

Academy of Sciences of the Czech Republic,

And

Charles University in Prague, Faculty of Sciences
Department of Animal Physiology



Autoreferát dizertační práce

**The functional role of disulphide bonding and extracellular
vestibule in rat P2X4 receptor**

**Funkční úloha disulfidických můstků a extracelulárního vestibulu
potkaního P2X4 receptoru**

Mgr. Miloš Rokič

Praha 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Fyziologie živočichů

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR

Autor: Mgr. Miloš Rokić

Školitel: RNDr. Hana Zemková, CSc.

S dizertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

OBSAH/CONTENT

SOUHRN	4
SUMMARY	5
ÚVOD	7
HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	9
MATERIÁL A METODIKA	9
VÝSLEDKY	11
DISKUZE.....	19
ZÁVER.....	23
INTRODUCTION.....	24
AIMS OF THE STUDY.....	26
MATERIALS AND METHODS.....	26
RESULTS.....	28
DISCUSSION	36
CONCLUSIONS	40
LITERATURA/LITERATURE	41
CURRICULUM VITAE.....	46

Souhrn

Purinergní P2X receptory jsou membránové iontové kanály stimulované extracelulárním ATP. U savců bylo dosud nalezeno sedm různých podtypů, označovaných jako P2X1-7, které svoji stavbou představují novou rodinu ligandem řízených iontových kanálů s výjimečnými strukturálně/funkčními vlastnostmi. Funkční P2X receptor je tvořen třemi podjednotkami, kde každá podjednotka má dvě transmembránové domény. Krystalografická data ukazují, že pór iontového kanálu se nachází mezi druhými transmembránovými doménami. Krystalová struktura P2X4 receptoru zebřičky (*Danio rerio*) je dostupná pro receptor v uzavřeném a otevřeném stavu s navázanou molekulou ATP, a proto je přesná struktura vazebného místa pro ATP vyřešena. Cílem této dizertační práce bylo studium strukturálně-funkčních vlastností v modelu rekombinantního P2X4 receptoru. Technikou bodové mutagenese a elektrofyziologickou technikou patch clamp byl zkoumán funkční význam pěti konzervovaných cysteinových párů v ektodoméně a funkční úloha aminokyselinových zbytků, které tvoří extracelulární vestibul P2X4 iontového kanálu potkana. Všech deset cysteinů, jeden po druhém, bylo nahrazeno alaniny nebo threoniny a ATP-stimulované proudy byly snímány z HEK293T buněk, nesoucích divoký typ P2X4 receptoru a jeho mutace. Výsledky získané u mutací C116A, C126A, C149A a C165A naznačují poruchu ATP-vazebné kapsy při narušení jimi tvořených disulfidických můstků (C116-C126 a C149-C165A). Třetí cysteinový můstek (C132-C159) se jeví jako nedůležitý. Na převodu signálu z ektodomény k transmembránovým doménám či otevírání iontového kanálu se podílí C261-C270 a C217-C227. Vzhledem k blízkosti cysteinové vazby C217-C227 a brány pro průchod iontů jsme zkoumali také roli aminokyselinových zbytků v polypeptidových řetězcích V47-V61 a F324-N338, které formují extracelulární vestibul P2X4 receptoru. Mutace v pozici F324, G325, V49, Y54 a Q55 měly za následek nefunkční receptor, což naznačuje klíčovou úlohu těchto aminokyselin ve funkci receptoru. Ukázalo se, že V49 je důležitá pro expresi kanálu na povrchu buňky. Výměnou Y54 za jiné aromatické aminokyseliny (Y54W a Y54F) se podařilo vrátit funkci receptoru, nikoli za nearomatickou (Y54L), což dokládá důležitost aromatického zbytku na této pozici. Funkci mutací Y54A a Y54C bylo možné částečně navrátit také použitím ivermektinu, alosterického modulátoru P2X4 receptoru, což ukazuje na snížení citlivosti k ATP u těchto mutací. U aminokyselinového zbytku Q55 se nepodařilo nijak navrátit funkci receptoru výměnou za jinou aminokyselinou, jediná mutace Q55E byla citlivá k ivermektinu. Mutace F324L, F324Y a F324W částečně či kompletně obnovily funkci receptoru, byly citlivé vůči ivermektinu a změny v citlivosti těchto mutantů korelovaly s velikostí a hydrofobicitou jejich řetězců. Další zasaženou aminokyselinu G325 se podařilo nahradit za prolin, což ukazuje na potřebu flexibilního ohybu v daném místě receptoru. Následná topologická analýza ukázala, že G325 a F324 přerušují po navázání ATP strukturu beta-listu. Výsledky prokazují mnohonásobnou úlohu aminokyselin v oblasti extracelulárního vestibulu ve funkci P2X4 receptoru.

Summary

Purinergic P2X receptors are membrane channels stimulated by extracellular ATP. There are seven isoforms of mammalian P2X receptors designated as P2X1-7, which according to their structure represent a novel family of ligand gated ionic channels, with extraordinary structural/functional properties. The P2X receptor consists of three subunits and every subunit has two transmembrane domains. Crystallographic data demonstrate that ionic channel pore is situated between the second transmembrane domains. Crystal structure of the P2X4 receptor from the zebrafish (*Danio rerio*) is available in both open and closed state of the channel and the exact structure of ATP binding site is solved. The aim of this thesis was to study the structure-function relationships in a model of recombinant P2X4 receptor of the rat. By employing the point mutagenesis and electrophysiological recording, the functional importance of conserved cysteine residues in the ectodomain and amino acid residues which form the extracellular vestibule was investigated. All ten cysteines were substituted one by one with alanine or threonine and ATP-induced currents were measured from HEK293T cells expressing wild type (WT) and mutated P2X4 receptors. The results indicate that C116A, C126A, C149A and C165A mutations disrupt two disulfide bonds (C116-C126 and C149-C165A) which are needed for the integrity of ATP binding site. The third disulfide bond (C132-C159) is found as unimportant. The fourth (C217-C227) and the fifth (C261-C270) disulfide bonds are supposed to be important for either coupling of ligand binding and channel gating or channel gating itself. Considering the close proximity of C217-C227 to the extracellular vestibule which forms the entrance for ions, the residues V47-V61 and F324-N338 forming the lateral portals of vestibule were also investigated. The mutations at positions F324, G325, V49, Y54 and Q55 have yielded a non-functional receptor indicating that these residues are essential for receptor function. It has been shown that V49 residue is important for expression of the channel on the cell surface. The substitution of Y54 to any other aromatic residue (Y54W and Y54F) resulted in restoring the receptor function, unlike non-aromatic residues (Y54L) which points out the importance of aromatic residue at this position. Furthermore, the Y54A and Y54C receptor function was partially rescued by ivermectin, a positive allosteric modulator of P2X4 receptor, suggesting a rightward shift in the potency of ATP to activate the receptor. In the case of Q55 residue, no substitution restored the receptor function; the only rescue was made by treating Q55E with ivermectin. The F324L, F324Y, and F324W mutations also rescued receptor function partially or completely, ivermectin action on channel gating was preserved in all mutants, and changes in ATP responsiveness correlated with the hydrophobicity and side chain volume of the substituent. The G325P mutant had a normal response to ATP, suggesting that G325 is a flexible hinge. A topological analysis revealed that the G325 and F324 residues disrupt an ectodomain β -sheet upon ATP binding. These results indicate multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the P2X4 receptor function.

Podíl práce Miloše Rokiće v autorských publikacích

Publikace tvořící součást dizertační práce:

(1)

Rokic, M. B., Tvrdonova, V., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (2010) Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating. *Physiological Research*. 59, 927-935, (IF: 1,555)

Prováděl elektrofyziologická měření, buněčné kultivace a transfekce, podílel se na přípravě manuskriptu.

(2)

Rokic, M. B., Stojilkovic, S. S., Vavra, V., Kuzyk, P., Tvrdonova, V and Zemkova, H. (2013) Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor. *Plos One*. Accepted for publication, (IF: 4,092)

Prováděl elektrofyziologická měření, buněčné kultivace a transfekce, analýzu dat, připravil návrh manuskriptu a podílel se na dokončení jeho finální verze.

Publikace netvořící část dizertační práce:

(3)

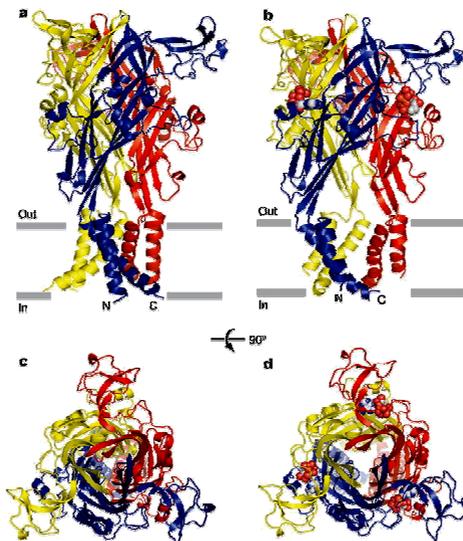
Nikolic, L., Rokic M., Todorovic, N., Kartelija, G., Nedeljko, M. and Zakrzewska, J. (2010) Effect of alternating the magnetic field on phosphate metabolism in the nervous system of *Helix pomatia*. *Biological Research*. 43, 243-250, (IF: 1.029)

Připravil vzorky, podílel se na měření NMR spektra mozkových ganglií hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*), podílel se na přípravě manuskriptu.

1. Úvod

Purinergní signalizace reprezentuje systém chemické komunikace mezi buňkami, která je zprostředkována extracelulárními purinovými a pyrimidinovými nukleotidy (Burnstock 1977; Burnstock 1986; Burnstock 2006; Burnstock 2011). Všudypřítomnost purinů a pyrimidinů v extracelulárním prostředí z nich dělá fyziologicky důležité signální molekuly (Burnstock 1977; Burnstock 1986; Burnstock 2006; Burnstock 2011; Khakh and North 2012). Purinergní receptory jsou transmembránové proteinové molekuly zodpovědné za fyziologické reakce spuštěné vazbou extracelulárních purinových nebo pyrimidinových nukleotidů a nukleosidů. Tyto receptory byly rozděleny do dvou skupin podle toho, který agonista se na receptory váže. P1 receptory jsou primárně aktivovány adenosinem, zatímco na P2 receptory se váže ADP nebo ATP (Abbracchio and Burnstock 1994). P2 receptory se dále dělí na metabotropní receptory označené jako P2Y receptory (P2Y) a ionotropní receptory značené jako P2X receptory (Burnstock 2006). P2X receptory jsou trimery (Nicke, Baumert et al. 1998). Byly naklonovány v polovině 90. let 20. století. P2X proteiny se skládají z 379 (P2X6) až 595 (P2X7) aminokyselinových zbytků. Sekvenční homologie mezi jednotlivými potkanými (*Rattus norvegicus*) P2X receptory se pohybuje v rozmezí 26 to 47%. Každá podjednotka receptoru se skládá ze dvou transmembránových domén (TM1 and TM2) spojených rozsáhlou extracelulární kličkou (Newbolt, Stoop et al. 1998). Ektodoména obsahuje pět disulfidických můstků, které jsou konzervované v celé savčí P2X rodině (Clyne, Wang et al. 2002; Ennion and Evans 2002). Tři podjednotky tvoří funkční kanál, který existuje v homomerní nebo heteromerní podobě (Nicke, Kerschensteiner et al. 2005). Vzorec aktivace P2X receptorů se liší mezi homomerními izoformami podle maximální proudové odpovědi a rychlosti desenzitizace. P2X4 receptor zebříčky Zebra fish (zfp2X4) byl vyřešen v rozlišení 3.1 Å (Kawate, Michel et al. 2009). Dále byl polypeptidový konstrukt zfp2X4 vykrytalizován v otevřeném i zavřeném statu (Hattori and Gouaux 2012). Struktury zfp2X4 receptoru s a bez navázaného ATP, Δ P2X4-C a Δ P2X4-B2 apo, byly vyřešeny v rozlišení 2.8 Å a 2.9 Å (Hattori and Gouaux 2012). Byla potvrzeno, že homotrimerní receptory mají kalichovitý tvar s velkou extracelulární kličkou vně membrány. Každá podjednotka má tvar podobný delfinu, kdy ocas delfinu reprezentuje transmembránové domény. Hlava delfinu reprezentuje strukturálně stabilní formu obsahující tři disulfidické můstky. Vyřešená struktura prokázala existenci pěti disulfidických můstků mezi konzervovanými cysteinovými reziduy. Tři můstky jsou přítomny v hlavové části (C119-C168, C129-C152, C135-C162; zfp2X4 číslování), jeden můstek je přítomen v oblasti hřbetní ploutve (C220-C230) a jeden je situován v dolní části těla delfína velmi blízko k vstupnímu portálu pro ionty. Mutagenese a elektrofyziologické studie u lidského P2X1 receptoru odhalily existenci disulfidických vazeb mezi všemi deseti cysteinovými reziduy (C117-C165, C126-C149, C132-C159, C217-C227 and C261-C270) (Ennion and Evans 2002). Obdobná avšak dřívější studie na potkaním P2X2

podtypu receptoru zjistila vazbu pouze mezi třema cysteinovými páry C115-C164, C214-C224 and C258-C266 (Clyne, Wang et al. 2002).



Obrázek č.1 Struktura zfp2X4 receptoru v zavřeném stavu (vlevo) a v otevřeném stavu po navázání ATP (vpravo). V navázaném stavu je patrné rozšíření oblasti bočních fenestrací lokalizovaných těsně nad plasmatickou membránou a také roztažení transmembránových domén (a, b). Související celkové rozšíření membránového póru ukazuje je zřejmé při kolmém pohledu na receptor z extracelulární strany (c, d). Vazebné místo pro ATP se nachází v oblastech mezi podjednotkami (b, d).

Struktura zfp2X4 receptoru rovněž ukázala přítomnost vestibulární prostory v extracelulární doměně, která se propojuje s okolním prostředím prostřednictvím tří fenestrací. Tyto byly původně označeny jako místa vstupu iontů do receptoru (Kawate, Michel et al. 2009), což bylo následně potvrzeno i funkčními studiemi. Vstup kationtů je usnadněn negativními aminokyselinovými zbytky E56 a D58 na povrchu struktury v oblasti fenestrací lidského P2X4 receptoru (Kracun, Chaptal et al. 2010; Kawate, Robertson et al. 2011; Samways, Khakh et al. 2011). Cysteinová skenovací mutagenese P2X1 receptoru v oblasti aminokyselin E52 až G96 rovněž ukázala, že všechny tyto mutantní varianty receptoru jsou funkční (Allsopp, El Ajouz et al. 2011), narodzil od P2X2 podtypu (Jiang, Rassendren et al. 2000; Kawate, Robertson et al. 2011). Oblast receptoru obsahující extracelulární vestibul byla rovněž studována s ohledem na její úlohu při aktivaci receptoru. Bylo ukázáno, že část nad druhou transmembránovou doménou, kterou tvoří aminokyseliny K313 až I333 je významná v přenosu signálu mezi ATP-vazebným místem a vlastním pórem kanálu (Yan, Liang et al. 2006).

2. HYPOTÉZY A CÍLE

Cílem této práce bylo zjistit úlohu konzervovaných cysteinových můstků a aminokyselinových zbytků v oblasti extracelulárního vestibulu ve funkci potkaního P2X4 receptoru.

