

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Marian Rupert

Spontánní vápníková propustnost iontového kanálu P2X receptoru po záměně konzervovaného tyrozinu v 1. transmembránové doméně

Spontaneous calcium permeability of ionic channel of P2X receptor after substitution of conserved tyrosine in the 1st transmembrane domain

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Zemková CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.8.2013

Podpis

Poděkování

RNDr. Haně Zemkové CSc. děkuji za vedení práce, její čas, trpělivost a důvěru, Mgr. Miloši Rokičovi děkuji za poskytnutí homologního modelu P2X2 receptoru, a všem pracovníkům Laboratoře buněčné a molekulární neuroendokrinologie Fyziologického ústavu AV ČR děkuji za vlídné přijetí, cenné rady a příjemné pracovní prostředí.

Abstrakt

Purinergní P2X receptory jsou membránové iontové kanály, které jsou aktivované extracelulárním ATP. U obratlovců kóduje podjednotky P2X receptorů sedm genů. Podjednotky, označované P2X1 – 7, mají 40 – 50 % shodných aminokyselinových sekvencí. P2X receptory se skládají ze tří podjednotek a ve tkáních obratlovců se vyskytují jako homo- nebo heterotrimery. P2X receptory mají v organismu širokou distribuci, funkční receptory byly nalezeny v neuronech, gliových buňkách, svalových buňkách a také v neexcitabilních tkáních, jako jsou epitel, endotel a hemopoietické tkáně. Purinergní signalizace má významnou úlohu v přenosu bolesti, při poranění CNS a v imunitních procesech. Podjednotka P2X receptoru se skládá ze dvou transmembránových domén, extracelulární domény a intracelulárních N- a C- konců. Každá transmembránová doména obsahuje dvě aminokyseliny konzervované napříč všemi P2X podjednotkami. V první transmembránové doméně receptoru P2X2 jsou to Gly30 a Tyr43 .

V předchozích experimentech bylo elektrofyziologickými měřeními prokázáno, že u receptoru P2X2 po záměně konzervovaného Tyr43 v první transmembránové doméně za alanin dochází k prodloužení doby deaktivace iontového kanálu po odmytí agonisty. Tato práce je zaměřena na objasnění role konzervovaného tyrozinu v procesu otvírání a zavírání iontového kanálu P2X receptorů a jeho vlivu na stabilizaci uzavřeného stavu iontového kanálu.

klíčová slova: ATP, purinergní signalizace, P2X receptory, iontový kanál, intracelulární Ca^{2+} , Ca^{2+} imaging.

Abstract

Purinergic receptors are membrane ion channels that are activated by extracellular ATP. In vertebrates, seven genes encode subunits of P2X receptors. The subunits, designated P2X1-7, are 40 - 50% identical in amino acid sequences. P2X receptors are composed of three subunits and are found as homo- and heterotrimers in tissues of vertebrates. P2X receptors have a wide distribution in the organism, functional receptors are found in neurons, glial cells, muscle cells and also in nonexcitable tissues as epithelial, endothelial, and in hemopoietic tissue. Purinergic signalling plays an important role in pain transmission, at CNS injury and immune processes. P2X receptor subunit consists of two transmembrane domains, extracellular domain and intracellular N- and C-termini. Each transmembrane domain contains two amino acids conserved across all P2X subunits. In the first transmembrane domain receptor P2X2 are that Gly30 and Tyr43.

In previous experiments performed on P2X2 receptor, electrophysiological measurements demonstrated that substitution of conserved Tyr43 in the first transmembrane domain with alanine prolongs the deactivation time of ion channel after agonist wash out. This work is focused on clarifying the role of conserved tyrosine in the process of opening and closing of ion channel of P2X receptors and its influence on the stabilization of the closed state of the ion channel.

key words: ATP, purinergic signalling, P2X receptors, ion channels, intracellular Ca²⁺, Ca²⁺ imaging.

Obsah:

1.	Úvod	9
1.1.	ATP v mezibuněčné signalizaci.....	9
1.2.	Metabolismus extracelulárního ATP	10
1.3.	Ionty Ca^{2+} v buněčné signalizaci	11
1.4.	P1 purinergní receptory	12
1.5.	P2Y purinergní receptory.....	12
1.6.	P2X purinergní receptory.....	13
1.7.	Farmakologie P2X receptoru	17
1.8.	Struktura P2X receptoru	18
1.8.1.	Extracelulární doména.....	20
1.8.2.	Transmembránové domény	23
1.8.3.	Intracelulární N- a C- konec	24
1.9.	Podtypy P2X receptorů	25
1.9.1.	P2X1 receptor	25
1.9.2.	P2X2 receptor	26
1.9.3.	P2X3 receptor	27
1.9.4.	P2X4 receptor	28
1.9.5.	P2X5 receptor	29
1.9.6.	P2X6 receptor	30
1.9.7.	P2X7 receptor	30
1.10.	Selektivita iontového kanálu P2X receptoru	31
1.11.	Kinetika P2X receptoru	32
2.	Cíle práce.....	34
3.	Materiál a metody.....	35
4.	Výsledky.....	42
5.	Diskuse	60

6.	Závěr.....	64
7.	Seznam použité literatury	65

Seznam použitých zkratk:

ADP	adenosin-5'-difosfát
AMP	adenosin-5'-monofosf
ATP	adenosin-5'-trifosfát
ATP γ S	adenosin 5'-O-(3-thio)trifosfát
BzATP	3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5'-trifosfát
[Ca ²⁺] _i	intracelulární koncentrace volných Ca ²⁺ iontů
cAMP	cyklický adenosin-5'-monofosfát
cDNA	kódující DNA
EC50	koncentrace agonisty vyvolávající 50% maximální odpovědi
ECS	extracelulární roztok
FURA 2	poměrový fluorescenční indikátor
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny (G-protein coupled receptors)
GT1	buněčná linie transformovaných myších hypotalamických neuronů
NMDG ⁺	N-metyl-D-glukamin
P1	purinergní receptory aktivované adenosinem
P2	purinergní receptory aktivované ATP
P2X	ionotropní P2 receptory
P2Y	metabotropní P2 receptory
PPADS	pyridoxalfoafát-6-azofenyl-2,4'-disulfonová kyselina
TM	transmembránové domény
TNP-ATP	trinitrofenyl adenosin-5'-trifosfát
UTP	uridin-5'-trifosfát
WT	divoký typ receptoru(wild type)
zfp2X4	zebrafish (<i>Danio rerio</i>) P2X4 receptor
$\alpha\beta$ -meATP	$\alpha\beta$ -metyladenosin-5'-trifosfát

2-MeSATP 2-metylthioadenosin-5'-trifosfát

Zkratky aminokyselin:

A, Ala	alanin
C, Cys	cystein
D, Asp	kyselina asparagová
E, Glu	kyselina glutamová
F, Phe	fenylalanin
G, Gly	glycin
H, His	histidin
I, Ile	isoleucin
K, Lys	lysin
L, Leu	leucin
M, Met	methionin
N, Asn	asparagin
P, Pro	prolin
Q, Gln	glutamin
R, Arg	arginin
S, Ser	serin
T, Thr	threonin
V, Val	valin
W, Trp	tryptofan
Y, Tyr	tyrosin

1. Úvod

1.1. ATP v mezibuněčné signalizaci

Adenosin-5'-trifosfát (ATP) objevil německý biochemik Karl Lohmann v roce 1929. V roce 1939 Fritz Albert Lipmann objasnil úlohu ATP v buněčném metabolismu a označil ATP za univerzální přenašeč energie, který slouží jako energetický zdroj ve všech biologických systémech. Ve vnitrobuněčných signalizačních drahách je ATP využíván jako zdroj fosfátu pro proteinkinázové reakce a tím se podílí na regulacích mnoha biochemických procesů. ATP je zdrojem energie pro iontové pumpy, které slouží k udržení membránového potenciálu.

V buňce je ATP také jedním z nukleotidů potřebných pro syntézu klíčových organických makromolekul, jako jsou nukleové kyseliny. Je nezbytný pro syntézu ribonukleové kyseliny, po přeměně na deoxyATP se stává základním kamenem deoxyribonukleové kyseliny.

ATP také působí rovněž jako extracelulární signální molekula a neuropřenašeč (Ralevic and Burnstock, 1998). Extracelulární ATP a produkty vzniklé jeho hydrolyzou aktivují purinergní receptory.

Signalizační funkce adeninu, nukleosidů a nukleotidů byla popsána v témže roce, kdy byl objeven ATP (Drury and Szent-Gyorgyi, 1929).

V roce 1954 bylo prokázáno, že ATP je uvolňováno ze sensorických nervových zakončení a způsobuje vasodilataci (Holton and Holton, 1954). Počátkem 70. let 20. století vznikla hypotéza přisuzující ATP roli neurotransmiteru a byla předpovězena existence purinergních receptorů (Burnstock, 1972).

Posléze došlo k rozdělení purinergních receptorů na P1 receptory aktivované adenosinem a P2 receptory aktivované extracelulárním ATP. Dosud byly popsány 4 podtypy P1 receptorů (A1, A2A, A2B a A3) a dvě rodiny P2 receptorů – P2X rodina zahrnující 7 podtypů ionotropních receptorů (P2X1-P2X7) a P2Y rodina s 8 podtypy metabotropních receptorů (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) (Burnstock, 2006).

1.2. Metabolismus extracelulárního ATP

Dosah signalizace molekul ATP není velký, protože jsou v mimobuněčném prostoru rozkládány soustavou mimobuněčných a membránových enzymů. Proto jsou zapojené výhradně v autokrinní a parakrinní signalizaci (Burnstock, 2006).

Evolučně se signalizace ATP pravděpodobně vyvíjela zároveň se signalizací cyklickým adenosin-5'-monofosfátem (cAMP). cAMP zůstal vnitrobuněčným druhým poslem, zatímco ATP se stal mimobuněčnou signalizační molekulou.

Koncentrace ATP v buňce je zhruba 5 mM, v sekrečních váčcích do 1mM, v mezibuněčném prostoru maximálně 200 μ M. (Corriden and Insel, 2010) Tyto relativně malé koncentrace stačí k aktivaci purinergních receptorů, což z ATP činí vysoce účinnou signální molekulu.

Do mezibuněčného prostoru se ATP může uvolňovat nejen z buněk mechanicky poškozených. Řízená sekrece ATP je pozorována u buněk téměř všech všech tkání eukaryotických organismů. Zároveň jsou exprimovány i odpovídající receptory. Buňky excitabilních a sensorických tkání vylučují ATP regulovanou exocytózou buď samostatně, nebo jako kotransmitter společně s dalšími neurotransmitery a extracelulárními mediátory ve specializovaných synaptických váčcích (Burnstock, 2004).

Neexcitabilní buňky mohou ATP uvolňovat konstitutivně, nebo přechodně. Podnětem k uvolňování ATP může být mechanický nebo hypotonický stres, hypoxie, acidóza, osmotický šok, zánět (Bodin and Burnstock, 2001). Existuje více možných způsobů uvolňování ATP u nedráždivých buněk, popsán byl průchod buněčnými connexinovými a pannexinovými kanály, objemově a napětově ovládanými aniontovými kanály (Burnstock, 2006a) nebo dilatovaným pórem P2X7 receptoru (Iglesias et al., 2008). Dalšími mechanismy jsou přenos ABC (ATP-binding cassette) transportéry a exocytóza (Abbracchio et al., 2009; Corriden and Insel, 2010; Yegutkin, 2008).

V extracelulárním prostoru je ATP rychle degradován čtyřmi rodinami ektonukleotidáz: První rodinou jsou ektonukleosid trifosfát difosfohydrolázy (E-NTPDázy 1, 2, 3 a 8), které hydrolyzují nukleosid trifosfáty nebo difosfáty, Druhou skupinou jsou ektonukleotid pyrofosfatázy, které jsou schopny hydrolyzovat nukleosid trifosfáty na monofosfáty a na anorganický fosfát a umožňují také přeměnu cAMP na adenosin, Do třetí skupiny patří ektofosfoesterázy (E-NPPázy), které vyštěpují z mnoha

nejrůznějších substrátů anorganický fosfát. Poslední skupinou jsou ekto-5'-nukleotidázy, které z nukleotid-5'-monofosfátů vyštěpují nukleosidy, čímž vzniká například adenosin který je agonistou pro P1 receptory. Všechny tyto enzymy jsou vázány v buněčné membráně, ale mohou se i odštěpit za vzniku solubilních exonukleotidáz.

Metabolismu extracelulárního ATP se účastní kromě ektonukleotidáz i další enzymy. Adenosin deamináza katalyzuje deaminaci adenosinu na inosin. Purin nukleosid fosforyláza vzniklý inosin fosforyluje za vzniku hypoxantinu, který je dále metabolizován až na kyselinu močovou (Corriden and Insel, 2010; Yegutkin, 2008; Zimmermann, 2001).

Buňky však mohou exprimovat extracelulární enzymy, které ATP regenerují a mohou tak působení purinergní signalizace prodloužit. Adenylát kináza katalyzuje vznik jedné molekuly ATP a jedné molekuly AMP ze dvou molekul ADP (Yegutkin et al., 2001; Yegutkin et al., 2002), nukleosid difosfát kináza která katalyzuje transfer γ fosfátu z nukleosid 5'-trifosfátu na nukleosid 5'-difosfát, čímž umožňuje změny poměru jednotlivých nukleosid trifosfátů v extracelulárním prostoru (Agren et al., 1974; Yegutkin et al., 2001; Yegutkin et al., 2002), nebo F1/F0 ATP syntáza která využívá elektrochemický gradient protonů k syntéze ATP (Das et al., 1994; Moser et al., 2001).

1.3. Ionty Ca^{2+} v buněčné signalizaci

Ionty Ca^{2+} regulují řadu fyziologických jevů. Patří mezi ně nervosvalová dráždivost, sekreční děje, enzymové reakce, uvolňování hormonů a neurotransmiterů a intracelulární působení řady hormonů. Iont Ca^{2+} má důležitou roli intracelulárního posla, vzrůst intracelulární koncentrace volných Ca^{2+} iontů ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) je odpovědí na množství různých signálů.

Normální koncentrace volných Ca^{2+} iontů v cytosolu je ve srovnání s koncentrací v extracelulární tekutině velmi nízká (1,5 mM extracelulárně : 10^{-7} M intracelulárně). Tento rozdíl je udržován membránovými pumpami, které vápník odčerpávají z cytosolu – buď přes plazmatickou membránu ven z buňky nebo do endoplazmatického retikula. Výsledkem je vysoký gradient elektrochemického potenciálu. Vstup vápníku z extracelulárního prostoru do buňky se děje prostřednictvím iontových kanálů. Při otevření vápníkového kanálu v membráně ionty vápníku proudí do cytosolu po svém

elektrochemickém gradientu, způsobují změny Ca^{2+} senzitivních proteinů cytosolu a následně spouštějí další děje.

Podle způsobu aktivace lze vápníkové kanály rozdělit na napěťově řízené a ligandem aktivované nespecifické kationtové kanály. Iontové kanály propustné pro ionty Ca^{2+} jsou aktivovány ligandy jako je acetylcholin, aktivující acetylcholinové receptory (AChR), glutamát, aktivující glutamátové receptory (GluR) a purinové nukleotidy aktivující purinergní P2X receptory (Clapham, 2007).

1.4. P1 purinergní receptory

P1 receptory jsou metabotropní, s G-proteinem spřažené receptory citlivé k adenosinu. Podle farmakologických vlastností a molekulární struktury se dělí na podtypy A1, A2A, A2B a A3. Aktivace A1 receptoru působí cestou G_i proteinu inhibicí adenylátcyklázy. Aktivace A2A, A2B receptoru spřaženého s G_s proteinem stimuluje adenylátcyklázu a aktivace A3 receptoru spřaženého s G_i proteinem působí inhibicí adenylátcyklázy, a aktivaci cesty fosfatidylinositol-fosfolipázy C. A2 receptory se dělí na A2A a A2B dle afinity k adenosinu, kdy k A2A receptorům se adenosin váže s výrazně vyšší afinitou (Ralevic a Burnstock, 1998).

1.5. P2Y purinergní receptory

Na základě farmakologických vlastností a dle typu G-proteinu se kterým jsou spřaženy jsou P2Y receptory rozděleny do osmi podtypů: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, Y14 (Dubyak, 2003; Abbracchio et al., 2003). S G_q -proteinem jsou spřažené receptory P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, s G_i -proteinem P2Y12, P2Y13, P2Y14.

Agonisté pro jednotlivé typy P2Y receptorů jsou ATP nebo ADP, jsou jimi aktivovány s různou účinností; některé P2Y receptory, P2Y4 a P2Y6, jsou s největší potencí aktivované uridin-5'-trifosfátem (UTP), takže jsou někdy rovněž označovány jako pyrimidinergní (O'Connor et al., 1991; Dubyak, 2003). Role P2Y receptorů je přesně popsána zejména u trombocytů, a endoteliálních a epitelálních buněk. Molekuly ATP, ADP, UTP jsou uloženy v granulech trombocytů (Goetz et al., 1971) a po uvolnění z adherentních trombocytů působí pozitivním zpětným mechanismem další aktivaci destiček. Agregace trombocytů je zprostředkována zejména P2Y12 receptory (Gachet

2001) a je prokázáno, že antagonisté P2Y₁₂ receptorů jsou účinnými antitrombotickými léky (Yusuf et al., 2001, Beinart et al., 2005).

Antiagregační účinky má také selektivní antagonistu P2Y₁ receptoru, analog PPADS, MRS2500 (Cattaneo et al., 2004).

Molekuly ATP i UTP jsou uvolňovány z endoteliálních buněk při zvýšeném krevním průtoku (Saiag et al., 1995). ATP pak může mít v regulaci cévního tonu duální účinek. Prostřednictvím aktivace P2Y receptoru endoteliálních buněk působí stimulaci syntézy a uvolnění prostacyklinu a oxidu dusnatého, což vede k vazodilataci (Ralevic and Burnstock, 1996; Burnstock, 2006b). V některých případech může ATP aktivovat P2Y receptory lokalizované přímo na hladkých svalových buňkách cév a vazodilataci způsobit touto cestou (Burnstock, 1990). Zároveň ale ATP uvolněné s noradrenalinem ze sympatických perivaskulárních zakončení působí vazokonstrikci, a to aktivací P2X receptorů na buňkách hladkého svalstva cév.

1.6. P2X purinergní receptory

P2X receptory jsou iontové kanály aktivované extracelulárním ATP, propustné pro Ca²⁺ ionty, monovalentní kationty jako Na⁺, K⁺ a malé organické kationty (Valera et al., 1994). Dosud bylo popsáno 7 podjednotek savčích P2X receptorů, označovaných jako P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇. Funkční P2X receptory se mohou vyskytovat ve formě homo- a heterotrimerů (Nicke et al., 1998; Stoop et al., 1999).

Podjednotky jsou složeny z 379 (P2X₆) až 595 (P2X₇) aminokyselin a identita aminokyselinových sekvencí mezi podjednotkami kolísá mezi 26-47 % (Khakh et al., 2001). Aminokyselinové sekvence potkaních P2X₁₋₇ podjednotek jsou uvedeny na Obr. 1.

Geny pro P2X receptory se nacházejí na různých chromozomech. Geny pro P2X₄ a P2X₇ podjednotky jsou shodně lokalizované blízko konce dlouhého raménka chromozomu 12, vzdálené od sebe přibližně 130 kb (Buell et al., 1998). P2X₄ podjednotka je svojí aminokyselinovou sekvencí nejvíce blízká P2X₇ podjednotce, existuje předpoklad, že tyto dvě podjednotky vznikly genovou duplikací, (North, 2002). Jednotlivé P2X podjednotky se navzájem liší propustností pro Ca²⁺, kinetikou desenzitizace a afinitou k agonistům, antagonistům a alosterickým modulátorům.

		Exon 2	
P2X1	MARRLQDELSA-FFPEYDTTPRMVLRNKKVGVIFRLIQLVVLVYVIGWVVFVYERKGYQTSS		59
P2X2	MVRRRLARGCWS-AFWDYETPKVIIVRRNRRLGFVHRMVQLLILLVYFVWVYFIVQKSYQDSE		59
P2X3	-----MNCIS-DFFTYETTKSVVKSWTIGLINRAVQLLIIISYFVGVWVFLHEKAYQVRD		53
P2X4	MAGCCSVLG-S-FLPEYDTPRIVLIRSRKVGQLMNRVQLLILAYVIGWVVFVWEKGYQETD		58
P2X5	MGQAAWKGFV-LSLFDYKTAKFVVAKSKKVGLLYRVLQLIILLVLLIIVFLLIKKSYQDID		59
P2X6	MASAVAAALVSWGFLDYKTEKYVMTRNCWVGISQRLLQLGVVVYVIGWALLAKKGYQEWD		60
P2X7	MPACCSWN----DVFOYETNKVTRIQSVNYGTIKWILHMTVFSYVS-FALMSDKLYQRKE		55
		Exon 3	
P2X1	D-LISSVSVKIKGLAVT--QLQGLG-PQ----VWDVADYVFAHGDSSFFVMTNFIVTPQ		111
P2X2	TGPESIIITKVKGITMS-----EDK-----VWDVEEYVKPPEGGSVVSIITRIEIVTPS		107
P2X3	TAIESSVVTVKVKGFGRY-----ANR-----VMDVSDYVTFPQGTSVFVIITKMIVTEN		101
P2X4	S-VVSSVTTKAKGVAVT--NTSQLG-FR-----IWDVADYVIPAQEENSLFIMTMMIVTVN		110
P2X5	TSLQSAVVTKVKGVAVTNTTMLGER-----LWDVADYVIPSQGENVFFVVTNLIVTPN		112
P2X6	MDPQISVITKLVKGVSVTQVKELEKR-----LWDVADYVIPSQGENVFFLVTFNLVTPA		113
P2X7	P-LISSVHTKVKGVAEVTENVTEGGVTKLVHGIFDTADYTLPLQG-NSFFVMTNYLKSEG		113
		Exon 4	
P2X1	QTQGHCAENPE-GG-ICQDDSGCTPGKAERKAQGIKRTGNCVFP-FNGTVK-TCEIFGWCHV		167
P2X2	OTLGTCPESMRVHSSSTCHSDDDCIAGQLDMQNGIRTGHCVPYHGDSEK-TCEVSAWCHV		166
P2X3	QMGGCPENEEKYR--CVSDSQ--GPERPFGGILTGRCVN-YSSVLR-TCEIQGWCHV		155
P2X4	QTQSTCPPIPKDTS-ICNSDADCTPGSVDTSSGVATGRCVFP-FNESVK-TCEVAWCHV		167
P2X5	QRQGIKAEREGIPDGECSEDDDCHAGESVAVGHGLKTGRCLR-VGNSTRGTCEIFAWCHV		171
P2X6	QVQGRCPHPSVPLANCWADEDCEGEMGTYSHGKTKGQVAFNGTHR-TCEIWSWCHV		171
P2X7	QEQLKCPYPSRGK-QCHSDQGGIKGWMDPQSKGIQTGRGIP-YDQKRK-TCEIFAWCHA		170
		Exon 5	
		Exon 6	
P2X1	EVDDKIPSPALLREANFTLFIKNSISFPRFKVNRNRLVEEVNGTYMKKGLYHKIQHPLC		227
P2X2	EDG-TSDNHFLGKMAPNFTILIKNSIHYPKFKFSKGNIASQKSD-YLKHCTFDQDSDPYC		224
P2X3	EVD-TVEMPIM-MAENFTIFIKNSIRFPLNFKGNLLPNTLTKDKIKRFRHPEKAPFC		209
P2X4	ENDVGVPTPAFLKNAENFTLLVKNNIWIYKFNFSKRNILPNIITTSYLSKGIYNAQTDPPC		227
P2X5	ZTK-SMPTDPLLKDAESFTISIKNFIRFPKFNFSKANVLETPDNKHFLKTHFSSSTN-LYC		229
P2X6	ESS-AVPRKPLLAQAKNFTLFIKNTVTFKFNFSRTNALDWTNDTYFKYGLDLSLSSPYC		230
P2X7	EEGKEAPRPAALLRSANFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNILLPGMNIS----CTFHKTWNPOC		226
		Exon 7	
		Exon 8	
P2X1	BVFNLGVVRESQDFRSLAEKGGVVGITIDWKKDLDWHVRRCKPIYQFHGL---YGEKN		284
P2X2	BIFRLGFIVEKAGENFTELAHKGGVIGVILNWNCDLSESECNPKYSFRRLD--PKYDP		282
P2X3	BILRVGDVVKFAGQDFAKLARTGCVLGIKIGWVCDLQKAWDOCIPKYSFTRLDGVSSEKSS		269
P2X4	BIFRLGTIVGDAGHSFOEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASLCLPRYSFRRLDTRDLEHN		287
P2X5	BIFRLGSIVRWAGADFDQDIALKGGVIGIYLEWDCDLDKAASKCNPHYYFNRLDNKHTHS-		288
P2X6	PVFRIGDLVAMTGGDFEDLALLGGAVGINIHWDCNLDTKGSDCSPQYSF-QLQE-----		283
P2X7	BIFRLQDIFQEIGENITEVAVQGGIMGIELIYWDNLDWSWHRCPKYSFRRLDDKYTNES		286
		Exon 9	
		Exon 10	
P2X1	LSPGFNFRFARHFVQ-NGTNRRLHFRVFGIHFDDILVDGKAGKFDIIPMTTIGSGIGIFG		343
P2X2	ASSGYNFRFAKYYKINGTTTTTRTLIKAYGIRIDVIVHGQAGKFSLIPTIINLATALTSIG		342
P2X3	VSPGYNFRFAKYYKMENGSEYRLLKAFGIRFDVIVLVYGNAGKFNIIPTIISVAAFTSVG		329
P2X4	VSPGYNFRFAKYYRDLAGKEQRTLTKAYGIRFDIIVFGKAGKFDIIPMTINVGSGLALLG		347
P2X5	ISSGYNFRFARYRDPNGVEFRDLMAKAYGIRFDVIVNGKAGKFSIIPVINIGSGLALMG		348
P2X6	---RGNFRFANYWAAAGVESRSLKLYGIRFDIIVTGGAGKFDIIPTAITVGTGAANLW		341
P2X7	LFPGYNFRYAKYYKE-NGMEKRTLTKAFGVRFDIIVFGTGGKFDIILQLVVYIGSTLSYFG		345
		Exon 11	
P2X1	VATVLCDLLLLH-----ILPKRHYYKQKFKYAEDMGPGEHEHPV		384
P2X2	VGSFLCDWILLT-----FMNKNKLYSHKFKDKVVRTPKHPSSRWVPTL		384
P2X3	VGTVLCDIILLN-----FLKADHYKARKFEEVTETTLKGTASTNPV		371
P2X4	VATVLCQIVLVY-----CMKKKYRDKKYYVEDYEQGLSGEMNQ		389
P2X5	AGAFFCDLVLIY-----LIRKSEFYRDKKFEKVRGQKEDANVEVEAN		390
P2X6	MVTFLCDLLLY-----VDREAGFYWRTRKYYEERAPKATTNSA 379		
P2X7	LATVCIQLIINTYASTCCRSRVYPSCKCCEPCAVNEYVYRKKCEPIVEPKPTLKYSVFD		405
P2X1	ATSSTLGLQENMRTS 399		
P2X2	ALVLGQIPPPSHYSQDQPPSPSPGEGPTLGEAELPLAVQSPRPCISALTEQVVDTLG		444
P2X3	FASDQATVEKQSTDSGAYSIGH 393		
P2X5	EMEQRPEDEPLERVQDEQSQELAQSQRKQNSNCQVLEPARFGLRENAIVNVKQSQIL		450
P2X7	EPHIWMVDQQLLGLKSLQDVKGQEVPRPQTDPLELSRLSLSLHHSPPIPGQPEEMQLLQIE		465
P2X2	QHMQRPPVPEPSQDSTSTDPKGLAQL 472		
P2X5	HPVKT 455		
P2X7	AVPRSRDSPDWCQCGNCLPSQLPENRRALEELCCRRKPGQCITTSSELSKIVLSREALQL		525
P2X7	LLLYQEPLLALEGEAINSKLRHCAYRSYATWRVFSQDMADFAILPSCCRWKIRKEPKTQ		585
P2X7	GQYSGFKYPY 595		

Obr. 1: Aminokyselinové sekvence potkaních P2X1-7 podjednotek. Vertikálními prázdnými obdélníky jsou zvýrazněny konzervované aminokyseliny, plnými šedými konzervované cysteiny, červeným obdélníkem jsou označeny konzervované tyroziny v 1. transmembránové doméně. Tmavé horizontální linie nad aminokyselinovou sekvencí označují oblast hydrofobních transmembránových domén. (North, 2002, upraveno).

