík má vysokou elektronegativitu, mezi ním a fosfátem je polární vazba. Rozdíl elektronegativit umožňuje soustředění vazebných elektronů blíže ke kyslíku, skrze to vytváření parciálního záporného náboje. Uhlík má hodnotu elektronegativity velmi blízkou k hodnotě fosfátu, elektrony jsou rozmístěny

rovnoměrně a náboj zde nevzniká. Parciální náboj vzniká samozřejmě i na krajních –OH skupinách vázaných na fosfátu. Ty však nejsou v  $\alpha\beta\text{meATP}$  ani v  $\beta\text{meATP}$  nijak pozměněny. Mohou mít na vazbu ATP k receptoru sice také vliv, ale hlavně ukazují, že důležité jsou kyslíky mezi fosfáty. Agonisté, kteří by byli pozměněni v krajních –OH skupinách, do této doby nebyli použiti nebo o nich nebylo informováno.

K vytvoření vazby na parciálně nabitý kyslík mezi fosfáty je třeba aminokyselina s kladně nabitým koncem řetězce. Volnou –NH<sub>2</sub> skupinu má glutamin a asparagin, kladným nábojem disponují také bazické AMK: histidin, arginin a lysin. Glutamin a asparagin nejsou vhodné kvůli kyslíku v řetězci, který by se odpuzoval (na základě shodných nábojů) s volnými krajními –OH skupinami. Histidin se na této vazbě podílet nemůže ze sterických důvodů. Vhodnými kandidáty jsou lysin a arginin, což potvrzují i již provedené výzkumy.

Dojde-li k výměně –OH skupiny na posledním fosfátu za –SH skupinu, jak je tomu u ATP $\gamma$ S (Obr. 8), sníží se schopnost agonisty aktivovat kanál také [4, 21, 25]. Mezi fosforem a sírou je již velmi malý rozdíl elektronegativit. Molekula je tak připravena o jednu možnost vazby vodíkovými můstky. Koncovou –OH skupinu již může vázat velká řada aminokyselin: asparagin, glutamin, serin, tyrosin, threonin, arginin, lysin i kyseliny asparagová a glutamová.

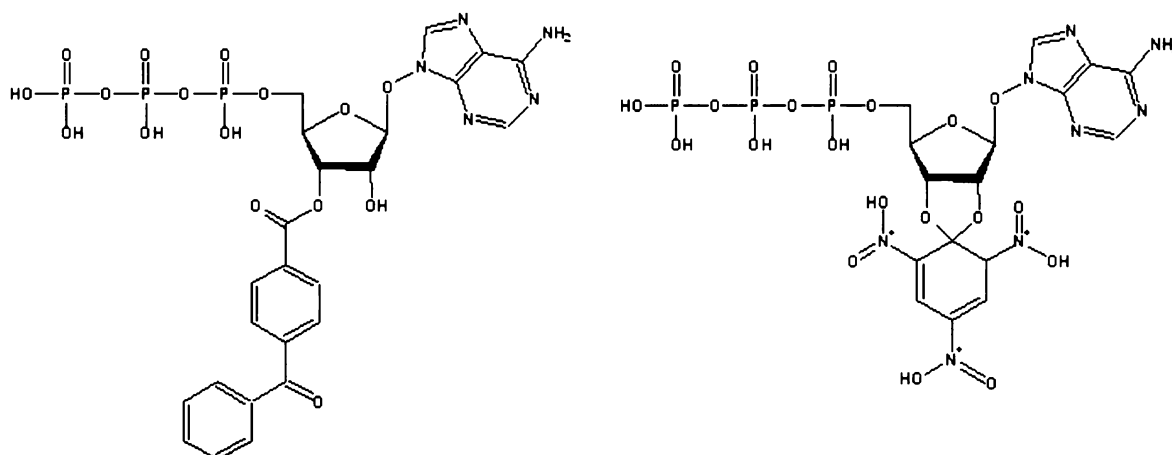


**Obrázek 8: Struktury analogů ATP**

A:  $\alpha\beta\text{meATP}$ , B:  $\beta\text{meATP}$ , C: ATP $\gamma$ S, červené rámečky v místech nahrazení původního kyslíku

### 4.3.3. Role ribosového kruhu

Dosud provedené výzkumy nenapovídají, že by ribosový kruh, resp. jeho dvě volné -OH skupiny, byly důležité pro vazbu ATP do proteinu. Je však nepostradatelný pro celkovou strukturu molekuly. TNP-ATP jako velmi účinný blokátor většiny P2X receptorů evokuje myšlenku na důležitost těchto volných skupin, kterou však struktura BzATP vyvrací. (Struktury ke srovnání na obrázku 9.) TNP-ATP obsahuje ve své struktuře velmi reaktivní -NO<sub>2</sub> skupinu. Jeho úspěšnost v roli antagonisty způsobuje pravděpodobně reakce s některým z míst kritických pro vazbu agonisty.