Konkrétními cíli práce bylo:

1. Identifikovat jednotlivé cysteinové můstky v ektodoméně P2X4 receptoru, které jsou důležité pro jeho funkci, a dále poskytnout mechanistický výklad možných funkčních změn navozených eliminací těchto vazeb. Specifickým úkolem bylo rozlišit mezi funkční úlohou jednotlivých cysteinových residuí a úlohou existence disulfidických vazeb.
2. Identifikovat aminokyselinové zbytky v oblasti extracelulárního vestibulu, které jsou zásadní pro mechanismy otevírání kanálu, přenosu signálu z vazebného místa nebo rozšíření vlastního vestibulu. Dalším úkolem bylo popsat interakci identifikovaných residuí s jejich okolním mikro-prostředím ve stavu zavřeného a otevřeného kanálu.

3. MATERIÁL A METODIKA

V proteinu receptoru P2X4 byly molekulárně biologickými metodami vytvářeny bodové mutace, kdy byly cysteiny vyměňovány za alaniny. Receptor byl následně exprimován v buněčné linii lidských embryonálních ledvinných buněk č. 293 (HEK293T; *American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA*). Funkčnost receptoru byla prověřována elektrofyziologickým měřením a jeho exprese byla zkoumána pomocí konfokální mikroskopie a Western blotu.

3.1 Příprava bodových mutací

K mutacím byla použita potkaní forma genu kódujícího podjednotku P2X4 receptoru (rP2X4). K dispozici byla zeleným fluorescenčním proteinem (EGFP) značená cDNA kódující sekvence, (*GenBank accession no. NM 031594*; [63]), klonovaná ve vektoru pIRES2-EGFP (*Clontech, Mountain View, CA, USA*), a původní, neznačená forma rP2X4 [29], klonovaná taktéž ve vektoru pIERS2-EGFP. Použité vektory v sobě nesly rezistenci na kanamycin. Tyto kódující vektory byly poskytnuty laboratoří Dr. S. S. Stojilkoviče (*NIH, Bethesda, MD, USA*). Bodové mutace byly do proteinu vnášeny pomocí primerů nesoucích pozměněnou sekvenci při polymerázové řetězové reakci (PCR). Primery skládající se z 33-36 bází s mutovaným místem zhruba uprostřed byly objednávány u firmy VBC-Biotech (*Videň, Rakousko*). K vytvoření

směsi pro PCR byl použit kit QuikChange II site-directed mutagenesis (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*).

3.2 Pěstování buněk a transfekce

Buňky HEK293T 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*) při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% CO₂. Transfekce byla provedena 24 hod po nasazení buněk na sklička podle transfekčního protokolu jetPRIME (*Polyplus-transfection, Illkirch, Francie*).

3.3 Analýza exprese P2X4 receptorů

Buňky transfekované DNA EGFP-značených mutantních receptorů rostoucí na krycích skličkách pokrytých roztokem poly-L-lysinu byly slity z růstového média a dvakrát opláchnuty fosfátovým pufrům (PBS). Následovala fixace ve vychlazeném (-20°C) 100% metanolu na ledu. Po té byl metanol slit, vzorky ponechány do úplného osušení při pokojové teplotě a následně položeny na podložní skla lícem dolů do kapky montovacího média Vectashield (Vector Laboratories, UK). Membránová lokalizace byla ověřována pomocí laserová skenovací konfokální mikroskopie (Leica SP2 AOBF). Pro kvantifikaci membránově lokalizovaných receptorů byl použit biotinylační kit Pierce® Cell Surface Protein Isolation Kit, podle návodu výrobce (Thermo Scientific, Rockford, USA). Výsledkem značení byly membránová a celková proteinová frakce, v nichž byla přítomnost receptorových proteinů zjišťována imuno-detekční technikou western blot pomocí primárních anti-P2X4 protilátek (Alomone Labs, Israel) z králíka. Detekce byla provedena pomocí sekundární protilátky proti králíkovi konjugované s křenovou peroxidázou. Produkt chemiluminiscenční reakce navozené přidáním roztoku luminolu a peroxidázy byl detekován pomocí přístroje Luminescent Image Analyzer LAS-1000plus (Fuji Photo Film, Japan)

3.4 Elektrofyziologie

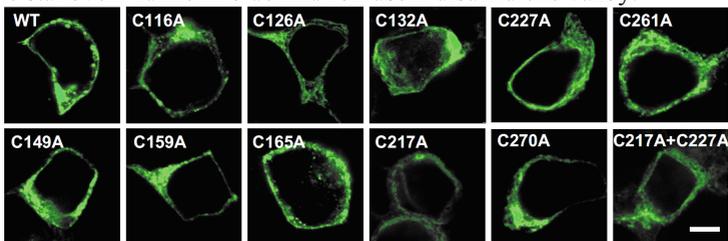
Elektrofyziologická měření byla prováděna patch-clamp technikou. Po celou dobu měření byly buňky udržovány v minimálním médiu bez séra, napodobujícím iontové prostředí uvnitř organismu (ECS), kterým byla snímací komůrka promývána s konstantní rychlostí asi 2 ml/min. Vodivé spojení s vnitřním prostorem buňky zajišťoval po protržení membrány vnitrobuněčný roztok (ICS) ve skleněné mikropipetě-elektrodě. Odpovědi byly stimulovány aplikačními roztoky s ATP o různé koncentraci, vždy po dobu 2-10s, 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. V některých experimentech byl účinek ATP aplikace měřen po předchozí inkubaci buněk v 3 mM Ivermektinu trvající po dobu 2 až 6 minut. 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. 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). Data koncentrační závislosti velikosti odpovědi byla fitována troj-parametrickou rovnicí s použitím programu SigmaPlot. Výsledkem fitování bylo určení hodnot EC50 a Hillova koeficientu. Kinetika doznívání proudových odpovědí způsobených odmyváním agonisty, neboli deaktivace, byla fitována jednoduchou exponenciální funkcí, rovněž pomocí programu SigmaPlot. Všechny numerické hodnoty v textu jsou prezentovány jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka rozptylu (SEM). Signifikantní rozdíly byly určeny na hladině 5% a 1% ($p^{**} < 0.05$ respektive $p^* < 0.01$).

4. VÝSLEDKY

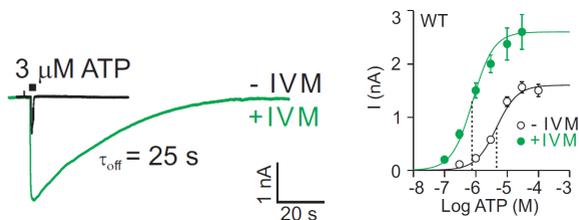
4.1 Úloha disulfidických vazeb pro funkční aktivitu a membránovou expresi potkaního P2X4 receptoru

Úloha disulfidických vazeb potkaního P2X4 receptoru byla studována měřením funkčních vlastností série mutantních receptorů, u kterých byly jednotlivé cysteinové zbytky, či případně konkrétní cysteinové páry tvořící disulfidickou vazbu, nahrazeny za alaninové anebo threoninové zbytky. U každého mutantního receptoru byla nejdříve analyzována míra jeho membránové exprese pomocí genetického označení zeleným fluorescenčním proteinem (EGFP). Fluorescenční signál EGFP byl u všech studovaných konstruktů převážně lokalizován v oblasti plasmatické membrány (viz Obrázek č. 2). Mutantní receptory s náhradou cysteinových párů za threoniny byly použity ke stanovení funkčního účinku rozrušení disulfidické vazby.



Obrázek č. 2. Membránová exprese původního typu (WT) a mutantních verzí potkaního P2X4 receptoru v buněčné linii HEK293T.

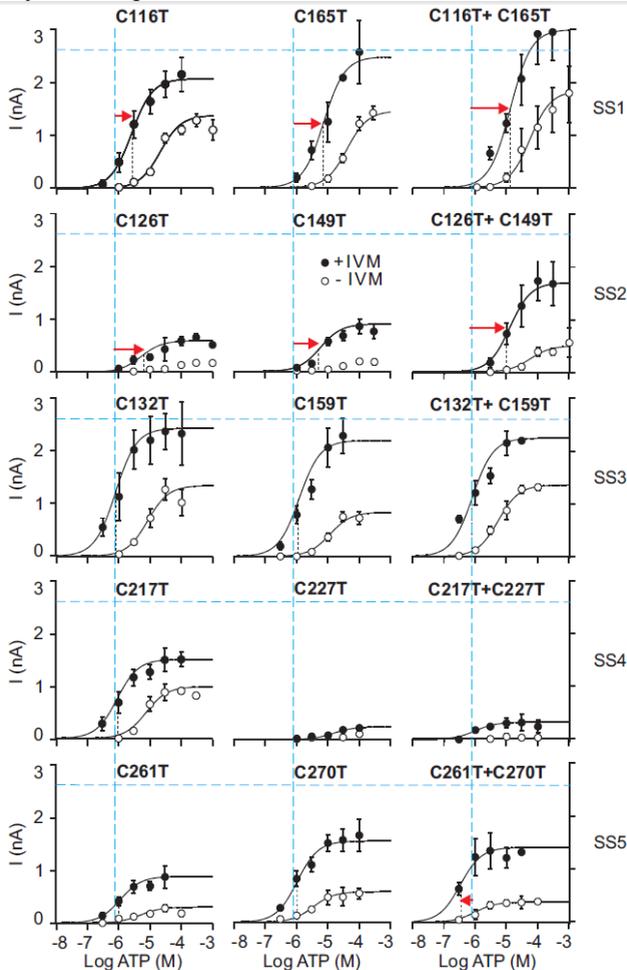
Jako nástroj pro zvýraznění funkčních rozdílů mezi jednotlivými konstrukty jsem používal látku ivermektin (IVM), jenž je znám jako pozitivní alosterický modulátor P2X4 receptorů. U původního typu (WT) P2X4 receptoru ivermektin vyvolává tři druhy funkčních změn: zvyšuje citlivost receptoru k ATP, což je patrné ze snížení hodnoty EC_{50} ; zvyšuje hodnotu amplitudy ATP-vyvolaného membránového proudu I_{max} ; a zpomaluje kinetiku deaktivace receptoru, což se projevuje navýšením koeficientu τ_{off} (viz. Obrázek č. 3).



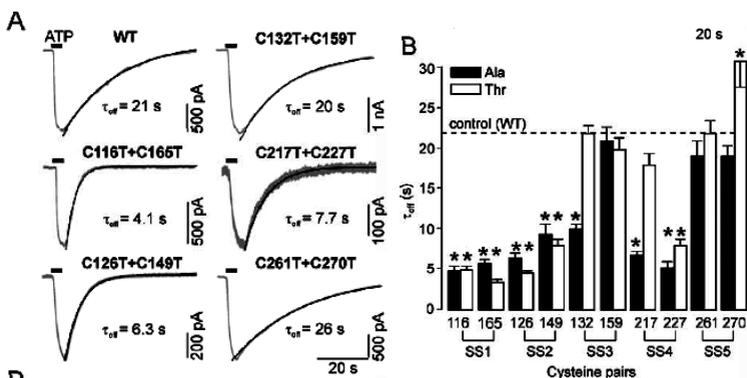
Obrázek č. 3. Účinek ivermektinu (IVM) na ATP-odpověď P2X4 WT receptoru v HEK293T buňkách. Levá část obrázku znázorňuje efekt IVM na maximální velikost (I_{max}) a čas deaktivace (τ_{off}) proudové odpovědi vyvolané aplikací 3 μM ATP. Vpravo je vykreslena křivka závislosti velikosti membránového proudu na koncentraci ATP v přítomnosti (plné symboly) a absenci (prázdné symboly) 3 μM IVM. Vertikální čerchované čáry ukazují polohu hodnot EC_{50} .

Dvojíтый threoninový mutant prvního cysteinového páru SS1 (C116-C165) vykazoval zhoršení schopnosti ATP otevřít membránový kanál, což se odrazilo na zvýšení jeho hodnoty EC_{50} vůči WT. Ivermektin dále způsobil výrazné zrychlení deaktivace kanálu, avšak nebyla pozorována změna v hodnotě maximálního proudu (I_{max}). Taktéž nahrazení druhého cysteinového páru SS2 (C126-C149) za threoniny způsobilo posun koncentrační křivky ATP směrem doprava, a dále navýšilo hodnotu maximálního proudu I_{max} . Tento efekt byl částečně potlačen působením Ivermektinu. Navýšení hodnoty maximální proudové odpovědi působením Ivermektinu bylo u tohoto mutantu vyšší než u WT receptoru. Nahrazením třetího cysteinového páru SS3 (C139-C159) threoninovými zbytky nezpůsobilo změnu v žádné ze sledovaných vlastností. Záměna čtvrtého cysteinového páru SS4 (C217-C227) vedla k úplné ztrátě funkce receptoru, která nebyla zachráněna ani inkubací s Ivermektinem. Tento efekt naznačuje kritický význam těchto cysteinových zbytků, jednotlivých aminokyselin i celého páru, pro funkci potkaního P2X4 receptoru. Čtvrtý cysteinový pár je umístěn v oblasti spodní části ektodomény, na niž jsme se soustředili v navazujících pokusech. Tato oblast receptoru představuje přechod mezi ektodoménou a transmembránovými doménami a vytváří tzv. extracelulární vestibul. Hodnota časové konstanty deaktivace v přítomnosti Ivermektinu byla u SS4 mutantního receptoru signifikantně snížena. Také nahrazení pátého páru SS5 (C261-C270) za threoniny vyvolalo snížení velikosti amplitudy proudové odpovědi. Působením

Ivermektinu se částečně podařilo proudové hodnoty zpětně navýšit. Míra tohoto navýšení působením Ivermektinu byla významně vyšší než u WT receptoru a hodnota EC_{50} byla mírně posunuta k nižším hodnotám.



Obrázek 4. Křivky závislosti odpovědi na podané dávce ATP pro jedno- a dvoubodové threoninové mutace P2X4 receptoru. Velikost proudové odpovědi závislá na koncentraci podaného ATP u jednobodových mutací (levý a střední panel) a dvoubodových mutací (pravý panel) je pro všech pět disulfidových můstků ukázána bez IVM (prázdná kolečka) a při aplikaci 3 μ M IVM (plná kolečka). Na každém řádku je pár cysteinových mutací, které formují cystinový můstek (SS1-5). Svislé a vodorovné čárkované linie (modře) ukazují hodnoty divokého typu receptoru pro EC_{50} a I_{max} při aplikaci 3 μ M IVM. Svislé tečkované linie označují hodnoty EC_{50} threoninových mutantů v přítomnosti IVM a červené šipky pak významné změny těchto hodnot vůči WT.



Obrázek 5. Vliv rozbití cystinové vazby na kinetiku deaktivace P2X4 receptoru v přítomnosti IVM.