Aktivace P2X receptoru má za následek zvýšení $[Ca^{2+}]_i$, a to dvěma odlišnými způsoby: Ca^{2+} ionty vstupují do buňky přímo pórem samotného P2X receptoru, a následně v excitabilních tkáních má depolarizace způsobená aktivací P2X receptoru za následek vstup Ca^{2+} do buňky přes napětově řízené Ca^{2+} kanály. Prostřednictvím zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ tak extracelulární ATP a P2X receptory získávají velký význam v mnoha fyziologických procesech.

Buňky často současně exprimují různé typy P2X podjednotek. P2X receptory se často přirozeně vyskytují ve formě heteromeru. Funkční studie rekombinantních receptorů prokazují, že heteromerní receptory mají odlišné farmakologické vlastnosti v porovnání s vlastnostmi odpovídajících homomerních receptorů. Funkčně a biochemicky byly doposud charakterizovány heteromery P2X1/P2X2 (Brown et al., 2002), P2X1/P2X4 (Nicke et al., 2005), P2X1/P2X5 (Le et al., 1999; North and Surprenant et al., 2000), P2X2/P2X3 (Lewis et al., 1995), P2X2/P2X6 a P2X4/P2X6 (Le et al., 1998).

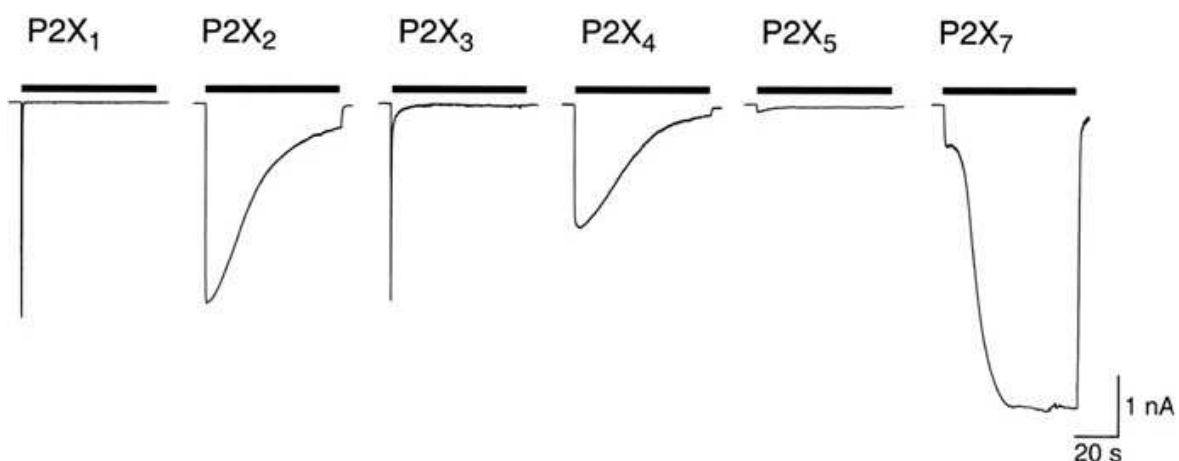
Byl popsán také heteromerní receptor P2X4/P2X7 (Guo et al., 2007), avšak jeho skutečná existence je stále nejasná. Otázku upřednostňovaného poměru uspořádání jednotlivých podjednotek v heteromeru řešila studie, která ukázala, že v heteromeru P2X2/P2X3 jsou podjednotky v kompozici P2X2(P2X3)₂ (Jiang et al., 2001). Funkční P2X receptor složený ze tří různých podjednotek dosud popsán nebyl. S využitím koimmunoprecipitačních technik se předpokládá také formování heteromeru P2X1/P2X3, P2X1/P2X6, P2X2/P2X5, P2X3/P2X5, P2X4/P2X5 a P2X5/P2X6 (Torres et al., 1999), avšak tyto heteromerní receptory prozatím nebyly charakterizovány funkčně ani farmakologicky.

Uspořádání P2X receptoru do trimeru je další z rysů, který jej odlišuje od ostatních skupin ligandem otevíraných iontových kanálů. Iontotropní glutamátové receptory, které se tradičně dle agonisty dělí na NMDA, Z-amino-3--hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionové (AMPA) a kainátové, tvoří jeden receptor ze čtyř podjednotek. Skupina receptorů zahrnující nikotinový acetylcholinový receptor (nAChR), receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA_AR), 5-hydroxytryptaminový a glycinový receptor, tvoří jeden kanál z pěti podjednotek .

P2X receptory se dále liší Ca^{2+} propustností; mají v průměru vyšší Ca^{2+} propustnost než nACh nebo AMPA receptory a stejnou nebo vyšší propustnost než NMDA receptory (Burnashev et al., 1995). U většiny kanálů je iontová selektivita během opakované stimulace konstantní, avšak některé podtypy P2X receptoru jsou unikátní tím, že jejich selektivní filtr je dynamický a dlouhodobá přítomnost agonisty vede k dilataci póru kanálu,

který se tak stává propustný pro větší molekuly (Khakh et al., 1999a; Virginio et al., 1999). Jednotková vodivost P2X kanálu je relativně malá; ~9-12 pS pro P2X4 kanál (Evans et al., 1995), ~30 pS pro P2X2 kanál (Ding and Sachs, 1999b), ve srovnání např. s jednotkovou vodivostí ~50 pS NR1/NR2A glutamátového receptoru (Stern et al., 1992).

V přetrvávající přítomnosti agonisty dochází k desenzitizaci receptoru, způsobené přechodem ligandem obsazeného kanálu do stabilní konformace, v níž je propustnost pro ionty změněna. Jednotlivé podtypy P2X receptorů se liší rychlostí desenzitizace. Pořadí receptorů od nejrychleji desenzitizujících je následující: P2X1 = P2X3 > P2X2b > P2X4 > P2X2a. Receptor P2X7 nedesenzitizuje (North, 2002; North and Barnard, 1997) Kinetika desenzitizace P2X receptoru je znázorněna na Obr. 2.



Obr. 2 Kinetika desenzitizace P2X receptoru při 60 s stimulaci 30 μ M ATP (P2X1 – 6) a 1 mM ATP (P2X7) (North, 2002) .

Mezi jednotlivými membránovými receptory byl popsán tzv. funkční cross-talk, což je modulace aktivity odlišných typů kolokalizovaných receptorů při současné aktivaci jejich vlastními přenašeči. Jedná se tedy o efektivní cestu adaptace neuropřenašečové signalizace ke změnám funkčních potřeb. Negativní cross-talk byl popsán například mezi P2X a nACh receptory, kdy proudy vyvolané současnou aplikací ACh a ATP jsou signifikantně menší než součet nezávislých ACh a ATP odpovědí (Nakazawa, 1994). Dále byl negativní cross-talk popsán mezi P2X2 a GABA_A, GABA_C receptory (Sokolova et al., 2001; Boué-Grabot et al., 2004), mezi P2X2 a 5-hydroxytryptaminovými receptory (Boué-Grabot et al., 2003), mezi P2X3, P2X2/3 a opiátovými receptory (Chizhnikov et al., 2005), mezi adenosinovými a dopaminovými receptory (Gines et al., 2000). Pro cross-talk mezi P2X2 a GABA_A, GABA_C receptory je nezbytná interakce cytoplazmatického C-

konce P2X receptoru a cytoplazmatické kličky mezi 3. a 4. transmembránovou doménou GABA receptoru (Boué-Grabot et al., 2004). Naopak synergický účinek byl pozorován mezi ATP a noradrenalinem, ATP a histaminem, kdy noradrenalinová nebo histaminová stimulace zesiluje P2X1 zprostředkovanou odpověď (Smith a Burnstock, 2004).

Zdá se, že P2X receptory a ATP jako endogenní rychlý neuropřenašeč jsou klíčové v přenosu bolesti a v mechanosenzorické transdukcii viscerálních dutých orgánů (Burnstock et al., 1996; Cook et al., 1997; Cook et al., 2002; Ford et al., 2006).

1.7. Farmakologie P2X receptoru

P2X podjednotky mají různou citlivost k ATP a agonistům (Obr. 3), koncentrace, které vyvolávají polovinu maximální odpovědi (EC_{50}) se pro jednotlivé typy P2X receptorů liší. Hodnota EC_{50} agonisty ATP je pro P2X1 ~1 μ M, pro P2X2 4.6–7.4, pro P2X3 0.03–2.6 μ M, pro P2X4 3.0–11.8 μ M (Gever et al., 2006). Některé nativní i rekombinantní P2X receptory jsou citlivé k α,β -metylen-adenosin-5'-trifosfátu (α,β -meATP), pomalu degradujícímu analogu ATP. Tento agonista mimikuje účinek ATP u P2X1 a P2X3 receptoru, které se tím odlišují od ostatních P2X podjednotek (North, 2002).

Dalším účinným agonistou je 3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5'-trifosfát (BzATP), který specificky aktivuje P2X7 receptor. Receptor P2X7 má nízkou citlivost k ATP, k receptorové aktivaci se používají koncentrace 100 μ M a více. Naproti tomu 10-30krát účinnějším agonistou je BzATP (North, 2002).

Type	Principle agonists
P2X ₁	ATP(0.1-1 μ M) = 2-methylthio-ATP(0.1-1 μ M) \geq $\alpha\beta$ -meATP(1-3 μ M) > BzATP(3-30 μ M)
P2X ₂	ATP(1-30 μ M) = 2-methylthio-ATP(3-10 μ M) > BzATP(30 μ M) >> $\alpha\beta$ -meATP(>300 μ M)
P2X ₃	2-methylthio-ATP(0.3 μ M) \geq ATP(1 μ M) = $\alpha\beta$ -meATP(1 μ M)
P2X _{2/3}	2-methylthio-ATP(1 μ M) > ATP(2 μ M) > $\alpha\beta$ -meATP(3 μ M)
P2X ₄	ATP(10 μ M) \geq 2-methylthio-ATP(1-100 μ M) >> $\alpha\beta$ -meATP(>300 μ M) \geq BzATP(>500 μ M)
P2X ₅	ATP(10 μ M) = 2-methylthio-ATP(10 μ M) >> $\alpha\beta$ -meATP(>300 μ M) \geq BzATP(>500 μ M)
P2X _{1/5}	ATP(0.7 μ M) > 2-methylthio-ATP(1.3 μ M) > $\alpha\beta$ -meATP(3.1 μ M)
P2X ₆	2-methylthio-ATP(9 μ M) \geq ATP(12 μ M) >> $\alpha\beta$ -meATP(>100 μ M)
P2X _{4/6}	ATP(6.3 μ M) \geq 2-methylthio-ATP(7.7 μ M) > $\alpha\beta$ -meATP(12 μ M)
P2X ₇	BzATP(3 μ M) > 2-methylthio-ATP(10 μ M) > ATP(100 μ M) > $\alpha\beta$ -meATP(>300 μ M)

Obr. 3 Agonisté P2X1-7 receptorů a porovnání jejich efektivity pro jednotlivé podjednotky (von Kügelgen, 2008)

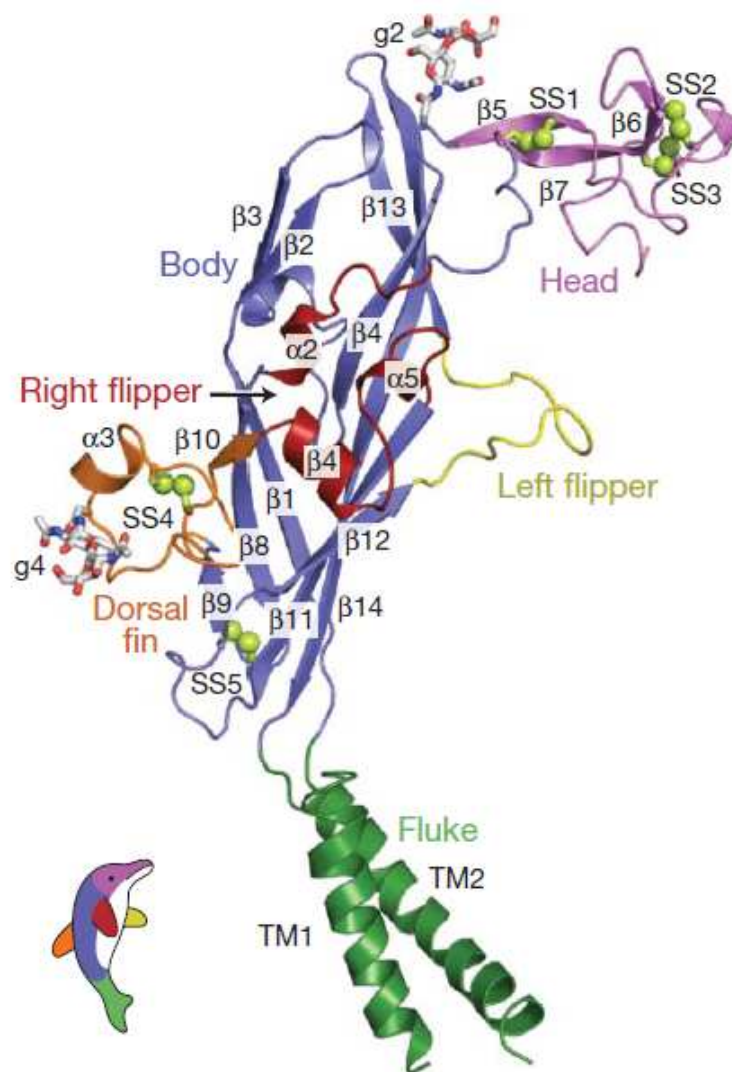
Antagonisté P2X receptoru

Neselektivními antagonisty P2X receptorů jsou suramin a PPADS (pyridoxal fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonová kyselina) (Evans et al., 1995). Citlivost k těmto antagonistům je však pro různé P2X podjednotky odlišná, například P2X4 podjednotka je oproti ostatním relativně necitlivá k inhibici suraminem a PPADS (Buell et al., 1996). Pro usnadnění farmakologické identifikace jednotlivých podtypů P2X receptorů byly v posledních letech vyvíjeni typově selektivní agonisti, vesměs sloučeniny odvozené od suraminu a PPADS.

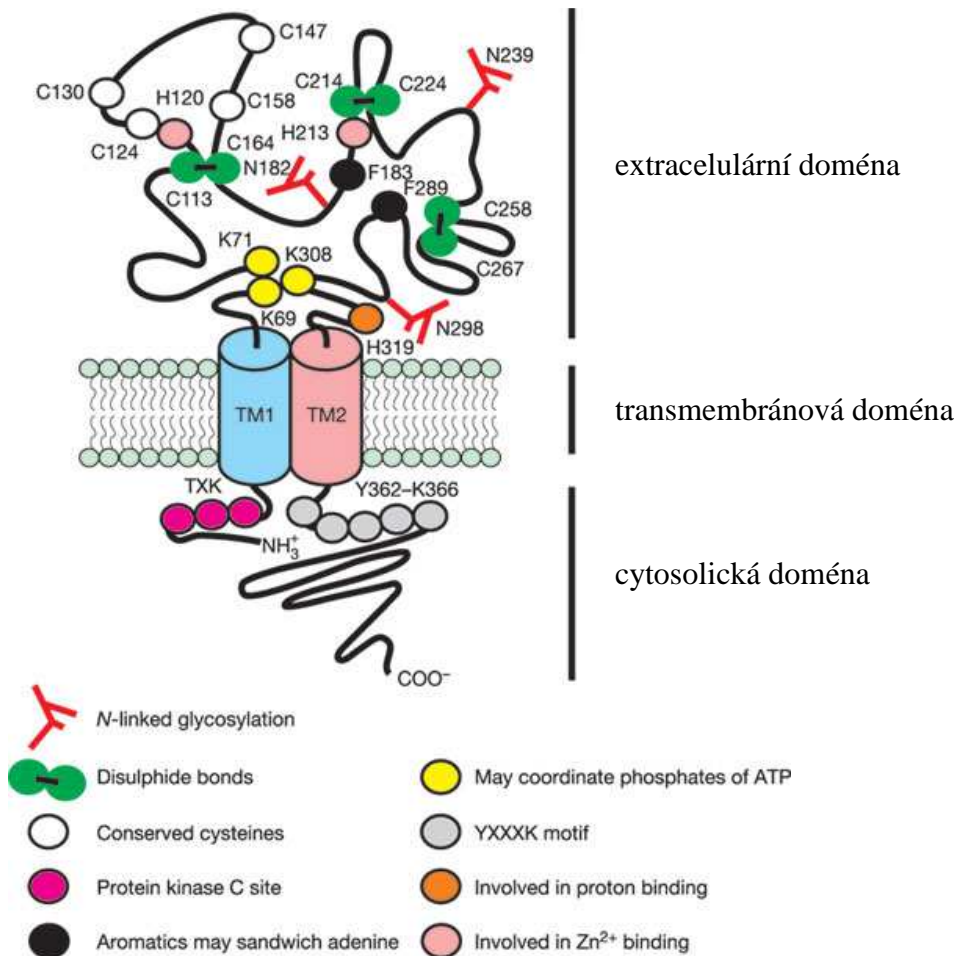
1.8. Struktura P2X receptoru

P2X receptory jsou složeny ze tří podjednotek a představují typ ligandem aktivovaných iontových kanálů, které se liší od kanálů typu glutamátového a acetylcholinového receptoru, které jsou složeny ze čtyř až pěti podjednotek. Funkční P2XR se mohou vyskytovat ve formě homo- a heterotrimeru (Nicke et al., 1998; Stoop et al., 1999). V nedávné době byla popsána jejich struktura v uzavřeném stavu pomocí krystalu upraveného P2X4 z *Danio rerio*, (zfP2X4) (Kawate, T., et al, 2009). Celý protein byl rozdělen do několika částí a popsán na základě jisté podobnosti s tvarem těla delfína (Obr.4).

Sekundární struktura P2X receptorů nicméně byla popsána již dříve. Podjednotky P2X receptoru se skládají z velké extracelulární domény, ze dvou transmembránových domén (TM1 a TM2), intracelulárního N konce a intracelulárního C konce s proměnnou délkou (Brake et al., 1994; Valera et al., 1994; Newbolt et al., 1998). (Obr. 5).



Obr. 4: Proteinová struktura podjednotky zfp2X4 receptoru Tvar podjednotky zfp2X4 receptoru byl popsán analogicky podle jisté podobnosti s tělem delfína. Extracelulární smyčka je tvořena tělem (modrá), hlavou (fialová), pravou prsní ploutví (červená), levou prsní ploutví (žlutá) a hřbetní ploutví (oranžová). Transmembránové domény, TM1 a TM2, tvoří pomyslnou ocasní ploutev (zelená). Ektodoména obsahuje pět disulfidických můstků (žluté koule). Intracelulární konce byly před krystalizací proteinu odstraněny, nejsou proto v modelu znázorněny. (Kawate et al., 2009).



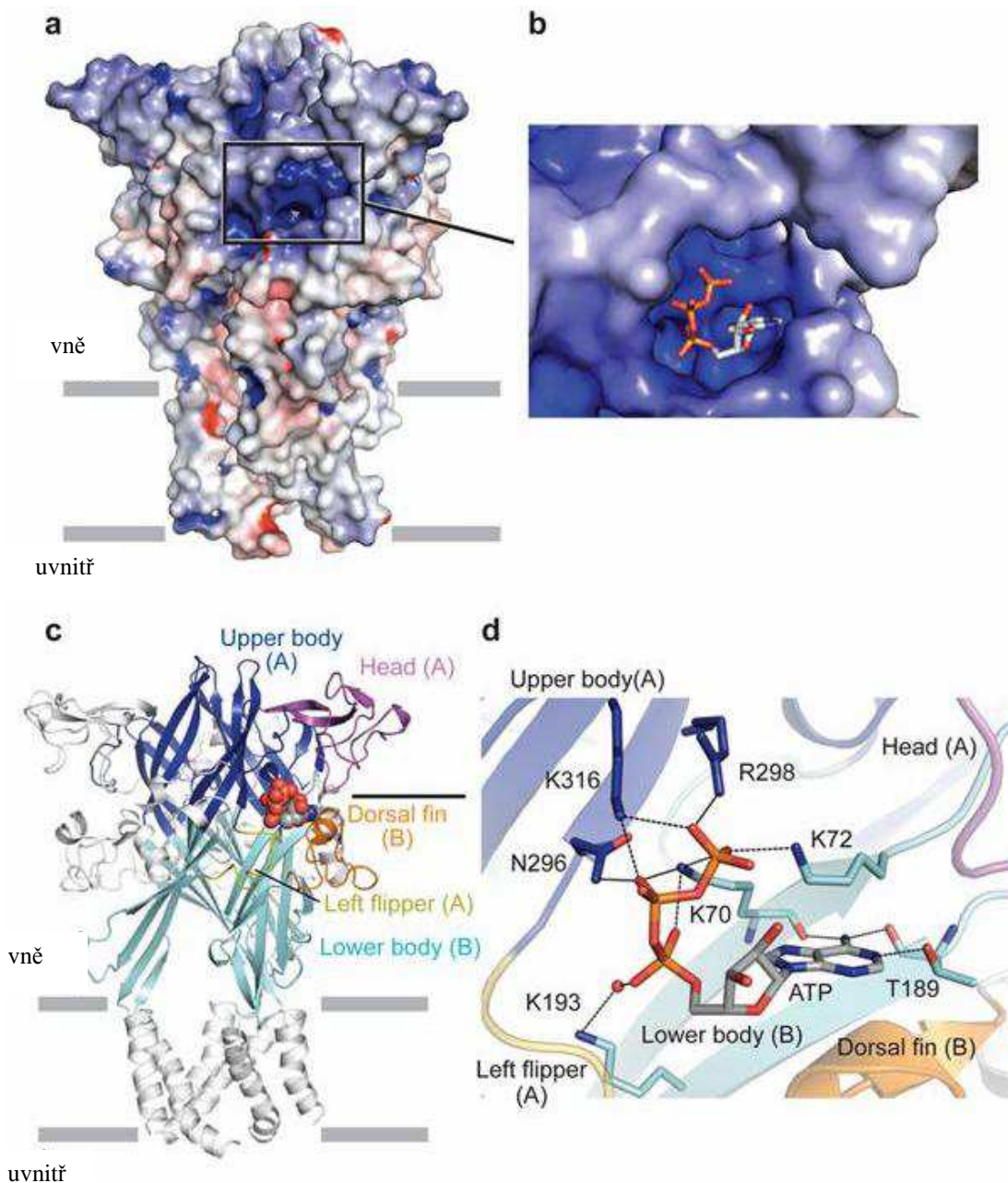
Obr. 5: Schema struktury P2X receptoru a orientace v plazmatické membráně. V extracelulární doméně jsou vyznačeny disulfidické můstky (zeleně) konzervované cysteiny (bíle), histidiny s možností vazby Zn^{2+} (růžově), fenyalanin (černě), lysiny koordinující vazbu ATP (žlutě) a glykosylovaná místa (červeně). V plazmatické membráně jsou označeny dvě transmembránové domény, v cytosolické doméně pak N konec se sekvencí pro interakci s proteinkinázou C a C konec s YXXXK motivem (Khakh and North, 2006).