**Obrázek 9: Ligandy s pozměněnou -OH skupin na ribosovém kruhu**

Vlevo je struktura agonisty BzATP, vpravo: je antagonist TNP-ATP.

BzATP je zvláště účinné u P2X<sub>1</sub> a P2X<sub>7</sub> receptoru [4, 25], naproti tomu není schopno aktivovat P2X<sub>4</sub> receptor. Aby mohl BzATP aktivovat receptor, musí se zafixovat postranní řetězec molekuly (4-benzoylbenzoyl). Pokud je navázán na nesprávné místo, natočí se molekula jinak a nedojde k aktivaci kanálu. Jestliže nebude tato struktura ukotvena vůbec, ostatní části se mohou navázat na vazebná místa, ale celá struktura bude velmi nestabilní. K fixaci 4-benzoylbenzoylu by mohl sloužit motiv P<sup>174</sup>xPALL<sup>179</sup>x (v lidských P2X receptorech P<sup>174</sup>RPALL<sup>179</sup>x, v krysích P<sup>174</sup>xPALLR<sup>180</sup>, Obr. 10). Například v krysím P2X<sub>4</sub> receptoru je v tomto motivu na místě leucinu velká aromatická aminokyselina fenylalanin.

### 4.4. Porovnání s motivy v enzimech

Pro vazbu intracelulárního ATP bylo identifikováno několik vazebných motivů o různé míře důležitosti – Walker A (dříve zvaný P-loop), Walker B, C-region, A-loop,

D-loop, H-loop a Q-loop. Jsou poskládány na dvou stranách ATP-vazebné kapsy. Nejvýznamnější z těchto oblastí je Walker A, Walker B a A-loop, proto se jim budu více věnovat. C-region skrývá oblast signifikantní pro každou bílkovinu [31].

#### 4.4.1. Walker A

Ve vazebném motivu nazvaném Walker A je stěžejní aminokyselinou lysin. Dříve se tento motiv označoval jako P-loop, protože váže fosfáty [32, 33]. Obecně je Walker A definován jako TKGxxxxG, často přesněji jako TKGxGxxG (zapsáno v opačném pořadí než je zvykem, pro lepší zviditelnění podobnosti s motivem v P2X receptorech). Tato struktura platí pro enzymy a kanály využívající intracelulární ATP jako zdroj energie [33]. V P2X receptorech využívajících extracelulární ATP lze nalézt obdobný motiv těsně nad první transmembránovou doménou T<sup>67</sup>KxKG<sup>71</sup> (číslováno dle P2X<sub>1</sub>, avšak jediný P2X<sub>1</sub> receptor nemá v poloze 67 threonin). Obecněji lze tedy tento motiv označit jako KxKG (Obr. 10). V tomto motivu je nepostradatelný první lysin (Lys<sup>68</sup>) – jeho náhrada za jakoukoli aminokyselinu, včetně argininu, způsobila nefunkčnost kanálu. [26, 34] Při substitucích druhého lysinu byl procházející proud významně snížen (cca 1000x), ale kanál byl stále funkční. [26] Motiv KxKG, stejně jako Walker A, je důležitý pro vazbu β- a γ-fosfátu ATP.

