Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
katedra Fyziologie

Autoreferát disertační práce

Úloha variabilních řetězců na rozhraní podjednotek ve formování ATP-vazebné kapsy a funkci P2X4 receptoru

Mgr. Vendula Tvrdoňová

Praha, 2014

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze

a Akademie věd České republiky

Program: **Fyziologie živočichů**

Předseda oborové rady: **Doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.**

Školicí pracoviště:

Fyziologický ústav Akademie věd ČR, oddělení Buněčné a molekulární neuroendokrinologie,

Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Česká Republika

Autor: **Mgr. Vendula Tvrdoňová**

Školitel: **RNDr. Hana Zemková, CSc.**

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

ABSTRAKT **4**

1. ÚVOD **5**

2. CÍLE PRÁCE **8**

3. METODY **8**

4. VÝSLEDKY A DISKUZE **9**

4.1. EFEKT ALANINOVÝCH MUTACÍ OBLASTI LF A DF NA FUNKCI P2X4R 9
4.2. IDENTIFIKACE KRITICKÝCH AMK VE STRUKTUŘE EXTRACELULÁRNÍHO VESTIBULU 14
4.3. KINETICKÉ PARAMETRY CHOVÁNÍ P2X4 RECEPTORU 15

5. ZÁVĚR **17**

6. POUŽITÁ LITERATURA **18**

CURRICULUM VITAE **19**

SEZNAM PUBLIKACÍ **21**

ABSTRAKT

Krystalizace P2X4 receptoru (P2X4R) ze zebřičky („zebra fish“, zfP2X4) v uzavřeném a otevřeném stavu odhalila změny v konformacích ektodomény včetně změn v oblasti styčných ploch mezi levou („left flipper“; LF) a hřbetní („dorsal fin“; DF) ploutví. Roli těchto struktur ve formování ATP vazebné kapsy a funkci receptoru jsme zkoumali pomocí alaninové skenovací mutageneze úseků LF (D280-N293) a DF (R203-L214) potkaního P2X4R, a s využitím ATP a analogických agonistů 2-(methylthio)adenosin 5´-trifosfátu, adenosin 5´-(γ-thio)trifosfátu, 2'(3'-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosin 5´-trifosfátu a α,β-methylenadenosin 5'-trifosfátu. Sníženou citlivost anebo účinnost ATP mělo 15 z 26 vytvořených mutací. Mutace R203A, N204A a N293A byly v podstatě nefunkční, ale jejich funkci bylo možné obnovit ivermektinem, alosterickým modulátorem P2X4R. Mutace I205A, T210A, L214A, P290A, G291A a Y292A měly změněnou odpověď na ATP a na analogické agonisty. Naproti tomu mutace L206A, N208A, D280A, T281A, R282A a H286A nevykazovaly ve srovnání s divokým typem receptoru žádnou změnu v odpovědích na ortosterické agonisty. Tyto pokusy, společně s homologním modelováním, ukázaly, že aminokyseliny z první skupiny, nacházející se v horní části obou řetězců LF a DF, se podílejí na přesné organizaci ATP-vazebné kapsy a iniciaci převodu signálu skrze receptor směrem ke druhé skupině aminokyselin ve spodní části obou řetězců. Aminokyseliny R203 a N204, zanořené hlouběji do proteinu, mohou integrovat informaci přicházející z obou řetězců a směřovat ji dále k bráně receptorového kanálu. Navíc, aminokyseliny v oblasti LF se přednostně podílejí na kontrole převodu receptoru ze stavu otevřeného do stavu desenzitizovaného. Výraznými konformačními změnami procházejí i řetězce extracelulárního vestibulu. Nativní rezidua mutací Y54A, Q55A, F324A a G325A, jejichž funkci nebylo možné obnovit ivermektinem, jsou důležitá pro správnou strukturu a funkci vestibulu. Přispěli jsme také k vypracování nového kinetického (Markovova) modelu P2X4 receptoru, kde ivermektinem vyvolaný převod z otevřeného do dilatovaného stavu je svázaný se senzitizací receptoru, která jde proti desenzitizaci a následné internalizaci.

1. ÚVOD

Purinergní P2X receptory (P2XR) jsou neselektivní kationtové kanály aktivované extracelulárním adenosin-5´-trifosfátem (ATP). Tato skupina kanálů byla objevena v 70. letech minulého století (Burnstock, 1972). P2XR jsou tvořeny třemi podjednotkami, každá podjednotka, jichž je známo sedm, P2X1-P2X7, má dvě transmembránové domény (TM). N- i C- konec se nachází uvnitř buňky, vně buňky je velká klička s vazebným místem pro ATP a jeho analogy. P2X4 podjednotky jsou schopny formovat homomerní i heteromerní receptory. P2XR se vyskytují hojně po celém organismu od centrální nervové soustavy, přes periferní nervovou soustavu, svaly, plíce, střevo, endokrinní a exokrinní žlázy až po ledviny, močový měchýř a chámovody. Podílejí se také na tvorbě kostí, funkci smyslů a imunitního systému či vývoji bolesti (North, 2002; Burnstock, 2013; Burnstock, 2014).