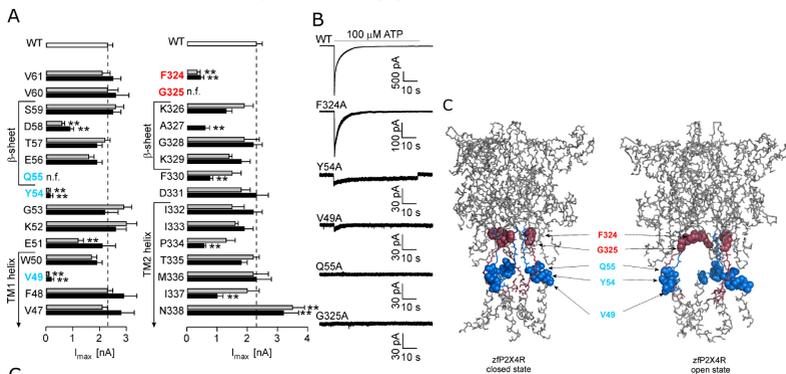
(A) Vzorky záznamu měření z dvoubodových mutací ukazují rozdíly v návratu receptoru po odmytí ATP. Všechny záznamy byly nahrávány při aplikaci 3 μ M IVM trvající 4-6 minut za použití nedesenzitizující koncentrace ATP (1-3 μ M pro SS1-3 a SS5, a 30 μ M pro SS4). Číslo pod křivkou je časová konstanta deaktivace (τ_{off}). (B) Srovnání vlivu IVM na časovou konstantu deaktivace (τ_{off}) pro alaninové (plně sloupečky) a threoninové (prázdné sloupečky) jednobodové mutace formující cystinové můstky SS1-5.

Stejně jako dvoubodové mutace SS1 můstku, tak i jednobodové alaninové a threoninové mutace cysteinů 116 a 165 vykazují signifikantní pokles citlivosti k ATP a to bez IVM i v jeho přítomnosti, aniž by byla změněna I_{max} . Tyto změny, které jsou spojeny i s rychlejší deaktivací po aplikaci IVM, indikují, že přerušení můstku SS1 je zodpovědné výhradně za snížení citlivosti receptoru k ATP. Tři jednobodové mutace v můstku SS2, C126T, C149A a C149T, měly mnohem nižší maximální proudovou amplitudu ve srovnání s dvoubodovou mutací SS2 a mutací C126A, zatímco hodnoty EC_{50} v nepřítomnosti IVM nebylo možné určit. Při podání IVM reagovaly alaninové a threoninové mutace cysteinů 126 a 149 v citlivosti k ATP podobně jako dvoubodový mutant; posun EC_{50} doprava byl spojen s rychlejší deaktivací a násobné zvýšení maximálních proudových odpovědí bylo mnohem výraznější u všech jednobodových mutací než u divokého typu. Funkce receptoru nebyly nijak viditelně zasaženy u mutací C132T, C159A a C159T, což potvrzuje, že přerušení můstku SS3 samo o sobě nemá specifický efekt na funkci P2X4 receptoru. Mimoto mutace C132A vykazovala signifikantně nižší proudové odpovědi na ATP, zvýšenou EC_{50} a rychlejší deaktivaci. Devastující efekt nahrazení cysteinového páru v můstku SS4 threoniny odrážely i jednotlivé mutace – C217A, C227A a C227T; tyto mutace vykazovaly nízkou citlivost k ATP nebo vůbec žádnou a funkce receptoru se nepodařilo navrátit ani za pomoci působení IVM. Naproti tomu velikost proudové odpovědi a citlivost k ATP nebyla zasažena výměnou cysteinu na pozici 217 za threonin. Vytvořili jsme také mutace C217L, C217E a C227R, ale ani jedna z těchto mutací nebyla funkční. Až mutace C217R byla funkční s hodnotami blízkými pro divoký typ. U šesti z osmi jednobodových mutací můstku SS4 byla signifikantně

snížená hodnota I_{\max} . Na toto snížení nemá pravděpodobně vliv přenos receptoru do membrány, protože dvoubodový alaninový mutant můstku SS4 v membráně přítomen byl. Stejně jako u dvojmutanta, tak i pro C217A, C227A a C227T sice nebylo možné určit hodnotu EC_{50} v přítomnosti IVM, ale bylo možné zjistit rychlost deaktivace. Jejich nízká hodnota τ_{off} indikuje, že ty to mutantní formy P2X4 receptoru mají sníženou citlivost k ATP. Rychlost deaktivace u mutací C217T a C217R je srovnatelná s divokým typem receptoru. Snížení proudové odpovědi bylo pozorováno v buňkách exprimujících dvojmutaci můstku SS5, stejně jako u jednobodových mutací C261T, C270T a C270A, kde byl také efekt IVM na I_{\max} mnohem vyšší než u WT. Žádné změny v citlivosti k ATP nebyly pozorovány u jednobodových mutací SS5 můstku a deaktivací konstanta mutace C270T byla ve srovnání s WT vyšší. Naproti tomu mutace C261A byla plně funkční.

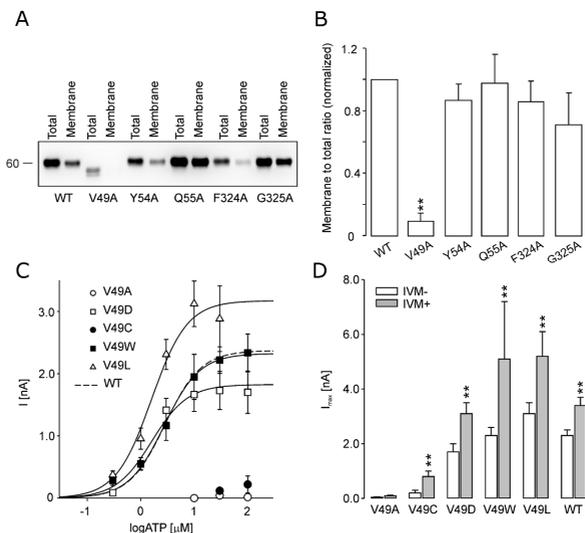
4.2 Úloha aminokyselinových zbytků formujících extracelulární vestibul ve funkci P2X4 receptoru

Obě, alaninová i cysteinová, skenovací analýza byly provedeny kvůli adekvátnímu srovnání s pracemi publikovanými dříve: (Stoop, Thomas et al. 1999; Jiang, Rassendren et al. 2001; Jiang, Kim et al. 2003; Li, Chang et al. 2008; Kawate, Robertson et al. 2011; Samways, Khakh et al. 2011). Nahrazení pěti reziduí (V49, Y54, Q55, F324 a G325) alaninem či cysteinem měl za následek vznik málo funkčního nebo nefunkčního receptoru vykazujícího proudy nižší než 20% WT a mimo mutace v bodě 324 nebylo možné jejich EC_{50} určit.



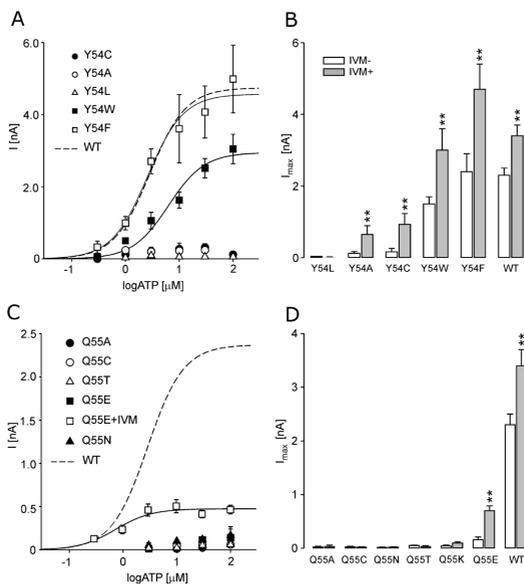
Obrázek 6. Vliv alaninových a cysteinových jednobodových mutací na maximální amplitudu proudu. (A) Alaninová a cysteinové skenovací analýza aminokyselinových zbytků v oblasti V47-V61 a F324-N338, což zahrnuje i horní část transmembránových domén a v otevřeném stavu β -listy. Graf ukazuje maximální amplitudu proudu vyvolaného ATP (I_{\max}) u divokého typu (WT; bílé sloupce), cysteinových (tmavé sloupce) a alaninových (šedé sloupce) mutantních receptorů. Nejvíce byly funkce receptoru zasaženy u mutací v pozici V49, Y54, Q55 (modře) a F324 a G324 (červeně). (B) Odpověď vyvolaná aplikací 100 μM ATP u WT a výrazně zasažených alaninových mutací P2X4 receptoru. (C) Umístění slabě odpovídajících aminokyselinových zbytků v modelu zP2X4R v apo-uzavřeném stavu (vlevo) a

otevřeném stavu s navázaným ATP (vpravo); mutovaná oblast je označena modře a červeně, zasažené aminokyseliny (rP2X4 číslování) pak modřými a červenými balíčky.



Obrázek 7. Membránová exprese slabě odpovídajících alaninových mutací a funkční charakterizace pro V49 a mutace této aminokyseliny. (A) Western blot ukazuje expresi na povrchu buňky u divokého typu P2X4 receptoru a mutací -V49A, Y54A, Q55A, F324A a G325A. (B) Densitometrická kvantifikace pro poměr mezi membránovým a celkovým výskytem pěti málo aktivních mutací. (C) Křivky závislosti proudové odpovědi na koncentraci podaného ATP pro různé mutace v místě V49. (D) Zvýšení maximální proudové odpovědi po aplikaci ivermektinu u různých mutací V49.

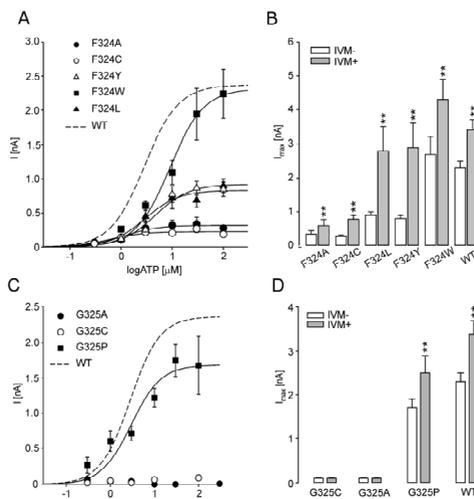
Mutace V49A nebyla vůbec či jen velmi málo exprimovaná na povrchu buňky, ačkoli další mutace exprimovány, v různém množství, byly. Ztráta funkce receptoru s mutací V49A je tak odrazem jeho neschopnosti exprimovat se na povrch buňky. V kontrastu k tomu mutace V49A, V49C ani žádná nepolární (V49L, V49W) či negativně nabitá mutace podobné velikosti (V49D) nezměnila nijak signifikantně funkci receptoru ve srovnání s divokým typem. Mutace Y54 za alanin či cystein měly velmi nízkou aktivitu, jejich proudovou odpověď ale bylo možné navýšit aplikací IVM. Citlivost k ATP byla tady u těchto mutací snižena a funkčnost receptoru bylo možné částečně obnovit pomocí IVM, které zvyšuje frekvenci otevírání kanálu (Priel and Silberberg 2004) a zvyšuje citlivost k ATP. (Khakh, Proctor et al. 1999). Funkce receptoru byla plně obnovena výměnou Y54 za fenylalanin či tryptofan, ale ne za leucin, což indikuje, že aromatická aminokyselina na pozici 54 je nepostradatelná pro funkci P2X4 receptoru.



Obrázek 8. Efekt mutací Y54 a Q55 na funkci P2X4 receptoru.

(A) Křivky závislosti proudové odpovědi na podané koncentraci ATP pro WT a mutace v místě Y54. (B) Hodnoty I_{\max} pro WT a mutace Y54 v přítomnosti (šedé sloupce) i bez podání (bílé sloupce) IVM. (C) Křivky závislosti proudu na podané koncentraci ATP pro WT a mutace v místě Q55. (D) Hodnoty I_{\max} pro WT a mutace Q55 v přítomnosti (šedé sloupce) i bez podání (bílé sloupce) IVM.

Výměna aminokyseliny Q55 za jinou s podobnou strukturou či chemickými vlastnostmi neobnovila funkci receptoru. Funkce receptoru s mutací Q55E byla částečně obnovena použitím IVM, ačkoli toto nebylo u ostatních mutací. Je tedy opodstatněné uzavřít, že výměna konzervovaných aminokyselin Y54 a Q55 nad TM1 za alanin či cystein způsobuje silnější snížení citlivosti k ATP než u mutací v pozici 49. Mutace F3324A a F324C vykazují významné snížení proudových odpovědí, přičemž použití IVM tyto proudy zvyšuje na úroveň srovnatelnou s WT. Hodnota EC_{50} a časová konstanta deaktivace u F324A je také blízká WT. Mutace F324 za jinou nepolární (F324L, F324W) nebo aromatickou (F324Y) aminokyselinu částečně či plně obnovuje funkce P2X4 receptoru. U mutantů F324 byla zjištěna lineární korelace mezi $\log EC_{50}$ a konstantou hydrofobicity a také mezi EC_{50} a velikostí postranního řetězce aminokyseliny. Z těchto dat vyplývá, že spíše než aromaticita, je na pozici 324 podstatná pro správnou funkci receptoru hydrofobicita a velikost řetězce aminokyseliny.



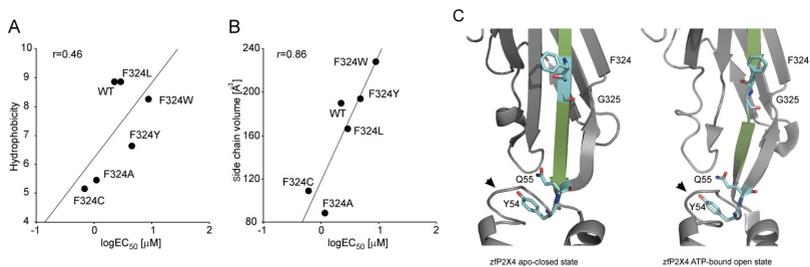
Obrázek 9: Vliv mutací F324 a G325 na funkci rP2X4 receptoru.

(A) Křivky závislosti proudové odpovědi na podané koncentraci ATP pro WT a mutace v místě F324. (B) Hodnoty I_{max} pro WT a mutace F324 v přítomnosti (šedé sloupce) i bez podání (bílé sloupce) IVM.

(C) Křivky závislosti proudové odpovědi na podané koncentraci ATP pro WT a mutace v místě G325.

(D) Hodnoty I_{max} pro WT a mutace G325 v přítomnosti (šedé sloupce) i bez podání (bílé sloupce) IVM.

Mutace G325A a G325C nebyly aktivní ani s použitím IVM. Mutace G325P měla EC_{50} a I_{max} srovnatelné s divokým typem receptoru. Navíc tato mutace vykazovala srovnatelný stupeň navýšení odpovědi receptoru při aplikaci IVM. Aminokyseliny G325 a F324 se nacházejí v blízkosti zlomového bodu na β -listu, který se objevuje v otevřeném stavu P2X4 receptoru. Tato data indikují, že když receptor podléhá aktivaci vyvolaným změnám struktury, G325 můžou fungovat jako „pant“.



Obrázek 10: Vliv hydrofobicity a velikosti aminokyseliny na pozici 324 pro aktivaci receptoru skrze ATP a umístění F324 a G325 v molekule receptoru. (A a B) Korelace mezi hodnotami EC_{50} a hydrofobní konstantou (A) či velikostní konstantou (B) bočního řetězce aminokyselin. (C) Oba aminokyselinové zbytky, F324 a G325, se nacházejí uvnitř β -listu spojujícím ATP-vazebné místo a pór (zeleně) receptoru v modelu zP2X4 v apo-uzavřeném stavu (vlevo) a vně β -listu ve stavu s navázaným ATP (vpravo); rP2X4

číslování. Všimněme si také stabilní pozice aminokyselin Y54 a Q55 a konzervovaného složení proteinu nad TM1 (šipka) v obou, uzavřeném i otevřeném, stavech.