#### 4.4.2. Vazba α-fosfátu

α-fosfát ATP by mohl být v purinergních receptorech typu P2X stabilizován pomocí lysinu a argininů nad druhou transmembránovou doménou. Spolu s motivem R<sup>305</sup>xLxKxxG<sup>312</sup> (číslování podle P2X<sub>1</sub>) (Obr. 10) by se na jeho vazbě mohl významně podílet také Arg<sup>292</sup>. Dojde-li například k výměně Arg<sup>292</sup> za glutamin, receptor kompletně ztratí svou funkci, ačkoli částečný kladný náboj na bočním řetězci aminokyseliny je zachován [30]. Přesné určení motivu u P2X receptorů však ještě provedeno nebylo. Analogie s jinými proteiny neexistuje, protože dle současných výzkumů není v enzymech a kanálech spolupracujících s intracelulárním ATP fixován α-fosfát [31]. Za tímto motivem směrem k TM2 se nachází velká oblast konzervativních aminokyselin. Ve všech sedmi receptorech se jen s velmi malými nuancemi opakuje přibližně osmnáct aminokyselin (G<sup>312</sup>I<sub>V</sub>RFDI<sub>V</sub>I<sub>L</sub>VxGxAGKFxI<sub>L</sub>I). Předpokládá se, že by tato oblast mohla hrát roli v převodu signálu z ATP vazebného místa k iontovému kanálu.