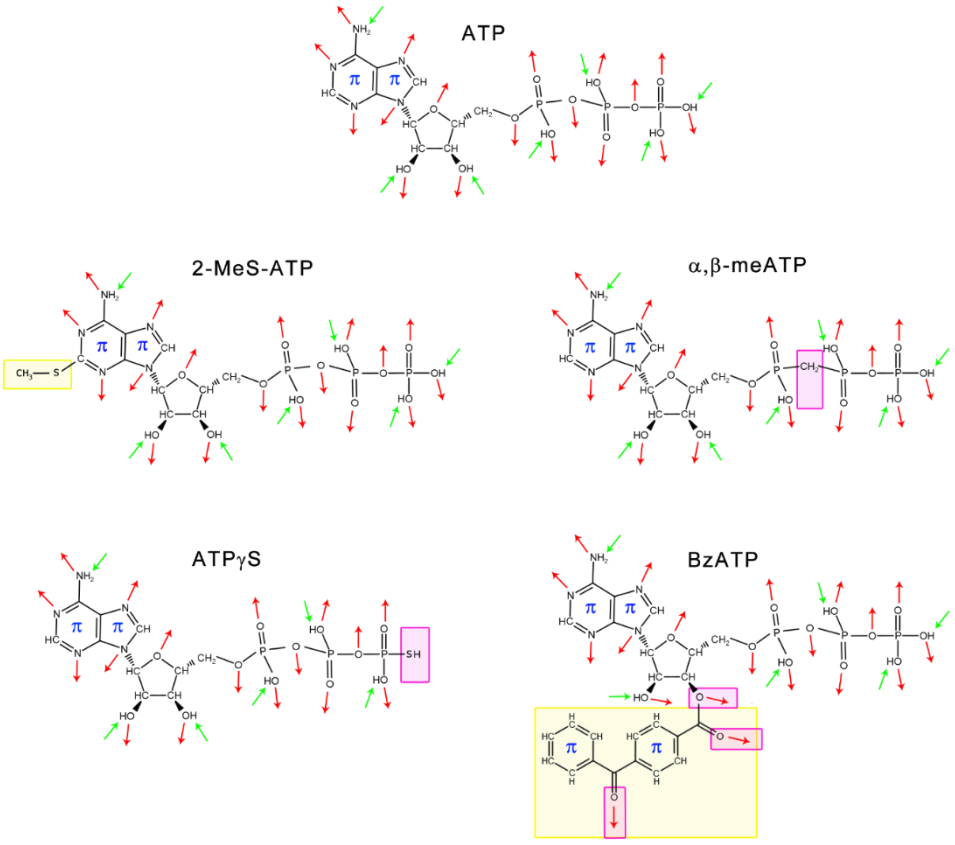
Předkládaná dizertační práce je zpracována na modelové podjednotce purinergního P2X4 receptoru potkana (rP2X4R). Důvodem pro výběr P2X4R byly jeho funkční, fyziologické a farmakologické vlastnosti. Každý homomerní P2XR tvořený ze stejných podjednotek má své specifické vlastnosti – různou citlivost na agonisty, antagonisty a modulátory, různou kinetiku otevírání kanálu, desenzitizace a dilatace, či propustnost pro Ca^{2+} (North, 2002; Burnstock, 2006; Coddou, 2011) – a vlastnosti P2X4R jsou zhruba ve středu možných vlastností P2XR (má středně rychlou aktivaci, desenzitizaci i dilataci). Má největší zastoupení v centrálním nervovém systému ze všech P2X receptorů a navíc jej lze specificky modulovat ivermektinem.

Stejně jako u všech ostatních P2XR je kanál tvořený třemi P2X4 podjednotkami propustný především pro Na^+ a K^+. Významná je také propustnost pro Ca^{2+}, poměr propustností P_{Ca2+}/P_{Na+} je přibližně 4,2. Tok vápenatých iontů skrz kanál tvoří přibližně 11% proudové odpovědi. Při krátké aplikaci agonisty je odpověď P2X4R velmi rychlá. Vodivost kanálu je poměrně malá, přibližně 9 pS (Evans, 1996). Při delší aplikaci agonisty (50-100 s) se pór kanálu dále rozšiřuje a je schopen propouštět i velké organické kationty jako je N-methyl-D-glukamin (NMDG) nebo i organické barvivo označované YO-Pro 1 (Khakh a kol., 1999a), ale jev byl popsán jen v nepřítomnosti Ca^{2+} v extracelulárním mediu (ECS). Při delší aplikaci agonisty se P2X4R projevuje středně rychlou desenzitizací, s rychlostní konstantou nižší než 20 s (Evans, 1996).

Plným agonistou P2X4R je ATP, následují další v pořadí: 2-methylthioadenosin-5´-trifosfát (2-MeSATP), adenosin 5'-O-(3-thiotrifosfát) (ATPγS), 3´-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5´-trifosfát (BzATP) a α,β-methylenadenosin-5´-trifosfát (α,β-meATP; Obr. 1). Velmi malá odpověď je na β,γ-methylenadenosin-5´-trifosfát, reaguje i na cytidyn-5´-trifosfát (Coddou a kol., 2011). P2X4R nemá specifického agonistu a ve srovnání s ostatními P2XR je na tradiční agonisty poměrně málo citlivý (North, 2002; Coddou a kol., 2011). Slabší účinek parciálních agonistů, kteří nejsou schopni vyvolat plnou reakci, se také používá v elektrofyziologických studiích pro odlišení P2X4 od jiných podjednotek (Vavra a kol., 2011).

P2X4R jsme si vybrali ke studiu také pro jeho citlivost k ivermektinu. Ivermektin je velká lipofilní molekula, váže se na P2X4R jako pozitivní alosterický modulátor (Khakh a kol., 1999b), který působí skrze kontakt s TM (Jelinkova a kol., 2006; Silberberg a kol., 2007) a není schopen kanál sám otevřít. Jeho efekt se projevuje zvýšením maximální proudové amplitudy a po preinkubaci (4-6 minut) také prodloužením doby deaktivace. (Priel a Silberberg, 2004; Jelinkova a kol., 2006)

Ivermektin tak může být použit pro testování mutací, které se jeví jako nefunkční, protože mají příliš malé odpovědi.



Obrázek 1: Schématické znázornění jednotlivých agonistů Znázornění jednotlivých ortosterických agonistů P2XR s vyznačením donorů (zelené šipky) a akceptorů (červené šipky) vodíkových vazeb. Zvýrazněné obdélníky pak demonstrují rozdíly vůči výchozí struktuře, ATP, s barevným odlišením efektu změny: růžové značí převládající efekt ztráty či nabytí možnosti tvořit vodíkový můstek, žluté pak převládající sterický efekt. Molekuly převzaty z ChemID a upraveny.