5. DISKUSE

Předcházející studie zabývající se tématem disulfidických vazeb P2X receptorů se soustřeďovaly hlavně na identifikaci cysteinových párů v ektodoméně savčích P2X receptorů. Uspořádání vazeb bylo poprvé identifikováno u P2X2 receptoru pro SS1, SS4 a SS5 páry (Clyne, Wang et al. 2002), jiná studie zaměřená na P2X1 receptor identifikovala uspořádání všech pěti SS párů (Ennion and Evans 2002). Naše studie ukázala, že narušením SS1, SS2 a SS4 vazeb náhradou obou cysteinů za treoniny vznikly receptory méně citlivé na ATP. Všechny čtyři jednobodové mutace SS1, tři ze čtyř jednobodových mutací SS2 a šest z osmi jednobodových mutací SS4 měly podobný účinek. Mutace SS4 cysteinových zbytků vyvolaly nejvýraznější změny ve funkci receptoru. Pro SS4 dvojmutací a šest jednobodových mutací hodnota EC_{50} nemohla být určena, ale amplituda proudu byla dostatečná k tomu, aby mohla být určena časová konstanta deaktivace v přítomnosti IVM. Protože existuje významná korelace mezi hodnotou EC_{50} pro ATP a rychlostí deaktivace receptoru v přítomnosti IVM (Zemkova, Yan et al. 2007), bylo možné z toho odvodit, že tyto SS4 mutanty mají sníženou citlivost k ATP. Mutace P2X1-C217A a P2X1-C227A byly plně funkční, ale nejméně citlivé k ATP mezi všemi deseti alaninovými mutacemi (Ennion and Evans 2002). Mutace P2X2-C224A v oocytech byla nefunkční, zatímco mutace C214A měla nižší citlivost k ATP. Dále se ukázalo, že hodnota I_{max} byla pro obě SS4 mutace významně snížena, dokonce nebyla detekovatelná když byl P2X2 receptor vložen do HEK buněk (Clyne, Wang et al. 2002). Dvojmutace SS5 a tři ze čtyř jednobodových mutací P2X4 receptoru měly nízkou hodnotu I_{max} a EC_{50} podobnou hodnotě u WT receptoru. Jejich rychlosti deaktivace v přítomnosti IVM byly také srovnatelné s hodnotami pozorovanými u kontrol, jasně dokazující, že jejich citlivost k ATP nebyla pozměněna. Citlivost SS5 A-mutantů u P2X1 a P2X2 receptoru nebyla také změněna a hodnoty I_{max} byly signifikantně nižší. Dříve se předpokládalo, že transport P2X1 receptoru do plazmatické membrány je narušen rozbitím SS5 vazby, a že tím dochází ke snížení hodnoty I_{max} (Ennion and Evans 2002). Naše výsledky ukazují, že nižší hodnoty I_{max} nalezené pro čtyři z pěti SS5 mutací by mohly být způsobeny jejich důležitou úlohou v mechanismu otevírání kanálu, a ukazovaly by na to, že uvedené mutace preferují uzavřený stav iontového kanálu. Rozdílné výsledky nalezené pro SS5-P2X1 a P2X4 mutace jsou pravděpodobně dány receptorově specifickými potřebami SS vazeb pro určitou funkci. V souladu s tím, u P2X1 není žádná z těchto vazeb individuálně nezbytná pro funkci receptoru, a několik dvojmutací zasahujících vazby SS2 a SS3 bylo funkčních (Ennion and Evans 2002). Avšak u P2X2 jsou vazby SS1-4 individuálně nezbytná pro správnou funkci receptoru (Ennion and Evans 2002). Naproti tomu, funkce P2X4 receptoru nebyla změněna u SS3 dvojmutace ani u tří ze čtyř jednobodových

mutací, což jasně ukazuje, že SS3 není klíčová pro funkci P2X4 receptoru. Expresní systém by také mohl hrát svou roli ve funkci receptoru. Například, na rozdíl od výsledků prezentovaných v této naší práci, každá z deseti cysteinových mutací P2X4 receptoru v oocytech vytvářela velký proud (>50 % proudu WT receptoru), a hodnoty EC₅₀ pro mutace C132A a C217A byly srovnatelné s hodnotami pro WT-P2X4 receptor (Yi, Liu et al. 2009). Také mutace P2X2-C258A byla prakticky nefunkční, pokud byl receptor zabudován v HEK buňkách, ale vytvářel větší proud, když byl exprimován v oocytech (Clyne, Wang et al. 2002). Výsledky prezentované v této dizertační práci také ukázaly, že ne všechny jednobodové SS mutace se chovají podobně a srovnatelně jako dvojmutace. Například v buňkách s mutací C132A bylo pozorováno snížení citlivosti k ATP a pokles I_{max}, zatímco v buňkách nesoucích SS3 dvojmutaci nedošlo k žádné změně funkce receptoru, a stejně tak tomu bylo i u tří dalších jednobodových mutací: C132T, C159A a C159T. Podobně nebyla funkce receptoru zasažena, když byl cystein C217 nahrazen threoninem nebo argininem. Také mutace C261A měla vlastnosti podobné jako WT receptor, na rozdíl od dvojmutace a tří jednobodových SS5 mutací. Tyto výsledky ukázaly, že jednotlivé cysteiny tvořící můstek nebo jejich substituenty mohou také hrát roli ve funkci receptoru nezávisle na ztrátě můstku, pravděpodobně vytvořením nových interakcí, které mohou poškodit nebo také zachránit strukturu kanálu nezbytnou pro vazbu agonisty anebo gating iontového kanálu. V souladu s tímto závěrem je skutečnost, že eukaryotní organizmus *Ostreococcus* vůbec nemá SS4 můstek, a *Dictyostelium* nemá SS4 a SS5 můstky (Jarvis and Khakh 2009; Surprenant and North 2009); ovšem vysoká koncentrace agonisty je potřeba k aktivaci těchto receptorů. Lze tedy na závěr říci, že vznik SS4 a SS5 můstků byl důležitý krok v evoluci P2X proteinů. Krystalová struktura P2X4 receptoru zebříčky (Kawate, Michel et al. 2009; Hattori and Gouaux 2012) nám pomohla do jisté míry vysvětlit specifickou úlohu SS1-5 disulfidických můstků ve funkci P2X4 receptoru. Dlouhá klička tvořená 13 aminokyselinami a vycházející od cysteinu 165 by mohla inhibovat vazbu ATP tím, že zakryje vazebné místo pro ligand, je-li uvolněna po rozbití SS1 můstku. Rozbití SS2 můstku by mohlo změnit tvar nebo velikost ATP vazebné kapsy, a také styčnou plochu mezi hlavou a tělem receptoru. Druhá dlouhá klička tvořená 14 aminokyselinami, zadní ploutev, nacházející se před cysteinem C217 by mohla hrát podobnou roli na protější straně předpokládaného ATP vazebného místa, pokud by byla uvolněna přerušením SS4 můstku. Devastující účinek dvojmutace SS4 na funkci receptoru lze vysvětlit změnami na styčné ploše mezi levou ploutví a hřbetní ploutví, které mohou ovlivnit interakci mezi podjednotkami receptoru a tak i přenos signálu z ATP vazebného místa do póru. Toto rozhraní je jedním ze tří hlavních kontaktů mezi podjednotkami, které jsou považovány za důležité pro funkci receptoru. (Kawate, Michel et al. 2009). Můstek SS5 se nachází relativně daleko od vazebného místa pro ATP, ale blízko extracelulárního vestibulu nad TM doménami, což podporuje jeho úlohu v otevírání kanálu a správném přenosu signálu z ATP vazebného místa do póru.

Právě proto se další část této dizertační práce zabývala vysvětlením funkční úlohy aminokyselin, které tvoří extracelulární vestibul potkaního P2X4 receptoru. Výsledkem předkládané práce je identifikace pěti aminokyselin, z extracelulárního vestibulu, které jsou nezbytné pro funkci receptoru: V49, Y54, Q55, F324 a G325. Tyto aminokyselinové zbytky se nacházejí také u zřP2X4 receptoru a mezi savčími P2X receptory jsou úplně konzervované zbytky Y54, Q55 a G325, zbytek V49 se nachází u pěti receptorů a F324 není konzervován napříč P2X podtypy. Zjistili jsme, že transport receptoru v buňce byl významně porušen při mutaci aminokyseliny V49, ale ne jiné aminokyseliny. Navíc mutace V49D byla zcela funkční, třebaže mohly vzniknout silné odpudivé síly mezi karboxylovým postranním řetězcem aspartátu a negativně nabitými fosfolipidy. Stejně tak mutace V49W nezměnila fungování receptoru (Silberberg, Chang et al. 2005), třebaže se tím nahromadily objemné aminokyseliny v této části TM1 helixu (F48-W49-W50) a mohlo dojít k destabilizaci helixu. Mutace rezidua V50 v receptoru P2X2 je také funkční (Li, Migita et al. 2004; Khakh and Egan 2005). Tyto výsledky ukázaly, že aminokyselina V49 hraje roli v transportu rP2X4 receptoru na povrch buňky, spíše než by destabilizovala jeho zakotvení v membráně nebo ovlivnila gating iontového kanálu. Dřívější studie prováděné na receptoru P2X2 také ukázaly, že mutace Y54C a Q55C (rP2X4 číslování) nevytvořily funkční kanály (Jiang, Rassendren et al. 2001; Kawate, Robertson et al. 2011), ale obě studie neposkytly žádné vysvětlení pro tento účinek. Cysteinová skenovací mutagenese sekvence aminokyselin E52-G96 v lidském P2X1 receptoru ukázala, že všechny mutanty této části extracelulárního vestibulu jsou funkční, existuje tedy podjednotkově specifické rozdíly ve schopnosti receptoru tolerovat Q55 a Y54 mutace (Roberts and Evans 2006; Allsopp, El Ajouz et al. 2011). Jiné polární nebo nabitě residuum v pozici Q55 nebylo schopné obnovit funkci receptoru, zatímco mutace Y54F a Y54W odpovídaly na ATP, což ukázalo na důležitost přítomnosti aromatického rezidua v pozici 54. Funkci mutací Y54A/C-P2X4 bylo možné částečně obnovit po aplikaci IVM, stejně tak i funkci Q55E-P2X4 receptoru. IVM usnadňuje otevírání kanálu a způsobuje posun křivky koncentrační závislosti receptoru doleva a zvyšuje jeho citlivost k ATP (Khakh, Proctor et al. 1999), lze proto předpokládat, že residuum Y54 se uplatňuje v procesu gating iontového kanálu. Je zajímavé, že stabilní proteinová smyčka se objevuje ve vzdálenosti 7 Å od Q55 a Y54 residuí jak v otevřeném, tak uzavřeném stavu kanálu (Hattori and Gouaux 2012). Znamená to, že struktura smyčky v blízkosti Q55 residua musí být zachována jak v otevřeném tak i uzavřeném stavu, má-li být kanál funkční. Dále jsme ukázali, že tzv. "stacking" interakce jsou pravděpodobně důležité pro funkci Y54 mutantů, protože v této pozici musí být aromatické residuum, aby receptor mohl fungovat. Možnými partnery pro tyto interakce s Y54 jsou F48 z TM1 a F330 z TM2 téže podjednotky. V souladu s touto hypotézou bylo pozorováno významné snížení I_{max} u mutace F330C. Residuum G325 receptoru rP2X4 bylo identifikováno jako funkčně důležité, protože obě mutace G325A a G325C byly necitlivé k ATP. Mapováním G325 ve struktuře otevřeného stavu receptoru zřP2X4

bylo zjištěno, že β -list nad TM2, spojující ATP vazebnou doménu s pórem kanálu, je zlomený v místě G325, ale není tomu tak v uzavřeném stavu, kde je zachována lineární celistvost tohoto β -listu (Hattori and Gouaux 2012). Obnovení receptorové funkce u G325P mutace jasně ukazuje na důležitost této oblasti, protože náhrada prolinem vytváří zlom β -listu nad TM2. Třebaže je residuum G325 konzervované napříč P2X receptory, má klíčovou úlohu pro funkci jen a pouze u P2X4 receptoru. U receptoru P2X1 je ekvivalentní mutace G321C normální (Digby, Roberts et al. 2005), ale má modifikované odpovědi na ATP v přítomnosti MTS redukčních činidel (Roberts and Evans 2007). Jiná studie na rP2X2 receptoru ukázala, že mutace H319C a G320C (analogické F324C a G325C mutacím P2X4 receptoru) jsou plně funkční (Rassendren, Buell et al. 1997; Kawate, Robertson et al. 2011). Cysteinové a alaninové mutace residua F324 u P2X4 receptoru měly významně snížený I_{\max} , což bylo nalezeno také ve studii jiných autorů (Popova, Asatryan et al. 2010), ale funkce byla částečně obnovena u mutací F324L, F324Y, a F324W. Nalezená korelace mezi hodnotou EC_{50} a hydrofobicitou daného substituenta F324 naznačuje, že velikost residua a jeho schopnost vytvářet hydrofobní interakce jsou důležité pro funkci P2X4 receptoru.

6. ZÁVĚRY

Pomocí molekulárně biologických a elektrofyziologických technik bylo řešeno několik otázek strukturně-funkčních vztahů u potkaního P2X4 receptoru. Tato dizertační práce objasnila důležitost konzervovaných cysteinů ektodomény a SS1-5 disulfidických můstků pro funkci receptoru a identifikovala aminokyseliny extracelulárního vestibulu, které jsou nezbytné pro otevírání receptorového kanálu, rozšíření vestibulu a transport receptoru do plazmatické membrány. Konkrétně v této práci bylo nalezeno:

1. Rozbití SS3 můstku nemělo žádné následky na fungování P2X4 receptoru, zatímco rozbití SS4 a SS5 můstků významně zasáhlo do funkce P2X4 receptoru, což ukazuje důležitost těchto disulfidických vazeb pro receptorové funkce.
2. Rozbití SS1 a SS2 vazeb, a do jisté míry také SS4, změnilo citlivost receptoru k ATP, a tento účinek naznačoval, že tím došlo k narušení celistvosti ATP vazebné kapsy. SS5 můstek je důležitý pro zachování mechanismu otevírání kanálu a pravděpodobně také pro převod signál z ATP vazebného místa k transmembránovému póru.
3. Skenovací mutagenese reziduí tvořících extracelulární vestibul vedla k identifikaci pěti klíčových aminokyselinových zbytků nezbytných pro fungování P2X4 receptoru: V49, Y54, Q55, F324 a G325. Pouze V49 byl shledán důležitým pro transport receptoru z endoplazmatického retikula do plazmatické membrány.
4. Sousedící rezidua Q55 a Y54 jsou důležitá pro otevírání iontového kanálu, pravděpodobně svojí strukturou udržují transmembránové domény správně orientované k ose.
5. Rezidua F324 a G325 jsou pravděpodobně důležitá pro rozšíření extracelulárního vestibule, což je důležitý předpoklad pro vstup iontů do otevřeného iontového kanálu. F324 také může zastávat funkci aminokyseliny hrající roli v plnění vnitřního prostoru vestibulu a zamezující přílišné roztažení vestibulu.