P2X1	MARRLQDELSA-FFFEYDTPRMVLVRNKKV	YERGYQTSS	59		
P2X2	MVRRRLARGCWS-AFWDIETPKVIVVRNRR	VQKSYQDSE	59		
P2X3	-----MNCIS-DFFTYETTKSVVVKSWTI	HEKAYQVRD	53		
P2X4	MAGCCSVLG-S-FLFEYDTPRIVLIRSKKV	WEKGYQETD	58		
P2X5	MGQAANKGFV-LSLFDYKTKAFVVAKSKKV	IKKSYQDID	59		
P2X6	MASAVAAALVSWGFLDYKTEKYVMTRNCVV	AKKGYQEWD	60		
P2X7	MPACCSWN----DVFOYETNKVTRIQSVNY	ISDKLYQRKE	55		
P2X1	D-LISSVSVLAVT--QLQGLG-PQ----VMDVADYVFR	HAHGDSSFFVVM	111		
P2X2	TGPESSIIITVITMS-----EDK-----VMDVVEEYVNF	PEGGSVVSIITRIE	107		
P2X3	TAIESSVVTVDFGRY-----ANR-----VMDVSDYVTF	PQGTSVFVIITKMI	101		
P2X4	S-VVSSVTTAVAVT--NTSQLG-FR----IWDVADYVIF	HAQEENSLFIMIN	110		
P2X5	TSLSQAVVTVAVAYTNTTMLGER-----LWDVADFVIF	HSQGENVFFVVTN	112		
P2X6	MDPQISVITLIVSVTQVKELEKR-----LWDVADFVIF	HSQGENVFFLVIN	113		
P2X7	P-LISSVHTVAVAEVTENVTEGGVTKLVHGIFD	TADYTLHLOG-NS	113		
P2X1	QTQGHVAENPE-GG-IQDDISGTPGKAERKAC	GIQTGNVP-FNGTVK	167		
P2X2	QTLGTPESMRVHSSTHSDDDIAQOLDMONGI	RTEGHPVYHGD	166		
P2X3	QMGGFPHENEKYR--VSDSQ--GPERFPGG	IITGRVFN--YSSVLR	155		
P2X4	QTQSTPEIPDKTS-INSDDADTPGSVDTHSS	GVATGRVP-FNESVK	167		
P2X5	QRQGIHAEREGIPDGESEDDDHAGESV	VAGELTKGRLR-VGNSTRGT	EIFAW	171	
P2X6	QVQGRPEHPSVPLANWADEDEPEGEMGT	YSEGIKTGQVA-FNGTHR	TEIFSW	171	
P2X7	QEQKLEPEYPSRGG-QHSDDQGIKGM	MDPQSKGIQTGRIP-YDQKRK	TEIFAW	170	
P2X1	EVDDKIEPALLREAEENFTLFIKNSIS	FPFKVNRRLVVEVNGTYMKA	LYNKIQNPL	227	
P2X2	EDG-TSDNHFLGKMAPNFTILIKNSI	YPKFKPKGFIASQKSD-YLKN	TFDQSDDPY	224	
P2X3	EVD-TVEMPIM-MEAENFTIFIKNSI	RFPPLFPEKGNLLPMLTDKDIK	RPHPEKAPF	209	
P2X4	ENDVGVPTPAFLKAAENFTLLVKN	NIWPKFNFSEKMLPMTTQVYK	KENQYDFF	227	
P2X5	ETK-SMPTDLLKDAESFTISIKNF	IRFPKHFSGKAVLETDKKNFLKT	HFSSTN-LY	229	
P2X6	ESS-AVPRKLLACAKNFTLFIKNT	VTFNPKFNSRTHALDTRDNTYFK	LYDSLSSPY	230	
P2X7	BEGKEAERPALLREAEENFTVLIKN	IDFPGHNYTTRILPGMNIS----	TFEKTWNPO	226	
P2X1	FVFNIGYVVRBSQDERSLREGGVVA	ITDNRMLLWHVRAEITIQPHG	---YGEKN	284	
P2X2	FIFRIGFIVEKAGENFTELAEHGGV	IGVITDNRMLLSESEFENYSE	FRNID--PKYDP	282	
P2X3	FILRVGDVVKAGDFAKLARTCGV	LGIKIGVWDLKAWDQIEEYSE	TRLDGVSEKSS	269	
P2X4	FIFRIGTIVGDAGESFOEMAVEGG	INGIQDNRMLLDRAASLLEF	YSEFRNIDTRDLENN	287	
P2X5	FIFRIGSIVRWAGADFODIALKGG	VIGIYDNRMLLDKAASK	IEEYSEFRNIDNKNTES-	288	
P2X6	FVFRIGDLVAMTGGDFEDLALLG	GAVGINDNRMLLDTKGS	DEFOYSE-CLQE-----	283	
P2X7	FIFRIGDIFQIEGENFTEVAVGG	INGIYDNRMLLDWSHRE	IEEYSEFRNIDDKYTNES	286	
P2X1	LSFGYFNFAHAFVQ-NGTNR	IRFVVFHFHDIIDGKAGKFDI	IPTMT	343	
P2X2	ASSGYNFNFNKKYKINGTITTT	TFAYIRFDVIVHGQAGKFS	LIPTII	342	
P2X3	VSPGYNFNFNKKYKMEGSEY	TFAYIRFDVIVYGNAGKFN	IPTII	329	
P2X4	VSPGYNFNFNKKYRDLAGIEG	TFAYIRFDIIVFGKAGKFD	IPTMI	347	
P2X5	ISSGYNFNFNKKYRDPAENGVER	DFAYIRFDVIVNGKAGKFS	IPTVI	348	
P2X6	--NGYNFNFNKKYWAASGVES	SILLYIRFDIIVTGQAGKFA	IPTAI	341	
P2X7	LFPGYFNFAHAFVQ-NGTNR	IRFVVFHFHDIIDGKAGKFD	IQLVV	345	
P2X1	[REDACTED]H-----	ILPKREHYKQKFKFYAED	MGPGEHEHPV	384	
P2X2	[REDACTED]T-----	FMNKNKLYSHKFDKVRT	PKHPSSRWVTL	384	
P2X3	[REDACTED]N-----	FLKGADEYKARKFEEVT	TETTLKGTASTNPV	371	
P2X4	[REDACTED]Y-----	CMKKKLYRDKYKYVED	YEQGLSSEMNO	389	
P2X5	[REDACTED]Y-----	LIRKSEFYRDKRFEKVR	GQKEDANVEVEN	390	
P2X6	[REDACTED]Y-----	VDREAGFYWRTRYEAR	APKATTNSA	379	
P2X7	[REDACTED]TYASTCCRSRVY	PSCKCCEPCAVNEFYRNR	CEPIVEPKPTLKYV	405	
P2X1	ATSSTLGLQENMRTS		399		
P2X2	ALVLGQIPPPSHYSQDPPSP	PSGEGPTLGEGAEPLAVQ	SPRPCSISALTEQVVDTLG	444	
P2X3	FASDQATVEKQSTDSGAYS	IGH		393	
P2X5	EMEQRPEDEPLERVQRDE	QSQELAQSGRKQNSNC	QVLLPARFGLRENAIV	NVKQSQIL	450
P2X7	EPHIWMVDQQLLGLKSLQ	DVKGQEVPRPQDFLELS	RSLSLHHSFPPIGQPE	EMQLLQIE	465
P2X2	QHMQRPPVPEPSQDST	STDPKGLAQL		472	
P2X5	HPVKT			455	
P2X7	AVPRSRDSPWCQCGN	CLPSQLPENRRALEEL	CRRKPGQCITTE	SELFISKIVLSREALQL	525
P2X7	LLLYQEPLLALEGEAIN	SKLRHCAYRSYATWR	FVSQDMADFAILP	SCCRWKIRKEFPKTO	585
P2X7	GQYSGFKYPY			595	

Obrázek 10: mapa aminokyselinového kódu sedmi podjednotek kryších P2X receptorů

Motivy: růžově – motiv KxKG (vazba  $\beta$ - a  $\gamma$ - fosfátu); fialově – motiv GxxKxLxR (vazba  $\alpha$ -fosfátu).