1.8.1. Extracelulární doména

U každé ze tří podjednotek P2X receptorů je extracelulární smyčka tvořená aminokyselinami, které jsou organizovány převážně v β -lístech doplněných několika nedefinovatelnými úseky a čtyřmi krátkými α -helixy. V extracelulární doméně všech P2X receptorů bylo identifikováno 10 konzervovaných cysteinových zbytků. Tvoří intramolekulární disulfidové můstky (Cys116-Cys165, Cys126-Cys149, Cys132-Cys159 a Cys217-Cys227; číslování P2X4). a podílejí se tak na tvorbě terciární struktury receptoru, což je unikátní v porovnání s jinými receptory (Smith a Burnstock, 2004)

Podobně jako u jiných receptorů je extracelulární doména všech P2X receptorů glykosylována. Glykosylace je nezbytná pro spojení podjednotek do funkčního receptoru a pro jeho lokalizaci v plazmatické membráně. (Torres et al., 1998; Rettinger et al., 2000). Počet konzervativních motivů pro N-glykosylaci (Asn-X-Ser/Thr) se u jednotlivých podjednotek liší (P2X1 – 4, P2X2 – 3, P2X3 – 4, P2X4 – 6, P2X5 – 2, P2X6 – 3, P2X7 – 3) (North, 2002). Glykosylace jednoho motivu je dostačující pro funkčnost receptoru, zatímco pro umístění receptoru do plazmatické membrány je potřebná glykosylace dvou těchto míst (Newbolt et al., 1998; North, 2002). Disulfidové můstky a glykosylační místa mohou determinovat strukturu ektodomény P2X receptoru, nejsou však rozhodující pro vazbu ATP.

Extracelulární doména P2X receptoru obsahuje 3 ATP vazebná místa (Bean et al., 1990). Každé vazebné místo je na rozhraní dvou podjednotek. Základem ATP vazebného místa je osm konzervovaných aminokyselinových zbytků zahrnujících Lys70, Lys72, Phe188 a Thr189 z jedné podjednotky a Asn296, Phe297, Arg298, Lys316 a ze sousední podjednotky (Goaux et al., 2009); číslování podle zP2X4 receptoru (Obr. 6). Vazba ATP pak způsobí konformační změny, které jsou převedeny k transmembránovým doménám a mechanismem podobným otvírání clony fotoaparátu vyústí ve změnu propustnosti iontového kanálu.



Obr.6: Vazebné místo pro ATP na rozhraní dvou podjednotek u zfp2X4 receptoru. Elektrostatický potenciál je vyjádřený v barevné škále: modré jsou kladně nabitě AMK, červené záporně nabitě AMK (a), totéž v detailu s molekulou ATP (b), znázornění domén, které se účastní vazby ATP: Upper body (horní část těla) modrá, Head (hlava) fialová, Dorsal fin (hřbetní ploutev) oranžová, Left flipper (levá prsní ploutev) žlutá a Lower body (spodní část těla) světle modrá (c). Detail ATP vazebného místa (d) s AMK, které se účastní koordinace vazby ATP. Vodíkové můstky jsou vyznačené černou přerušovanou čarou. (Kawate et al., 2009)

1.8.2. Transmembránové domény

Transmembránové domény (TM) mají strukturu α -helixů, které tvoří iontový kanál. Tvar kanálu připomíná přesýpací hodiny a je tvořen šesti α -helixy, dvěma v každé ze tří podjednotek (Li et al., 2004; Khakh a Egan, 2005). Každý helix je tvořen 21 aminokyselinou. V rámci podjednotky jsou TM1 a TM2 α -helixy orientovány k sobě navzájem antiparalelně a vzhledem k plazmatické membráně jsou nakloněny pod úhlem téměř 50 °. Podjednotky jsou orientovány symetricky vzhledem k myšlené ose, která prochází kolmo k plazmatické membráně. Vnitřní TM2 helixy se vzájemně kříží zhruba v polovině jejich délky. Na rozdíl od krátkých extracelulárních helixů jsou TM helixy pravotočivé (Kawate et al., 2009).

Oba TM helixy jsou zapojeny v mechanismu otvírání a zavírání iontového kanálu, který se označuje také jako „gating“ (Egan et al., 1998; Jiang et al., 2001; Li et al., 2004; Silberberg et al., 2005; Silberberg et al., 2007). Tímto pojmem se označují konformační změny v molekule proteinu, které nastávají mezi otevřeným a uzavřeným, respektive uzavřeným a otevřeným stavem iontového kanálu jako odpověď na specifický podnět (Colquhoun, 1998), v tomto případě na vazbu ATP. Během aktivace kanálu dochází k největším konformačním změnám v částech TM, které jsou blízké extracelulární doméně: v úsecích Tyr42-Val47 a Thr335-Leu346 (číslování P2X4) (Silberberg et al., 2005). TM1 tvoří rozsáhlé interakce se sousedním TM2 a také s lipidovou dvouvrstvou. V té části TM1 domény, která je blízko N-konci je také lokalizována většina reziduí necitlivých k mutagenезi, což může být vysvětleno právě velkou lipidovou expozicí tohoto úseku. Naproti tomu úsek TM1 domény blízký ektodoméně obsahuje rezidua citlivější k záměně, což naznačuje, že tento úsek pravděpodobně silněji interaguje s jinou podjednotkou (Silberberg et al., 2005; Jelínková et al., 2008). TM1 doména je méně důležitá v kontrole toku iontů (Jiang et al., 2003; Khakh a Egan, 2005; Samways et al., 2008), částečně se podílí na kontrole Ca^{2+} permeability (Samways et al., 2008) a změně stavu póru z relativně selektivního v dilatovaný (Khakh a Egan, 2005).

TM2 helixy lemují pór a tvoří vlastní iontový kanál a také se podílejí na spojování podjednotek, iontové selektivitě a permeabilitě pro dvojmocné ionty (Egan et al., 1998; Migita et al., 2001; Samways a Egan, 2007; Li et al., 2008).

Každá transmembránová doména obsahuje dvě aminokyseliny konzervované napříč všemi P2X podjednotkami. Jedná se o Gly30, Tyr43 v TM1, a Gly342, Asp349 v TM 2 (P2X2 číslování). Při alaninové skenovací mutagenезi TM domén, která byla provedena u nedesenzitizujícího P2X2 receptoru, se záměna G30A neprojevila změnou v ATP citlivosti

ani v rychlosti deaktivace kanálu. Mutace Y43A se projevila zvýšenou ATP citlivostí a pomalejší deaktivací ve srovnání s divokým typem (WT) P2X2 receptoru (Li et al., 2004). Vzhledem k tomu, že ATP vazebné místo se nachází v ektodoméně, svědčí to o důležitosti této konzervované aminokyseliny v „gating“ mechanismu. Mutace G342A se také projevila výrazně zvýšenou citlivostí k ATP, mutací D349A vznikl nefunkční P2X2 kanál. Změny naznačují důležitost konzervovaných aminokyselin Tyr43, Gly342, Asp349 v kinetice P2X2 kanálu (Li et al., 2004).

Tryptofanová (Silberberg et al., 2005) a cysteinová (Jelínková et al., 2008) mutagenese P2X4 receptoru potvrdila důležitost konzervovaných aminokyselin. U mutace G29W (odpovídá pozici G30 P2X2) nedošlo k výrazným změnám ATP citlivosti oproti WT receptoru, avšak záměna Y42W a Y42C (Y43 u P2X2) způsobila zvýšení ATP citlivosti. Záměna G347W a G347C (G342 u P2X2) se projevila výrazným snížením citlivosti kanálu, záměna D354W a D354C (D349 u P2X2) vyústila ve vznik nefunkčního kanálu (Silberberg et al., 2005) (Jelínková et al., 2008).

1.8.3. Intracelulární N- a C- konec

Intracelulární konce P2X podjednotek se podílí především na regulaci desenzitizace receptoru. Vyjmutí fosforylačního konzervovaného YxTxR/K motivu z N-konce způsobí urychlení desenzitizace (Boue-Grabot et al., 2000; Liu et al., 2003). Desenzitizací označujeme snížení citlivosti receptoru k agonistům, které se projevuje poklesem proudové odpovědi v přítomnosti agonisty.

V délce intracelulárního C-konce jsou mezi jednotlivými P2X podjednotkami značné rozdíly (27 aminokyselin u P2X6 až 239 u P2X7), přesto u všech podjednotek byl na tomto konci identifikován konzervovaný YxxxK motif. Nachází se v blízkosti TM2 a je asociován s efektivitou exprese receptoru na buněčném povrchu (Chaumont et al., 2004). P2X7 receptor má nejdelší C-konec a existují hypotézy, že terminálních 180 aminokyselin je zapojeno ve stabilizaci receptoru a interakci s lipidy (Denlinger et al., 2001; Denlinger et al., 2003; Smart et al., 2003). Interakce P2X2 receptoru s jinými ligandem aktivovanými kationovými kanály (5-HT₃A, ω 3 β 4 nAChR, GABA_ACR) je spojována s reziduy 374-469 na C-konci receptoru (Boue-Grabot et al., 2003, 2004). C-konec je rovněž zapojen v modifikaci desenzitizace. Například sestříhová varianta P2X2 receptoru se zkráceným C-koncem (P2X2b receptor, kterému chybí 69 aminokyselin: Val₃₇₀-Gln₄₃₈ včetně) desenzitizuje přibližně 5krát rychleji než varianta nezkrácená (Koshimizu et al., 1998b).

1.9. Podtypy P2X receptorů

1.9.1. P2X1 receptor

Podjednotka P2X1receptoru byla poprvé naklonována z hladkého svalu potkana v roce 1994. Je složena z 399 aminokyselin. (Valera et al., 1994). Gen pro P2X1 receptor je lokalizován na krátkém raménku 17. chromozomu (17p13.3). Desenzitizace P2X1 receptoru je rychlá, v řadu stovek milisekund, a obnova z desenzitizovaného stavu je extrémně pomalá. K úplnému návratu z desenzitizovaného stavu dochází až po více než 15 minutách (Buell et al., 1996; Valera et al., 1994). Důležitý vliv na fenotyp desenzitizace mají obě transmembránové domény a přilehlá rezidua v intracelulární části proteinu (Werner et al., 1996). Důležitý pro průběh desenzitizace se zdá být také Thr18. Nachází se v oblasti intracelulárního N-konce, v konsensus sekvenci pro fosforylaci PKC (TXR/K), která je konzervovaná mezi všemi P2X receptory. Jednobodová mutace Thr18 za Ala zrychlí průběh desenzitizace P2X1 receptoru (Ennion and Evans, 2002b). Thr18 ale není fosforylován. PKC pravděpodobně působí na P2X1 receptor nepřímo, fosforylaci proteinu asociovaného s tímto receptorem (Vial et al., 2004). Na pravděpodobnou přítomnost intracelulárního regulátoru desenzitizace P2X1 receptoru ukázaly i elektrofyziologické pokusy s buňkami permeabilizovanými pomocí amphotericinu. (Lewis and Evans, 2000).

Agonisti P2X1 receptoru (seřazeno podle účinnosti) jsou: α,β -meATP = ATP = 2-MeSATP. Selektivním antagonistou P2X1 receptoru je IP₅I (diinosin pentafofát), dalšími antagonisty jsou TNP-ATP (trinitrofenyl adenosin-5'-trifosfát), analogy suraminu NF023, NF279 a NF449, a analogy PPADS, MRS 2159 a PPNDS. Regulátorem P2X1 receptoru je také fosfatidylinositol-4,5bisfosfát (PI(4,5)P₂). Bylo prokázáno, že snížením jeho koncentrace v buňce se snižuje amplituda ATP-vyvolaného proudu a prodlužuje se doba návratu P2X1 receptoru z desenzitizovaného stavu. PIP₂ interaguje s motivem Ile356-Ala371 v C-terminální doméně (Bernier et al., 2008b). Desenzitizaci P2X1 receptoru také pravděpodobně ovlivňuje i asociace s aktinovým skeletem v buňce (Parker, 1998).

P2X1 receptory byly nalezeny v hladkých svalových buňkách cév, močového měchýře a střeva. Jejich prostřednictvím dochází ke kontrakci stěny těchto dutých orgánů (Suzuki a Kokubun, 1994; Ralevic et al., 1998; Burnstock, 2006c). P2X1 receptory jsou také přítomny na krevních destičkách, kde hrají roli v jejich aktivaci a agregaci (Rolf et al., 2001; Hechler et al., 2003; Erhardt et al., 2003). Dále byly P2X1 receptory identifikovány v hippocampu, mozečku a neuronech zadních rohů míšních (Burnstock 2003a, Burnstock et al 1998).

1.9.2. P2X2 receptor

P2X2 receptor byl poprvé klonován v roce 1994 z PC12 buněk (pheochromocytoma cells) (Brake et al., 1994). Oproti P2X1 receptoru obsahuje C-terminální extenzi a jeho sekvence je dlouhá 472 aminokyselin. Gen pro P2X2 receptor je lokalizován na dlouhém raménku 12. chromozomu (12q24.33). Při trvalejší aplikaci (10 - 60s) agonisty P2X2 receptor dilatuje a stává se propustným i pro velké organické molekuly (Virginio et al., 1999). Desenzitizace P2X2 receptoru je pomalá, probíhá v řádu několika desítek sekund (Brake et al., 1994; Evans et al., 1995). Pravděpodobně příčinou pomalého fenotypu desenzitizace P2X2 receptoru je konstitutivní fosforylace Thr18 (Boue-Grabot et al., 2000). Důležitá z hlediska průběhu desenzitizace je pravděpodobně i C-terminální doména, jejíž délka se liší mezi sestřihovými variantami receptoru. O 69 aminokyselin kratší izoforma P2X2B desenzitizuje pětikrát rychleji než delší sestřihová varianta P2X2A, a zkracování nebo mutace C-terminální domény P2X2A receptoru způsobují zrychlení jeho desenzitizace (Koshimizu et al., 1999; Koshimizu et al., 1998; Smith et al., 1999). Také mutace negativně nabitého rezidua Asp349 blízko intracelulárního konce TM2 P2X2A receptoru může urychlit desenzitizaci (Zhou et al., 1998). Při měření ATP vyvolaných proudů P2X2 receptorů z oocytů *Xenopus laevis* metodou „outside-out patch“, kdy dochází k vytrhnutí terčíku z plasmatické membrány, je oproti měření z cele buňky průběh desenzitizace P2X2 receptoru také zrychlen. Je tedy možné, že s C-terminální doménou interaguje intracelulární regulátor zpomalující rychlost desenzitizace receptoru (Zhou et al., 1998).

Agonisté P2X2 receptoru (seřazeno podle účinnosti) jsou: $ATP \geq ATP\gamma S \geq 2\text{-MeSATP} > \alpha, \beta\text{-meATP}$. Antagonisté P2X2 receptoru jsou: suramin a jeho analog NF770, isoPPADS a RB2 (Reactive blue 2). Bylo prokázáno, že desenzitizace P2X2 receptoru je regulována fosfoinositidy. Fosfatidylinositol-3-fosfát a fosfatidylinositol-3,5bisfosfát se váží na kladně nabitá rezidua v C-terminální doméně receptoru, konkrétně Lys365 a Lys369, a pravděpodobně tak brání konformačním změnám receptoru a prodlužují dobu jeho desenzitizace. Interakce s fosfoinositidy také zvyšuje propustnost P2X2 receptoru pro velké organické kationty (Fujiwara and Kubo, 2006).

P2X2 receptory se čteně vyskytují v nervovém systému a periferních tkáních. Jsou přítomny na nervových zakončeních i postsynaptických membránách a hrají roli v ATP-zprostředkovaném rychlém synaptickém přenosu na interneurálních synapsích. V CNS jsou lokalizovány především v kortexu, mozečku, hypotalamu, striatu, hippocampu a zadních rožích míšních (Kanjhan et al., 1999; Burnstock et al., 2004; Terasawa et al., 2005;

Gever et al., 2006; Vavra et al., 2011; Bhattacharya et al., 2013). P2X2 receptory tak mohou být zapojeny do regulace učení a paměti, v kontrole motorických funkcí, v senzoričké integraci, v autonomní koordinaci základních životních funkcí. V periferním nervovém systému se P2X2 receptory vyskytují na neuronech senzoričkých a autonomních ganglií (Simon et al., 1997; Vulchanova et al., 1997; Calvert a Hans, 2004; Ma et al., 2005) a neuronech myenterických pletení (Castelucci et al., 2002; Ohta et al., 2005; Ren et al., 2003). P2X2 receptory se dále nalézají například ve dřeni nadledvin (Vulchanova et al., 1996), v endotelech a epitelech (King et al., 1998; Hansen et al., 1999a; Birder et al., 2004; Housley et al., 1999), ve skeletálních, hladkých a srdečních svalových buňkách (Ryten et al., 2002; Hansen et al., 1999b; Lee et al., 2000) a v gonadotropních buňkách hypofýzy, kde stimuluje uvolňování luteinizačního hormonu (Zemkova et al., 2006).

1.9.3. P2X3 receptor

P2X3 receptor byl poprvé naklonován ze senzoričkých neuronů dorzálních kořenových ganglií, jejichž centrální projekce končí v lamině II zadního rohu míšního (Chen et al., 1995; Burnstock, 2006b). Skládá se z 393 aminokyselin (Chen et al., 1995; Lewis et al., 1995) a gen je lokalizován na dlouhém raménku 11. chromozomu (11q12). Agonisti P2X3 receptoru (seřazeno podle účinnosti) jsou: 2-MeSATP > ATP > α,β -meATP > Ap4A Antagonisti P2X3 receptoru jsou TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110.

Stejně jako u P2X1 receptoru, desenzitizace P2X3 receptoru je velice rychlá, v řádech ms, s velice pomalým návratem z desenzitizovaného stavu (Lewis et al., 1995). Ten může být urychlen zvýšením extracelulární koncentrace Ca^{2+} (Cook et al., 1998; Giniatullin et al., 2003) nebo zpomalen zvýšením extracelulární koncentrace Mg^{2+} (Giniatullin et al., 2003). Pro průběh desenzitizace P2X3 receptoru je kromě transmembránových domén a přilehlých intracelulárních oblasti rovněž důležitá i délka C-terminální domény a oblast N-terminální domény (Werner et al., 1996).

P2X3 a heteromerní P2X2/3 receptory jsou lokalizovány na periferních i centrálních zakončeních nemyelinizovaných C-vláken a A-vláken neuronu dorzálních kořenových, trigeminálních a nodózních senzoričkých ganglií (Bradbury et al., 1998; Burnstock et al., 2004; Vulchanova et al., 1997). ATP uvolněný ze zakončení primárních senzoričkých nervu v zadních rozích míšních může postsynapticky aktivovat P2X4 a P2X6 receptory (Chen a Gu, 2005; Abbracchio a Burnstock, 1998) zatímco jeho působení na

presynaptické P2X3 a P2X2/3 receptory potencuje uvolnění glutamátu v oblasti lamina II (Gu a MacDermott, 1997; Nakatsuka a Gu, 2001; Nakatsuka et al., 2003). Při chronickém konstričním poranění nervu dochází v ipsilaterální oblasti zadních rohu míšních ke zvýšené neuronální expresi P2X3 receptoru (Novakovic et al., 1999).

1.9.4. P2X4 receptor

P2X4 receptor byl izolován v letech 1995 a 1996 z mozku (Bo et al., 1995; Soto et al., 1996a), sympatických ganglii (Buell et al., 1996) a slinivky potkana (Wang et al., 1996). Sekvence P2X4 receptoru je dlouhá 388 aminokyselin. Gen pro P2X4 receptor je lokalizován na dlouhém raménku 12. chromozomu (12q24.32).

P2X4 receptor je vysoce propustný pro ionty Ca^{2+} . Proud nesený Ca^{2+} tvoří přibližně 11 % celkového proudu. (Buell et al., 1996; Soto et al., 1996a). Propustnost P2X4 receptoru je závislá na době aplikace agonisty. Podobně jako P2X2 při trvalejší aplikaci (10 - 60s) agonisty dilatuje a stává se propustným i pro organické molekuly, ale pouze v nepřítomnosti extracelulárního Ca^{2+} . Propouští menší kationty jako dimethylamin (DMA; 6,1 x 4,2 x 3,8 Å) nebo tris(hydroxymetyl)aminometan (TRIS; 7,5 x 6,5 x 6,4 Å) i velké organické kationty jako Nmetyl- D-glukamin (NMDG⁺; 10,8 x 8,7 x 6,5 Å) nebo YO-PRO-1 (16,8 x 12,8 x 8,2 Å) (Virginio et al., 1999). Agonisti P2X4 receptoru (seřazeno podle účinnosti) jsou: ATP << α,β -meATP = CTP. Účinky agonistů jsou potencovány alosterickým modulátorem ivermektinem. P2X4 receptor není citlivý k typickým antagonistům P2X receptorů suraminu a PPADS a k jejich analogům. Slabými antagonisty P2X4 receptoru jsou TNP-ATP a BBG (Brillant blue green).

P2X4 receptor je hojně exprimován v centrální nervové soustavě, ale byl nalezen také v plicích, močovém měchýři, žaludku, střevě, slinivce, brzlíku, srdci i buňkách cév a imunitního systému (Bo et al., 1995; Soto et al., 1996a; Wang et al., 1996). Dále se P2X4 receptor nachází v laktotropních buňkách hypofýzy a stimuluje uvolňování prolaktinu (Zemkova et al., 2010). V neuronech byl P2X4 receptor nalezen na rychlých nervových spojeních. Na postsynaptické membráně moduluje postsynaptický signál, na presynaptické membráně jeho aktivace zvyšuje pravděpodobnost vyloučení váček s mediátorem (Khakh and North, 2006; Vavra et al., 2011). P2X4 receptor byl identifikován i v buňkách plicních bronchiol, byl objeven v proximální části cilií, (Ma et al., 2006). Dále je P2X4 receptor exprimován společně s P2X7 receptorem v endotelových buňkách cév, kde je zapojen v signalizaci, která vede k syntéze oxidu dusného (NO), který způsobuje vasodilataci.

P2X4 receptor hraje roli také v chronické neuropatické bolesti (Tsuda et al., 2003). P2X4 receptory jsou lokalizovány intracelulárně v neaktivních mikroglálních buňkách. Jejich exprese na plasmatické membráně mikroglíí se zvyšuje po stimulaci zánětlivými signály nebo po zranění nervů. (Tsuda et al., 2003).

1.9.5. P2X5 receptor

Gen pro P2X5 receptor je lokalizován na krátkém raménku 17. chromozomu (17p13.3)

P2X5 podjednotka cDNA byl poprvé izolována z knihovny potkana sympatického ganglia (Collo et al., 1996) a srdce (Garcia-Guzman et al., 1996). RNA je vyjádřena především v srdci (Garcia-Guzman et al., 1996), P2X5 receptor byl poprvé klonován v roce 1996 ze sympatických ganglií (Collo et al., 1996) a srdce potkana (Garcia-Guzman et al., 1996). Proteinová sekvence tohoto receptoru je dlouhá 455 aminokyselin. Na rozdíl od ostatních podtypů P2X receptorů je P2X5 receptor propustný pro Cl⁻ anionty.

Nejvýraznější rys ATP-stimulovaných proudů snímaných z buněk exprimujících potkaní P2X5 receptor je jejich nízká amplituda. Zatímco maximální proudy P2X5 receptorů exprimovaných v buněčné linii lidských embryonálních ledvinných buněk (HEK293 buněk) jsou 50-200 pA, proudy P2X2 receptoru vyvolané za stejných podmínek vyjadřujeme v nA (Collo et al., 1996; Garcia-Guzman et al., 1996).

P2X5 receptor se dále vyznačuje velmi malou mírou desenzitizace (Bo et al., 2003; Collo et al., 1996), která je napěťově závislá (Bo et al., 2003).