1. INTRODUCTION

Purinergic singling represents the system of chemical communication between cells mediated by the extracellular purine and pyrimidine nucleotides (Burnstock 1977; Burnstock 1986; Burnstock 2006; Burnstock 2011). The omnipresence of purines and pyrimidines in extracellular environment makes them physiologically important signaling molecules (Burnstock 1977; Burnstock 1986; Burnstock 2006; Burnstock 2011; Khakh and North 2012). Purinergic receptors are transmembrane protein molecules responsible for triggering physiological responses to purine or pyrimidine nucleotides and nucleosides in the extracellular environment. These receptors have been categorized into two groups in respect to which agonist they bind. P1 receptors are activated primarily by adenosine while P2 receptors are involved in binding ADP or ATP (Abbracchio and Burnstock 1994). P2 receptors exist as metabotropic receptors designated as P2Y receptors (P2Y) and ionotropic receptors (ionic channels) designated as P2X receptors (Burnstock 2006). P2X receptors are trimeric proteins (Nicke, Baumert et al. 1998) which were cloned in the mid 1990s. The corresponding proteins consist of 379 (P2X6) to 595 (P2X7) amino acid residues. The sequence homology between the receptors in the rat (*Rattus norvegicus*) is ranging from 26 to 47%. Every subunit consists of two transmembrane domains (TM1 and TM2) connected by a large extracellular loop which folds into an ectodomain (Newbolt, Stoop et al. 1998). The ectodomain also contains five disulphide bridges which are conserved across the mammalian P2X family (Clyne, Wang et al. 2002; Ennion and Evans 2002). Three subunits make a functional channel which exists in homo or hetero trimeric forms (Nicke, Kerschensteiner et al. 2005). The patterns of activation of P2X receptors differ among homotrimeric isoforms in relation to maximum current amplitude and desensitization velocity. Zebra fish P2X4 receptor (zfP2X4) was solved at a resolution of 3.1 Å (Kawate, Michel et al. 2009). Further research has resulted in polypeptide construct of zfP2X4 which has crystallized in both open and closed state (Hattori and Gouaux 2012). The structures of zfP2X4 receptor with and without bound ATP, Δ P2X4-C and Δ P2X4-B2 apo, were solved at a resolution of 2.8 Å and 2.9 Å, respectively (Hattori and Gouaux 2012). The homotrimeric receptor was found to have a chalice-shape, with large extracellular domain away from the membrane. Each subunit resembles a dolphin-like structure with a tale of a dolphin representing a transmembrane domain. The head of the dolphin represents a structurally stable form which contains three disulphide bonds. The solved structures have demonstrated the existence of five disulphide bonds between conserved cysteine residues. Three bonds are present in the head domain (C119-C168, C129-C152, C135-C162; zfP2X4 numbering), one bond is present in dorsal fin (C220-C230) and one bond is situated in lower part of the dolphin body very near to the postulated access portals for the ions. Mutagenesis and electrophysiological study in human P2X1 receptor revealed the existence of disulphide bonding within all 10 cysteine residues (C117-C165, C126-C149, C132-C159, C217-C227 and C261-C270) (Ennion and Evans 2002). Another study done

before confirmed only the connection between C115-C164, C214-C224 and C258-C266 in rat P2X2 receptor (Clyne, Wang et al. 2002).

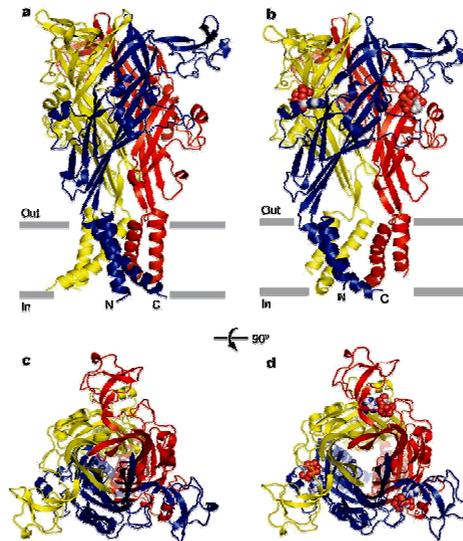


Figure 1 zfP2X4 receptor structure in open with bonded ATP (right) and closed (left) state reveals trimeric architecture, the widening of lateral fenestration just above the outer leaflet of the lipid bilayer and expansion of TM domains (a and b). ATP binding is facilitated on the interface between subunits in between the head group and dorsal fin (b and d). The widening of the pore is depicted along the central axes. (c and d) ATP molecule is presented in space filled model in right panel.

The structure of zfP2X4 receptor also revealed the existence of extracellular vestibule with three lateral fenestrations trough which the ion entrance was initially postulated (Kawate, Michel et al. 2009) and later confirmed in functional studies. The ion access was confirmed to be facilitated by negatively charged amino acid residues E56 and D58 at the entrance point to the fenestration in human P2X4 (Kracun, Chaptal et al. 2010; Kawate, Robertson et al. 2011; Samways, Khakh et al. 2011). Furthermore, cysteine-scanning mutagenesis of P2X1 residues from E52 to G96 showed that all vestibule residues mutants are functional (Allsopp, El Ajouz et al. 2011), which is not a case of P2X2 (Jiang, Rassendren et al. 2000; Kawate, Robertson et al. 2011). The region of extracellular vestibule was also investigated in terms of facilitation of channel activation and the region above TM2, which encompasses the residues from K313 to I333, is important for the signal transduction between ATP binding site and the pore (Yan, Liang et al. 2006).

2. AIMS

The aim of this thesis is to provide the knowledge on several structure/function related aspects of the rat P2X4 receptor. The aim of this work is to understand the role of conserved cysteine bridges and extracellular vestibule residues in P2X4 receptor function,

The specific tasks of this work are to:

1. Identify disulfide bridges in the ectodomain that are important for the function of rat P2X4 receptor and provide mechanistic explanations of possible changes induced by disruption of these bonds. Additional task is to dissect between the functional importance of particular cysteine residues and disulphide bonds for the receptor function.
2. Find amino acid residues of the extracellular vestibule which are crucial for channel gating, signal transduction or vestibule widening and elucidate the role of identified amino acid residues by exploring the mechanisms of their interaction with their microenvironment in channel closed and open state.

3. MATERIAL AND METHODS

The molecular biology methods were employed to make the point mutations within P2X4 receptor was subsequently expressed in human embryonic kidney cell line (HEK293T; *American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA*). The functionality of the receptor was explored by electrophysiological measurements and its expression was verified by confocal microscopy and Western blot.

3.1 Single point mutagenesis

To prepare mutations the rat P2X4 receptor gene was used as template. Tagged green fluorescent protein cDNA of the receptor was at a disposal (*GenBank accession no. NM 031594*), cloned in into pIRES vector (*Clonetech, Mountain View, CA, USA*). The used vectors had a resistance gene to kanamycin. These vectors were provided by the courtesy of Dr. S. S. Stojilkovic (*NIH, Bethesda, MD, USA*). The point mutations were introduced by using the primers with a mismatch pairs in polymerase chain reaction (PCR). The primer contained between 33-36 and 36 bases with a mismatching site in the middle of a primer were obtained from VBC-Biotech (*Vienna, Austria*). For the preparation of the PCR mix the QuikChange II site-directed mutagenesis was used (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*).

3.2 Cell culturing and transfection

HEK293T were cultivated in Dullbeco Modified Eagle Medium (D-MEM; *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), with 10% of heat deactivated fetal bovine serum (*Sigma-Aldrich*), 50 U/ml penicilin (*Invitrogen*) and 50 µg/ml streptomycin (*Invitrogen*) at 37°C in humidified atmosphere containing 5% CO₂. Transfection was done 24 hours after cell plating in accordance to the transfection protocol jetPRIME (*Polyplus-transfection, Illkirch, France*).

3.3 Expression analysis of P2X4 receptor

The cells transfected with the DNA of mutated receptors containing the EGFP tag on poly-L-lysine impregnated glasses were washed two times with phosphate buffered saline (PBS). The cells were fixed by 100% methanol on ice (-20°C). Methanol was eliminated and the samples were dried at room temperature and then mounted onto a Vectashield drop facing down (Vector Laboratories, UK). Membrane expression was verified by laser scanning confocal microscopy (Leica SP2 AOBF). For quantification of membrane localized receptors Pierce® Cell Surface Protein Isolation Kit was used in accordance to manufacturers instructions (Thermo Scientific, Rockford, USA). The result was quantification of total and membrane fraction of P2X receptors and their presence was verified by immunodetection on Western blot by using primary anti rabbit P2X4 antibody (Alomone Labs, Israel). The detection was performed by anti-rabbit secondary antibody coupled with horse radish peroxidase. The product of chemiluminescent reaction of peroxidase coupled oxidation of luminol was detected by Luminescent Image Analyzer LAS-1000plus (Fuji Photo Film, Japan)

3.4 Electrophysiology

The electrophysiological measurement was done by patch-clamp method. During the entire measurement the cells were continuously perfused at a rate of 2ml/min by extracellular solution which corresponds to the physiological extracellular environment in terms of concentration of ions. The intracellular environment was corresponding to the intracellular solution filled in a microelectrode. The cellular responses were stimulated by different concentrations of ATP during 2-10s, by the use of BioLogic EVH-9 application system (BIO-LOGIC, Claix, France). The placement of application system was approximately 500 µm from and 50 µm above recorded cell. The exchange of solutions in the environment of the cell was 100-300 ms. In some experiments, whole cell currents were measured by the preincubation of the cells with 3 µM IVM for 2-6 min. The responses were captured by using Clampex 9.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and the amplifier

Axopatch-200B (Axon Instruments, Union City, CA, USA) by using Bessel filter 1kHz. The data was captured by using the Digidata 1322A (Axon Instruments). The concentration-response data points were fitted by a three-parameter logistic equation using a non-linear curve-fitting program that derives the EC_{50} values and Hill coefficient values of the produced curves. The kinetics of current decay induced by the washout of agonists, deactivation, were fitted by a single exponential function by using SigmaPlot software. All numerical values in the text are reported as the mean \pm SEM. Significant differences ($p^{**} < 0.01$ and $p^* < 0.05$).

4. RESULTS

4.1 The role of disulphide bonding in activity and expression of rat P2X4 receptor

The disulphidic bonding in rat P2X4 receptor was investigated by estimating the activity of a series of single point and double point mutants. Double alanine or double threonine mutants were generated by introducing either two alanine or two threonines on the positions of each disulphide pair. In this way the specific role of disulphide bond was investigated. Single cystein residues were further substituted with alanine or threonine one by one in order to elucidate the role of particular cystein residues in rP2X4 receptor function and their importance in particular disulphide bond. Before estimating the WT and mutant receptor activity, the functional expression was checked by tagging the receptor with enhanced green fluorescent protein (EGFP). The EGFP fluorescence was predominantly localized in the membrane region in case of every mutant. In experiments, the mutants where both cysteines were substituted with threonines the influence of disruption of SS bonds on receptor function was investigated.

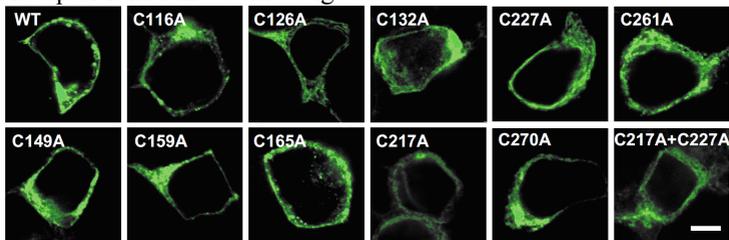


Figure 2. Expression and function of wild type (WT) and mutant rat P2X4 receptor in HEK293T cells.

In this work, positive allosteric gating potentiator ivermectin (IVM) was used as a tool to estimate the effect of the mutation on gating. In the cells expressing the WT receptor, ivermectin treatment caused three types of changes in current response: it increased the sensitivity of the receptors to ATP, as indicated by a leftward shift in the EC_{50} value; it augmented I_{max} ; and it slowed the deactivation kinetics of the receptor, as estimated by τ_{off} .

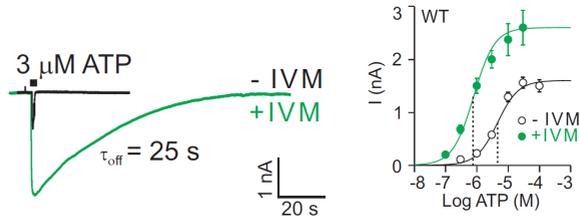


Figure 3. The effects of ivermectin (IVM) on ATP-induced current in HEK293T cells expressing P2X4 receptor-WT. Concentration dependence of ATP on the peak current amplitude in the absence (open symbols) and presence (closed symbols) of 3 μ M IVM. (right) The vertical dotted lines represent the mean EC_{50} values. On left a sample recording showing the effects of IVM on the peak amplitude and deactivation time (τ_{off}) of current induced by stimulation with 3 μ M ATP (2-s pulse) is shown.

The SS1 (C116-C165) double threonine mutant showed significantly lower ATP potency to open the channel, with its EC_{50} value increased compared to that of P2X4 receptor-WT. Rapid channel deactivation was detected in the presence of IVM, but no effect on I_{max} was detected. The SS2 (C126-C149) double threonine mutant also showed a rightward shift in the ATP potency but exhibited a significant decrease in I_{max} , which was partly rescued with ivermectin treatment. The IVM-induced increase in the maximum current for this mutant was higher, than in cells expressing the WT receptor. The replacement of the SS3 (C139-C159) cysteines with threonines did not affect receptor function in any observed parameter. Double mutation of the SS4 (C217-C227) cysteines resulted in a highly non-functional channel for which the EC_{50} value could not be determined, and the current amplitude was not rescued by IVM. This indicates the critical importance of either the SS4 bond or the individual cysteine residues in rat P2X4 receptor function. SS4 is situated in the lower part of ectodomain on which the further focus was driven by exploring the polypeptide segment which links ectodomain with transmembrane domains and comprises the extracellular vestibule of rP2X4 receptor. Similar to the SS1 and SS2 double mutants, the deactivation time constant estimated after the removal of agonist in the presence of IVM could be measured and it was significantly reduced in the SS4 double mutant. The SS5 (C261-C270) double mutant also responded with low peak current amplitude. After IVM treatment, the current value was partly rescued. The increase in I_{max} for this mutant was significantly higher than for the WT receptor, and the EC_{50} value was shifted slightly leftward.

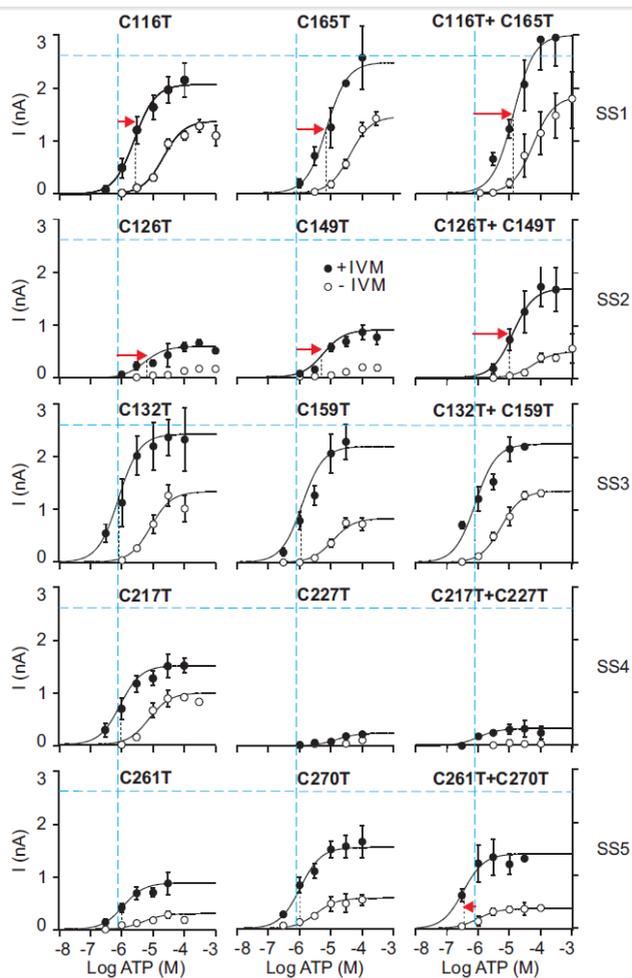


Figure 4. ATP dose-response curves for single and double threonine mutants of P2X4 receptor. Concentration dependence of ATP on the peak current amplitude responses in single-point mutants (left and middle panels) and double mutants (right panels) for five disulfide bonds is shown in the absence (open circles) and presence (closed circles) of 3 μ M IVM. Each row shows paired cysteine mutants that form disulfide bonds (SS1-5). Vertical and horizontal dashed lines (in blue) indicate the EC_{50} and I_{max} values, respectively, for P2X4 receptor-WT in the presence of 3 μ M IVM. The vertical dotted lines represent the mean EC_{50} values for T-mutants in the presence of IVM and significant shifts (red arrows).