Zvýraznění: zeleně – transmembránové domény; modře – cystein-bohatá oblast, modrá závorka – cysteinová klička; červeně – oblast antiparalelních  $\beta$ -listů

Rámečky: zelený – předpokládaná oblast pro vazbu BzATP; červený – předpokládaná oblast pro rozšíření póru a propouštění velkých organických iontů; šedý nevyplněný – konzervativní aminokyseliny; šedý vyplněný – konzervativní cysteiny, které se mohou spojit disulfidovými můstky. Převzato z [4], upraveno.



#### 4.4.3. Walker B

Další ATP-vazebný motiv známý u enzymů je Walker B. Jeho esenciální aminokyselinou je kyselina asparagová. Bývá definován jako DExx. V P2X receptorech však nebyly nalezeny tyto dvě aminokyseliny blízko sebe. Funkcí motivu Walker B je fixace  $\gamma$ -fosfátu a vody. Spolupracuje také s hořečnými kationty [31]. S největší pravděpodobností se podílí na hydrolýze ATP.

Podobný motiv lze nalézt u ektonukleotidas, které degradují ATP v extracelulárním prostoru. Jejich motiv EF hand (DxDxDGxxDxxE) je takřka nabit asparagovými kyselinami, vyskytuje se zde i kyselina glutamová. Dle již publikovaných výzkumů se tento motiv podílí na regulaci funkce – tzn. hydrolýzy – ektonukleotidas pomocí interakce s vápenatými nebo hořečnatými kationty. [15] U receptorů pro extracelulární ATP k hydrolýze nedochází. Žádná obdoba motivu Walker B se zde tudíž nemusí vůbec vyskytovat. Model P2X<sub>4</sub> receptoru, založený na podobnosti s aminoacyl t-RNA syntetázou, však s Asp<sup>280</sup> a koordinací vazby k ATP prostřednictvím hořečiku počítá [29].

#### 4.4.4. A-loop, role aromatických AMK

A-loop neboli AAA-motiv původně měl mít jen vliv na navázání adeninového kruhu do enzymové struktury. Zkratka AAA vznikla z názvu „aromatic residue interacting with adenine base of ATP“ (aromatické zbytky interagující s adeninovou bází v ATP) [31]. U aromatických aminokyselin se předpokládala  $\pi$ -interakce s adeninovým kruhem [26]. Dosud prováděné výzkumy na P2X receptorech testovaly především konzervativní aromatické aminokyseliny. U velké většiny z nich nebyl zjištěn žádný významný vliv na vazbu ATP [26, 34].

Určitý vliv mají Phe<sup>185</sup> a Phe<sup>291</sup> [26, 34]. Nicméně i ty jsou postradatelné, aniž by byly funkce receptoru a možnost jeho aktivace narušeny. Některé receptory se substituovanými aromatickými aminokyselinami nebyly vůbec vyneseny do plazmatické membrány. Z toho lze usuzovat, že tyto aminokyseliny jsou také důležité pro expresi receptoru na povrch buňky [34]. Poslední výzkumy zjistily, že A-loop v enzymech je důležitá pro hydrolýzu ATP. Konkrétněji se jedná o tyrosiny, které se v této oblasti vyskytují [31, 35].

#### 4.5. Počet a umístění vazebných míst na P2X receptoru

K aktivaci kanálu P2X receptoru jsou potřeba nejméně dvě molekuly ATP. Vazebná místa jsou v celém receptoru pravděpodobně tři [4, 26, 34]. Není jisté, zda je vazebné místo pro ATP umístěno mezi dvěma podjednotkami receptoru nebo se celé nachází v každé ektodoméně. Ani jedna možnost nebyla zatím zcela vyloučena. Pokud by vazebné místo pro ATP leželo mezi jednotlivými podjednotkami, vazba ATP by napomáhala jejich užší spolupráci. Je totiž známo, že při aktivaci kanálu dochází k pohybu obou transmembránových domén. Jedná se o dva úzce propojené kroky: nejprve dojde k navázání agonisty na protein a následně ke konformačním změnám, které vedou k otevření kanálu [21].