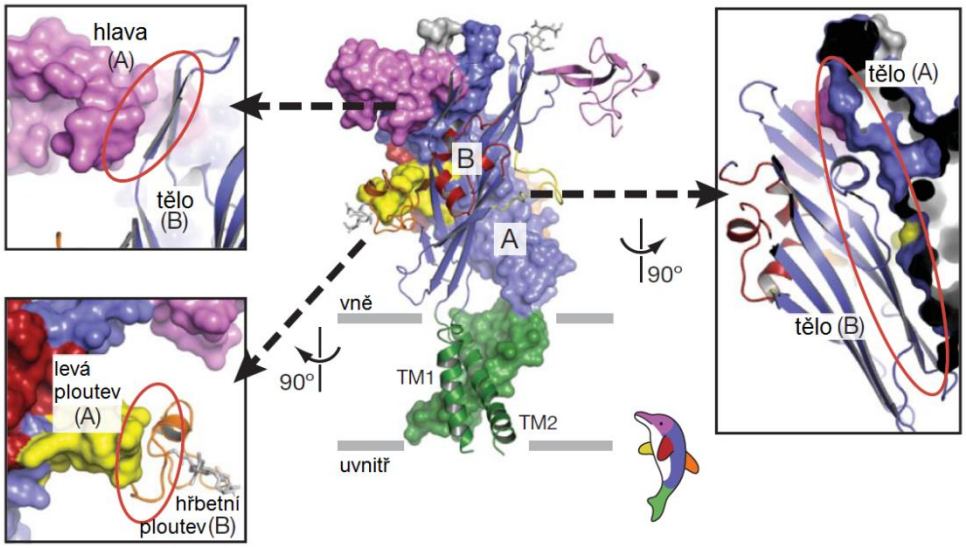
Neumí ale navýšit odpovědi mutovaných receptorů, které nevážou ATP, nejsou správně složeny, či nebyly transportovány do membrány.

V minulosti byly zkoumány především konzervované nabité a aromatické AMK v extracelulární doméně P2XR, protože ATP se váže na receptor z vnější strany membrány. V těchto studiích bylo vytipováno několik AMK, které by měly být v přímém kontaktu s ATP, především K69-X-K71 a N293-F294-R295 (pro detailnější přehled původních studií viz např. (Chataigneau a kol., 2013)). Bližší určení polohy daných úseků v terciální struktuře receptoru ale nebylo známo. Přesněji zasadit zkoumanou oblast do struktury receptoru umožnila až krystalizace P2X4R ze zebřičky („zebra fish“; zfP2X4R) v uzavřeném stavu (Kawate a kol., 2009).

Kawate navíc krystal zfP2X4R rozdělil dle tvarové podobnosti s delfínem na oblasti (hlava, levá ploutev, pravá ploutev, hřbetní ploutev, tělo a ocas; barvami v Obr. 2) a označil všechny části s příslušnými sekundárními strukturami. Vytyčil také tři styčné plochy podjednotek v extracelulární doméně (Obr. 2), některé více, jiné méně, přesně definované. Přestože se nejednalo o krystal v otevřeném stavu, vyřešil tento článek jeden ze sporů, které vědce rozdělovaly. Bez jakýchkoli pochybností bylo možné určit, že ATP-vazebné místo je mezi podjednotkami, nikoli uvnitř podjednotek (Kawate a kol., 2009). Přesné umístění ATP ve struktuře P2XR bylo definitivně objasněno až při vyřešení struktury krystalu zfP2X4R s navázaným ATP (Hattori a Gouaux, 2012). Druhá krystalová studie potvrdila mnoho dat získaných v dřívějších elektrofyziologických pokusech na receptorech s jednobodovými mutacemi. Označila také další AMK, které by měly přijít do kontaktu s ATP: T186, K190, K313, I229, L188, L217 v zfP2X4 (Hattori a Gouaux, 2012). Přestože

známe krystalovou strukturu zfP2X4R s navázaným ATP, jeho přesná poloha ve vazebné kapse není jasná. Máme mnoho indicií, které indikují jiné možné polohy ATP v kapse (Jiang a kol., 2011; Valente a kol., 2011; Du a kol., 2012; Huang a kol., 2014). Navíc je zde důvodná pochybnost o to, ve kterém kinetickém stavu se krystalizovaný receptor nachází.

V každém případě je vnější část ATP-vazebné kapsy formována málo konzervovanými řetězci levé (LF; z anglického „left flipper“) a hřbetní ploutve (DF; „dorsal finn“), na její tvar mají vliv i další, hlouběji uložené řetězce. Po navázání ATP následují výrazné změny ve struktuře hlavy, horní části těla a levé ploutvi jedné podjednotky a spodní části těla a hřbetní ploutve podjednotky sousední, které vyústí v uzavření kapsy pro ATP na jedné straně a otevřením póru na straně druhé (Hattori a Gouaux, 2012; Huang a kol., 2014). Zároveň se rozšiřují vestibuly, především pak extracelulární vestibul těsně nad cytoplazmatickou membránou.



B

		α-helix			β-list
P2X4	**203**	**RNILPNITTSYL**	**280**	**DTRDLEHNVSPGYN**
zfP2X4	206	RNILPNINSSYL	280	DNKDPDNNVAPGYN
P2X1	203	RNLVEEVNGTYM	280	YGE---KNLSPGFN
P2X2	201	GNIASQKSD-YL	277	DPKYDPA--SSGYN
P2X3	189	GNLLPNLTDKDI	266	DGVSEKSSVSPGYN
P2X5	206	ANVLETDNKHFL	282	DNKHTHS-ISSGYN
P2X6	206	TNALDTWDNTYF	283	ER---------GYN
P2X7	206	RNILPGMNIS--	279	DDKYTNESLFPGYN