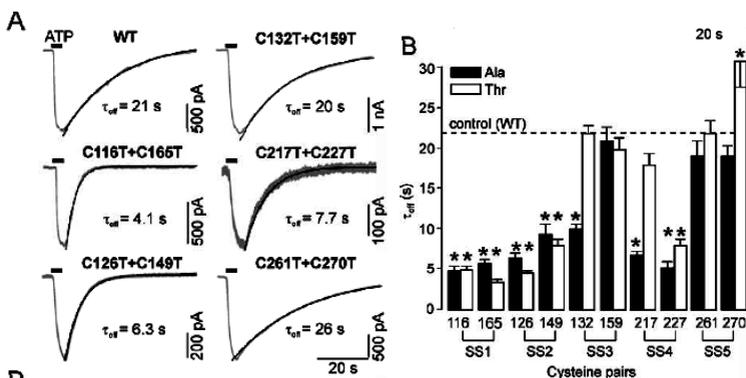


Figure 5. Effects of the disruption of disulfide bonds on the deactivation kinetics of P2X4 receptor in the presence of ivermectin. (A) Sample recordings of ectodomain cysteine double mutants showing differences in the current decay after washout of ATP. All traces were recorded 4-6 min after the application of 3 μ M IVM, and a non-desensitizing concentration of ATP (1-3 μ M for SS1-3 and SS5 and 30 μ M for SS4) was used for stimulation. Numbers below the traces indicate the deactivation time constant (τ_{off}) values. (B) Comparison of IVM effects on the deactivation time constant (τ_{off}) of A- (closed bars) and T- (open bars) single-point mutants of cysteine residues forming the disulfide bonds SS1-5.

As for the double SS1 mutants, single A- and T-mutants of cysteine 116 and 165 residues resulted in a significant decrease in ATP potency to activate the rP2X4 receptor, in both the presence and absence of IVM, without affecting I_{max} . These changes were accompanied by faster receptor deactivation in the presence of IVM, after removal of agonist, indicating that disruption of SS1 was solely responsible for the observed decrease in receptor sensitivity to ATP. Three single point SS2 mutants, C126T, C149A and C149T, the I_{max} amplitude was much lower compared with the SS2 double and C126A single mutants, while the EC_{50} values could not be determined in the absence of IVM. In the presence of IVM, the A- and T-mutants of cysteines 126 and 149 also mimicked the effects of the double SS2 mutant on ATP sensitivity; a rightward shift in the EC_{50} was accompanied by faster deactivation, and the fold-increase of I_{max} current for all single mutants was higher than for the WT receptor. Receptor function was not obviously affected by the C132T, C159A and C159T mutation, confirming that disruption of SS3 bond alone does not significantly affect P2X4 receptor function. Furthermore, the C132A mutation resulted in the channel responding to ATP with a significantly smaller current, a rightward shift in the EC_{50} and faster deactivation time. The devastating effects of replacement of the SS4 cysteine pair with threonine were completely mimicked by C217A, C227A and C227T mutations; these mutants showed a low response to ATP or were nonfunctional, and receptor function could not be rescued by IVM. In contrast, the peak current amplitude and ATP sensitivity was not significantly affected by replacing cysteine 217 with threonine. We further generated C217L, C217E, C217R

and C227R mutants. Three mutants were non-functional and the peak current amplitude and ATP sensitivity were not significantly affected when cysteine 217 was replaced with arginine. In six of the eight SS4 single-point mutants, I_{\max} was significantly reduced. This reduction probably did not reflect inefficient trafficking of the mutants to the plasma membrane because double point A-mutants of SS4 were present in the membrane. As for the double SS4 mutant, the deactivation kinetics, but not the EC_{50} value, could be determined for C217A, C227A and C227T mutants in the presence of IVM. Their low τ_{off} value indicated that these mutants have reduced sensitivity to ATP. The deactivation kinetics of the C217T and C217R mutant was comparable to those of WT-P2X4 receptor. A decrease in the peak current amplitude observed in cells expressing the SS5 double mutant was mimicked by single point mutants C261T, C270T and C270A, and the rescue effect of IVM on I_{\max} was also higher than for the WT receptor. No changes in the sensitivity to ATP were observed in the single SS5 mutants, and the deactivation time constant of the C270T mutant was higher compared to the WT receptor. In contrast, the C261A mutant was fully functional.

4.2 The role of amino acid residues comprising the extracellular vestibule in rat P2X4 receptor functions

Both alanine- and cysteine-scanning mutagenesis were performed to provide an adequate comparison to the work performed previously (Stoop, Thomas et al. 1999; Jiang, Rassendren et al. 2001; Jiang, Kim et al. 2003; Li, Chang et al. 2008; Kawate, Robertson et al. 2011; Samways, Khakh et al. 2011). Substitution of five residues (V49, Y54, Q55, F324 and G325) with both alanine and cysteine resulted in a low functional or non-functional receptors, that responded with I_{\max} amplitudes less than 20% of that observed in the WT receptor and their EC_{50} could not be determined, except for F324 mutants.

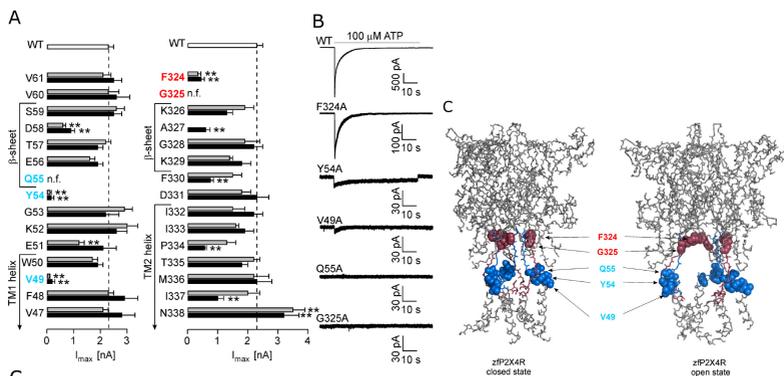


Figure 6. Effect of alanine and cysteine point mutations on maximum current amplitude. (A) Alanine and cysteine scanning mutagenesis of residues V47-V61 and F324-N338 that contain the upper parts of the TM1 and TM2 helices and the β -sheets in the open state. The maximum amplitude of the ATP-induced currents (I_{max}) in the wild type (WT; white bar) and cysteine (dark bars) and alanine (gray bars) mutant receptors. The receptors most affected had mutations at positions V49, Y54, Q55 (blue), F324 and G325 (red). (B) The 100 μ M ATP-induced currents by the WT and low-responsive rP2X4 receptor alanine mutants. (C) The topology of low-active residue mutants in the zifP2X4 receptor in the apo-closed state (left) and ATP-bound open state (right); the mutated regions containing the upper parts of the TM1 and TM2 are shown in blue and red, respectively; affected mutated residues (rP2X4 numbering) are shown in red and blue spheres.

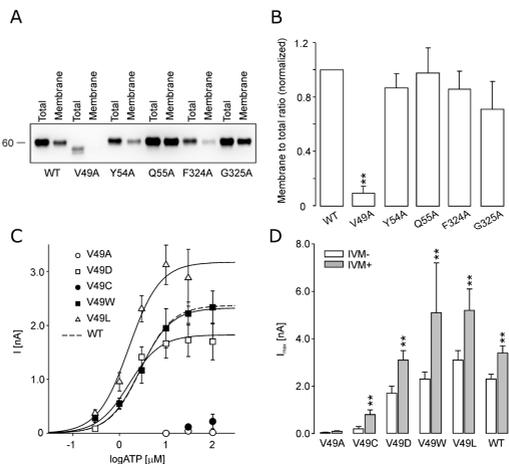


Figure 7. The membrane expression of the low-responsive alanine mutants and functional characterization of the V49-rP2X4 receptor mutants. (A) Western blots showing the expression pattern of the rP2X4 receptor-WT and V49A, Y54A, Q55A, F324A and G325A mutants. (B) Densitometry quantification of the membrane/ total ratio for five low-active mutants. (C) The ATP concentration response curves of the WT and V49 mutant receptors. (D) The augmentation of the maximum current amplitude of the WT and V49 mutants by ivermectin (IVM).

The V49A mutant showed low or almost no expression in the plasma membrane fraction, whereas other mutants were present in the plasma membrane in variable quantities. Thus, for the V49A mutant, the loss of receptor function reflects the lack of its expression at the plasma membrane. In contrast to the V49A and V49C mutants, substitution of the valine at position 49 with another non-polar (V49L, V49W) residue or a negatively charged residue of similar size (V49D) did not significantly alter the receptor function compared with WT. The Y54 alanine and cysteine mutants exhibited very low activity. The current amplitude of Y54A and Y54C mutants was augmented by IVM. These results indicate that substitution of Y54 with alanine and cysteine led to a rightward shift in the potency of ATP for mutants, and that the functionality of these receptors was partially restored by IVM, which increases the frequency of channel openings (Priel and Silberberg 2004) and sensitizes P2X4 receptor to ATP (Khakh, Proctor et al. 1999). The activity of rP2X4 receptor was fully rescued by introducing phenylalanine and tryptophan, but not leucine, mutations to Y54, further indicating that an aromatic residue at position 54 is essential for the receptor to function.

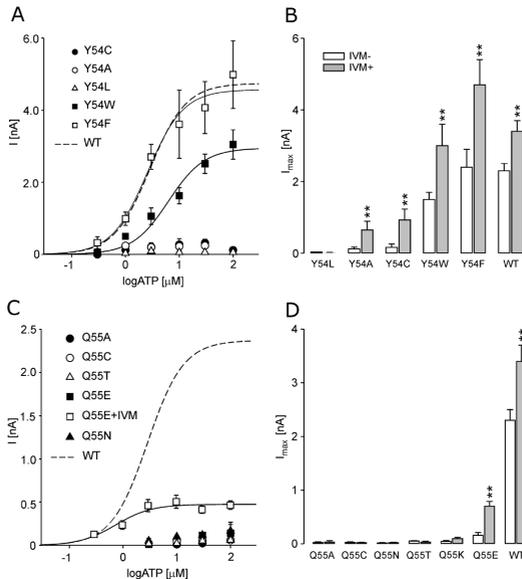


Figure 8. The effects of the Y54 and Q55 mutations on rP2X4 receptor function. (A) The ATP-concentration dependence curves for the WT and Y54 substitution mutants. (B) The I_{max} values for the WT and Y54 substitution mutants in the presence (gray bars) and absence (white bars) of IVM. (C) The ATP dose response curve for the Q55 mutants. (D) The I_{max} values of the Q55 mutants measured in the absence (white bars) and in the presence (gray bars) of IVM.

Introducing amino acids of similar structure and chemical properties at Q55 position did not rescue the receptor function. The function of Q55E was partially restored by the treatment with IVM, whereas IVM was ineffective with other mutants. Thus, it is reasonable to conclude that substitutions of conserved residues Y54 and Q55 above TM1 with alanine or cysteine cause a stronger rightward shift in the potency of ATP for P2X4 receptor than mutation of V49-P2X4 receptor residue. The F324A and F324C mutants exhibited significantly reduced currents, and preincubation with IVM increased the current amplitude, comparable to that observed with the WT receptor. The EC_{50} value and time course of F324A current were also similar to the WT receptor. The mutation of F324 to another non-polar (F324L, F324W) residue or a polar aromatic (F324Y) residue partially or fully rescued the receptor function. For the F324 mutants, there was linear correlation between the $\log EC_{50}$ values and the hydrophobicity and the volume of the amino acid side chain substituent. These data suggest that hydrophobicity and the size, rather than aromaticity, at position 324 are important for the proper receptor function.

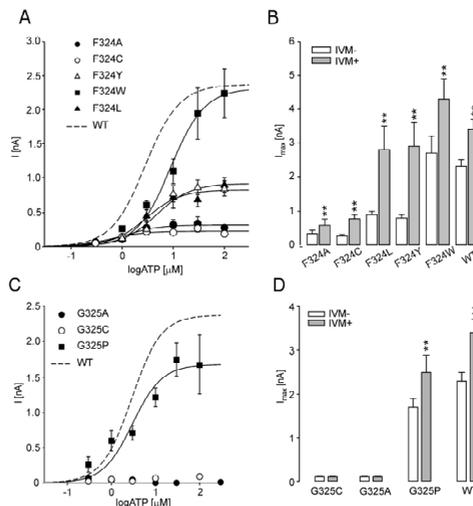


Figure 9 The effects of the F324 and G325 mutations on rP2X4 receptor function. (A) The ATP-concentration response curves for the single point mutants at position F324. (B) The I_{max} values of the F324 mutants measured in the absence (white bars) and presence (gray bars) of IVM. (C) The concentration-response curve for the rP2X4-G325P (symbols) and WT receptor (dotted line). (D) The I_{max} values of G325 mutants measured in the absence (white bars) and in the presence (gray bars) of IVM.

The G325A and G325C mutants were not active in the absence and presence of IVM. The G325P mutant had an EC_{50} and I_{max} value comparable to the WT receptor. Furthermore, this mutant showed a comparable degree of IVM-induced I_{max} augmentation to the WT receptor. The G325 and F324 residues are located in the breakage point of the β -sheet in P2X4 receptor open state. These data indicate

that when the receptor undergoes activation-induced conformational changes, the G325 could operate as a hinge.

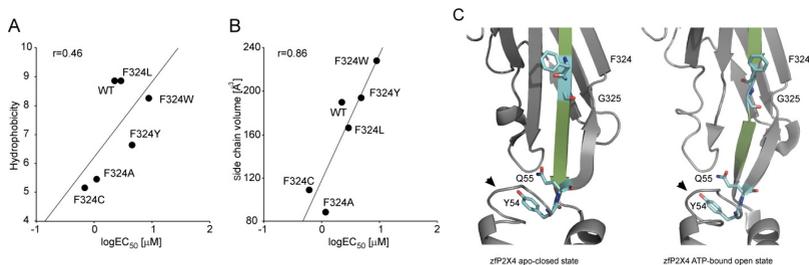


Figure 10 The effect of hydrophobicity and the size at position 324 on ATP potency and the localization of the F324 and G325 residues in the rP2X4 receptor molecule. (A and B) The correlation between the EC₅₀ values with the hydrophobic effect (A) and the change in side chain residue volume (B). (C) Both the F324 and G325 residues are within the β -sheet connecting the ATP binding site and the pore (in green) in the zP2X4 apo-closed state (left) and outside the β -sheet in the ATP-bound open state (right); rP2X4 numbering. Notice the stable position of Y54 and Q55, and conserved protein fold above TM1 (arrowhead) both in the closed and open state.