Receptory P2X5 se nejčastěji vyskytují v proliferujících buňkách kůže savců (Gröschel-Stewart et al., 1999) a v diferencujících se tkáních, zahrnujících osteoblasty (Naemsch et al., 1999), epiteliální buňky nosní sliznice (Gayle and Burnstock, 2005), střeva (Gröschel-Stewart et al., 1999), močového měchýře a močovodu (Lee et al., 2000), ve skeletálních svalech, kde se receptor podílí na diferenciaci satelitních buněk ve zralá vícejaderná svalová vlákna (Collet et al., 2002; Meyer et al., 1999; Ryten et al., 2001).

Dále byly P2X5 receptory identifikovány v thymu, v mozku, míše a nadledvinách (Garcia-Guzman et al., 1996). Také některé endokrinní buňky také vykazují P2X5 imunoreaktivitu (Glass a Burnstock, 2001).

Agonisti P2X5 receptoru (seřazeno podle účinnosti) jsou: ATP >> α,β -meATP = ATP γ S. Antagonisti P2X5 receptoru jsou suramin, PPADS, BBG.

1.9.6. P2X6 receptor

P2X6 receptor byl poprvé izolován v roce 1996 z předního cervikálního ganglia (Collo et al., 1996) a mozku potkana (Soto et al., 1996b). Jeho sekvence je dlouhá 379 aminokyselin.

Podjednotka P2X6 jako jediná netvoří funkční homomery (Barrera et al., 2005; Ormond et al., 2006), avšak je schopná tvořit funkční heteromery odpovídající na aplikaci ATP (Le et al., 1998; Soto et al., 1996b). Podjednotky P2X6 jsou lokalizovány v endoplasmatickém retikulu a v plazmatické membráně jsou přítomny pouze v heteromerních komplexech s jinými P2X podjednotkami (Barrera et al., 2005).

Gen pro P2X6 receptor je lokalizován na dlouhém raménku 22. chromozomu (22q11.21)

P2X6 podjednotka je výrazně exprimována v CNS, zejména v Purkyňových buňkách mozečku, a v hippocampu (Bobanovic et al., 2002; Xiang a Burnstock, 2005; Burnstock a Knight, 2004). Exprese P2X6 receptoru byla dále prokázána v epitelu bronchů (Collo et al., 1996), v epitelech slinných žláz (Worthington et al., 1999), v buňkách kosterního svalstva (Meyer et al., 1999), v buňkách žláz dělohy (Collo et al., 1996). Jelikož P2X6 ne vytváří funkční homomery, pravděpodobně tvoří heteromerní kanály v kombinaci s jinou P2X podjednotkou exprimovanou v těchto tkáních. P2X6 pravděpodobně působí jako inhibiční podjednotka, která brání nadměrné aktivaci P2X receptoru (Vávra et al. 2008).

1.9.7. P2X7 receptor

P2X7 receptor byl izolován v roce 1996 z mozku potkana (Surprenant et al., 1996). Proteinová sekvence tohoto receptoru je dlouhá 595 aminokyselin, je ze všech P2X receptorů nejdelší. Desenzitizace P2X7 receptoru je pomalá, v řadu desítek sekund až minut, a je dále prodloužena odstraněním Mg^{2+} a Ca^{2+} iontů z extracelulárního prostředí (Surprenant et al., 1996); projevuje se pouze v nízkých koncentracích agonisty (Khadra et

al., 2013). V dlouhodobé přítomnosti vysokých koncentrací nebo po opakovaných aplikacích agonisty iontový kanál dilatuje a stává se propustným i pro velké organické kationty. Dlouhodobá aplikace ATP pak může vest až k buněčné smrti. Dilatace pravděpodobně souvisí s činností C-terminální domény. U mutantního receptoru s delecí C-terminální domény nebylo zvýšení propustnosti kanálu po opakované stimulaci agonistou pozorováno (Surprenant et al., 1996).

Agonisté P2X7 receptoru (seřazeno podle účinnosti) jsou: BzATP > ATP \geq 2-MeSATP \gg α,β -meATP, Antagonisté P2X7 receptoru jsou analogy PPADS, KN62 a KN04, a brilliant blue G. Ireverzibilním antagonistou je oATP (2',3'-DialdehydeATP). Gen pro P2X7 receptor je lokalizován na dlouhém raménku 12. chromozomu (12q24).

P2X7 receptor je fyziologicky velmi významný a je intenzivně zkoumán. Pravděpodobně netvoří heteromery a nachází se zejména v buňkách imunitního systému: makrofágách, lymfocytech, žírných buňkách a mikroglíích. P2X7 receptory hrají roli v buněčné smrti, a to několika mechanismy. Přímý způsob je lýza buňky způsobená progresivní dilatací póru (Virginio et al., 1999b). P2X7 receptory u makrofágů a mikroglíí aktivují apoptózu také prostřednictvím uvolnění interleukinu-1 β , což v důsledku vede k aktivaci kaspázové kaskády (Ferrari et al., 1997a,b; Hughes et al., 2007). Snížená exprese P2X7 receptoru byla pozorována v nádorových buňkách (Zhou et al., 2008). Inhibice aktivní role P2X7 receptoru v apoptóze je pravděpodobně jednou z příčin excesivní buněčné proliferace.

1.10. Selektivita iontového kanálu P2X receptoru

P2X receptory se označují jako neselektivní kationtové kanály. Propustnost monovalentních kationtů; P2X2 kanálu je odstupňována v pořadí: $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$. Toto pořadí je odlišné od relativní pohyblivosti iontu ve vodě a proto se uvažuje, že ionty interagují při průchodu pórem se specifickým vazebným místem o slabé elektrické síle (Ding a Sachs, 1999a,b).

Aktivace P2X receptoru způsobuje prostup Ca^{2+} iontu pórem kanálu a následné zvýšení intracelulární Ca^{2+} koncentrace. Propustnost pro Ca^{2+} ionty je relativně vysoká, z celkového ATP-indukovaného proudu je Ca^{2+} ionty nesené 2.7 % (P2X3) až 11-12 % (P2X4, P2X1) (Egan a Khakh, 2004). Stejně bodové mutace, které u P2X2 receptoru ovlivnily propustnost monovalentních kationtů, ovlivňují i propustnost Ca^{2+} iontu: záměna

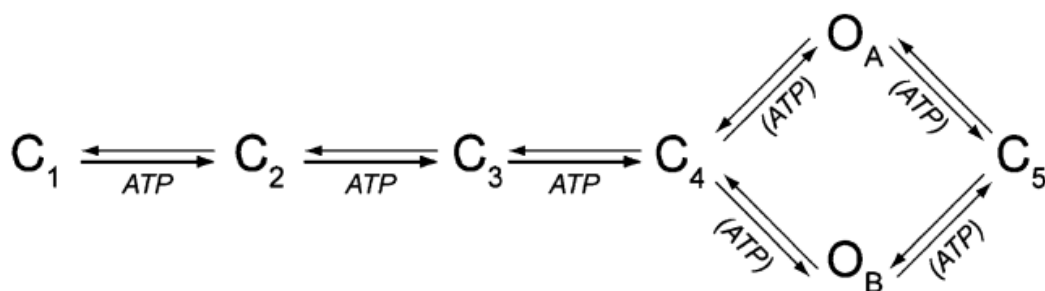
aminokyselin Thr336, Thr339, Ser340 sníží Ca^{2+} permeabilitu. Tato rezidua jsou pravděpodobně součástí selektivního filtru P2X2 póru (Migita et al., 2001; Egan a Khakh, 2004; Samways a Egan, 2007; Li et al., 2008). Zmíněná rezidua však nejsou konzervovaná, takže u jiných podjednotek se mohou na filtru podílet jiná rezidua, což by vysvětlilo rozdíly v propustnosti mezi P2X receptory.

Při opakované stimulaci nebo prodloužené aplikaci ATP (> 5-10 s) dochází u některých P2X receptoru k dilataci póru s následnou propustností pro větší molekuly. Roste například permeabilita velkého organického kationtu NMDG^+ (N-metyl-D-glukosamin), a to v závislosti na kompozici podjednotek a času aktivace receptoru (Virginio et al., 1999). Tuto vlastnost vykazuje P2X7 receptor (Surprenant et al., 1996; Rassendren et al., 1997b), P2X2 a P2X4 receptor (Virginio et al., 1999b). V případě P2X7 receptoru se předpokládá zvětšení průměru póru z 8 Å až na 30–50 Å a zvýšení poměru propustnosti NMDG^+ a Na^+ ($p_{\text{NMDG}}/p_{\text{Na}}$) z 0.03 na 0.48 (Eickhorst et al., 2002; Virginio et al., 1999b). I při zvýšené permeabilitě pro větší ionty zůstává pór kationtově selektivní (Virginio et al., 1999b). Dilatace póru a zvýšená permeabilita P2X7 receptoru může vyústit až v rozpad buňky. V tomto jevu se předpokládá účast C-konce P2X7 receptoru. V případě P2X2 a P2X4 receptoru nebyl jev lýze buňky v důsledku zvýšené permeability P2X receptoru pozorován (Surprenant et al., 1996).

1.11. Kinetika P2X receptoru

Pro aktivaci receptoru je nezbytná vazba více než jedné molekuly agonisty (Brake et al., 1994). Protože P2X receptor je trimer a vazebné místo pro ATP je mezi podjednotkami, jeho ektodoména obsahuje 3 ATP vazebná místa (Bean et al., 1990). Předpokládá se, že obsazením jednoho ATP vazebného místa je pozitivně kooperována vazba další molekuly ATP (Ding a Sachs, 1999b).

Bylo vytvořeno několik kinetických modelu popisujících chování P2X kanálu, avšak žádný z nich není úplný. Důvodem je obtížná analýza vlastností jednotlivých P2X kanálu. V lineárním kinetickém modelu navrženém Dingem a Sachsem (Obr. 7), je popsáno pět uzavřených stavu ($C_{1,2,3,4,5}$) a dva otevřené ($O_{A,B}$).



Obr.7: Kinetický model P2X2 receptoru. Uzavřené stavy označené C1 – C4, otevřené O1 a O2 (Ding a Sachs, 1999b)

Tento model byl vytvořen na základě měření charakteristik jednotlivých P2X2 kanálu (outside out patch clamp technika) v membránách HEK293 buněk a oocytů *Xenopus laevis*. V modelu předchází otevření kanálu postupné navázání 3 molekul ATP, kdy každá vazba urychlí vazbu následující. Kanál se otevírá po obsazení všech vazebných míst a může se vyskytovat ve dvou otevřených stavech: *OA* a *OB* (stav se zvýšenou propustností pro velké ionty). Poslední stav *C5* je zavřený, k ATP necitlivý (Egan et al., 2006; Ding a Sachs, 1999b). Model počítá ze stejnou cestou aktivace a deaktivace kanálu. Rychlost deaktivace je tak závislá na rychlosti odvázaní ligandu a afinitě ATP vazebného místa. Ding a Sachs v tomto modelu nezhvěžili uzavření iontového kanálu v důsledku desenzitizace receptoru, která je však u P2X2 relativně pomalá (Ding a Sachs, 2002).. S desenzitizací počítá cyklický kinetický model navržený pro P2X3 receptoru (Fabretti et al., 2004). Pomocí tohoto modelu bylo ukázáno, že konzervovaný Tyr37 v TM1 se podílí na stabilizaci desenzitizovaného stavu P2X3 a omezuje jeho propustnost pro Ca^{2+} (Jindrichova et al., 2011). V modelu Dinga a Sachse dále není zahrnuta časová závislost zvýšení permeability pro NMDG^+ , která je typická pro přechod k *OB* stavu. Cyklický kinetický model vysvětlující otevřený a dilatovaný stav P2X7 receptoru však již existuje (Yan et al., 2005) a byl nedávno doplněn o stav desenzitizovaný (Khadra et al., 2013).. Bylo také prokázáno, že P2X kanál se může otevřít i v případě, kdy nejsou ligandem obsazena všechna vazebná místa (Wilkinson et al., 2006).

V přetrvávající přítomnosti agonisty dochází k desenzitizaci receptoru způsobené přechodem ligandem obsazeného kanálu do stabilní konformace, v níž je propustnost pro ionty změněna. Jednotlivé podtypy P2X receptoru se liší rychlostí desenzitizace. Pořadí WT receptoru od nejrychleji desenzitizujících je následující: P2X1=P2X3 > P2X2b > P2X4 > P2X2a. Receptor P2X7 nedesenzitizuje (North, 2002; North a Barnard, 1997)

2. Cíle práce

V předchozích experimentech bylo elektrofyziologickými měřeními prokázáno, že u receptoru P2X2 a P2X4 po záměně konzervovaného tyrozinu v první transmembránové doméně za alanin dochází ke zvýšení citlivosti pro ATP a prodloužení doby deaktivace iontového kanálu po odmytí agonisty (Li et al., 2004; Jelinkova et al., 2008). U P2X3 receptoru dochází k destabilizaci desensitizovaného stavu (Jindrichova et al. 2011). V této práci jsem se proto zaměřil na objasnění role konzervovaného tyrozinu v procesu spontánního otvírání a zavírání iontového kanálu P2X receptorů v nepřítomnosti agonisty.

Cílem práce bylo:

1. Zjistit, zda je P2X2 Y43A propustný pro Ca^{2+} v nepřítomnosti ATP a porovnat vodivost pro Ca^{2+} u P2X2 WT a P2X2 s mutací Y43A.
2. Zjistit, zda jsou pro vápník spontánně propustné podobné mutace receptoru P2X4, P2X3 a P2X7
3. Zjistit, zda je spontánní otevření kanálu P2X2-Y43A citlivé k selektivnímu inhibitoru P2X receptoru PPADS
4. Zjistit, zda návratová mutace P2X2-Y43F a P2X4-Z42F vede k obnovení původní funkce receptoru

3. Materiál a metody

Buňky

Pro měření aktivity P2X receptorů byly použity transfekované GT1-7 buňky (dále GT1 buňky). GT1-7 buňky jsou transformované myší hypotalamické neurony uvolňující gonadotropin-releasing hormon (GnRH) které ve své plazmatické membráně přirozeně neexprimují purinergní receptory, měření tedy není ovlivněno vlastní odpovědí buněk na ATP. Buňky GT1 byly pěstovány v médiu skládajícím se z Dulbeccova modifikovaného Eaglova média (D-MEM; *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), 10% tepelně deaktivovaného hovězího plodového séra (*Sigma-Aldrich*), 50 U/ml penicilinu (*Invitrogen*) a 50 µg/ml streptomycinu (*Invitrogen*). Buňky rostly v 75 cm² plastových kultivačních lahvích (*NUNC, Rochester, NY, USA*). Lahve s buňkami byly umístěny v inkubátoru IR SENSOR (*Sanyo E&E Europe BV Medical Division, Az Etten Leur, Holandsko*) při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% CO₂ a 95% vzduchu. Buňky byly ponechány v tomto prostředí přibližně 48 až 72 hodin, jakmile pokryly 80% až 95% plochy lahve, byly přepasážovány.

Pasážování

V boxu bylo z kultivačních lahví odsáto médium a buňky byly opláchnuty 3 ml Versenova roztoku (*Invitrogen*) ohřátého na teplotu 37°C. Aby došlo k uvolnění buněk od povrchu kultivační lahve, byly následně inkubovány přibližně 30 s při 37°C se 3 ml Versenova roztoku s 0,25% trypsinu. Trypsin byl inaktivován 5 ml předehřátého D-MEM media a celý obsah lahve byl jemně promíchán nasátím a vypuštěním z pipety. Obsah lahve byl přemístěn do zkumavky a stočen po dobu 5 min při 800 rpm a 26°C. Tekutina byla slita a peleta byla resuspendována v 5 ml předehřátého D-MEM media. Pro udržení buněčné linie bylo do nové lahve se 7,5 ml předehřátého D-MEM media nasazeno 0,3-0,5 ml suspenze buněk (obsahuje 1,5-2,0 x10⁶ buněk). Buňky byly vždy pěstovány ve dvou nezávislých lahvích (obvykle jedna s vyšší koncentrací buněk, druhá s nižší), z nichž jen jedna byla vybrána k pasážování. Celkový počet pasáží se pohyboval mezi 30-50. Nové buňky byly získány rozmrazením zásob (2. – 3. pasáž originálních buněk) uchovávaných v tekutém dusíku. Pro transfekci se buňky nasazovaly do 35 mm plastových kultivačních misek (*Sarstedt, Newton, NC, USA*) se třemi 12 mm poly-L-lysinovými sklíčky

(*Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sandheim, Německo*). Do misky se 2 ml přehřátého D-MEM media byly na každé sklíčko nasazeny 4 μ l buněčné suspenze.

DNA konstrukty

K transfekci byly použity potkaní formy genů kódujících podjednotky P2X receptorů a jejich jednobodové mutace v první transmembránové doméně: P2X2a-WT (dále jen P2X2-WT) receptor a P2X2 receptor s mutací Y43A a Y43F, P2X3-WT receptor a P2X3 receptor s mutací Y37A, P2X4-WT receptor a P2X4 receptor s mutací Y42A a Y42F, P2X7-WT receptor a P2X7 receptorů s mutací Y40A. Veškerá cDNA pro WT receptory pochází z laboratoře Dr. S. S. Stojilkoviče (NIH, Bethesda, MD, USA). Mutace byly vyrobeny v Laboratoři buněčné a molekulární neuroendokrinologie Fyziologického ústavu AVČR. Geny byly zaklonovány do expresního vektoru pIRES2-EGFP se zesíleným zeleným fluorescenčním proteinem (EGFP) (Clontech, Mountain View, CA, USA).

Transfekce

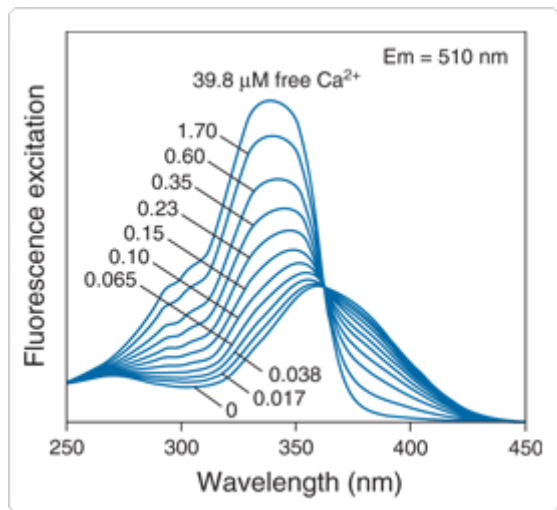
Transfekce byla provedena podle transfekčního protokolu jetPEI (*Polyplus-transfection, Illkirch, Francie*).

Transfekce byla provedena 24 hod po nasazení buněk na sklíčka. Buňkám v 35 mm misce (3 sklíčka) byly vyměněny 2ml média. V 1ml eppendorfci bylo smícháno 100 μ l 150 mM roztoku NaCl se 3 μ g DNA, směs byla homogenizována 10s vortexem s následným krátkým stočením. V druhé eppendorfci (1ml) byla připravena směs 6 μ l jet PEI reagent se 100 μ l 150 mM NaCl a také homogenizována 10s vortexem a centrifugována. Do zkumavky s DNA byla přidána směs s jet PEI reagent. Po 10s vortexu a centrifugaci byla směs inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Poté byla směs DNA přidána k buňkám a inkubována 24 hodin při teplotě 37⁰ C. Účinnost transfekce buněk byla 60 - 95%.

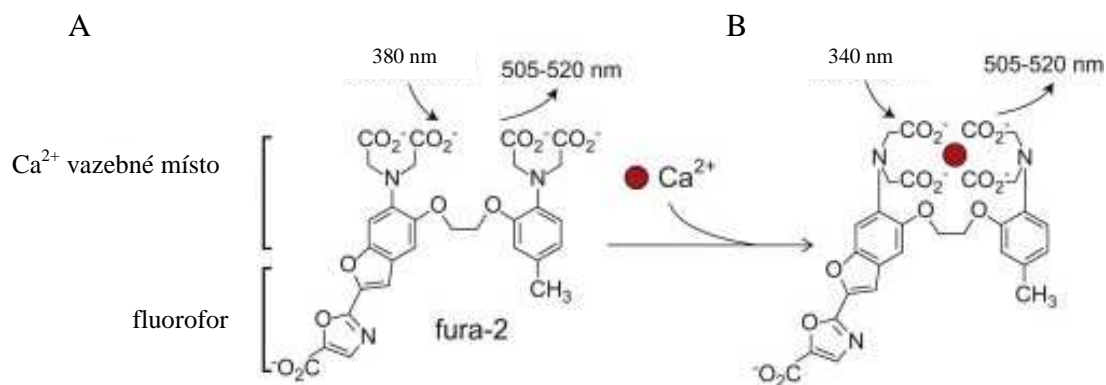
Ca²⁺ – imaging:

Vápníkový imaging je mikrofluorimetrické měření změn [Ca²⁺]_i. Je to běžný způsob měření vápníkové signalizace v živých buňkách. Zobrazovací technika využívá vlastností fluorescenčních indikátorů, jimiž jsou organické molekuly, které mění své spektrální vlastnosti v závislosti na vazbě s volnými ionty Ca²⁺. Indikátory pro Ca²⁺ - imaging spadají do dvou kategorií, poměrové indikátory jako Fura-2 a Indo-1, a barviva pro jednu vlnovou délku jako Fluo-4.

Pro experimenty byl použitý indikátor Fura -2 , který má emisní maximum při 510 nm a mění maximum svého excitačního spektra od 340 nm do 380 nm v reakci na vazbu vápníku. Pokud je na sondu Ca²⁺ navázaný, vlnová délka excitace je 340 nm, pokud není, sonda je excitována při 380 nm (Obr. 8, 9). Snímací kamera zaznamenává střídavě snímky při 340 nm a 380 nm, kombinace snímků pak určí výsledný obraz: koncentrace intracelulárního vápníku se určí z poměru fluorescenční emise a při excitaci různými vlnovými délkami. Hlavní výhodou použití ratiometrických barviv je, že signál je nezávislý na koncentraci barviva, jeho vyhasínání, intenzitě osvětlení a délce optické dráhy.



Obr. 8 Fluorescenční excitační spektrum indikátoru Fura-2 v závislosti na vazbě iontů Ca²⁺. Fura-2 AM jako neaktivní acetoxymetyler difunduje přes plazmatickou membránu do buněk, kde je metylesterová skupina odštěpena esterázami asociovanými s plazmatickou membránou a jako aktivní může vázat ionty Ca²⁺. Koncentrace iontů Ca²⁺ od 0 μM do 39,8 μM (převzato z: [http://www.lifetechnologies.com/Life Technologies Corporation](http://www.lifetechnologies.com/Life%20Technologies%20Corporation), 2013)



Obr. 9 Molekula fluorescenčního indikátoru Fura-2 s nenavázaným (A) a navázaným (B) iontem Ca^{2+} . (převzato z: Dojindo Molecular Technologies, Inc. 2012, upraveno).

K zaznamenání a vyhodnocení hodnot fluorescence byl použitý program MetaFluor (Molecular Devices, LLC Sunnyvale, United States).

Příprava buněk na měření:

Roztok pro fluorescenční značení byl připravený ze 2ml extracelulárního roztoku (ECS) s 2,5 μl indikátoru Fura-2 AM (ze zásobního roztoku 50 μg Fura-2AM rozpuštěného v 50 μl DMSO), a 5 μl neiontového surfaktantu Pluronic F-127 (pro usnadnění solubilizace acetoxymetylésteru) na 3 sklíčka. Buňky na sklíčku byly inkubovány v temnu 45 minut při teplotě 37°C a následně 15 minut při pokojové teplotě. Poté byla sklíčka s buňkami opatrně omyta v ECS a umístěna do do 35 mm plastových misek s čistým ECS. K vlastnímu měření byla sklíčka jednotlivě přenesena do měřicí komůrky a instalována do měřicí aparatury.

Měřicí aparatura

Aparatura se skládá z invertovaného mikroskopu Olympus **IX83** s imerzními objektivy, z lampy – emitoru fluorescenčního záření (monochromátoru), digitální chlazené kamery, aplikačního zařízení s mikromanipulátorem, odsávání a PC se záznamovým a vyhodnocovacím software MetaFluor.

Postup měření:

Po instalaci do měřicí aparatury byla sklíčka s buňkami ponořena do roztoku ECS. Špička aplikátoru byla pomocí mikromanipulátoru při 10 násobném zvětšení umístěna do bezprostřední blízkosti buněk. Po celou dobu měření byly buňky trvale omývány ECS roztokem.

Poté byla vybrána konkrétní oblast pro měření – byly vybrány buňky izolované od ostatních aby měření nebylo ovlivněno mezibuněčnou komunikací. Následně byl nastaven objektiv se 40 násobným zvětšením a v programu MetaFluor na monitoru PC označeny jednotlivé buňky vybrané pro měření.

V každém experimentu bylo měřeno 25 – 40 buněk. Vlastní měření spočívalo v aplikaci jednotlivých roztoků (agonisti, inhibitory, Ca^{2+}) na buňky a snímání změn fluorescence. Mezi jednotlivými aplikacemi byl dodržen interval minimálně 2 minuty pro odmytí předchozí aplikace.

Změna $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v čase byla zobrazena na barevné škále a převedena do numerického vyjádření jako poměr měření při vlnových délkách 340 a 380 (F340/F380). Snímání probíhalo frekvencí 2 snímky za sekundu. Záznam měření byl uložen pro další vyhodnocení.