Obrázek 2: **Styčné plochy podjednotek a jejich variabilita**

A) Krystalová struktura zfP2X4R v uzavřeném stavu (Kawate a kol., 2009) s vyznačením styčných ploch v extracelulární doméně mezi podjednotkami. Jedna podjednotka vyznačena povrchem (A), druhá schematickou strukturou (B); třetí podjednotka pro lepší viditelnost chybí. Barevně odlišeny části receptoru: fialově „hlava“, modře „tělo“, žlutě „levá ploutev“, oranžově „hřbetní ploutev“, červeně „pravá ploutev“, zeleně TM představující „ocas“. Cytoplazmatické domény musely být pro účely krystalizace z receptoru odstraněny. **B)** Srovnání sekvence AMK, které tvoří rozhraní mezi oblastmi DF (R203-L214) jedné podjednotky a LF (D280-N293) druhé podjednotky, napříč jednotlivými potkaními formami P2XR a srovnání se zfP2X4 receptorem. Konzervované AMK jsou v boxech (N204, G291, N293), sekundární struktura (α-helix či β-list) je označena šipkou.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této dizertační práce bylo přispět k objasnění role styčných ploch mezi dvěma podjednotkami v bezprostřední blízkosti ATP-vazebného místa ve funkci rP2X4R. Dále prozkoumat vztah mezi strukturou a funkcí extracelulárního vestibulu rP2X4R a analyzovat kinetické chování receptoru pod vlivem pozitivního alosterického modulátoru ivermektinu. Konkrétně byly řešeny tyto úkoly:

1. Postupnou záměnou všech AMK v oblastech R203-L214 (DF) a D280-N293 (LF) v extracelulární doméně P2X4R za alaniny a pomocí specifických účinků alosterického modulátoru ivermektinu zjistit:
    a. Které AMK mají vliv na velikost ATP odpovědí a zda jsou důležité pro formování a transport proteinu nebo pro funkci receptoru.
    b. Zda AMK, které mají vliv na citlivost receptoru vůči ATP, ovlivňují účinek ortosterických agonistů a strukturu ATP-vazebné kapsy anebo se podílí na předávání informace z ATP-vazebného místa směrem k TM doménám.
    c. Zda některé AMK nebo skupiny AMK hrají roli v desenzitizaci receptoru.
    d. Pokusit se o mechanistické vysvětlení naměřených dat pomocí homologního modelu rP2X4R.
2. Identifikovat možná kritická místa v extracelulárním vestibulu skrze záměnu všech AMK jeho řetězců (V47-V61 a F324-N338) za alaniny a cysteiny.
3. Vysvětlit pozitivní účinky alosterického modulátoru ivermektinu a vytvořit kinetický model chování P2X4R v jeho přítomnosti.

3. METODY

Zadané cíle byly řešeny pomocí molekulárně biologických, biochemických a elektrofyziologických metod a pomocí homologního modelování receptorového proteinu. V DNA pro rP2X4R byly vytvářeny jednobodové mutace. Divoký typ (WT) či mutovaný receptor byl následně exprimován v buněčné linii lidských embryonálních ledvinných buněk č. 293 se zvýšenou citlivostí k transfekci (HEK293T; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) a měřen elektrofyziologicky.

Konkrétně byly použity tyto metody:

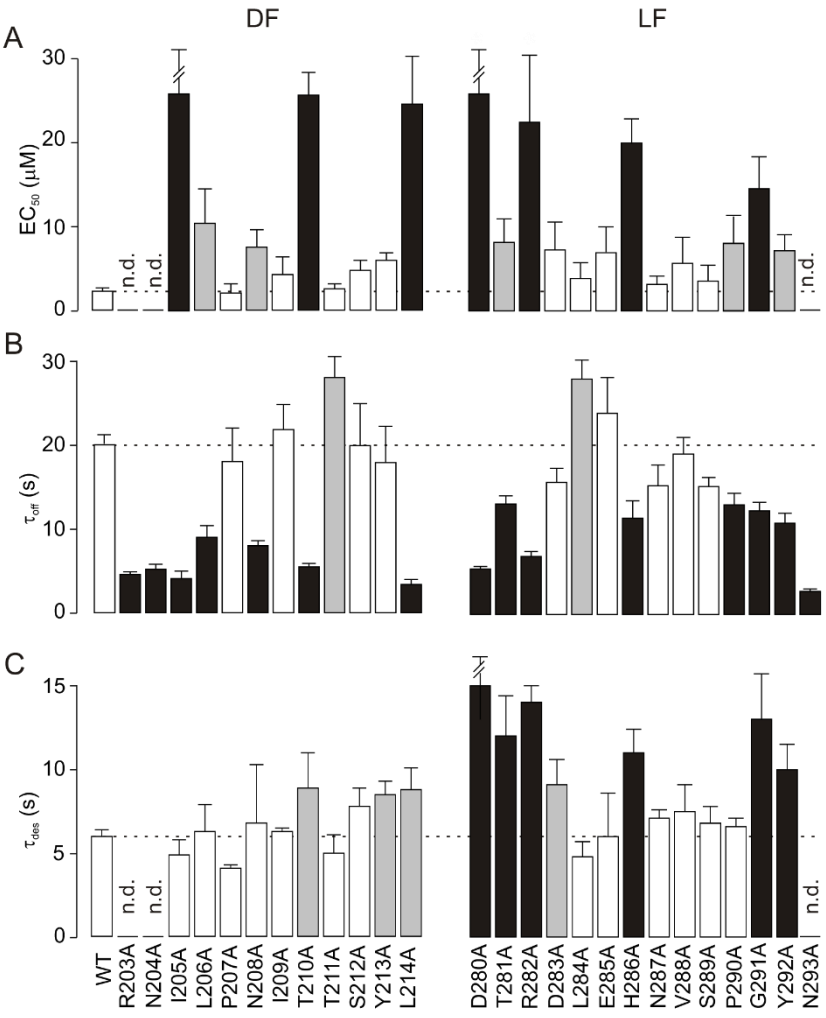
- Polymerázová řetězová reakce, transformace kompetentních buněk (E. coli), izolace DNA pomocí izolačního kitu a kontrolní sekvenace pro získání receptorové DNA s vnesenými bodovými mutacemi
- Pasážování a transfekce buněčných linií HEK293T
- Elektrofyziologická měření technikou patch clamp v módu whole-cell voltage clamp anebo ramp s využitím modulace ivermektinem
- Western blotting a biotinylace pro kvantifikaci proteinu v membráně
- Homologní modelování (Swiss-model, PyMol)
- Statistické a výpočtové metody pro zpracování výsledků (programy ClampFit 9.1, SigmaPlot 2000 v9.1 a SigmaStat 9)