5. DISCUSSION

The main focus in previous work on the topic of disulphide bonding in P2X receptors was the identification of cysteine pairing in ectodomain of mammalian P2X receptors. The bonding order was first identified in P2X2 receptor within SS1, SS4, and SS5 pairs (Clyne, Wang et al. 2002), another study focused on P2X1, receptor identifying the pairing order of all five SS pairs (Ennion and Evans 2002). This study shows that disruption of the SS1, SS2 and SS4 bonds by substituting both cysteines with threonine generated receptors less sensitive to ATP. All four SS1 single mutants, three of four SS2 single mutants and six of eight SS4 single mutants showed similar effect. SS4 cysteine residues generated the most profound changes in the receptor function. For SS4 double mutant and six single mutants, the EC₅₀ values could not be determined, but the amplitude of response was sufficient to estimate deactivation time constant in the presence of IVM. Because there is a significant correlation between the EC₅₀ values for ATP and the rate of receptor deactivation in the presence of IVM (Zemkova, Yan et al. 2007), it is reasonable to conclude that these SS4 mutants are also less sensitive to ATP. The P2X1-C217A and the P2X1-C227A mutants were fully functional but were the least sensitive among ten A-mutants (Ennion and Evans 2002). The P2X2-C224A mutant expressed in oocytes was not functional, whereas the C214A mutant showed decreased sensitivity to ATP. Furthermore, the I_{max} value for both SS4 mutants was significantly reduced or undetectable when P2X2 receptor was expressed in HEK293

cells (Clyne, Wang et al. 2002). The double SS5 mutant and three of four single P2X4 receptor mutants show low I_{\max} and EC_{50} values closer to that of the WT receptor. Their rates of deactivation in the presence of IVM were also comparable to those observed in controls, clearly indicating that their sensitivity for ATP is not affected. The sensitivity of the SS5 A-mutants of P2X1, P2X2 was also not affected and I_{\max} values were significantly lower. It has been suggested previously that trafficking of P2X1 to the plasma membrane is reduced by disruption of the SS5 bond, accounting for the smaller I_{\max} value (Ennion and Evans 2002). Together, these results indicate that the lower I_{\max} values for four of the five SS5 mutants could reflect their relevance for channel gating and suggesting that these mutants show a preference for the closed state of the channel. The difference in the results with SS5-P2X1 and P2X4 mutants probably indicates receptor specificity in the requirement of the SS bonds for particular functions. In agreement with this, in P2X1 none of these bonds individually is essential for receptor function, and several double mutants affecting the SS2 and SS3 bonds were functional (Ennion and Evans 2002). For P2X2, however, the SS1-4 bonds are individually needed for proper receptor function (Ennion and Evans 2002). In contrast, the P2X4 receptor function was not affected in double SS3 mutant nor in three of four single mutants, clearly indicating that SS3 bond is not critical for P2X4 receptor function. The expression system may also play a role in receptor function. For example, in contrast to results presented in this thesis, each of ten P2X4 receptor mutants expressed in oocytes generated a robust inward current (>50 % of the WT receptor), and the EC_{50} values of the C132A and C217A mutants were comparable to P2X4 receptor-WT (Yi, Liu et al. 2009). In addition, the P2X2-C258A mutant was practically non-functional when expressed in HEK cells but generated a larger current when expressed in oocytes (Clyne, Wang et al. 2002). The results presented in this thesis also showed that not all single residue SS mutants behaved similarly and comparably to the double mutants. For example, a decrease in ATP sensitivity and I_{\max} in cells expressing the C132A mutant is observed, whereas the receptor function was not affected by double SS3 mutants, as well as three single mutants: C132T, C159A, and C159T. Similarly, the P2X4 receptor function was not affected when the C217 was replaced with threonine or arginine. Also, mutant C261A showed properties comparable to the WT receptor, in contrast to double and three single SS5 mutants. These results indicate that individual cysteines forming the bond or their substitutes might also play a role in receptor function independently of the loss in bonding, probably by generating new interactions that might impair and/or preserve the structure of the channel necessary for agonist binding and/or channel gating. Consistent with this conclusion, the SS4 bond is absent in the simple eukaryote *Ostreococcus*, and the SS4 and SS5 bonds are absent in *Dictyostelium* (Jarvis and Khakh 2009; Surprenant and North 2009); however, a high concentration of agonist is required for their activation. Thus, it is reasonable to conclude that formation of the SS4 and SS5 bonds was an important step in the evolution of P2X proteins. The crystal structure of zebrafish P2X4

receptor (Kawate, Michel et al. 2009; Hattori and Gouaux 2012) provides some rationale for the specific roles of the SS1-5 disulfide bonds in P2X function. It shows that a long turn of 13 amino acids starting from cysteine 165 could inhibit ATP binding by covering the ligand binding site if liberated by disruption of the SS1 bond. Disruption of the SS2 could also change the shape or size of the ATP binding pocket, as well as the head-to-body interface. A long turn of 14 amino acids, the dorsal fin, preceding cysteine 217 could play a similar role in the opposite half of the predicted ATP binding site if liberated by disruption of the SS4 bond. The devastating effect of the SS4 double mutant on receptor function could be explained by changes in the left-flipper-to-dorsal-fin interface affecting the interaction between receptor subunits and subsequent signal transduction from the ATP binding site to the pore. This interface is one of three major subunit-subunit contacts suggested to be important for receptor function (Kawate, Michel et al. 2009). The SS5 bond is located relatively far from the putative ATP binding site but close to the extracellular vestibule above the TM domains, supporting its role in channel gating and proper signal transduction from the ATP-binding site to the pore. Precisely for this reason the topic of this thesis has shifted towards the elucidation of the functional role of the amino acids which form the vestibule of rat P2X4 receptor. The research described in this thesis has identified five amino acid residues from the extracellular vestibule that are critical for rP2X4 receptor function: V49, Y54, Q55, F324 and G325. These residues are also present in zP2X4 receptor and among the mammalian P2X receptors, Y54, Q55 and G325 are fully conserved, V49 is present in five receptors, and F324 is non-conserved across P2X subtypes. Here it is confirmed that trafficking of receptors was significantly affected by mutation of V49 but not other residues. In addition, the V49D mutant is fully functional, although repulsive forces may form between the carboxyl side chain of aspartate and the negatively charged phospholipids. Similarly, the V49W mutation did not alter the receptor's function (Silberberg, Chang et al. 2005), although bulky amino acids could accumulate in this part of the helix (F48-W49-W50) resulting in helix destabilization. The V50-P2X2 receptor mutant is also functional (Li, Migita et al. 2004; Khakh and Egan 2005). These results indicate that V49 residue plays a role in trafficking of the rP2X4 receptor, rather than destabilizing membrane anchoring inside membrane or influencing channel gating. The previous studies performed on P2X2 also showed that the Y54C and Q55C mutants (rP2X4 numbering) did not form functional channels (Jiang, Rassendren et al. 2001; Kawate, Robertson et al. 2011), but both studies provided no explanation for these effects. Cysteine-scanning mutagenesis of residues E52-G96 in human P2X1 receptor showed that all extracellular vestibule mutants are functional; therefore, there are subtype differences in the ability of the receptor to tolerate Q55 and Y54 mutations (Roberts and Evans 2006; Allsopp, El Ajouz et al. 2011). The other polar or charged mutations at Q55 position were not able to rescue the receptor function, while the Y54F and Y54W mutants responded to ATP, indicating the crucial relevance of aromatic residue at the position 54. The

Y54A/C-P2X4 receptor function is partially rescued by IVM as well as the Q55E-P2X4 receptor function. Because IVM causes a leftward shift in the sensitivity of receptors to ATP (Khakh, Proctor et al. 1999), it is reasonable to suggest that the Y54 residue contributes to gating. Interestingly, an unchanging structural fold is present within 7 Å of the Q55 and Y54 residues when the channel is either open or closed (Hattori and Gouaux 2012). Therefore, we conclude that the structure fold proximal to the Q55 residue must be maintained for the channel to be functional in either open or closed conformational state. It is further shown that stacking interactions are most likely important for the functionality of the Y54 mutants because an aromatic residue is crucial at this position for receptor function. The possible interaction partners of Y54 are F48 from TM1 and F330 from the TM2 of the same subunit. In agreement with this hypothesis, the F330C mutant exhibited a significantly reduced I_{\max} current. The G325 residue of rP2X4 receptor is identified to be functionally important because both G325A and G325C were not responsive to ATP. The topology of G325 in the open state of zfP2X4 receptor reveals that the β -sheet above TM2, connecting ATP binding domain with the channel pore, is disrupted in the position of G325, unlike closed state where the linear integrity of this β -sheet is maintained (Hattori and Gouaux 2012). The rescue effect of G325P mutant clearly shows the importance of this region because proline makes angular disruption and brakeage of β -sheet above TM2. Although the G325 residue is conserved along the P2X receptor isoforms, its critical functional importance is shown only in rP2X4 receptor. In the P2X1, the G321C mutant (equivalent to G325C in P2X4) was normal (Digby, Roberts et al. 2005) but exhibited a modified response to ATP in the presence of reducing reagents (Roberts and Evans 2007). Other study with rP2X2 also showed that H319C and G320C receptor mutants (analogous to F324C and G325C) are fully functional (Rassendren, Buell et al. 1997; Kawate, Robertson et al. 2011). Cysteine and alanine mutants of F324 residue in P2X4 receptor had reduced I_{\max} , which was found also by others (Popova, Asatryan et al. 2010), but were partially rescued by introducing F324L, F324Y, and F324W mutations. The correlation between the EC_{50} value and hydrophobicity for a particular F324 substituent indicates that the size of the residue and the ability to form hydrophobic interactions are important for receptor function.

6. CONCLUSION

By using the molecular biology and electrophysiology techniques several questions on structure/function relationships in the rat P2X4 receptor have been addressed. This doctoral thesis elucidated the importance of conserved ectodomain cysteines and disulphide bondings (SS1-5) in the receptor functions and identified amino acids in the extracellular vestibule which are important for channel gating, vestibule enlargement and receptor expression in the plasma membrane.

1. The disruption of SS3 bond failed to change function of P2X4 receptor while disruption of SS4 and SS5 bonds has profoundly affected the P2X4 receptor, indicating that these bonds are important for receptor function.

2. SS1 and SS2, and to some extent SS4, bond disruption produced changes in receptor sensitivity to ATP which suggests that it may disrupt the integrity of the ATP binding site. SS5 bond is important for maintaining the integrity of channel gate or signal transduction from the ATP binding site to the pore.

3. The extensive mutagenesis of residues forming the extracellular vestibule resulted in identifying the crucial residues for the functions of the channel: V49, Y54, Q55, F324 and G325. Only the residue V49 has been found to be important for channel trafficking from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. The functioning of the remaining four residues has been investigated in details.

4. F324 and G325 residues were found to be important for widening of the extracellular vestibule as a crucial prerequisite for channel opening. F324 may also pose as a residue which is involved in filling the vestibule lumen and obstruction of vestibule enlargement.

5. Adjacent Q55 and Y54 residues are found to be important for gating of the channel, most probably by structurally constraining the transmembrane domains towards the conserved axial orientation.

LITERATURA/LITERATURE

- Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1994). "Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?" *Pharmacol Ther* **64**(3): 445-75.
- Allsopp, R. C., S. El Ajouz, et al. (2011). "Cysteine scanning mutagenesis (residues Glu52-Gly96) of the human P2X1 receptor for ATP: mapping agonist binding and channel gating." *J Biol Chem* **286**(33): 29207-17.
- Bean, B. P. (1990). "ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics." *J Neurosci* **10**(1): 1-10.
- Bennett, J. L., J. F. Williams, et al. (1988). "Pharmacology of ivermectin." *Parasitol Today* **4**(8): 226-8.
- Bianchi, B. R., K. J. Lynch, et al. (1999). "Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes." *Eur J Pharmacol* **376**(1-2): 127-38.
- Bo, X., L. H. Jiang, et al. (2003). "Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1407-16.
- Bo, X., Y. Zhang, et al. (1995). "A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile." *FEBS Lett* **375**(1-2): 129-33.
- Bobanovic, L. K., S. J. Royle, et al. (2002). "P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific." *J Neurosci* **22**(12): 4814-24.
- Bonan, C. D. (2012). "Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **11**(6): 739-50.
- Brake, A. J., M. J. Wagenbach, et al. (1994). "New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor." *Nature* **371**(6497): 519-23.
- Buell, G., C. Lewis, et al. (1996). "An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain." *Embo J* **15**(1): 55-62.
- Burnstock, G. (1977). "The purinergic nerve hypothesis." *Ciba Found Symp*: 295-314.
- Burnstock, G. (1986). "Purines and cotransmitters in adrenergic and cholinergic neurones." *Prog Brain Res* **68**: 193-203.
- Burnstock, G. (2006). "Purinergic signalling." *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**: S172-81.
- Burnstock, G. (2006). "Purinergic signalling--an overview." *Novartis Found Symp* **276**: 26-48; discussion 48-57, 275-81.
- Burnstock, G. (2008). "Purinergic signalling and disorders of the central nervous system." *Nat Rev Drug Discov* **7**(7): 575-90.
- Burnstock, G. (2011). "Introductory overview of purinergic signalling." *Front Biosci (Elite Ed)* **3**: 896-900.
- Cao, L., H. E. Broomhead, et al. (2009). "Polar residues in the second transmembrane domain of the rat P2X2 receptor that affect spontaneous gating, unitary conductance, and rectification." *J Neurosci* **29**(45): 14257-64.
- Clyne, J. D., L. F. Wang, et al. (2002). "Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor." *J Neurosci* **22**(10): 3873-80.
- Cockcroft, S. and B. D. Gomperts (1979). "ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells." *Nature* **279**(5713): 541-2.
- Collo, G., R. A. North, et al. (1996). "Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels." *J Neurosci* **16**(8): 2495-507.
- Colquhoun, D. (1998). "Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors." *Br J Pharmacol* **125**(5): 924-47.
- Digby, H. R., J. A. Roberts, et al. (2005). "Contribution of conserved glycine residues to ATP action at human P2X1 receptors: mutagenesis indicates that the glycine at position 250 is important for channel function." *J Neurochem* **95**(6): 1746-54.
- Ding, S. and F. Sachs (1999). "Ion permeation and block of P2X(2) purinoceptors: single channel recordings." *J Membr Biol* **172**(3): 215-23.

