Abstrakt

Purinergní P2X receptory jsou membránové iontové kanály aktivované extracelulárním ATP. U savců bylo dosud nalezeno sedm různých podtypů, označovaných jako P2X1-7, které svojí stavbou představují rodinu ligandem řízených iontových kanálů s výjimečnými strukturně/funkčními vlastnostmi. Každý 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 strukturně-funkčních vlastností v modelu rekombinantního P2X4 receptoru. Technikou bodové mutageneze 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 nebo 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 čtvrý a pátý můstek (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. Alaninové 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.