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Každou jednotlivou AMK v obou řetězcích (R203-L214 (DF) a D280-N293 (LF)) jsme zaměnili za alanin, vytvořené konstrukty DNA a WT jsme vnesli do buněk typu HEK293 a elektrofyziologicky jsme zkoumali transmembránové proudy stimulované aplikací ATP. Měřena byla charakteristika závislosti odpovědi na dávce ATP, velikost maximální amplitudy proudu (I_{max}) a jeho potenciace po inkubaci v ivermektinu, časová konstanta deaktivace (τ_{off}) a desenzitizace (τ_{des}). U vybraných receptorů jsme studovali relativní účinnost ortosterických analogických agonistů 2-MeSATP, ATPγS, BzATPa α,β- meATP ve srovnání s ATP.

4.1. EFEKT ALANINOVÝCH MUTACÍ OBLASTI LF A DF NA FUNKCI P2X4R

Charakteristika závislosti odpovědi na dávce ATP byla měřena snímáním odpovědí po podání různých koncentrací ATP, od 1 µM do 300 µM. Získaná data byla vynesena do grafu, proložena sigmoidální křivkou a výpočtem byla zjištěna koncentrace ATP, při které bylo dosaženo poloviny velikosti maximální amplitudy proudové odpovědi (EC_{50}; Obr. 3A). K významným změnám v citlivosti nedošlo u mutací P207A, I209A, T211A, S212A, Y213A, D283A, L284A, E285A, N287A, V288A a S298A. U těchto mutací nedošlo ani k žádné významné změně ve velikosti I_{max}. U tří mutací (R203A, N204A a N293A) jsme nemohli definovat EC_{50} (Obr. 3A) z důvodu velmi nízkých odpovědí ($I_{max} \leq 0{,}2$ nA), u těchto mutací jsme mohli pouze konstatovat, že mají sníženou účinnost ATP. Dalších 7 mutací mělo EC_{50} nejméně 7x vyšší než WT (I205A, T210A, L214A, D280A, R282A, H286A a G291A). Snížená citlivost vůči ATP je často spjata s jeho sníženou účinností, což ale neplatilo u mutací T210A, H286A a G291A, kde byla I_{max}

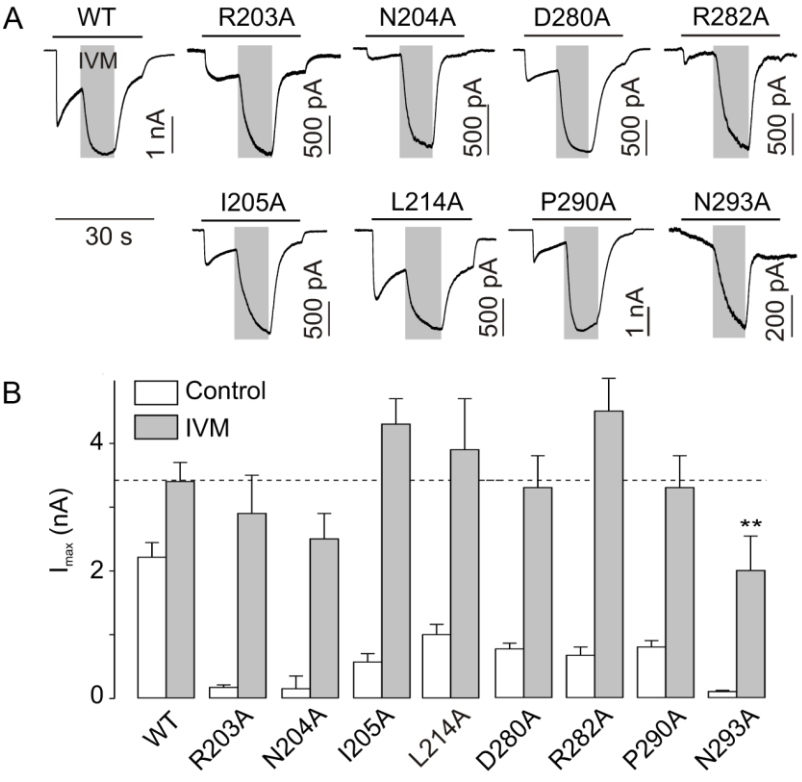


Obrázek 3: Identifikace klíčových AMK v LF a DF rP2X4R.

Efekt alaninových mutací na citlivost k ATP (EC_{50}; A), časovou konstantu deaktivace (τ_{off}; B) a váženou časovou konstantu desenzitizace (τ_{des}; C). Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± SEM z 21-63 měření u mutace a 267 měření u WT. Signifikantní rozdíly vůči WT byly testovány použitím ANOVY a jsou vyznačeny barvami, šedou ($p < 0{,}05$) a černou ($p < 0{,}01$). Tečkovaná linie představuje hodnotu pro WT. (n.d., nedefinováno)

srovnatelná s maximální odpovědí WT receptoru. O něco méně, ale přesto signifikantně ($p < 0,05$), byla snížena citlivost u mutací L206A, N208A, T281A, P290A a Y292A. Ve studovaném souboru 26 alaninových mutací styčné plochy se tak vyskytuje 15 mutací s významně změněnou citlivostí nebo účinností ATP.