- Ding, S. and F. Sachs (1999). "Single channel properties of P2X2 purinoceptors." *J Gen Physiol* **113**(5): 695-720.
- Drury, A. N. and A. Szent-Gyorgyi (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." *J Physiol* **68**(3): 213-37.
- Du, J., H. Dong, et al. (2012). "Gating mechanism of a P2X4 receptor developed from normal mode analysis and molecular dynamics simulations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(11): 4140-5.
- Egan, T. M. and B. S. Khakh (2004). "Contribution of calcium ions to P2X channel responses." *J Neurosci* **24**(13): 3413-20.
- Ennion, S. J. and R. J. Evans (2002). "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* **61**(2): 303-11.
- Evans, R. J. (1996). "Single channel properties of ATP-gated cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in Chinese hamster ovary cells." *Neurosci Lett* **212**(3): 212-4.
- Evans, R. J., C. Lewis, et al. (1995). "Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors)." *Mol Pharmacol* **48**(2): 178-83.
- Evans, R. J., C. Lewis, et al. (1996). "Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells." *J Physiol* **497**(Pt 2): 413-22.
- Fujiwara, Y., B. Keceli, et al. (2009). "Voltage- and [ATP]-dependent gating of the P2X(2) ATP receptor channel." *J Gen Physiol* **133**(1): 93-109.
- Garcia-Guzman, M., F. Soto, et al. (1997). "Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue." *Mol Pharmacol* **51**(1): 109-18.
- Garcia-Guzman, M., F. Soto, et al. (1996). "Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor." *FEBS Lett* **388**(2-3): 123-7.
- Green, H. N. and H. B. Stoner (1950). "Present Status of Adenine Nucleotides in Bodily Response to Injury." *Br Med J* **1**(4657): 805-9.
- Hattori, M. and E. Gouaux (2012). "Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors." *Nature* **485**(7397): 207-12.
- Hu, B., C. Senkler, et al. (2002). "P2X4 receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP." *J Biol Chem* **277**(18): 15752-7.
- Jarvis, M. F. and B. S. Khakh (2009). "ATP-gated P2X cation-channels." *Neuropharmacology* **56**(1): 208-15.
- Jelinkova, I., V. Vavra, et al. (2008). "Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin." *Pflugers Arch* **456**(5): 939-50.
- Jelinkova, I., Z. Yan, et al. (2006). "Identification of P2X(4) receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation." *Biochem Biophys Res Commun* **349**(2): 619-25.
- Jiang, L. H., M. Kim, et al. (2003). "Subunit arrangement in P2X receptors." *J Neurosci* **23**(26): 8903-10.
- Jiang, L. H., F. Rassendren, et al. (2001). "Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor." *J Biol Chem* **276**(18): 14902-8.
- Jiang, L. H., F. Rassendren, et al. (2000). "Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor." *J Biol Chem* **275**(44): 34190-6.
- Jindrichova, M., K. Khafizov, et al. (2010). "Highly conserved tyrosine 37 in the first transmembrane domain of ATP-gated P2X3 receptor is critical for maintaining rapid desensitization." *JBC submitted*.
- Jindrichova, M., V. Vavra, et al. (2009). "Functional relevance of aromatic residues in the first transmembrane domain of P2X receptors." *J Neurochem* **109**(3): 923-34.
- Jones, C. A., I. P. Chessell, et al. (2000). "Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues." *Br J Pharmacol* **129**(2): 388-94.
- Jones, C. A., C. Vial, et al. (2004). "Functional regulation of P2X6 receptors by N-linked glycosylation: identification of a novel alpha beta-methylene ATP-sensitive phenotype." *Mol Pharmacol* **65**(4): 979-85.
- Kawate, T., J. C. Michel, et al. (2009). "Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state." *Nature* **460**(7255): 592-8.

- Kawate, T., J. L. Robertson, et al. (2011). "Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels." *J Gen Physiol* **137**(6): 579-90.
- Keceli, B. and Y. Kubo (2009). "Functional and structural identification of amino acid residues of the P2X2 receptor channel critical for the voltage- and [ATP]-dependent gating." *J Physiol* **587**(Pt 24): 5801-18.
- Khakh, B. S. and T. M. Egan (2005). "Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics." *J Biol Chem* **280**(18): 6118-6129.
- Khakh, B. S., P. P. Humphrey, et al. (1997). "ATP-gated cation channels (P2X purinoceptors) in trigeminal mesencephalic nucleus neurons of the rat." *J Physiol* **498** (Pt 3): 709-15.
- Khakh, B. S. and R. A. North (2012). "Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS." *Neuron* **76**(1): 51-69.
- Khakh, B. S., W. R. Proctor, et al. (1999). "Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels." *J Neurosci* **19**(17): 7289-99.
- King, B. F., J. T. Neary, et al. (1996). "P2 purinoceptors in rat cortical astrocytes: expression, calcium-imaging and signalling studies." *Neuroscience* **74**(4): 1187-96.
- King, B. F., S. S. Wildman, et al. (1997). "Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor." *Br J Pharmacol* **121**(7): 1445-53.
- Kracun, S., V. Chaptal, et al. (2010). "Gated access to the pore of a P2X receptor: structural implications for closed-open transitions." *J Biol Chem* **285**(13): 10110-21.
- Krishtal, O. A., S. M. Marchenko, et al. (1988). "Cationic channels activated by extracellular ATP in rat sensory neurons." *Neuroscience* **27**(3): 995-1000.
- Kubo, Y., Y. Fujiwara, et al. (2009). "Dynamic aspects of functional regulation of the ATP receptor channel P2X(2)." *J Physiol* **587**(Pt 22): 5317-24.
- Li, M., T. H. Chang, et al. (2008). "Gating the pore of P2X receptor channels." *Nat Neurosci* **11**(8): 883-7.
- Li, Z., K. Migita, et al. (2004). "Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor." *J Neurosci* **24**(33): 7378-86.
- Lorinczi, E., Y. Bhargava, et al. (2012). "Involvement of the cysteine-rich head domain in activation and desensitization of the P2X1 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(28): 11396-401.
- Lynch, K. J., E. Touma, et al. (1999). "Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors." *Mol Pharmacol* **56**(6): 1171-81.
- Maenhaut, C., J. Van Sande, et al. (1990). "RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity." *Biochem Biophys Res Commun* **173**(3): 1169-78.
- Miller, K. J., A. D. Michel, et al. (1998). "Cibacron blue allosterically modulates the rat P2X4 receptor." *Neuropharmacology* **37**(12): 1579-86.
- Mohebbipour, A., P. Saleh, et al. (2012). "Treatment of Scabies: Comparison of Ivermectin vs. Lindane Lotion 1%." *Acta Dermatovenerol Croat* **20**(4): 251-5.
- Moro, S., Z. G. Gao, et al. (2006). "Progress in the pursuit of therapeutic adenosine receptor antagonists." *Med Res Rev* **26**(2): 131-59.
- Nakazawa, K. and P. Hess (1993). "Block by calcium of ATP-activated channels in pheochromocytoma cells." *J Gen Physiol* **101**(3): 377-92.
- Neelands, T. R., E. C. Burgard, et al. (2003). "2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP and A-317491 are competitive antagonists at a slowly desensitizing chimeric human P2X3 receptor." *Br J Pharmacol* **140**(1): 202-10.
- Newbolt, A., R. Stoop, et al. (1998). "Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor)." *J Biol Chem* **273**(24): 15177-82.
- Nicke, A., H. G. Baumert, et al. (1998). "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." *Embo J* **17**(11): 3016-28.
- Nicke, A., D. Kerschensteiner, et al. (2005). "Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits." *J Neurochem* **92**(4): 925-33.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." *Physiol Rev* **82**(4): 1013-67.
- North, R. A. and A. Surprenant (2000). "Pharmacology of cloned P2X receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 563-80.

- Ormond, S. J., N. P. Barrera, et al. (2006). "An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum." *Mol Pharmacol* **69**(5): 1692-700.
- Popova, M., L. Asatryan, et al. (2010). "A point mutation in the ectodomain-transmembrane 2 interface eliminates the inhibitory effects of ethanol in P2X4 receptors." *J Neurochem* **112**: 307-17.
- Priel, A. and S. D. Silberberg (2004). "Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels." *J Gen Physiol* **123**(3): 281-93.
- Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." *Pharmacol Rev* **50**(3): 413-92.
- Rassendren, F., G. Buell, et al. (1997). "Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor." *Embo J* **16**(12): 3446-54.
- Rettinger, J., A. Aschrafi, et al. (2000). "Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor." *J Biol Chem* **275**(43): 33542-7.
- Roberts, J. A. and R. J. Evans (2004). "ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists." *J Biol Chem* **279**(10): 9043-55.
- Roberts, J. A. and R. J. Evans (2006). "Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP." *J Neurochem* **96**(3): 843-52.
- Roberts, J. A. and R. J. Evans (2007). "Cysteine substitution mutants give structural insight and identify ATP binding and activation sites at P2X receptors." *J Neurosci* **27**(15): 4072-82.
- Robertson, S. J., M. G. Rae, et al. (1996). "Characterization of a P2X-purinoreceptor in cultured neurones of the rat dorsal root ganglia." *Br J Pharmacol* **118**(4): 951-6.
- Ruppelt, A., W. Ma, et al. (2001). "Genomic structure, developmental distribution and functional properties of the chicken P2X(5) receptor." *J Neurochem* **77**(5): 1256-65.
- Samways, D. S. and T. M. Egan (2007). "Acidic amino acids impart enhanced Ca²⁺ permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family." *J Gen Physiol* **129**(3): 245-56.
- Samways, D. S., B. S. Khakh, et al. (2011). "Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(33): 13800-5.
- Samways, D. S., B. S. Khakh, et al. (2012). "Allosteric Modulation of Ca²⁺ flux in Ligand-gated Cation Channel (P2X4) by Actions on Lateral Portals." *J Biol Chem* **287**(10): 7594-602.
- Seguela, P., A. Haghghi, et al. (1996). "A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain." *J Neurosci* **16**(2): 448-55.
- Silberberg, S. D., T. H. Chang, et al. (2005). "Secondary Structure and Gating Rearrangements of Transmembrane Segments in Rat P2X4 Receptor Channels." *J Gen Physiol* **125**(4): 347-59.
- Silberberg, S. D., M. Li, et al. (2007). "Ivermectin Interaction with Transmembrane Helices Reveals Widespread Rearrangements during Opening of P2X Receptor Channels." *Neuron* **54**(2): 263-274.
- Sokolova, E., A. Skorinkin, et al. (2004). "Agonist-dependence of recovery from desensitization of P2X(3) receptors provides a novel and sensitive approach for their rapid up or downregulation." *Br J Pharmacol* **141**(6): 1048-58.
- Sokolova, E., A. Skorinkin, et al. (2006). "Experimental and modeling studies of desensitization of P2X3 receptors." *Mol Pharmacol* **70**(1): 373-82.
- Soto, F., M. Garcia-Guzman, et al. (1996). "P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3684-8.
- Steinberg, T. H., A. S. Newman, et al. (1987). "ATP4- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes." *J Biol Chem* **262**(18): 8884-8.
- Stoner, H. B. and H. N. Green (1950). "Studies on the role of the adrenal cortex in adenosine triphosphate shock." *Br J Exp Pathol* **31**(5): 603-14.

- Stoop, R., S. Thomas, et al. (1999). "Contribution of individual subunits to the multimeric P2X₂ receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C." Mol Pharmacol **56**(5): 973-81.
- Surprenant, A. and R. A. North (2009). "Signaling at purinergic P2X receptors." Annu Rev Physiol **71**: 333-59.
- Tatham, P. E. and M. Lindau (1990). "ATP-induced pore formation in the plasma membrane of rat peritoneal mast cells." J Gen Physiol **95**(3): 459-76.
- Thomas, S. A. and R. I. Hume (1990). "Permeation of both cations and anions through a single class of ATP-activated ion channels in developing chick skeletal muscle." J Gen Physiol **95**(4): 569-90.
- Torres, G. E., T. M. Egan, et al. (1998). "N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X₂ receptor." Biochemistry **37**(42): 14845-51.
- Toulme, E., F. Soto, et al. (2006). "Functional properties of internalization-deficient P2X₄ receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin." Mol Pharmacol **69**(2): 576-87.
- Valera, S., N. Hussy, et al. (1994). "A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP." Nature **371**(6497): 516-9.
- Virginio, C., A. MacKenzie, et al. (1999). "Pore dilation of neuronal P2X receptor channels." Nat Neurosci **2**(4): 315-21.
- Virginio, C., R. A. North, et al. (1998). "Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X₂ and P2X₃ receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones." J Physiol **510** (Pt 1): 27-35.
- Whitlock, A., G. Burnstock, et al. (2001). "The single-channel properties of purinergic P2X ATP receptors in outside-out patches from rat hypothalamic paraventricular parvocells." Pflugers Arch **443**(1): 115-22.
- Wong, A. Y., G. Burnstock, et al. (2000). "Single channel properties of P2X ATP receptors in outside-out patches from rat hippocampal granule cells." J Physiol **527** Pt 3: 529-47.
- Yan, Z., Z. Liang, et al. (2006). "Participation of the Lys313-Ile333 sequence of the purinergic P2X₄ receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate." J Biol Chem **281**(43): 32649-59.
- Yi, C. L., Y. W. Liu, et al. (2009). "Conserved extracellular cysteines differentially regulate the inhibitory effect of ethanol in rat P2X₄ receptors." Biochem Biophys Res Commun **381**(1): 102-6.
- Zemkova, H., M. L. He, et al. (2004). "Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors." J Neurosci **24**(31): 6968-78.
- Zemkova, H., Z. Yan, et al. (2007). "Role of Aromatic and Charged Ectodomain Residues in the P2X₄ Receptor Functions." J Neurochem **102**(4): 1139-50.
- Zhou, Z. and R. I. Hume (1998). "Two mechanisms for inward rectification of current flow through the purinoceptor P2X₂ class of ATP-gated channels." J Physiol **507**(Pt 2): 353-64.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 299-309.

CURRICULIM VITAE

Milos Rokic was born in Yugoslavia in 1984.

Excellent in Spanish (DELE certificate) and English (Cambridge certificate) language.

Conference and workshop participations:

Society for Neuroscience, 2012 meeting, New Orleans, US, 2012.

Society for Neuroscience, 2011 meeting, Washington, US, 2011.

International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Beijing, China, 2011.

FEBS-EMBO Lecture Course on Ionic Channels and Transporters, Erice, Italy, 2011.

Practical course in microarray techniques, Prague, Czech Republic, 2011.

Student conference of Academy of Sciences of the Czech Republic, Trest, Czech Republic, 2011.

Workshop in microscopic immunodetection in Biomedicine, Prague, 2010.

FENS neuroscience meeting 2010, Amsterdam

PURINES 2010 purinergic signaling meeting 2010, Barcelona

Workshop in current methods in cell biology Workshop, Prague, 2010.

1st Prague Protein Spring, Prague, 2010.

Winter School in Biophysics of Neurodegeneration, Venice, 2010.

Joint Conference of the Czech and Slovak Neuroscience Societies, Prague 2009.

IV Congress of Serbian Society of Neuroscience, Kragujevac, 2009.

Regional biophysics conference, Linz, Austria, 2009.

IBRO Summer Training School in neuroscience, Neuroimaging and complementary techniques, Belgrade, 2008.

Education

2009-2013 PhD at Charles University Prague, Science Faculty, and experimental part performed at Institute of physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic.

2008 Diploma in biochemistry, Belgrade University, Chemistry faculty, Biochemistry department

2007-2009 Volunteer at the laboratory for biophysics at the Center for multidisciplinary studies, Belgrade

2007 IAESTE Summer Practice at Center for Chemistry and Biochemistry at the University of Lisbon

2001-2004 Petnica Science Center, collaborating assistant within the program of Molecular biomedicine

1999-2003 High school of Medicine, Belgrade, department for pharmaceutical technology

Contact

Milos Rokic

Address: Momcila Radivojevic 53, 11080 Zemun, Beograd

Tel: +381 11 6610-204

e-mail: milosroki@hotmail.com