Roztoky

Extracelulární roztok

V průběhu měření byly buňky omývány proudícím ECS, který byl složen z chloridu sodného, chloridu draselného, chloridu vápenatého, chloridu hořečnatého, N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-2-etansulfonové kyseliny (HEPES) a D-glukózy rozpuštěných v deionizované vodě. Všechny chemikálie pocházely od firmy Sigma-Aldrich. Příslušná množství a výsledné koncentrace jsou uvedené v tabulce 1.

chemikálie	vzorec	množství na 1 l	koncentrace [mM]
chlorid sodný	NaCl	8,298 g	142
chlorid draselný	KCl	0,223 g	3
chlorid vápenatý	CaCl ₂	2 ml	2
chlorid hořečnatý	MgCl ₂	1 ml	1
D-glukosa		1,8 g	10
HEPES		2,383 g	10
deionizovaná voda		1 l	

Tab. 1 Seznam chemikálií používaných pro přípravu extracelulárního roztoku.

Po rozpuštění všech chemikálií bylo upraveno pH na 7,3 pomocí 1M NaOH. Výsledný roztok měl osmolaritu 290-300 mOsm. Její hodnoty byly kontrolovány na osmometru Vapro 5520 (Wescon, Logan, UT, USA). Zásobní ECS byl uložen v plastových lahvích při -20°C. Obvykle bylo připravené množství spotřebováno nejpozději za měsíc.

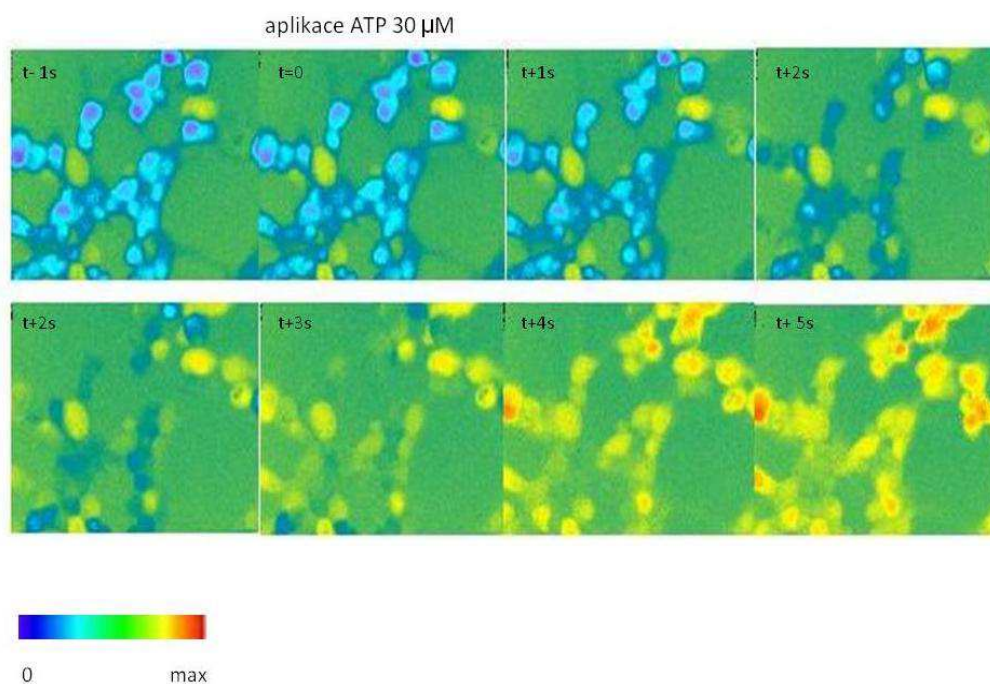
Aplikační roztoky

Jako aplikační roztoky byly používány 5mM roztok CaCl₂ (dále 5 mM Ca²⁺), 30 μM roztok ATP, 100 μM roztok BzATP a 3μM roztok antagonisty PPADS. Aplikační roztoky byly připravovány před každým pokusem nové ze zásobních roztoků naředěním v ECS. Aplikačním roztokům s vysokou koncentrací ATP (100μM) bylo kontrolováno pH a v případě potřeby upraveno NaOH na hodnotu 7,3. Zásobní roztoky ATP v deionizované vodě o koncentracích 100 mM a byly uchovávány v -80°C. Množství aplikačních roztoků připravované pro experiment bylo obvykle 5 – 10 ml.

4. Výsledky

Určení propustnosti iontového kanálu P2X receptoru pro Ca^{2+} metodou Ca^{2+} imagingu.

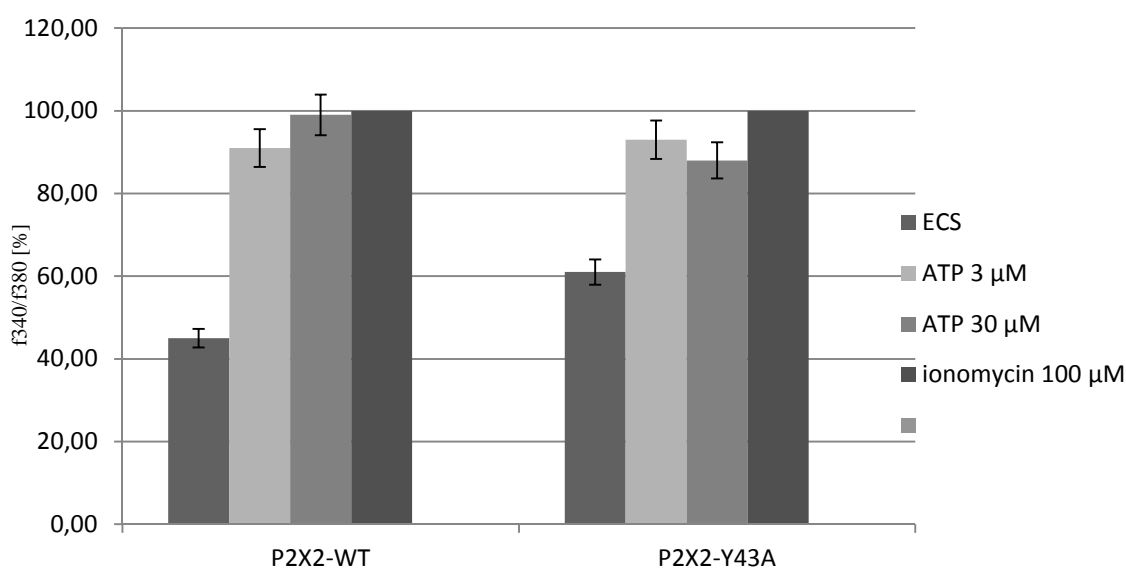
Změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ byly měřeny v GT1 buňkách transfekovaných s divokým typem P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7 receptorů, v GT1 buňkách transfekovaných mutantními receptory se záměnou konzervovaného tyrozinu v první transmembránové doméně za alanin (P2X2-Y43A, P2X3-Y37A, P2X4-Y42A a P2X7-Y40A) a u netransfekovaných GT1 buněk. Tyto immortalizované myší GnRH neurony nemají endogenní P2X receptory, a proto netransfekované buňky neodpovídají na ATP. Po transfekci P2X receptory lze zaznamenat změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimulované ATP (Obr.10).



Obr. 10. Obrazový záznam změn $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v GT1 buňkách transfekovaných P2X2-WT během 5 s aplikace 30 μM ATP. Začátek aplikace ATP je označen $t = 0$. Škála barvev odpovídá koncentraci intracelulárního Ca^{2+} od nejnižší (modrá) po nejvyšší (červená).

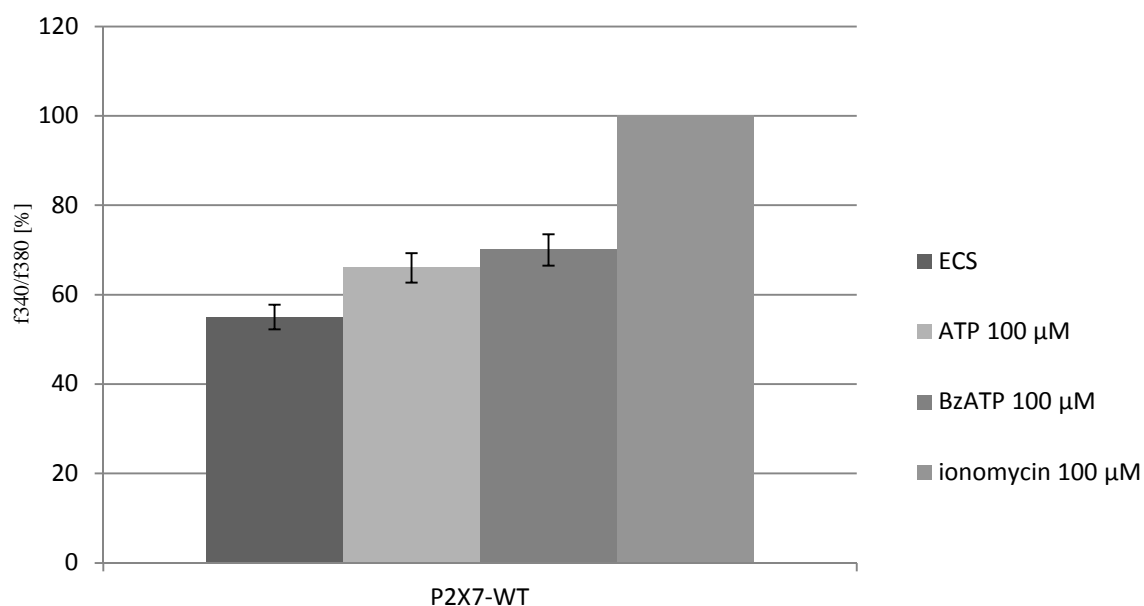
V úvodních experimentech byla porovnána účinnost dvou koncentrací ATP (3 μM a 30 μM) u P2X2-WT receptoru (Obr.11) a dvou různých agonistů (ATP a BzATP) u P2X7 receptoru (Obr.12). Tyto dva typy P2X receptorů byly použity proto, že málo desensitivizují a jsou vhodné pro metodu Ca^{2+} imagingu, kterou lze zaznamenávat změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ řádově po sekundách (Obr. 11), zatímco jiné receptory, např. P2X1 a P2X3, jsou již desensitivizované (desensitivizují řádově v milisekundách). Na konci každého pokusu byl za účelem kalibrace aplikován ionomycin (100 μM), Ca^{2+} ionofor, který tvoří v membráně pór propustný pro Ca^{2+} , a kterým byla zjištěna maximální hladina $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v dané buňce.

U P2X2-WT bylo maximální odpovědi dosaženo po aplikaci 30 μM ATP (Obr. 11 vlevo), zatímco u mutace P2X2-Y43A již při 3 μM ATP (Obr.12 vpravo). Tyto výsledky ukázaly, že $[\text{Ca}^{2+}]_i$ odpovědi jsou koncentračně závislé, a že P2X2-Y43A má vyšší citlivost k ATP než WT, což je v souladu s již publikovanými elektrofyziologickými pokusy (Jindrichova et al., 2009)



Obr. 11. Porovnání propustnost pro Ca^{2+} při různých koncentracích ATP u receptoru P2X2-WT a P2X2-Y43A. Na ose y je znázorněna změna $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vyjádřená poměrem emise navázaného a nenačázaného indikátoru Fura-2 při dvou excitačních vlnových délkách (F340/F380) v %, kde za 100% je považována odpověď na ionomycin. Aplikace extracelulární roztoku (ECS) je kontrola, a představuje hladinu vápníku v klidové buňce.

U P2X7-WT bylo větší odpovědi dosaženo při aplikaci 100 μ M BzATP než při aplikaci 100 μ M ATP (Obr. 13). Maximální hodnoty však nebylo dosaženo při žádné z těchto aplikací. Receptor P2X7 se liší od ostatních receptorů P2X rodiny nižší citlivostí k ATP, a řadou jiných vlastností, například schopností dilatace poru iontového kanálu v dlouhodobé přítomnosti agonisty (viz Úvod). Uvedené výsledky potvrdily, že P2X7 receptor má nižší citlivostí k ATP, a že BzATP je selektivním agonistou pro tento receptor.



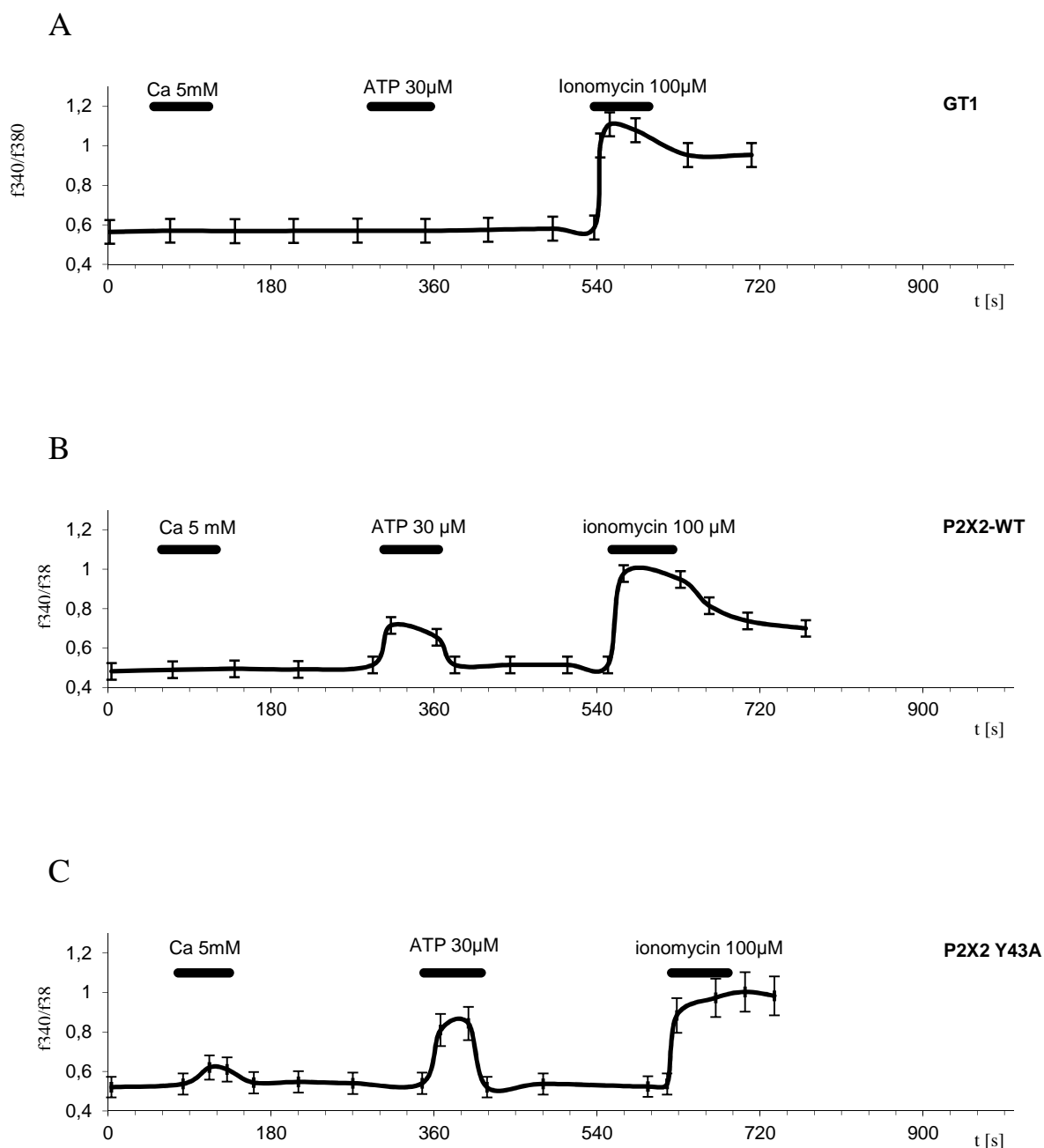
Obr. 12. Porovnání propustnosti pro Ca^{2+} při stimulaci P2X7-WT receptoru ATP a BzATP. Změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jsou znázorněny jako poměr F340/F380 (%), odpověď na ionomycin (100 μ M) představuje 100 %. Aplikace extracelulární roztoku (ECS) je kontrola a představuje hladinu vápníku v klidové buňce.

Propustnost iontového kanálu P2X2-Y43A receptoru pro Ca^{2+} v nepřítomnosti ATP.

V další sérii pokusů bylo cílem zjistit, jaká je klidová Ca^{2+} propustnost neligandovaného P2X2-Y43A receptoru. Byl aplikován roztok 5 mM Ca^{2+} , pro zvýšení gradientu Ca^{2+} na plazmatické membráně buňky, roztok 30 μM ATP pro aktivaci P2X2 receptorů a 100 μM roztok ionomycinu pro zjištění maximální intracelulární hladiny Ca^{2+} . Změny byly zkoumány v GT1 buňkách transfekovaných P2X2-WT nebo mutantním P2X2-Y43A receptorem, a v netransfekovaných buňkách (Obr. 13).

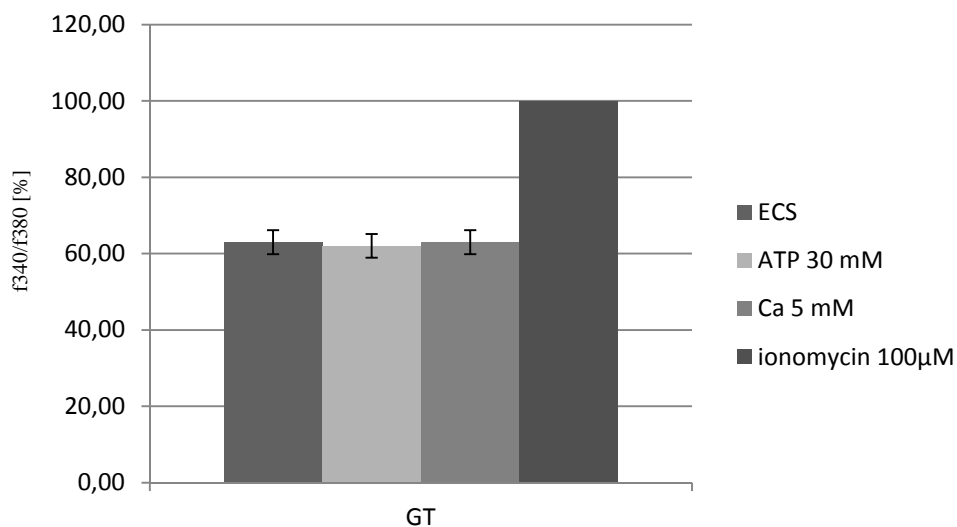
U kontrolních netransfekovaných buněk došlo ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pouze po aplikaci ionomycinu (Obr. 13A). U buněk transfekovaných P2X2-WT receptoru došlo ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaci ATP a ionomycinu (Obr. 13B). U buněk s mutovaným P2X2-Y43A došlo ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaci 5 mM Ca^{2+} , 30 μM ATP a 100 μM ionomycinu (Obr. 13C).

Po zprůměrování 3 – 5 pokusů, ve kterých bylo v každém snímáno asi 25 buněk, byly výsledky vyneseny do sloupcových grafů s vyznačením statisticky významných rozdílů (Obr. 14). Statistická analýza potvrdila význam změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaci 5 mM Ca^{2+} v buňkách s receptorem P2X2-Y43A (Obr. 14B, *vpravo*). Tyto výsledky ukázaly, že záměna konzervovaného tyrozinu Y43 v první transmembránové doméně receptoru P2X2 za alanin zvyšuje klidovou propustnost membrány pro ionty Ca^{2+} v nepřítomnosti ligandu (ATP).

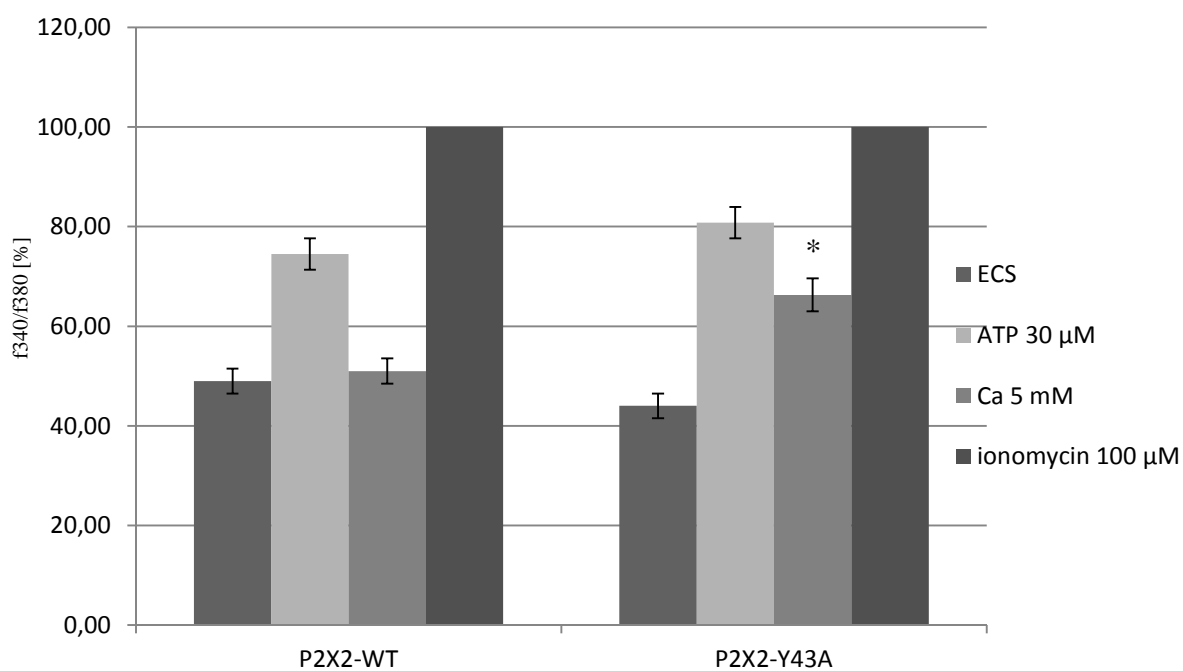


Obr. 13. Časový průběh změn $[Ca^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X2-WT a P2X2-Y43A receptorů. Změny $[Ca^{2+}]_i$ jsou znázorněny jako poměr F340/F380 (%). Délka aplikace roztoku 5 mM Ca^{2+} , 30 µM ATP nebo 100 µM ionomycinu je znázorněna horizontální čarou nad záznamem z netransfekovaných buněk (A) a transfekovaných receptorem P2X2-WT (B) nebo P2X2-Y43A (C). Výsledná křivka vznikla průměrem z 25 buněk, vyznačené odchylky jsou standardní chyby průměru vypočtené vždy ve stejném časovém bodě záznamu. Body pro výpočet standardní chyby byly pro přehlednost grafu vybrány s intervalem 10 – 20 s, při zobrazení standardní chyby v každém bodě měření, tj. 1x za sekundu by byl průběh křivky nepřehledný. Každý experiment byl opakován nejméně 5krát.

A



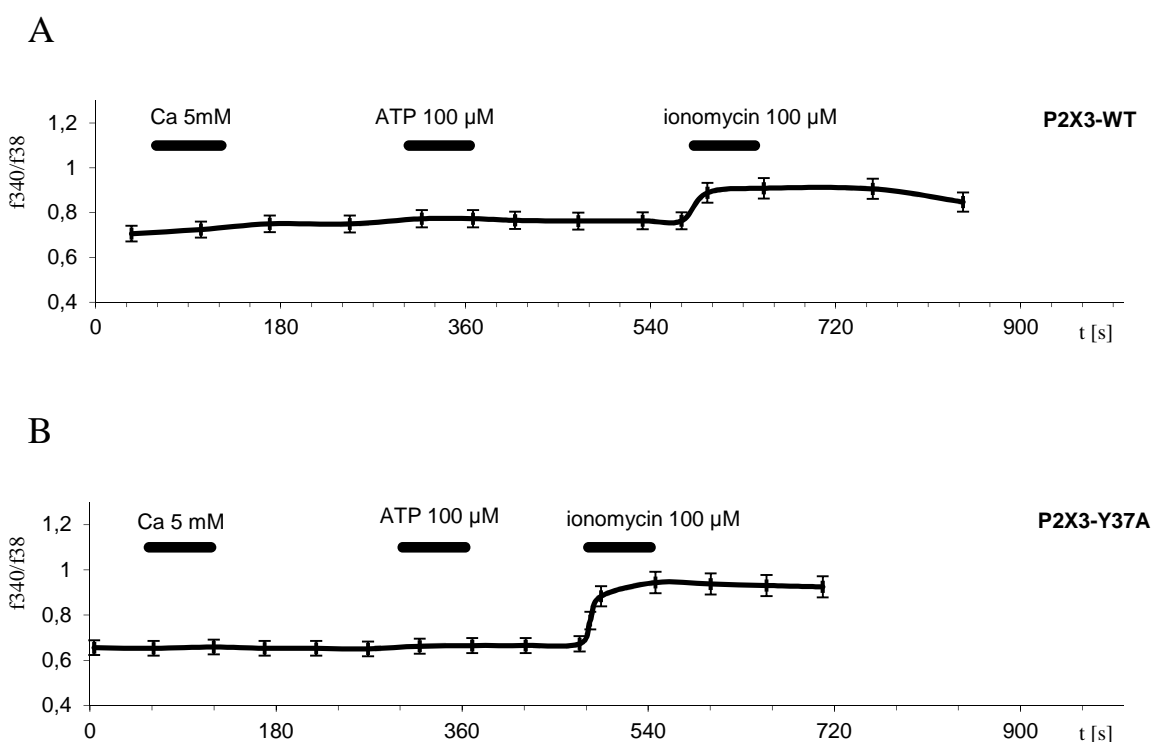
B



Obr. 14. Sloupcové grafy změn $[Ca^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X2-WT a P2X2-Y43A receptorů. Grafy ukazují průměrné hodnoty maximálních změn $[Ca^{2+}]_i$ s vyznačením standardní chyby. Byly vypočteny u netransfekovaných buněk (A) a transfekovaných receptorem P2X2-WT nebo P2X2-Y43A (B). Na ose y je znázorněna změna koncentrace Ca^{2+} vyjádřená poměrem F340/F380 (%), emise navázaného a nenavázaného indikátoru Fura-2 v %, kde za 100% je považována odpověď na ionomycin.