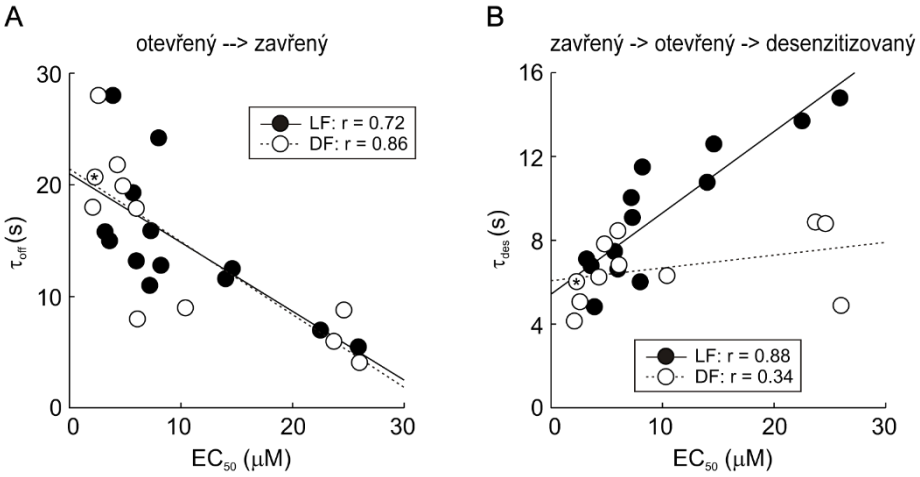
Potenciál ivermektinu jsme plně využili při testování mutací s malými odpověďmi: R203A, N204A, I205A, L214A, D280A, R282A, P290A a N293A. Při akutní aplikaci, kdy byl ivermektin o koncentraci 3 µM aplikován po 10 s během aplikace 100 µM ATP, bylo možné I_{max} všech zmíněných mutací výrazně navýšit (Obr. 4A). Pro statistické vyhodnocení účinku ivermektinu jsme použili dlouhodobý protokol, kdy byly buňky preinkubovány v ivermektinu po 4-6 minut a poté byla měřena hodnota I_{max}. Výsledky uvedené na obrázku 4B jasně ukazují, že proudové odpovědi všech mutací, vyjma N293A, bylo možné skrze ivermektin navýšit na hodnoty srovnatelné s hodnotami pro WT. Mutaci N293A nebylo možné do takové míry navýšit, což je ve shodě s její rolí v kontaktu s ATP.



Obrázek 4: Návratový efekt ivermektinu na proudy málo funkčních mutací levé a horní ploutve.

A) Akutní aplikace 3 µM ivermektinu po 10 s (šedá oblast) v průběhu aplikace 100 µM ATP (30 s, horizontála) v buňkách exprimujících WT či mutace LF (R203A, N204A, I205A, L214A; vlevo) a DF (D280A, R282A, P290A, N293A; vpravo). Trasy jsou příkladem ze 3-5 podobných záznamů pro mutaci a 30 pro WT. B) Graf ukazuje celkový efekt dlouhodobé aplikace (4-6 minut) ivermektinu na navýšení odpovědi receptoru (šedé sloupce). Při dlouhodobé aplikaci ivermektinu byly navýšeny všechny mutace s nízkými proudy na hodnotu blízkou WT s výjimkou mutace v kontaktu s ATP (N293A). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM z 5-8 měření pro mutaci a 15 pro WT. Signifikantní rozdíly vůči WT byly testovány ANOVOU (**$p < 0,01$).

Dlouhodobá, 4-6 minutová, preinkubace s 3 µM ivermektinem byla použita také v kombinaci s nedesenzitizující koncentrací ATP (1 or 3 µM) pro zjištění časové konstanty deaktivace (τ_{off}; vyhodnoceno proložením monoexponenciální křivky) daného receptoru (Obr. 3B). Mutace v oblasti DF ukázaly velké změny v deaktivaci ve srovnání s WT, více než polovina mutací tohoto řetězce měla τ_{off} významně zkrácenou: R203A, N204A, I205A, L206A, N208A, T210A a L214A. V oblasti LF byla hodnota τ_{off} významně snížena ($p < 0,01$) u D280A, T281A, R282A, H286A, P290A, G291A, Y292A a N293A (Obr. 3B). U dvou mutací, T211A a L284A, jsme zaznamenali s nižší signifikancí ($p < 0,05$) zvýšenou časovou konstantu deaktivace. Při vynesení τ_{off} do grafu proti EC_{50} je vidět dobrá korelace hodnot v obou řetězcích (Obr. 5A). Tato data potvrdila sníženou citlivost

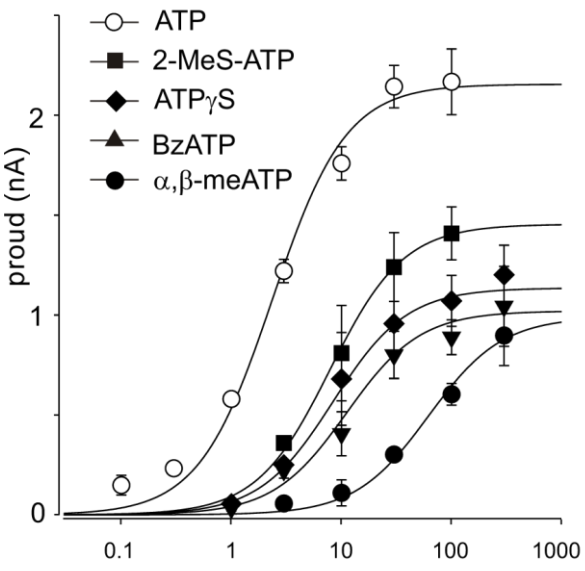


Obrázek 5: Závislost deaktivace a desenzitizace na citlivosti k ATP.