Výzkumy bylo zjištěno, že u enzymů a kanálů využívajících intracelulární ATP se kritické místo pro jeho vazbu a hydrolýzu nalézá „proti“ vazebným motivům Walker A a B. Celý vazebný motiv ATP-vazebné kapsy pro intracelulární ATP se skládá ze dvou částí, označovaných jako „nucleotide binding domains“ (NBD; nukleotid vázající oblasti). Tyto části představují dvě strany „kapsy“. V NBD1 se nalézají motivy Walker A a B, v NBD2 pak místo kritické pro vazbu a hydrolýzu (v některých pramenech nazývané C-region nebo také C-linker). Pokud jsou v enzymu dvě kapsy pro ATP, má druhá obrácenou topologii vazebných míst. „Dimerizace“ vazebných míst je poměrně častá [36].

Předpokládá se, že u receptorového kanálu nemají obě „kapsy“ stejnou roli. Navázání ATP do jednoho místa dává signál k otevření kanálu, při obsazení druhého místa dojde ke stabilizaci otevřeného kanálu [36]. Je možné, že různorodost vazebných míst na jednom receptoru vede k rozdělení jejich role i u P2X receptorů. Jestliže ne u všech, pak alespoň u těch, které mají schopnost propouštět i velké organické ionty. Například schopnost některých P2X receptorů propouštět i velké organické ionty v důsledku „dilatace“ vodivého póru iontového kanálu je podmíněna delším působením agonisty. Existuje tedy možnost, že tento jev vzniká až po navázání další molekuly ATP na receptor.

## 5. ZÁVĚR

Výskyt ATP v extracelulárním prostoru, existence purinergních P2X receptorů a především fyziologická funkce ATP v mezibuněčné signalizaci může být pro někoho překvapivým jevem. ATP je stále vnímán jako specifická intracelulární molekula, která plní pouze jednu specifickou funkci, tj. být hlavním energetickým oběživem buňky. Čtrnáct let poté, co byl naklonován první P2X receptor, však porozumění molekulární struktúře a fyziologické funkci těchto receptorů udělalo velký pokrok. Jisté je, že se ATP může dostat mimo buňku, aniž by při tomto pochodu došlo k ohrožení životaschopnosti buňky. Ví se, že na povrchu buňky jsou speciální receptory pro extracelulární ATP a zároveň jsou zde přítomny i proteiny pro degradaci nukleotidů (ektonukleotidázy). Produkty rozkladu nukleotidů, především ADP a adenosin, jsou v signalizaci využívány také. Je zřejmé, že P2X receptory a extracelulární ATP obecně hrají roli v mnoha životně důležitých fyziologických procesech. Jejich výskyt byl potvrzen nejen u vyšších živočichů, ale i u bezobratlých a rostlin. V lidském organismu se vyskytují na nejrůznějších místech. Zkoumána je především jejich role v centrální nervové soustavě a přenosu bolesti. Jsou hledáni specifictí agonisté i antagonisté, kteří by pomohli rozpoznat jednotlivé podtypy receptorů, intenzivně se zkoumá místo vazby ATP v purinergních receptorech.

Vazebné místo pro extracelulární ATP v P2X receptorech neobsahuje žádné kanonické vazebné motivy nalezené v jiných proteinech, které ale spolupracují s intracelulárním ATP. Navázáním ATP se mění konformace druhé transmembránové domény a dochází k otevření póru. Pravděpodobné signifikantní části řetězce agonisty jsou kyslíky v trifosfátovém řetězci a -NH<sub>2</sub> skupina na adeninu, důležité je také zachování celkové struktury látky. Většina výzkumů přičítá stěžejní funkci ve vazbě jmenovaných oblastí agonisty aminokyselinám Lys<sup>68</sup>, Arg<sup>292</sup>, Lys<sup>305</sup> a Arg<sup>309</sup> (číslování podle P2X<sub>1</sub> receptoru).