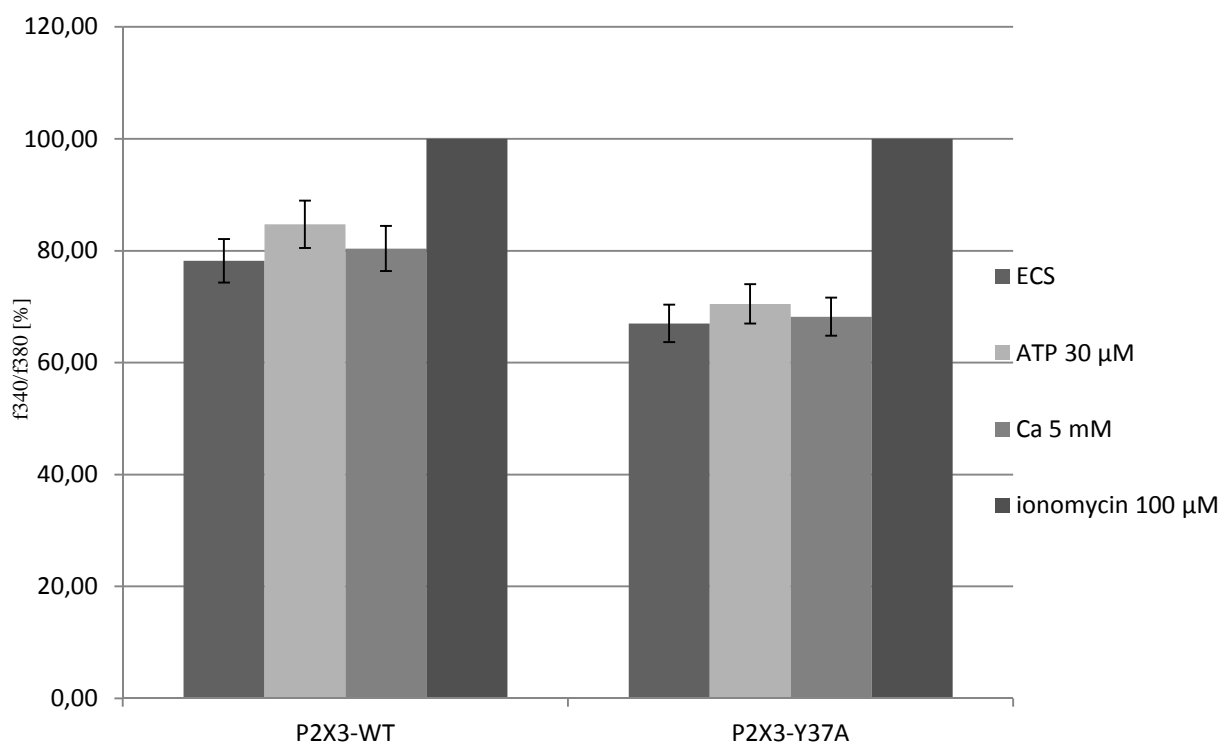
Propustnost iontového kanálu P2X3-Y37A receptoru pro Ca^{2+} v nepřítomnosti ATP.

V sérii pokusů s P2X3 receptory byl aplikován 5 mM roztok Ca^{2+} , pro zvýšení gradientu Ca^{2+} na plazmatické membráně buňky, 100 μM roztok ATP pro aktivaci P2X3 receptorů a 100 μM roztok ionomycinu pro zjištění maximální intracelulární koncentraci Ca^{2+} . U buněk transfekovaných P2X3-WT receptorem došlo k nepatrnému zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaci ATP ve srovnání s velkým zvýšením po aplikaci 100 μM ionomycinu (Obr. 15A). U buněk s mutovaným P2X3- Y37A receptorem bylo zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pozorováno pouze po aplikaci 100 μM ionomycinu (Obr. 15B).



Obr. 15. Záznam změn $[\text{Ca}^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X3-WT a P2X3-Y37A receptorů. Změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jsou znázorněny jako poměr F_{340}/F_{380} (%). Délka aplikace roztoku 5 mM Ca^{2+} , 100 μM ATP nebo 100 μM ionomycinu je znázorněna horizontální čarou nad záznamem z buněk transfekovaných receptorem P2X3-WT (A) nebo P2X3-Y37A (B). Výsledná křivka vznikla průměrem z 25 buněk, vyznačené odchylky jsou standardní chyby průměru vypočtené vždy ve stejném časovém bodě záznamu. Každý experiment byl opakován 3krát.

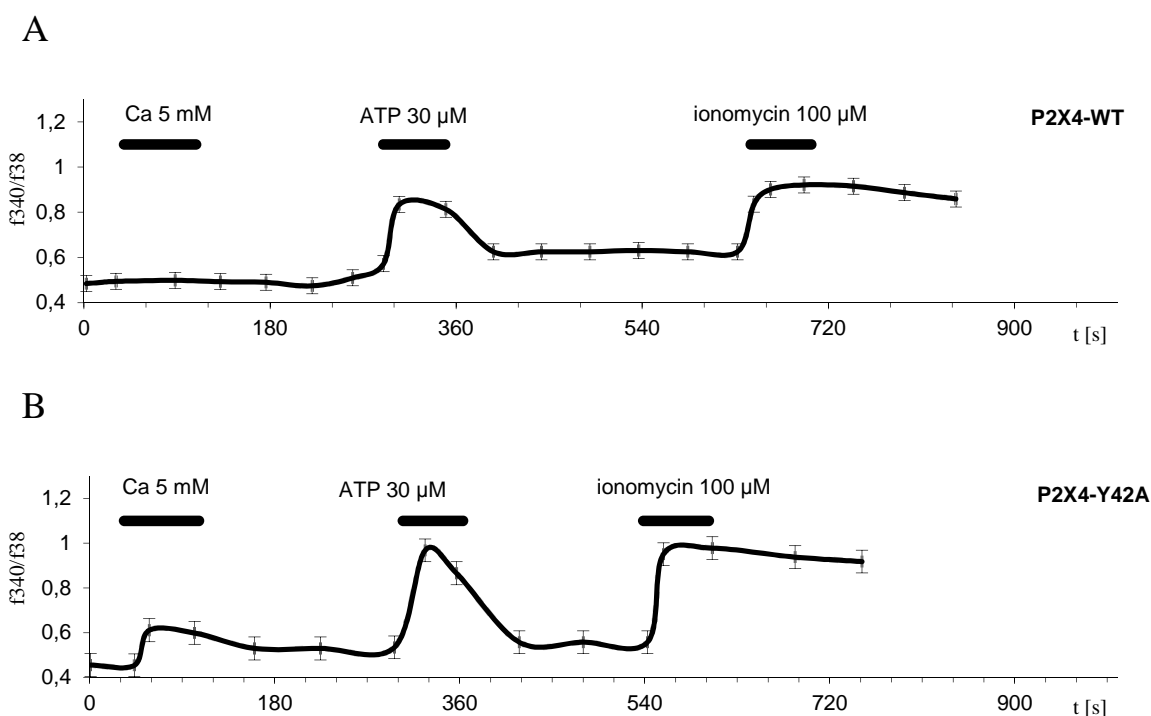
Statistická analýza potvrdila, že k významným změnám $[Ca^{2+}]_i$ po aplikaci ATP nebo 5 mM Ca^{2+} v buňkách s receptorem P2X3-WT (Obr. 16, *vlevo*) a P2X3-Y37A (Obr. 16, *vpravo*) nedošlo. Zvýšení klidové propustnosti membrány pro ionty Ca^{2+} v nepřítomnosti ATP při záměně konzervovaného tyrozinu Y37 v první transmembránové doméně za alanin se tedy u receptoru P2X3 nepodařilo prokázat. Vzhledem k tomu, že k desenzitizaci P2X3 receptoru dochází v řádu desítek milisekund, metoda Ca^{2+} imagingu v tomto případě není dostatečně rychlá, protože interval mezi snímáním jednotlivých bodů je 1s .



Obr. 16. Sloupcové grafy změn $[Ca^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X3-WT a P2X3-Y37A receptorů. Grafy ukazují průměrné hodnoty maximálních změn $[Ca^{2+}]_i$ s vyznačením standardní chyby. Byly vypočteny u transfekovaných buněk s receptorem P2X3-WT (*vlevo*), nebo P2X3-Y37A (*vpravo*). Koncentrace Ca^{2+} vyjádřená poměrem emise navázaného a nenavázaného indikátoru Fura-2 v %, kde za 100% je považována odpověď na ionomycin.

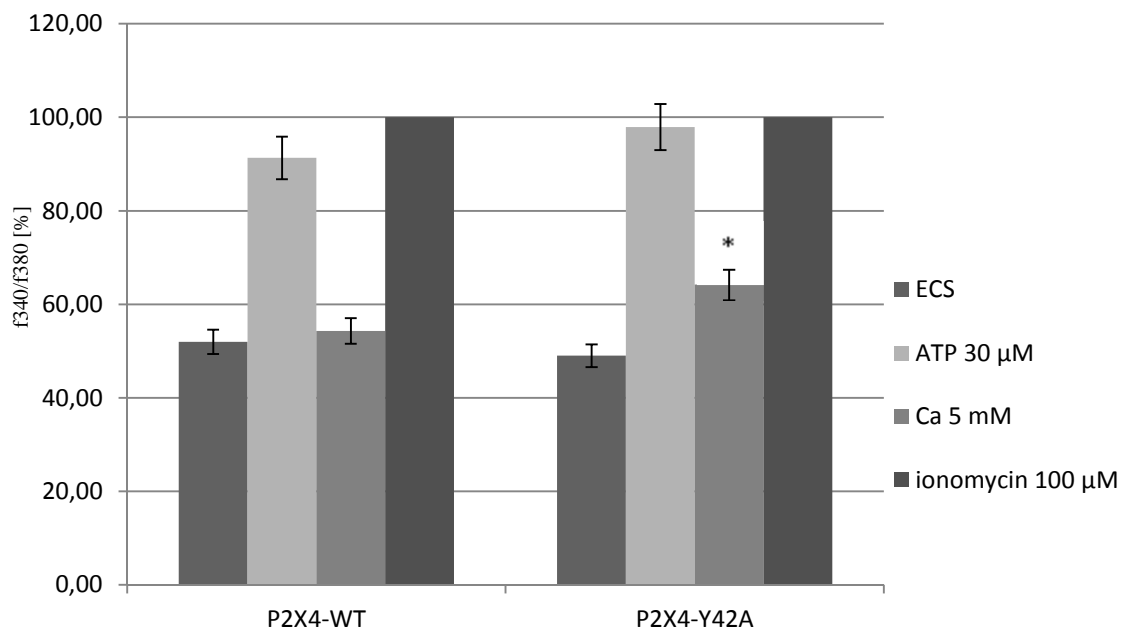
Propustnost iontového kanálu P2X4-Y42A receptoru pro Ca^{2+} nepřítomnosti ATP.

V sérii pokusů s P2X4 receptory byl aplikován 5mM roztok Ca^{2+} , pro zvýšení gradientu Ca^{2+} na plazmatické membráně buňky, 30 μM roztok ATP pro aktivaci P2X4 receptorů a 100 μM roztok ionomycinu pro zjištění maximální intracelulární koncentraci Ca^{2+} . U buněk s divokým typem P2X4 receptoru došlo ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaci 30 μM roztoku ATP a 100 μM roztoku ionomycinu (Obr. 17A). U buněk s mutovaným P2X4-Y42A receptorem došlo ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaci 5 mM roztoku Ca^{2+} , 30 μM roztoku ATP a 100 μM roztoku ionomycinu (Obr. 17B).



Obr. 17. Záznam změn $[\text{Ca}^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X4-WT a P2X4-Y42A receptorů. Změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jsou znázorněny jako poměr F340/F380 (%). Délka aplikace roztoku 5 mM Ca^{2+} , 30 μM ATP nebo 100 μM ionomycinu je znázorněna horizontální čarou nad záznamem z buněk transfekovaných receptorem P2X4-WT (A) nebo P2X4-Y42A (B). Výsledná křivka vznikla průměrem z 25 buněk, vyznačené odchylky jsou standardní chyby průměru vypočtené vždy ve stejném časovém bodě záznamu. Každý experiment byl opakován 5krát.

Po zprůměrování byly výsledky vyneseny do sloupcových grafů, které ukázaly statisticky významné zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ po aplikaci 5 mM Ca^{2+} u mutace P2X4-Y42A (Obr. 18). Výsledky potvrdily, že záměna konzervovaného tyrozinu Y42 v první transmembránové doméně receptoru P2X4 za alanin zvyšuje klidovou propustnost membrány pro ionty Ca^{2+} v nepřítomnosti ATP.



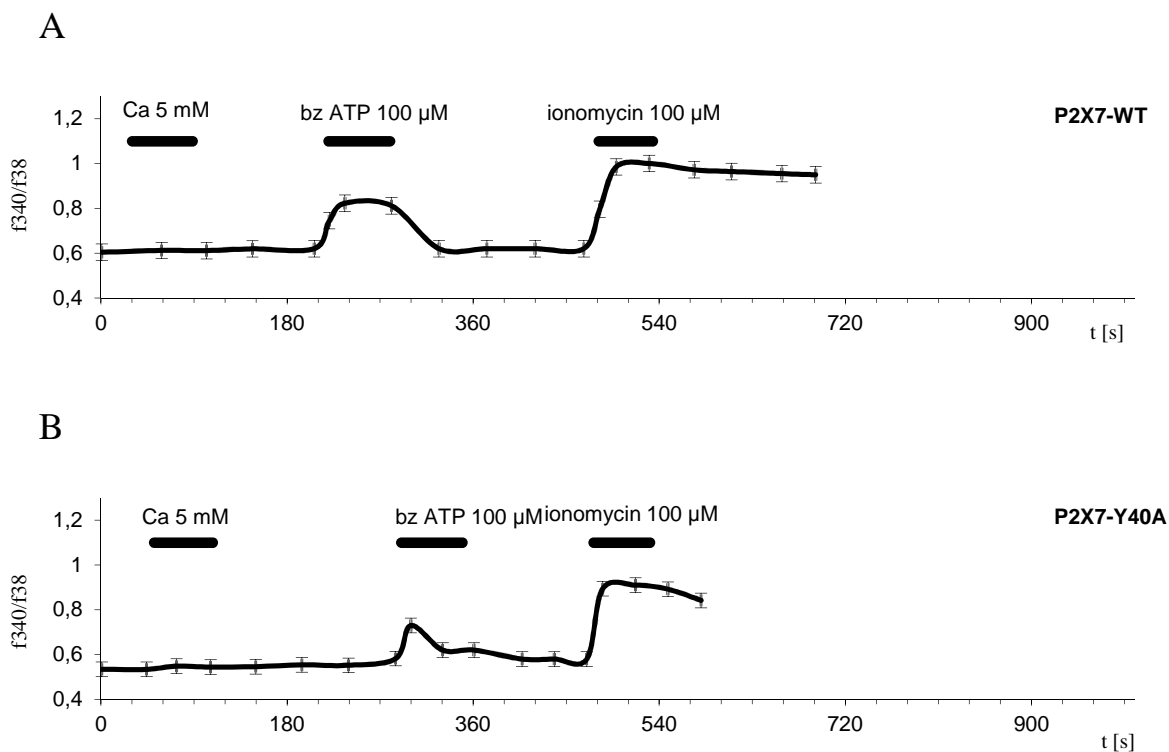
Obr. 18. Sloupcové grafy změn $[Ca^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X4-WT a P2X4-Y42A receptorů. Grafy ukazují průměrné hodnoty maximálních změn $[Ca^{2+}]_i$ s vyznačením standardní chyby. Byly vypočteny u transfekovaných buněk s receptorem P2X4-WT (vlevo), nebo P2X4-Y42A (vpravo). Koncentrace Ca^{2+} vyjádřena poměrem emise navázaného a nenavázaného indikátoru Fura-2 v %, kde za 100% je považována odpověď na ionomycin.

Propustnost iontového kanálu P2X7-Y40A receptoru pro Ca^{2+} v nepřítomnosti ATP.

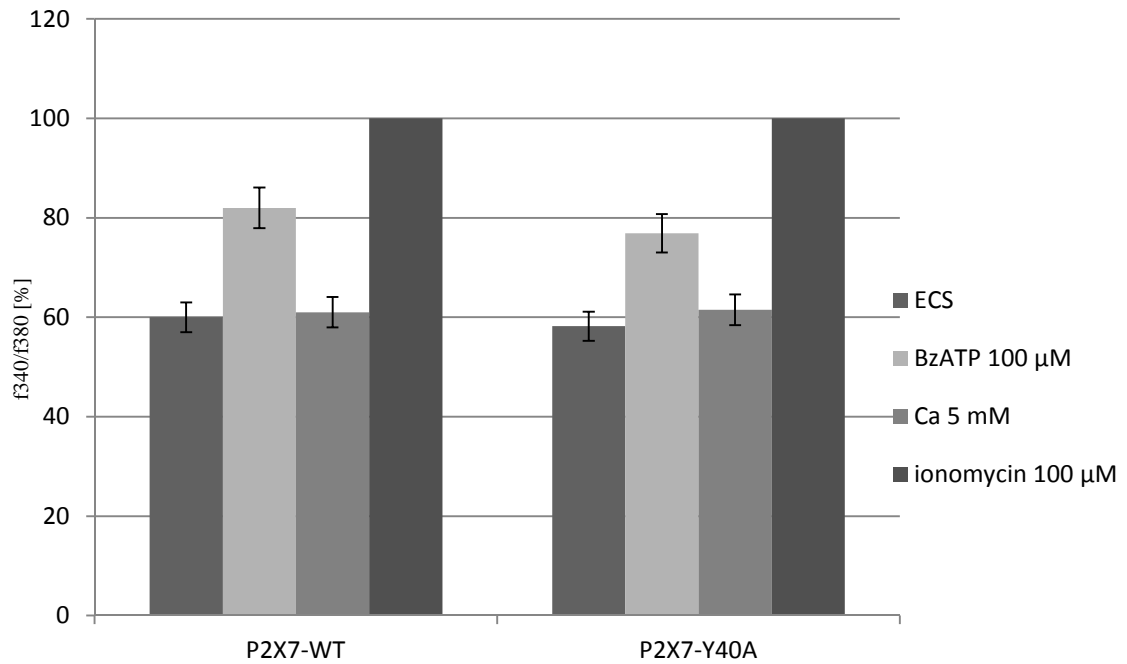
V sérii pokusů s P2X7 receptory byl aplikován 5 mM roztok Ca^{2+} , pro zvýšení gradientu Ca^{2+} na plazmatické membráně buňky, 100 μM roztok BzATP pro aktivaci P2X7 receptorů a 100 μM roztok ionomycinu pro zjištění maximální intracelulární koncentrace Ca^{2+} .

U buněk s P2X7-WT receptorem došlo ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaci BzATP a ionomycinu (Obr. 19A). U buněk s mutovaným P2X7-Y40A receptorem došlo ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaci BzATP a ionomycinu (Obr. 19B); žádné změny u P2X7-Y40A nenastaly po aplikaci 5 mM Ca^{2+} , ale byla pozorována větší rychlost desenzitizace po aplikaci BzATP v porovnání s divokým typem P2X7 (Obr. 19B).

Po zprůměrování byly výsledky vyneseny do sloupcových grafů (Obr. 20) bylo potvrzeno, že statisticky významného zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bylo u P2X7 receptorů dosaženo pouze po aplikaci agonisty BzATP. Toto zjištění dokazuje, že záměna konzervovaného tyrozinu Y40 v první transmembránové doméně receptoru P2X7 za alanin nezvyšuje klidovou propustnost membrány pro ionty Ca^{2+} v nepřítomnosti ATP.



Obr. 19. Záznam změn $[Ca^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X7-WT a P2X7-Y40A receptorů. Změny $[Ca^{2+}]_i$ jsou znázorněny jako poměr F340/F380 (%). Délka aplikace roztoku 5 mM Ca^{2+} , 100 μ M BzATP nebo 100 μ M ionomycinu je znázorněna horizontální čarou nad záznamem z buněk transfekovaných receptorem P2X7-WT (A) nebo P2X7-Y40A (B). Výsledná křivka vznikla průměrem z 25 buněk, vyznačené odchylky jsou standardní chyby průměru vypočtené vždy ve stejném časovém bodě záznamu. Každý experiment byl opakován 3krát.



Obr. 20. Sloupcové grafy změn $[Ca^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X7-WT a P2X7-Y40A receptorů. Grafy ukazují průměrné hodnoty maximálních změn $[Ca^{2+}]_i$ s vyznačením standardní chyby. Byly vypočteny ze záznamů buněk transfekovaných s receptorem P2X7-WT (vlevo), nebo P2X4-Y42A (vpravo). Koncentrace Ca^{2+} vyjádřena poměrem emise navázaného a nenavázaného indikátoru Fura-2 v %, kde za 100% je považována odpověď na ionomycin.

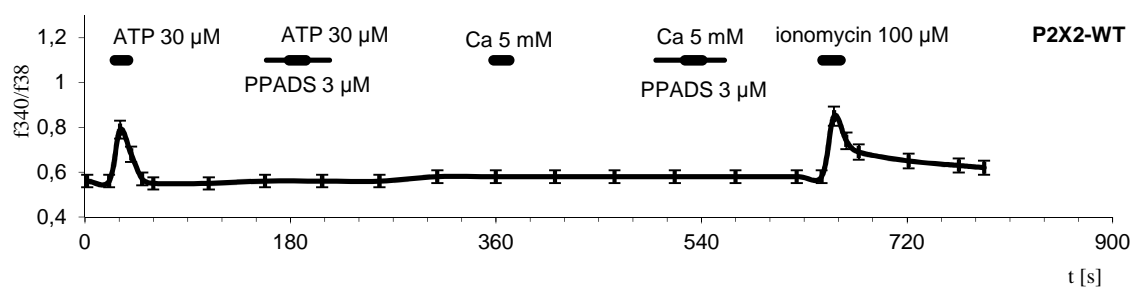
Vliv inhibitoru P2X receptorů na spontánní Ca^{2+} propustnost P2X2-Y43A

V dalších sériích pokusů byl zjišťován vliv běžně používaného inhibitoru P2X2 receptorů, PPADS (Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid tetrasodium salt), na spontánní propustnost membrány pro ionty Ca^{2+} u P2X2-Y43A .

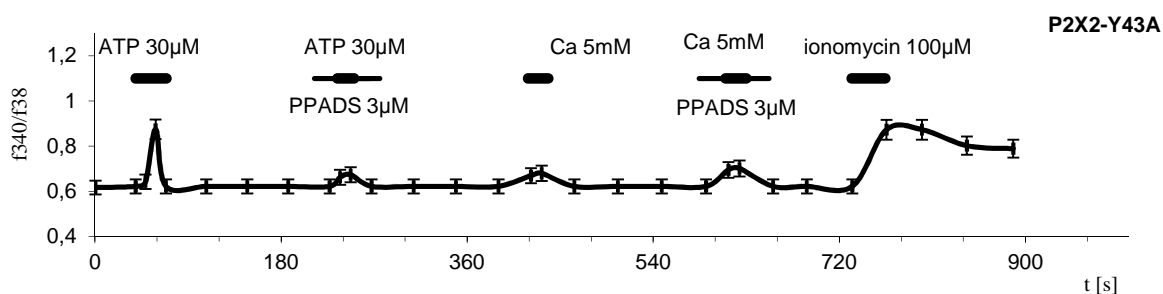
V kontrolním pokuse byl aplikován 5 mM roztok Ca^{2+} pro zvýšení gradientu Ca^{2+} na plazmatické membráně buňky, 30 μM roztok ATP pro aktivaci P2X2 receptorů a 100 μM roztok ionomycinu pro zjištění maximální intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Poté byly ATP a Ca^{2+} aplikovány také současně s 3 μM inhibitoru PPADS .

Obr. 21A ukazuje, že při aplikaci 30 μM ATP u P2X2 WT dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace iontů Ca^{2+} . Při současné aplikaci 30 μM ATP a inhibitoru PPADS ke zvýšení intracelulární koncentrace iontů Ca^{2+} nedochází. Při aplikaci 30 μM ATP u P2X2 Y43A dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace iontů Ca^{2+} , které je také inhibováno PPADS (Obr. 21B). Při aplikaci 5 mM roztoku Ca^{2+} dochází ke zvýšení Ca^{2+} u P2X2-Y43A, ale při současné aplikaci 5 mM roztoku Ca^{2+} a inhibitoru PPADS k inhibici nedochází (Obr. 22B).