Korelace závislosti deaktivace (**A**) a desenzitizace (**B**) na citlivosti receptoru k ATP. Mutace levé ploutve (LF) jsou zobrazeny jako plné kruhy, hřbetní ploutev (DF) pak prázdnými kruhy. WT je označen hvězdičkou. Ke korelaci byla provedena v programu SigmaPlot.

vůči ATP u mutací, u kterých byla naměřena zvýšená hodnota EC_{50}, a prokázala sníženou citlivost u nefunkčních a málo funkčních mutací, u kterých EC_{50} nemohla být změřena. Dále jsme studovali vliv záměny jednotlivých AMK v LF a DF na kinetiku desenzitizace rP2X4R. V přítomnosti 100 μM ATP po dobu 60 s proud WT receptoru klesal biexponciálně s τ_{des1} = 1,3 ± 0,2 s a τ_{des2} = 9,0 ± 0,7 s; pomalejší komponenta se podílela na poklesu 63 ± 3,0 %. V některých případech bylo lépe použít monoexponenciální fitování, proto jsme pro srovnání mezi mutacemi a WT počítali s váženou konstantou desenzitizace (WT τ_{des} = 6,0 ± 0,4 s; Obr. 3C). Mutace D280A, T281A, R282A, D283A, H286A, G291A a Y292A (LF) vykazovaly 1,5-2,6x zpomalenou desenzitizační kinetiku. Méně signifikantně ($p < 0,05$) pak byly prodloužené desenzitizace některých mutací v DF (T210A, Y213A a L214A). U zbylých mutací (I205A, L206A, I207A, N208A, I209A, T211A, S212A, L284A, E285A, N287A, V288A, S289A a P290A) jsme nenašli žádnou výraznější změnu rychlosti desenzitizace. Při vynesení hodnot τ_{des} proti hodnotám EC_{50} jednotlivých receptorů do grafu jsme nalezli silnou korelaci mezi hodnotami pro LF, nikoli pro DF (Obr. 5B). Tyto výsledky ukázaly, že na kontrole desenzitizace se podílí významně oblast LF, nikoli ale DF, a odpovědná je skupina AMK, spíše než jednotlivé AMK.

Jak bylo zmíněno výše, řetězce LF a DF částečně formují ATP-vazebnou kapsu. Zároveň se jedná o variabilní řetězce bez výraznější sekundární struktury. Lze tedy očekávat, že budou mít vliv na přesné formování ATP-vazebné kapsy a že záměny jednotlivých AMK za alanin mohou vyvolat změny ve tvaru kapsy, které budou mít za následek změny v účinnosti různých agonistů. Pro tato měření jsme použili čtyři analogy ATP, které působí jako parciální agonisté P2X4R: 2-MeSATP, ATPγS, BzATP a α,β-meATP (EC_{50} pro WT: 2-MeS-ATP = 7,9 ± 1,0 μM; ATPγS = 8,4 ± 1,8 μM; BzATP = 11,1 ± 2,9 μM; α,β-meATP EC_{50}= 62 ± 18 μM; Obr. 6). Agonisté a ATP byli podáváni v koncentraci 100 μM a následně byl počítán poměr mezi odpovědí



Obrázek 6: Citlivost rP2X4R k alternativním agonistům ve srovnání s ATP.

Křivky závislosti odpovědi na podanou koncentraci pro různé agonisty pro WT.

vyvolanou ATP a odpovědí vyvolanou analogickým agonistou. Ačkoli tato koncentrace není pro všechny mutace maximálně účinná, je stále ideální k rozlišení efektu různých agonistů.

Výsledné poměry pak byly porovnávány s poměry naměřenými stejným postupem u WT receptoru (ATP (100 %) > 2-MeS-ATP (67 %) > ATPγS (50 %) > BzATP (38 %) > α,β-meATP (32 %)). Pro pokusy s alternativními agonisty jsme vybrali všechny mutace, u kterých byla významně změněna EC_{50} anebo τ_{off}. Na základě získaných dat můžeme mutované receptory rozdělit do tří skupin uvedených v Tabulce 1. Ve *skupině I* jsou mutace, u kterých jsme zachytili významné změny v odpovědích na agonisty: I205A, T210A, L214A, P290A, G291A a Y292A. U mutací I205A a L214A se jednalo o komplexní snížení odpovědí všech agonistů při přetrvávající dominanci 2-MeSATP. U dalších čtyř mutací, T210A, P290A, G291A a Y292A, došlo k ojedinělým propadům či navýšením u některého z agonistů.

Tabulka 1: Percentuální odpovědi ortosterických agonistů ve srovnání s ATP pro WT a vybrané mutované receptory.