Očekává se, že prozkoumání role extracelulárního ATP může přivést k odhalení nových dosud neprobádaných fyziologických jevů a objasnit souvislosti mezi funkcemi, které nám dosud byly utajeny a mohly by pomoci při léčbě lidských onemocnění.

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

1. kolektiv, *Biochemie - základní kurz*. 3. 1999, Praha: Karolinum.
2. Burnstock, G., *Purinergic signalling*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S172-81.
3. Donnelly-Roberts, D., et al., *Painful purinergic receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **324**(2): p. 409-15.
4. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 1013-67.
5. Simoni, R.D., R.L. Hill, and M. Vaughan, *The determination of phosphorus and the discovery of phosphocreatine and ATP: the work of Fiske and SubbaRow*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 21e.
6. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1953*. Nobel Lectures [biography] 1964 [cited 04.04.2008]; Available from: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1953/lipmann-bio.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1953/lipmann-bio.html).
7. Raju, T.N., *The Nobel chronicles. 1953: Hans Adolf Krebs (1900-81) and Fritz Albert Lipmann (1899-1986)*. Lancet, 1999. **353**(9164): p. 1628.
8. Červinka, O., *Nobelova cena za chemii 1997*. Chemické listy, 1998. **29**(2).
9. Gale, T. *ATP (adenosine triphosphate)*. World of Scientific Discovery [cited 04.04.2008]; Available from: <http://www.bookrags.com/research/atp-adenosine-triphosphate-wsd/>.
10. *Akademický profil Geoffreyho Burnstocka*. [cited 12.04.2008]; Available from: <http://www.ucl.ac.uk/ani/prof-GB.htm>.
11. Born, G.V. and M.A. Kratzer, *Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man*. J Physiol, 1984. **354**: p. 419-29.
12. Gordon, J.L., *Extracellular ATP: effects, sources and fate*. Biochem J, 1986. **233**(2): p. 309-19.
13. *The kiss-and-run model of neurotransmitter secretion*. [cited 25.01.2008]; Available from: [http://www.neuroworld.it/aBC/kis\\_run.htm](http://www.neuroworld.it/aBC/kis_run.htm).
14. Jiang, L.H., et al., *Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34190-6.
15. Zimmermann, H., *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 299-309.
16. 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.
17. He, M.L., et al., *Release and extracellular metabolism of ATP by ecto-nucleotidase eNTPDase 1-3 in hypothalamic and pituitary cells*. Purinergic Signal, 2005. **1**(2): p. 135-44.
18. Fields, R.D. and G. Burnstock, *Purinergic signalling in neuron-glia interactions*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(6): p. 423-36.
19. Rivkees, S.A., M.E. Lasbury, and H. Barbhuiya, *Identification of domains of the human A1 adenosine receptor that are important for binding receptor subtype-selective ligands using chimeric A1/A2a adenosine receptors*. J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20485-90.
20. Rivkees, S.A., H. Barbhuiya, and I.J. AP, *Identification of the adenine binding site of the human A1 adenosine receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3617-21.
21. Khakh, B.S., *Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(3): p. 165-74.

22. Hoffmann, C., et al., *The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 14639-47.
23. University of Miami, d.o.b., *G-protein receptor structure*, [Available from <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/memb/fig11x7.jpg>].
24. 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.
25. 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.
26. Roberts, J.A. and R.J. Evans, *ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 9043-55.
27. Ennion, S., S. Hagan, and R.J. Evans, *The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29361-7.
28. 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.
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. 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.
31. Ambudkar, S.V., et al., *The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1049-55.
32. Karpowich, N., et al., *Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter*. Structure, 2001. **9**(7): p. 571-86.
33. Hemmer, W., et al., *Role of the glycine triad in the ATP-binding site of cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 16946-54.
34. 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.
35. Kim, I.W., et al., *The conserved tyrosine residues 401 and 1044 in ATP sites of human P-glycoprotein are critical for ATP binding and hydrolysis: evidence for a conserved subdomain, the A-loop in the ATP-binding cassette*. Biochemistry, 2006. **45**(24): p. 7605-16.
36. Bompadre, S.G., M. Li, and T.C. Hwang, *Mechanism of G551D-CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) potentiation by a high affinity ATP analog*. J Biol Chem, 2008. **283**(9): p. 5364-9.