A

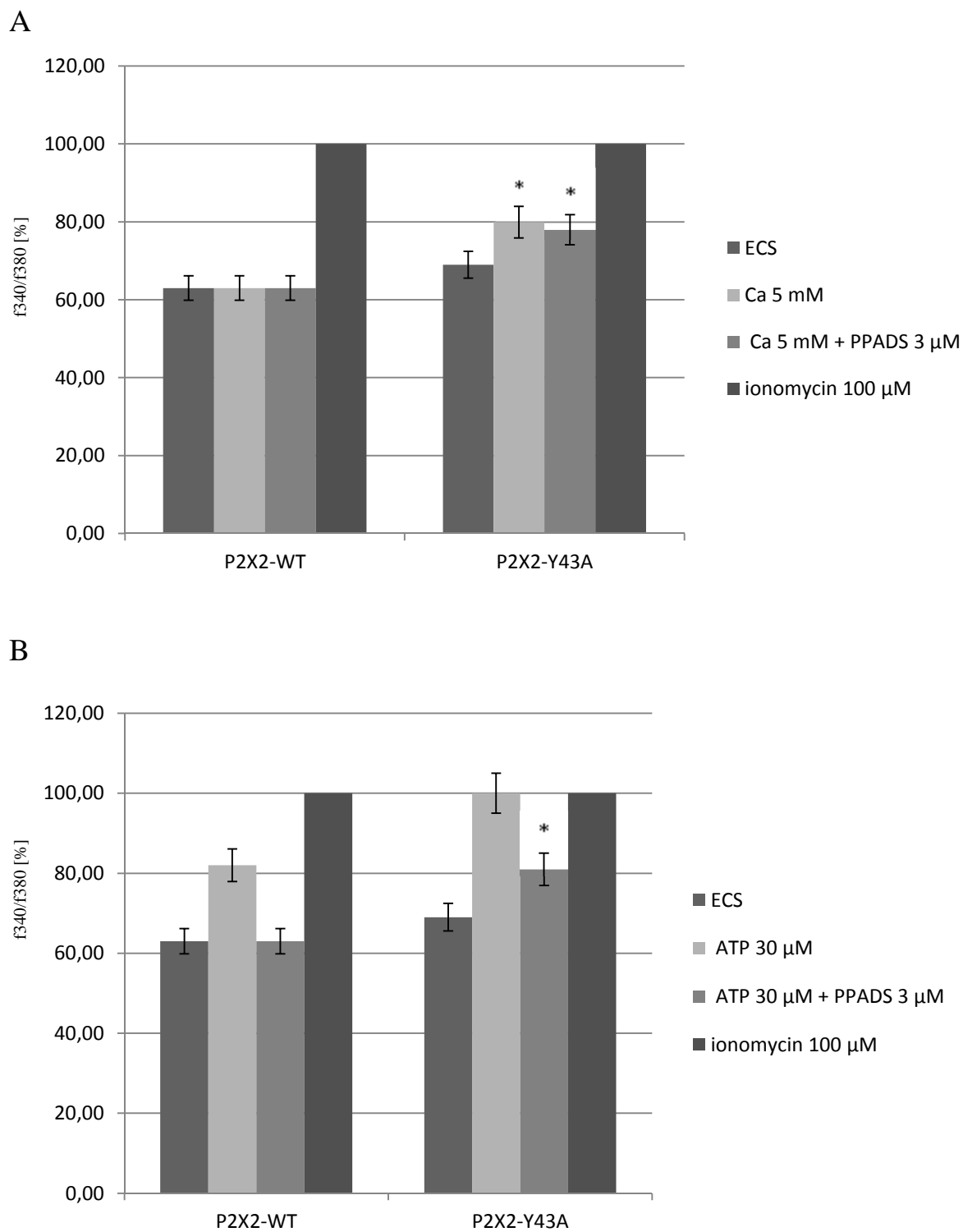


B



Obr. 21. Záznam změn $[Ca^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X2 receptorů v přítomnosti a nepřítomnosti specifického inhibitoru P2X receptorů PPADS. ATP-stimulované odpovědi u P2X2-WT (A) a P2X2-Y43A (B) byly inhibovány, ale PPADS neměl žádný vliv na spontánní Ca^{2+} propustnost (B). Délka aplikace roztoku 5 mM Ca^{2+} , 3 μ M PPADS, 30 μ M ATP nebo 100 μ M ionomycinu je znázorněna horizontální čarou. ATP a Ca^{2+} byly aplikovány současně s inhibitorem po krátké preinkubaci se samotným PPADS. Výsledná křivka vznikla průměrem z 25 buněk, vyznačené odchylky jsou standardní chyby průměru vypočtené vždy ve stejném časovém bodě záznamu. Každý experiment byl opakován 3krát.

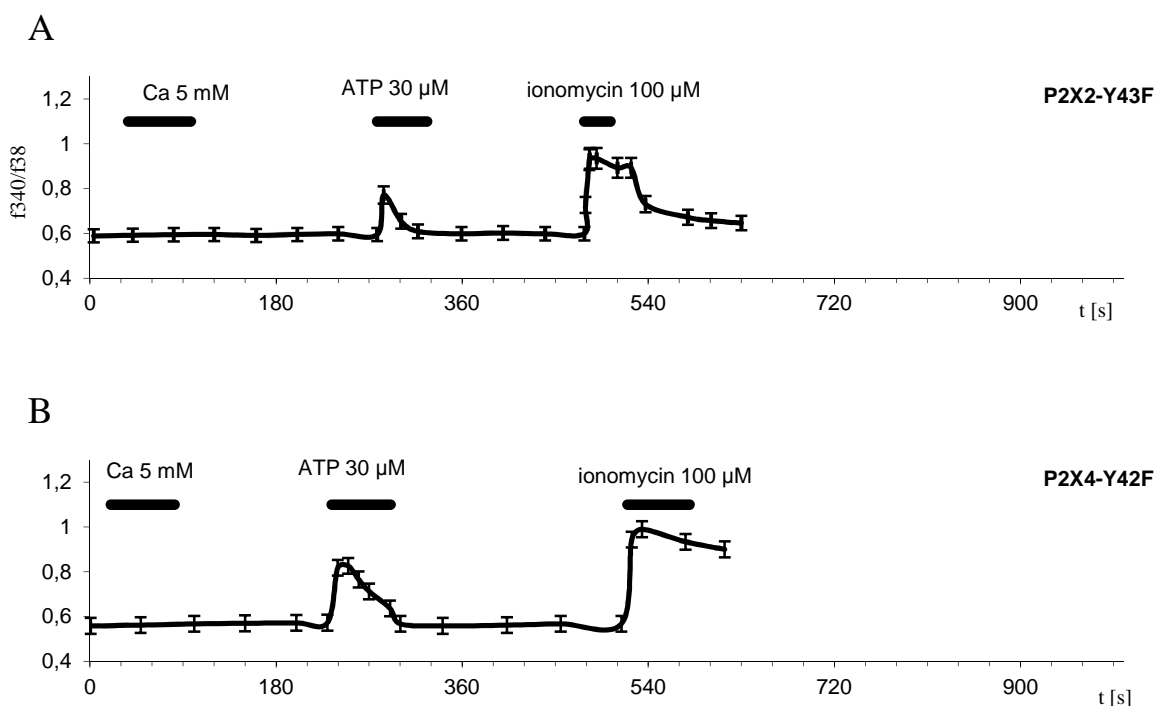
Po zprůměrování byly výsledky vyneseny do sloupcových grafů, které ukázaly, že PPADS nemá významný inhibiční účinek na \uparrow zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ stimulované 5 mM Ca^{2+} u P2X2-Y43A receptoru (Obr.22A), třebaže signifikantně inhibuje ATP odpovědi P2X2-WT a P2X2-Y43A receptorů (Obr.22B). Na základě těchto měření lze předpokládat, že spontánní propustnost iontového kanálu P2X2-Y43A nezávisí na aktivaci ATP vazebného místa, kde kompetitivně působí PPADS.



Obr. 22. Sloupcové grafy změn $[Ca^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X2-WT a P2X2-Y40A receptorů. Grafy ukazují průměrné hodnoty maximálních změn $[Ca^{2+}]_i$ po aplikaci 5 mM Ca^{2+} (A) nebo 30 μ M ATP (B) v přítomnosti a nepřítomnosti 3 μ M PPADS. Byly vypočteny ze záznamů buněk transfekovaných s receptorem P2X2-WT (vlevo) a P2X2-Y43A (vpravo). Koncentrace Ca^{2+} je vyjádřena poměrem emise navázaného a nenavázaného indikátoru Fura-2 v %, kde za 100% je považována odpověď na ionomycin.

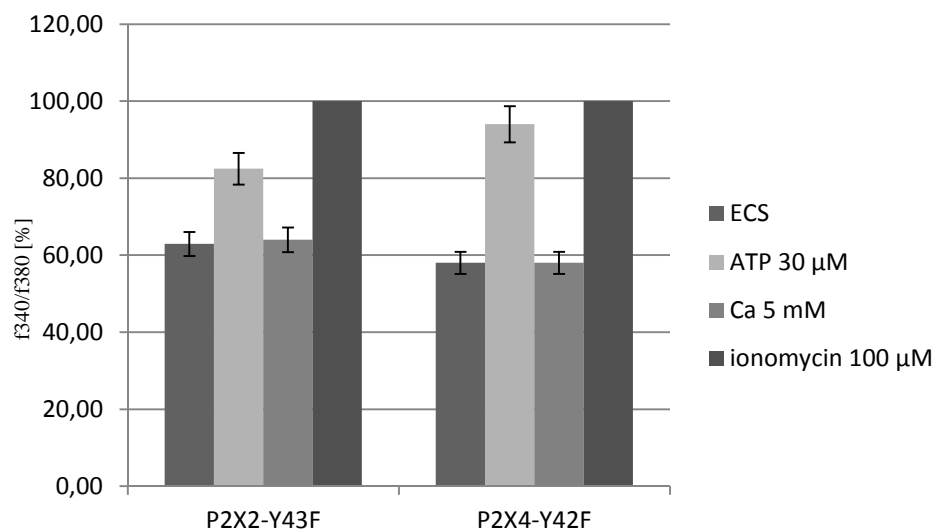
Ztráta spontánní Ca^{2+} propustnosti iontového kanálu u návratových mutací P2X2-Y43F a P2X4-Y42F

V další sérii pokusů bylo zjišťováno, zda návratové mutace P2X2-Y43F a P2X4-Y42F, u kterých byl tyrosin zaměněn podobně velkou a aromatickou AMK fenylalaninem, vedou k obnovení původní funkce receptoru. K buňkám transfekovaným divokým typem receptorů a mutacemi byl aplikován 5 mM roztok Ca^{2+} , pro zvýšení gradientu Ca^{2+} na plazmatické membráně buňky, 30 μM roztok ATP pro aktivaci P2X2 receptorů a 100 μM roztok ionomycinu pro zjištění maximální intracelulární koncentrace Ca^{2+} (Obr. 14). U buněk s mutovaným P2X2-Y43F ani P2X4-Y42F receptorem aplikace 5 mM neměla žádný vliv na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ale došlo ke zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} po aplikaci ATP a ionomycinu (Obr. 23).



Obr. 23. Záznam změn $[\text{Ca}^{2+}]_i$ u návratových mutací. Změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jsou znázorněny jako poměr F340/F380 (%). Délka aplikace roztoku 5 mM Ca^{2+} , 30 μM ATP, 100 μM ATP, a 100 μM ionomycinu je znázorněna horizontální čarou nad záznamem. Testovány byly P2X2-Y43F (A) a P2X4-Y42F (B) mutace. Výsledná křivka vznikla průměrem z 25 buněk, vyznačené odchylky jsou standardní chyby průměru vypočtené vždy ve stejném časovém bodě záznamu. Každý experiment byl opakován nejméně 3krát.

Po zprůměrování byly výsledky vyneseny do sloupcových grafů s vyznačením standardní chyby (Obr. 24). Návrátové mutace P2X2-Y43F a P2X4-Y42F vedou k obnovení původní funkce receptoru, jejich spontánní propustnost je nulová jako u WT receptorů.



Obr. 24. Sloupcové grafy změn $[Ca^{2+}]_i$ u ligandem aktivovaných a neaktivovaných P2X2-Y43F a P2X4-Y42F receptorů. Grafy ukazují průměrné hodnoty maximálních změn $[Ca^{2+}]_i$ s vyznačením standardní chyby. Byly vypočteny ze záznamů buněk transfekovaných s receptorem P2X2-Y43F (vlevo), nebo P2X4-Y42F (vpravo). Koncentrace Ca^{2+} vyjádřená poměrem emise navázaného a nenavázaného indikátoru Fura-2 v %, kde za 100% je považována odpověď na ionomycin.

5. Diskuse

V TM1. se nacházejí dvě rezidua, která jsou konzervovaná u všech typů P2X receptorů, u P2X2 jsou to Gly30 a Tyr43 (srovnání TM1 domén potkaních P2X receptorů je na obrázku 1), lze proto očekávat, že budou mít důležitou roli v molekulárním mechanismu receptoru. Náhrada za malý nepolární alanin je základní metodou, jíž se zjišťuje vliv polarity, náboje, velikosti či jiných vlastností (například aromaticity) původní aminokyseliny (AMK) na strukturu a funkci receptoru.

Předchozími pokusy bylo zjištěno, že záměna konzervovaného TM1 tyrozinu za alanin nebo cystein u receptoru P2X2 a P2X4 zvyšuje citlivost k ATP a prodlužuje dobu deaktivace receptoru po odmytí agonisty. (Li et al., 2004 Jelínková et al., 2004; Jindřichová et al., 2009). U P2X4 receptoru tato záměna také vede ke zvýšení citlivosti pro ATP, ale prodloužení doby deaktivace je mnohonásobně větší (~60x) a neodpovídá zvýšení citlivosti pro ATP (~7x) (Jelinkova et al., 2008). U P2X3 receptoru dochází k destabilizaci desensitizovaného stavu (Jindrichova et al. 2011). Tyto výsledky naznačují, že TM1 tyrozin by mohl být důležitý pro stabilitu uzavřeného stavu iontového kanálu. V této práci jsem se proto snažil zjistit, zda záměna této velké aromatické AMK za malý alanin nevede k procesu spontánního otevírání iontového kanálu P2X receptorů v nepřítomnosti agonisty.

V prvních experimentech této práce byla porovnána účinnost dvou koncentrací ATP (3 μM a 30 μM) u P2X2-WT receptoru (Obr. 12) který pomalu desensitivuje (řádově v desítkách sekund) a je proto vhodný pro zkoumání metodu Ca^{2+} imagingu, kterou lze zaznamenávat změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ řádově po sekundách. U P2X2-WT bylo maximální odpovědi dosaženo po aplikaci 30 μM ATP, zatímco u mutace P2X2-Y43A již při 3 μM ATP. Tyto výsledky ukázaly, že $[\text{Ca}^{2+}]_i$ odpovědi jsou koncentračně závislé, a že P2X2-Y43A má vyšší citlivost k ATP než WT, což je v souladu s již publikovanými elektrofyziologickými pokusy (WT $\text{EC}_{50} = 5.4 \pm 0.8 \mu\text{M}$; P2X2-Y43A $\text{EC}_{50} = 0.28 \pm 0.05 \mu\text{M}$; Jindrichova et al., 2009). U P2X7-WT bylo větší odpovědi dosaženo při aplikaci 100 μM BzATP než při aplikaci 100 μM ATP (Obr. 12). Uvedené výsledky jsou také v souladu s již publikovanými daty, potvrdily že BzATP je selektivním agonistou pro P2X7 receptor, a že tento receptor má nižší citlivost k ATP (Khakh et al, 2001). Z těchto měření je zřejmé, že metoda Ca^{2+} imagingu je vhodná pro studium Ca^{2+} propustnosti

málo desensitizujících P2X receptorů. Její výhodou oproti elektrofyziologickému snímání metodou patch clamp je možnost snímání z mnoha buněk současně (běžně bylo snímáno 25 buněk z jedné oblasti buněčné kultury), zatímco při elektrofyziologickém měření je snímána vždy jen jedna buňka. Metodou Ca^{2+} imagingu lze tedy dosáhnout kvantitativně spolehlivých měření v kratším čase a méně pokusy.

Abychom otestovali hypotézu, že TM1 tyrosin hraje roli ve stabilitě uzavřeného stavu iontového kanálu, měřili jsme propustnost iontového kanálu P2X2 receptorů pro ionty Ca^{2+} , respektive změnu jejich intracelulární koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_i$ u P2X2-WT a u P2X2-Y43A. Výsledky ukázaly, že záměna konzervovaného tyrozinu Y43 v první transmembránové doméně receptoru P2X2 za alanin zvyšuje klidovou propustnost membrány pro ionty Ca^{2+} v nepřítomnosti ligandu (ATP).

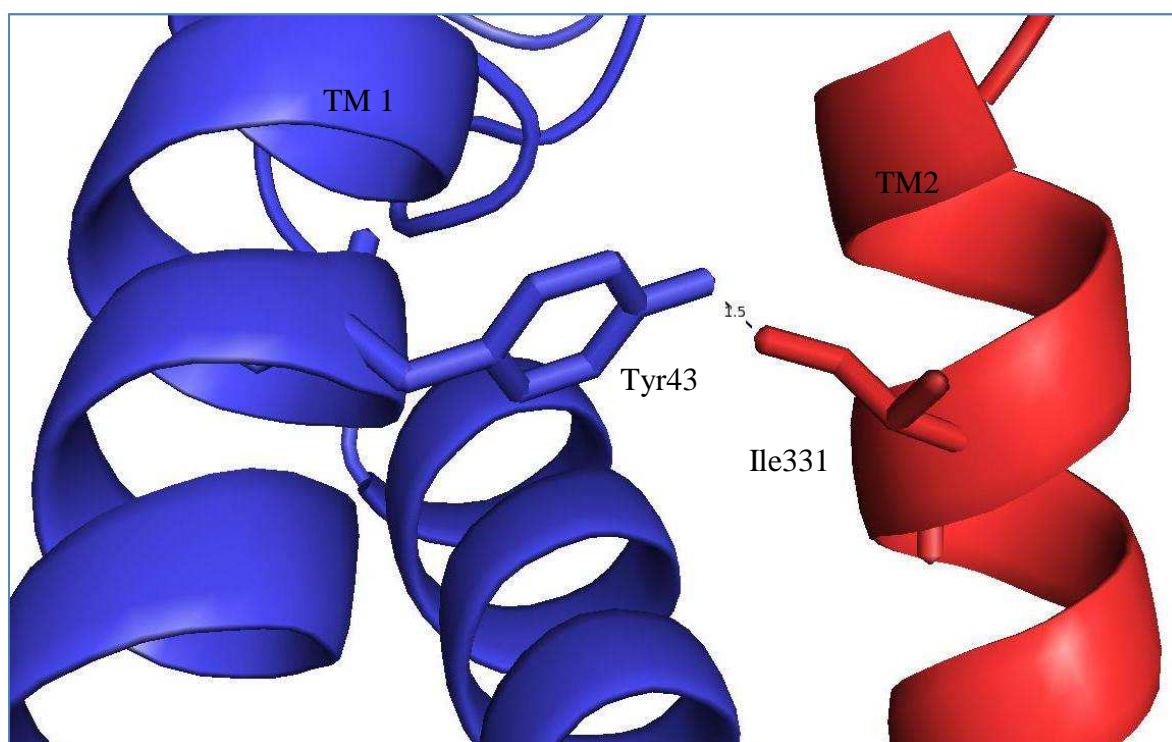
V dalších sériích pokusů byl zjišťován vliv běžně používaného inhibitoru P2X2 receptorů, PPADS, na spontánní propustnost membrány pro ionty Ca^{2+} u P2X2-Y43A. PPADS působí kompetitivně na ATP vazebném místě, jak prokázaly výsledky experimentu při aplikaci 30 μM ATP u P2X2 WT. Ale při současné aplikaci 5mM roztoku Ca^{2+} a inhibitoru PPADS u P2X2-Y43A k inhibici nedošlo. Tyto výsledky prokázaly, že spontánní propustnost iontového kanálu P2X2-Y43A nezávisí na aktivaci ATP vazebného místa, a že otevírání nemůže být způsobeno malým množstvím endogenního ATP, který se z kultivovaných buněk uvolňuje (He et al. 2003).

Dalším typem receptoru, u kterého byl zkoumán vliv záměny konzervovaného tyrozinu byl receptor P2X3. Tento receptor úplně desensitizuje během dvou sekund (Sokolova et al, 2001) a jeho propustnost pro Ca^{2+} je relativně malá (Virginio et al., 1999a; North, 2002), dalo se proto očekávat, že změnám $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaci ATP budou nepatrné, protože metoda Ca^{2+} imagingu není dostatečně vhodná pro studium rychle desensitizujících receptorů. Interval mezi snímáním jednotlivých snímků je 0.5 s, při poměrovém měření tak získáme jeden bod za sekundu. Statistická analýza potvrdila, že k významným změnám $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaci ATP nebo 5 mM Ca^{2+} v buňkách s receptorem P2X3-WT a P2X3-Y37A nedošlo. Zvýšení klidové propustnosti membrány pro ionty Ca^{2+} v nepřítomnosti ATP při záměně konzervovaného tyrozinu Y37 v první transmembránové doméně za alanin se tedy u receptoru P2X3 nepodařilo prokázat.

U P2X7 receptorů bylo statisticky významného zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dosaženo pouze po aplikaci agonisty BzATP. Záměna konzervovaného tyrozinu Y40 v první

transmembránové doměně receptoru P2X7 za alanin nezvyšovala klidovou propustnost membrány pro ionty Ca^{2+} v nepřítomnosti agonisty. Znamená to, že u tohoto receptoru Y40 není nezbytný pro uzavření iontového kanálu. Receptor P2X7 se ale liší od ostatních receptorů rodiny P2X výraznou schopností dilatace póru v dlouhodobé přítomnosti agonisty. V našich pokusech byl agonista aplikován pouze několik sekund, je tedy otázkou, zda TM1 tyrozin nehraje významnou roli v této druhé fázi otevírání iontového kanálu.

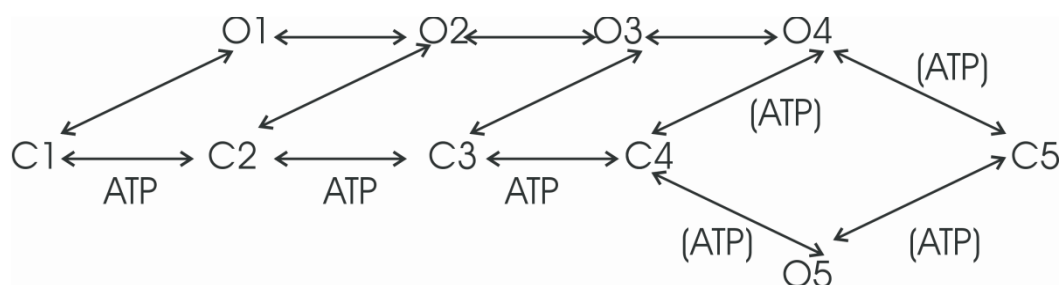
Mutace P2X4-Y42A vedla k podobnému spontánnímu otevírání iontového kanálu v nepřítomnosti ATP, jaké bylo pozorováno u P2X2-Y43A mutace. Návrátové mutace P2X2-Y43F a P2X4-Y42F, u kterých byl tyrosin zaměněn podobně velkou a aromatickou AMK fenylalaninem, vedly k obnovení původní funkce receptoru. Tím bylo zjištěno, že velká aromatická aminokyselina musí být v pozici TM1, aby byl zajištěno normální fungování P2X2 a P2X4 receptorů.



Obr. 25 Model transmembránových domén TM1 a TM2 P2X2 receptoru v uzavřeném stavu, možná interakce mezi konzervovaným Tyr43 a jeho vazebným partnerem Ile331. Vzdálenost naměřená mezi těmito rezidui je 1,5Å, Pro zobrazení použit homologní model potkaního P2X2 v programu PyMol.

V případě receptoru P2X4 je k dispozici krystalová struktura $\text{zf}\Delta\text{P2X4}$ a my jsme podle ní vytvořili homologní model potkaního P2X2 receptoru (Rokic et al., unpublished). Na tomto modelu byl vytipován možný vazebný partner konzervovaného tyrozinu 43 (Obr. 25). Model ukázal, že konzervovaný tyrozin je lokalizován v oblasti TM1, která se nachází v blízkosti TM2, a u receptoru P2X2-WT by mohl interagovat s reziduem Ile331 helixu TM2. Vzdálenost mezi konzervovaným tyrozinem a jeho vazebným partnerem určená z modelu P2X2 receptoru je 1.5 Å, existuje zde tedy možnost vodíkového můstku a stabilizace vzájemné polohy TM1 a TM2 v uzavřeném stavu. Domníváme se proto, že narušení této interakce může mít vliv na stabilizaci uzavřeného stavu P2X2 receptoru. Záměna konzervovaného tyrozinu za alanin tedy znemožní stabilizaci uzavřeného stavu iontového kanálu P2X receptoru a může být zodpovědná za spontánní otevírání iontového kanálu.

Chování P2X2-Y43A mutace nelze vysvětlit lineárním kinetickým modelem P2X2 receptoru (Obr. 7), který nepočítá s otevíráním iontového kanálu v nepřítomnosti agonisty. Na základě získaných výsledků byl navržen cyklický model, který počítá s více otevřenými stavy (O1-O5) a uvažuje i možnost přechodu receptoru ze stavu neligandovaného (C1) do stavu otevřeného (O1) bez navázání agonisty lineárního (Obr. 26). K realizaci tohoto modelu by však byla potřebná elektrofyziologická analýza kinetického chování jednotlivých iontových kanálů P2X2-Y43A receptoru a matematické ověření modelu pomocí dob otevírání a zavírání jednotlivých kanálů.



Obr. 26 Návrh cyklického model P2X2-Y43A mutace. Model uvažuje s možností otevření kanálu bez přítomnosti agonisty (C1-O1). Otevřené stavy O2, O3 a O4 mají navázané 1,2 a nebo 3 ATP. Stav O5 je dilatovaný a stav C5 je desenzitizovaný.

6. Závěr

Zjistili jsme, že záměna konzervovaného tyrozinu v první transmembránové doméně za alanin zvyšuje klidovou propustnost membrány pro Ca^{2+} ionty v nepřítomnosti ATP u receptorů P2X2 a P2X4

U receptoru P2X3 se nepodařilo prokázat, že záměna konzervovaného tyrosinu zvyšuje klidovou propustnost membrány pro Ca^{2+} ionty. Použitá metoda Ca^{2+} imagingu však v tomto případě není dostatečně rychlá, protože interval mezi snímáním jednotlivých snímků je 1s, zatímco k desenzitizaci P2X3 receptoru dochází v řádu desítek milisekund.

U receptoru P2X7 se nepodařilo prokázat, že záměna konzervovaného TM1 tyrosinu zvyšuje klidovou propustnost membrány pro Ca^{2+} ionty. Tento náleží je v souladu se skutečností, že receptory P2X7 mají v rodině P2X receptorů výlučné postavení.

Záměna konzervovaného TM1 tyrozinu za fenylalanin nemá vliv na klidovou propustnost membrány pro Ca^{2+} ionty u P2X2 a P2X4 receptoru. Aromatická AMK v pozici konzervovaného tyrozinu v TM1 stabilizuje uzavřený stav iontového kanálu.

7. Seznam použité literatury

Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* **24**:52-55.

Abbracchio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* **78**:113-145.

Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* **32**:19-29.

Agren, G., Pontén, J., Ronquist, G., and Westermark, B. (1974). Nucleoside diphosphate kinase at the cell surface of neoplastic human cells in culture. *J Cell Physiol.* **83**: 91-101.

Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X₂ receptors are trimers but that P2X₆ receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem.* **280**:10759-10765.

Bean BP, Williams CA, Ceelen PW (1990) ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: current-voltage relation and single-channel behavior. *J Neurosci* **10**:11-19.

Beinart SC, Kolm P, Veledar E, Zhang Z, Mahoney EM, Bouin O, Gabriel S, Jackson J, Chen R, Caro J, Steinhubl S, Topol E, Weintraub WS (2005) Long-term cost effectiveness of early and sustained dual oral antiplatelet therapy with clopidogrel given for up to one year after percutaneous coronary intervention results: from the Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation (CREDO) trial. *J Am Coll Cardiol.* **46**:761-769.

Bhattacharya, A., (2013), Potentiation of inhibitory synaptic transmission by extracellular ATP in rat suprachiasmatic nuclei. *J of Neurosci.* **33**:8035-8044

Birder LA, Ruan HZ, Chopra B, Xiang Z, Barrick S, Buffington CA, Roppolo JR, Ford AP, de Groat WC, Burnstock G (2004) Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**:F1084-F1091.

Bo X, Kim M, Nori SL, Schoepfer R, Burnstock G, North RA (2003) Tissue distribution of P2X₄ receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res.* **313**:159-165.

Bo X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G, Schoepfer R (1995) A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* **375**:129-133.

Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD (2002) P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* **22**:4814-4824.

Bodin P, Burnstock G (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res.* **26**:959-969.

- Boue-Grabot E, Archambault V, Séguéla P (2000) A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X2 ATP-gated channels. *J Biol Chem.* **275**:10190-10195.
- Boue-Grabot E, Barajas-Lopez C, Chakfe Y, Blais D, Bélanger D, Emerit MB, Séguéla P (2003) Intracellular Cross Talk and Physical Interaction between Two Classes of Neurotransmitter-Gated Channels *J. Neurosci.* **23**:1246-1253.
- Boue-Grabot E, Toulmé E, Emerit MB, Garret M (2004) Subunit-specific coupling between gamma-aminobutyric acid type A and P2X2 receptor channels. *J Biol Chem.* **279**:52517-52525.
- Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB (1998) The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* **12**:256-268.
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**:519-523.
- Brown SG, Townsend-Nicholson A, Jacobson KA, Burnstock G, King BF (2002) Heteromultimeric P2X1/2 receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:673-680.
- Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *Embo J* **15**:55-62.
- Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA, Antonarakis SE (1998) Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels* **5**:347-354.
- Burnstock, G., (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* **3**:509-81.
- Burnstock G (1990) Dual control of local blood flow by purines. *Ann N Y Acad Sci.* **603**:31-44.
- Burnstock B (1996) Purinoceptors: Ontogeny and phylogeny. *Drug Dev Res.* **39**:204-242.
- Burnstock G (2004) Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol.* **4**:47-52.
- Burnstock G (2006a) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci.* **27**:166-176.
- Burnstock G (2006b) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev.* **58**:58-86.
- Burnstock G (2006c) Purinergic signalling. *Br J Pharmacol.* **147**:172-181.
- Calvert JA, Evans RJ (2004) Heterogeneity of P2X receptors in sympathetic neurons: contribution of neuronal P2X1 receptors revealed using knockout mice. *Mol Pharmacol.* **65**:139-148.

- Castelucci P, Robbins HL, Poole DP, Furness JB (2002) The distribution of purine P2X2 receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem Cell Biol.* **117**:415-422.
- Cattaneo M, Lecchi A, Ohno M, Joshi BV, Besada P, Tchilibon S, Lombardi R, Bischofberger N, Harden TK, Jacobson KA (2004) Antiaggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y₁ receptor. *Biochem Pharmacol.* **68**:1995-2002.
- Clapham, D.,E., (2007) Calcium signalling, *Cell.* **131**:1047-1058
- Collet C, Strube C, Csernoch L, Mallouk N, Ojeda C, Allard B, Jacquemond V (2002) Effects of extracellular ATP on freshly isolated mouse skeletal muscle cells during pre-natal and post-natal development. *Pflugers Arch.* **443**:771-778.
- Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G (1996) Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci.* **16**:2495-2507.
- 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**:924-947.
- Cook SP, McCleskey EW (2002) Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain.* **95**:41-47.
- Cook SP, Vulchanova L, Hargreaves KM, Elde R, McCleskey EW (1997) Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature.* **387**:505-508.
- Coryden 2010
- Cook, S.P., Rodland, K.D., and McCleskey, E.W. (1998). A memory for extracellular Ca²⁺ by speeding recovery of P2X receptors from desensitization. *J Neurosci.* **18**:9238-9244.
- Das, B., Mondragon, M.O., Sadeghian, M., Hatcher, V.B., and Norin, A.J. (1994). A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of H⁺ transporting ATP synthase on the surface of tumor cell lines. *J Exp Med.* **180**: 273-281.
- Denlinger LC, Fisette PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, Proctor RA, Bertics PJ (2001) Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* **167**:1871-1876.
- Denlinger LC, Sommer JA, Parker K, Gudipaty L, Fisette PL, Watters JW, Proctor RA, Dubyak GR, Bertics PJ (2003) Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X7 nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function. *J Immunol.* **171**:1304-1311.
- Ding S, Sachs F (1999a) Ion permeation and block of P2X2 purinoceptors: single channel recordings. *J Membr Biol.* **172**:215-223.

Ding S, Sachs F (1999b) Single Channel Properties of P2X2 Purinoceptors. *J Gen Physiol.* **113**:695-720.

Drury, A.N., and Szent-Gyorgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *Journal of Physiology-London.* **68**: 213-237.

Dubyak GR (2003) Knock-Out Mice Reveal Tissue-Specific Roles of P2Y Receptor Subtypes in Different Epithelia. *Mol Pharmacol.* **63**:773-776.

Egan TM, Haines WR, Voigt MM (1998) A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J Neurosci.* **18**:2350-2359.

Egan TM, Khakh BS (2004) Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. *J Neurosci.* **24**:3413-3420.

Egan TM, Samways DS, Li Z (2006) Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch.* **452**:501- 512.

Eickhorst AN, Berson A, Cockayne D, Lester HA, Khakh BS (2002) Control of P2X2 channel permeability by the cytosolic domain. *J Gen Physiol.* **120**:119-131.

Ennion SJ, Evans RJ (2002b) P2X1 receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem Biophys Res Commun.* **291**:611-616.

Erhardt JA, Pillarisetti K, Toomey JR (2003) Potentiation of platelet activation through the stimulation of P2X1 receptors. *J Thromb Haemost.* **1**:2626-2635.

Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2X purinoceptors). *Mol Pharmacol.* **48**:178-183.

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F (1997a) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol.* **159**:1451-1458.

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F (1997b) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med.* **185**:579-582.

Ford APDW, Gever JR, Nunn PA, Zhong Y, Cefalu JS, Dillon MP, Cockayne DA (2006) Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. *Br J Pharmacol.* **147**:S132-S143.

Fujiwara, Y., and Kubo, Y. (2006). Regulation of the desensitization and ion selectivity of ATPgated P2X(2) channels by phosphoinositides. *Journal of Physiology-London.* **576**: 135-149.

Gachet C (2001) ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost.* **86**:222- 232.

Garcia-Guzman M, Soto F, Laube B, Stühmer W (1996) Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett.* **388**:123-127.

Gayle S, Burnstock G (2005) Immunolocalisation of P2X and P2Y nucleotide receptors in the rat nasal mucosa. *Cell Tissue Res.* **319**:27-36.

Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP (2006). Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* **452**:513-537.

Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casadó V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K, Franco R (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**:8606-8611.

Giniatullin, R., Sokolova, E., and Nistri, A. (2003). Modulation of P2X3 receptors by Mg²⁺ on rat DRG neurons in culture. *Neuropharmacology.* **44**:132-140.

Glass R, Burnstock G (2001) Immunohistochemical identification of cells expressing ATP--gated cation channels (P2X receptors) in the adult rat thyroid. *J Anat.* **198**:569-579.

Goetz V, Da Prada M, Pletscher A (1971) Adenine-, guanine- and uridine-5'-phosphonucleotides in blood platelets and storage organelles of various species. *J Pharmacol Exp Ther.* **178**:210-215.

Groschel-Stewart U, Bardini M, Robson T, Burnstock G (1999) Localisation of P2X5 and P2X7 receptors by immunohistochemistry in rat stratified squamous epithelia. *Cell Tissue Res.* **296**:599-605.

Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.* **72**:1447-1456.

Hansen MA, Bennett MR, Barden JA. (1999b) Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart. *J Auton Nerv Syst.* **78**:1-9.

Hansen MA, Dutton JL, Balcar VJ, Barden JA, Bennett MR (1999a) P2X (purinergic) receptor distributions in rat blood vessels. *J Auton Nerv Syst.* **75**:147-155.

Hechler B, Lenain N, Marchese P, Vial C, Heim V, Freund M, Cazenave JP, Cattaneo M, Ruggeri ZM, Evans R, Gachet C (2003) A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J Exp Med.* **198**:661-667.

Holton, F.A., and Holton, P. (1954). The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots - a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *Journal of Physiology-London.* **126**:124-140.

Housley GD, Kanjhan R, Raybould NP, Greenwood D, Salih SG, Järlebark L, Burton LD, Setz VC, Cannell MB, Soeller C, Christie DL, Usami S, Matsubara A, Yoshie H, Ryan AF, Thorne PR (1999) Expression of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the cochlea: implications for sound transduction and auditory neurotransmission. *J Neurosci.* **19**:8377-8388.

Hughes JP, Hatcher JP, Chessell IP (2007) The role of P2X7 in pain and inflammation. *Purinergic Signal.* **3**:163-169.

Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem.* **279**:29628-29638.

Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature.* **377**:428–431.

Chen M, Gu JG (2005) A P2X receptor-mediated nociceptive afferent pathway to lamina I of the spinal cord. *Mol Pain.* **1**:4.

Chizhnikov I, Yudin Y, Mamenko N, Prudnikov I, Tamarova Z, Krishtal O (2005) Opioids inhibit purinergic nociceptors in the sensory neurons and fibres of rat via a G protein-dependent mechanism. *Neuropharmacology.* **48**:639-647.

Iglesias, S. Locovei, A. Roque, A. P. Alberto, G. Dahl, D. C. Spray, and E. Scemes (2008) P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* **295**: C752-C760.

Jelinková I, Vávra V, Jindrichova M, Obsil T, Zemkova HW, Zemkova H, Stojilkovic SS (2008) Identification of P2X4 receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Arch.* **456**:939-950.

Jiang LH, Rassendren F, Spelta V, Surprenant A, North RA (2001) Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X2 receptor. *J Biol Chem.* **276**:14902-14908.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature.* **423**:33-41.

Jindřichová M., Vávra V., Obšil T., Stojilkovic S. S., Zemková H. (2009) Functional relevance of aromatic residues in the first transmembrane domain of P2X receptors. *J Neurochem.* **109**(3), 923-934,

Jindřichová M., Khafizov K., Skorinkin A., Fayuk D., Bart G., Zemková H., Giniatullin R. (2011) Highly conserved tyrosine 37 stabilizes desensitized states and restricts calcium permeability of ATP-gated P2X3 receptor. *J Neurochemistry.* **119**:676-685

Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., and Gouaux, E. (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature.* **460**:592-U555.

- Khadra A., Tomić M, Yan Z., Zemková H., Sherman A, Stojilkovic S.S. (2013) Dual Gating Mechanism and Function of P2X7 Receptor Channels. *Biophys J.* **104**:2612-21.
- Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999a) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci.* **2**:322-330.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Séguéla P, Voigt M, Humphrey PP (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev.* **53**:107-118.
- Khakh BS, Egan TM (2005). Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics. *J Biol Chem.* **280**:6118-6129.
- Khakh BS, North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature.* **442**:527-532.
- King M, Housley GD, Raybould NP, Greenwood D, Salih SG (1998) Expression of ATP-gated ion channels by Reissner's membrane epithelial cells. *Neuroreport.* **9**:2467-2474.
- Koshimizu T, Koshimizu M, Stojilkovic SS (1999) Contributions of the C-terminal domain to the control of P2X receptor desensitization. *J Biol Chem.* **274**:37651-37657.
- Koshimizu T, Tomic M, Van Goor F, Stojilkovic SS (1998a). Functional role of alternative splicing in pituitary P2X2 receptor-channel activation and desensitization. *Mol Endocrinol.* **12**:901-913.
- Koshimizu T, Tomic M, Koshimizu M, Stojilkovic SS (1998b) Identification of amino acid residues contributing to desensitization of the P2X2 receptor channel. *J Biol Chem.* **273**:12853-12857.
- Le KT, Babinski K, Séguéla P (1998) Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci.* **18**:7152-7159.
- Le KT, Boue-Grabot E, Archambault V, Séguéla P (1999) Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *J Biol Chem.* **274**:15415-15419.
- Lee HY, Bradini M, Burnstock G (2000) Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J Urol.* **163**:2002-2007.
- Lewis, C.J., Evans, R.J. (2000). Lack of run-down of smooth muscle P2X receptor currents recorded with the amphotericin permeabilized patch technique, physiological and pharmacological characterization of the properties of mesenteric artery P2X receptor ion channels. *Br J Pharmacol.* **131**:1659-1666.
- Lewis CJ, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature.* **377**:432-435.

- Li M, Chang TH, Silberberg SD, Swartz KJ (2008) Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci.* **11**:883-887.
- Li Z, Migita K, Samways DS, Voigt MM, Egan TM (2004) Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor. *J Neurosci.* **24**:7378-7386.
- Liu GJ, Brockhausen J, Bennett MR (2003) P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton Neurosci.* **108**:12-16.
- Ma B, Ruan HZ, Burnstock G, Dunn PM (2005) Differential expression of P2X receptors on neurons from different parasympathetic ganglia. *Neuropharmacology.* **48**:766-777.
- Ma, W., Korngreen, A., Weil, S., Cohen, E.B., Priel, A., Kuzin, L., and Silberberg, S.D. (2006). Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. *J Physiol.* **571**:503-517.
- Meyer MP, Groschel-Stewart U, Robson T, Burnstock G (1999) Expression of two ATP-gated ion channels, P2X5 and P2X6, in developing chick skeletal muscle. *Dev Dyn.* **216**:442-449.
- Migita K, Haines WR, Voigt MM, Egan TM (2001) Polar residues of the second transmembrane domain influence cation permeability of the ATP-gated P2X2 receptor. *J Biol Chem.* **276**:30934-30941.
- Moser, T.L., Kenan, D.J., Ashley, T.A., Roy, J.A., Goodman, M.D., Misra, U.K., Cheek, D.J., and Pizzo, S.V. (2001). Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**:6656-6661.
- Nakazawa K (1994) ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons. *J Neurosci.* **14**:740-750.
- Newbolt A, Stoop R, Virginio C, Surprenant A, North RA, Buell G, Rassendren F (1998) Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem.* **273**:15177-15182.
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligandgated ion channels. *Embo J.* **17**:3016-3028.
- Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F (2005). Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *J Neurochem.* **92**:925-933.
- North RA (2002) Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev.* **82**:1013-1067.
- North, R.A., and Surprenant, A. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* **40**:563-580.
- North RA, Barnard EA (1997) Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol.* **7**:346-357.

- O'Connor SE, Dainty IA, Leff P (1991) Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol Sci.* **12**:137-141.
- Ohta T, Kubota A, Murakami M, Otsuguro K, Ito S (2005) P2X2 receptors are essential for $[Ca^{2+}]_i$ increases in response to ATP in cultured rat myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **289**:G935-G948.
- Ormond SJ, Barrera NP, Qureshi OS, Henderson RM, Edwardson JM, Murrell-Lagnado RD (2006) An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol.* **69**:1692-1700.
- Parker, K.E. (1998). Modulation of ATP-gated non-selective cation channel (P2X1 receptor) activation and desensitization by the actin cytoskeleton. *J Physiol.* **510**: 19-25.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* **50**:413-492.
- Rassendren F, Buell G, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A (1997b) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem.* **272**:5482-5486.
- Ren J, Bian X, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford AP, Galligan JJ (2003) P2X2 subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *J Physiol.* **552**:809-821.
- Rettinger J, Aschrafi A, Schmalzing G (2000) Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J Biol Chem.* **275**:33542-33547.
- Rolf MG, Brearley CA, Mahaut-Smith MP (2001) Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with $\beta\beta\beta$ -methylene ATP. *Thromb Haemost.* **85**:303- 308.
- Ryten M, Dunn PM, Neary JT, Burnstock G (2002) ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X5 receptor on satellite cells. *J Cell Biol.* **158**:345-355.
- Ryten M, Hoebertz A, Burnstock G (2001) Sequential expression of three receptor subtypes for extracellular ATP in developing rat skeletal muscle. *Dev Dyn.* **221**:331-341.
- Saiag B, Bodin P, Shacoori V; Catheline M; Rault B; Burnstock G(1995) Uptake and flow- induced release of uridine nucleotides from isolated vascular endothelial cells. *Endothelium.* **2**:279-285.
- Samways DS, Egan TM (2007) Acidic amino acids impart enhanced Ca^{2+} permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. *J Gen Physiol.* **129**:245-256.

Samways DS, Migita K, Li Z, Egan TM (2008) On the role of the first transmembrane domain in cation permeability and flux of the ATP-gated P2X2 receptor. *J Biol Chem.* **283**:5110-5117.

Silberberg SD, Chang TH, Swartz KJ (2005) Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol.* **125**:347-359.

Silberberg SD, Li M, Swartz KJ (2007) Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. *Neuron.* **54**:263-274.

Simon J, Kidd EJ, Smith FM, Chessell IP, Murrell-Lagnado R, Humphrey PP, Barnard EA (1997) Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor. *Mol Pharmacol.* **52**:237-248

Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, Petrou S (2003) P2X7 receptor cell surface expression and cytolitic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem.* **278**:8853-8860.

Smith NCE, Burnstock G (2004) Mechanisms underlying postjunctional synergism between responses of the vas deferens to noradrenaline and ATP. *Eur J Pharmacol.* **498**:241-248.

Smith, F.M., Humphrey, P.P.A., and Murrell-Lagnado, R.D. (1999). Identification of amino acids within the P2X(2) receptor C-terminus that regulate desensitization. *Journal of Physiology.* **520**: 91-99.

Sokolova E, Nistri A, Giniatullin R (2001) Negative cross talk between anionic GABAA and cationic P2X ionotropic receptors of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* **21**:4958-4968.

Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez JM, Hollmann M, Karschin C, Stühmer W (1996b) P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**:3684-3688.

Soto F, Garcia-Guzman M, Karschin C, Stühmer W (1996a) Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* **223**:456-460.

Stern P, Behe P, Schoepfer R, Colquhoun D (1992) Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc Biol Sci.* **250**:271-277.

Stoop R, Thomas S, Rassendren F, Kawashima E, Buell G, Surprenant A, North RA (1999) Contribution of individual subunits to the multimeric P2X2 receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol Pharmacol.* **56**:973-981.

- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*. **272**:735-738.
- Suzuki H, Kokubun S (1994) Subtypes of purinoceptors in rat and dog urinary bladder smooth muscles. *Br J Pharmacol*. **112**:117-122.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998) N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry*. **37**:14845-14851.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999b) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem*. **274**:6653-6659.
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. **424**:778-783.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*. **371**:516-519.
- Vávra, V., Bhattacharya, A., and Zemkova, H. (2011) Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices. *Neuroscience*. **188**:1-12.
- Vávra V, Jindřichová M, Jelínková I, Zemková H (2008) SFN Neuroscience 2008, Washington, 822.9/C8.
- Vial, C., Tobin, A.B., and Evans, R.J. (2004) G-protein-coupled receptor regulation of P2X1 receptors does not involve direct channel phosphorylation. *Biochem J*. **382**:101-110.
- Virginio C., MacKenzie A, North RA, Surprenant A (1999b) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol*. **519**:335-346.
- Virginio C., MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999a) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci*. **2**:315-321.
- von Kügelgen I. (2008) Pharmacology of mammalian P2X- and P2Y-receptors. *Biotrend Reviews*. **03**:1-10.
- Vulchanova L, Arvidsson U, Riedl M, Wang J, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R (1996) Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**:8063-8067.

- Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R (1997) Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology* **36**:1229-1242.
- Wang, C.Z., Namba, N., Gono, T., Inagaki, N., and Seino, S. (1996). Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **220**:196-202.
- Werner P, Seward EP, Buell GN, North RA (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**:15485-15490.
- Wilkinson WJ, Jiang LH, Surprenant A, North RA (2006) Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol Pharmacol*. **70**:1159-1163.
- Worthington RA, Dutton JL, Poronnik P, Bennett MR, Barden JA (1999) Localisation of P2X receptors in human salivary gland epithelial cells and human embryonic kidney cells by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting and immunofluorescence. *Electrophoresis*. **20**:2065-2070.
- Xiang Z, Burnstock G (2005) Changes in expression of P2X purinoceptors in rat cerebellum during postnatal development. *Dev Brain Res*. **156**:147-157.
- Yan, Z., Liang, Z., Tomic, M., Obsil, T., and Stojilkovic, S.S. (2005). Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel. *Mol Pharmacol*. **67**:1078-1088.
- Yegutkin, G.G., Henttinen, T., and Jalkanen, S. (2001). Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *FASEB J*. **15**:251-260.
- Yegutkin, G.G., Henttinen, T., Samburski, S.S., Sychala, J., and Jalkanen, S. (2002). The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J*. **367**:121-128.
- Yegutkin, G.G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. **1783**:673-694.
- Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK; Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators (2001) Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*. **345**:494-502.
- Zemková H, Balík A, Jiang Y, Kretschmannova K, Stojilkovic SS (2006) Roles of purinergic P2X receptors as pacemaking channels and modulators of calcium-mobilizing pathway in pituitary gonadotrophs. *Mol Endocrinol*. **20**:1423-1436.

Zemková H, Balík A, Jindrichová M, Vávra V (2008) Molecular Structure of Purinergic P2X Receptors and their Expression in the Hypothalamus and Pituitary. *Physiol Res.* **57** :S23-S38.

Zemková, H., Kucka, M., Li, S., Gonzalez-Iglesias, A.E., Tomic, M., and Stojilkovic, S.S. (2010). Characterization of purinergic P2X(4) receptor channels expressed in anterior pituitary cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* **298**: E644-E651.

Zhou L, Qi X, Potashkin JA, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI (2008) Micro-RNAs miR-186 and miR-150 downregulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *J Biol Chem.* **283**:28274-28286.

Zhou X, Galligan JJ (1998) Non-additive interaction between nicotinic cholinergic and P2X purine receptors in guinea-pig enteric neurons in culture. *J Physiol.* **513**:685-697.

Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res.* **52**:44-56.