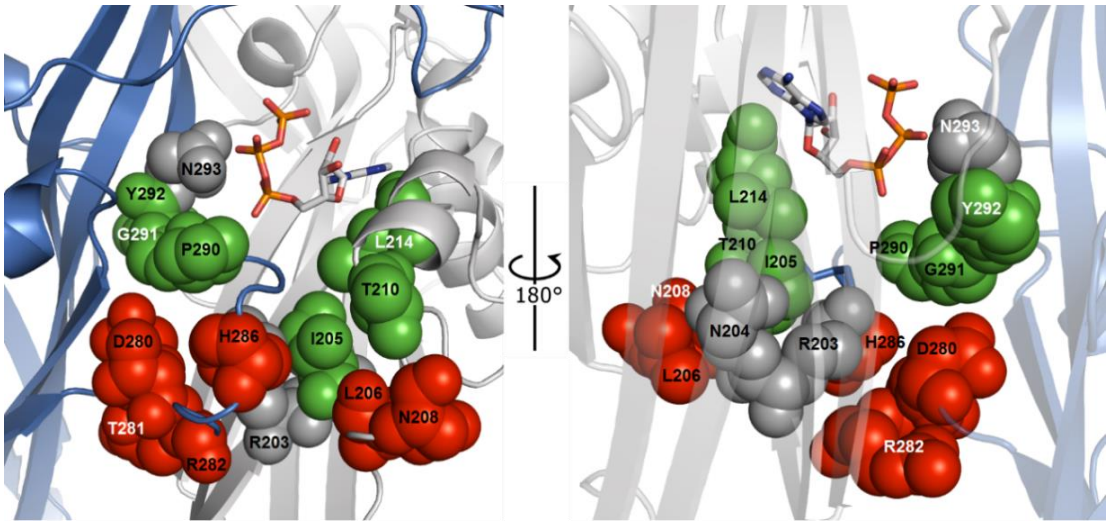
Krátké (2 s) aplikace agonistů (100 μM) byly střídány s promýváním ECS (60 s). Hodnoty, relativní odpověď ku ATP (100%), jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM pro 26-37 měření pro WT a 3-18 měření pro mutaci. *Skupina I*: Mutace vykazují změny v citlivosti/účinnosti ATP a také v odpovědích alternativních agonistů. *Skupina II*: Mutace vykazující změny v citlivosti/účinnosti ATP, ale ne v odpovědích alternativních agonistů. *Skupina III*: Mutace bez signifikantních změn v citlivosti/účinnosti ATP. Statistická signifikance byla vyhodnocovaná ANOVOU srovnáním odpovědí agonistů mezi WT a mutacemi. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Receptor	doména	**2-MeS-ATP**	**ATPγS**	**BzATP**	**α,β–meATP**
WT		67.3 ± 4.6	49.6 ± 3.5	38.2 ± 3.4	31.8 ± 3.3
			skupina I		
I205A	DF	35.6 ± 1.9**	11.3 ± 2.2**	4.4 ± 2.6**	4.6 ± 1.0**
T210A	DF	59.2 ± 6.9	27.2 ± 3.2**	23.9 ± 3.2**	8.8 ± 2.3**
L214A	DF	21.4 ± 1.7**	7.9± 2.0**	5.9 ± 0.5**	6.5 ± 1.5**
P290A	LF	50.7 ± 3.7	37.0 ± 11.0	16.9 ± 3.2**	17.8 ± 2.4**
G291A	LF	36.9 ± 8.8**	31.6 ± 6.1*	53.0 ± 4.0**	2.8 ± 0.5**
Y292A	LF	49.8 ± 8.6	42.3 ± 7.0	28.9 ± 8.2	16.2 ± 4.4**
			skupina II		
L206A	DF	68.3 ± 6.5	39.6 ± 8.4	33.7 ± 8.0	27.5 ± 2.5
N208A	DF	60.0 ± 11.2	42.2 ± 5.2	33.4 ± 5.4	28.5 ± 2.3
D280A	LF	56.3 ± 7.8	55.7 ± 3.8	25.4 ± 1.5	33.1 ± 6.0
T281A	LF	69.6 ± 5.1	50.2 ± 5.9	26.7 ± 3.9	28.2 ± 5.5
R282A	LF	55.1 ± 12.9	45.5 ± 5.2	25.7 ± 3.7	27.3 ± 7.9
H286A	LF	67.9 ± 1.2	39.8 ± 6.2	25.6 ± 4.0	30.0 ± 6.8
			skupina III		
S212A	DF	65.1 ± 19.7	61.7 ± 3.9	47.5 ± 5.2	19.2 ± 6.2
Y213A	DF	63.8 ± 16.4	37.1 ± 5.5	27.3 ± 5.5	31.3 ± 6.7
T211A	DF	79.3 ± 6.7	61.8 ± 6.1	23.4 ± 4.7*	39.1 ± 7.2
L284A	LF	69.0 ± 3.0	32.4 ± 8.2	20.6 ± 0.2**	22.2 ± 3.9

Mutace na pozici 210 a 291 ale výrazně ovlivnily i pořadí agonistů: u T210A přeskočilo BzATP účinnějšího agonistu ATPγS (ATP > 2-MeSATP (59%) > BzATP (24%) > ATPγS (17%) > α,β- meATP (9%)). Výměna glycinu na pozici 291 za alanin pak vedla k úplně novému profilu agonistů: ATP > BzATP (53%) > 2-MeSATP (37%) > ATPγS (32%) > α,β-meATP (3%), kde navíc byla odpověď na podání α,β-meATP silně utlumená. Tato data ukázala možné ovlivnění formování ATP-vazebné kapsy skrze variabilní řetězce LF a DF.

Ve *skupině II* jsou soustředěny mutace, u kterých jsme zjistili změny v EC_{50} a/nebo τ_{off}, ale odpovědi ortosterických agonistů v poměru k ATP u nich nebyly změněny (L206A, N208A, D280A, T281A, R282A, H286A). Změny v odpovědi na ATP, ale zachování veškerých poměrů dalších agonistů vůči ATP, ukazují na možnost ovlivnění předávání informace skrze protein. Kontrolní *skupina III,* tj. skupina mutací, které neměly změněnu účinnost ani velikost odpovědi na ATP, nevykazovala ani změny v odpovědích na analogické agonisty. Drobnou výjimkou je nižší účinnost BzATP u mutací T211A a L284A, u kterých jsme zachytili s nižší významností ($p < 0,05$) prodlouženou časovou konstantu deaktivace.

Na základě krystalu zfP2X4 receptoru o rozlišení 2,8-3,2 Å (Kawate a kol., 2009; Hattori a Gouaux, 2012) jsme vytvořili homologní model potkaní P2X4 podjednotky. Tyto dvě formy P2X4R mají podobnost sekvence AMK 61%. Rozlišení a podobnost obou forem umožňují vytvoření poměrně přesného modelu s nízkým počtem chyb. Obrázek 7 ukazuje data uvedená v Tabulce 1 z pohledu na strukturu rP2X4R. Zelené glóby zobrazující pozici nativních residuí ze *skupiny I*, jejichž mutace měly změněnu citlivost na ATP i odpovědi ortosterických agonistů, jsou soustředěny v blízkosti navázaného ATP, podobně jako ATP-vazebné reziduum N293. Níže, v dolní části obou zkoumaných řetězců, jsou pak seskupeny AMK ze *skupiny II*, jejichž mutace nijak nezměnila procentuální odpověď alternativních agonistů, ačkoli změnila charakteristiky ve vztahu k ATP. Pohled zezadu ukazuje šedými glóby polohu R203 a N204, jejich alaninové mutace byly téměř nefunkční.



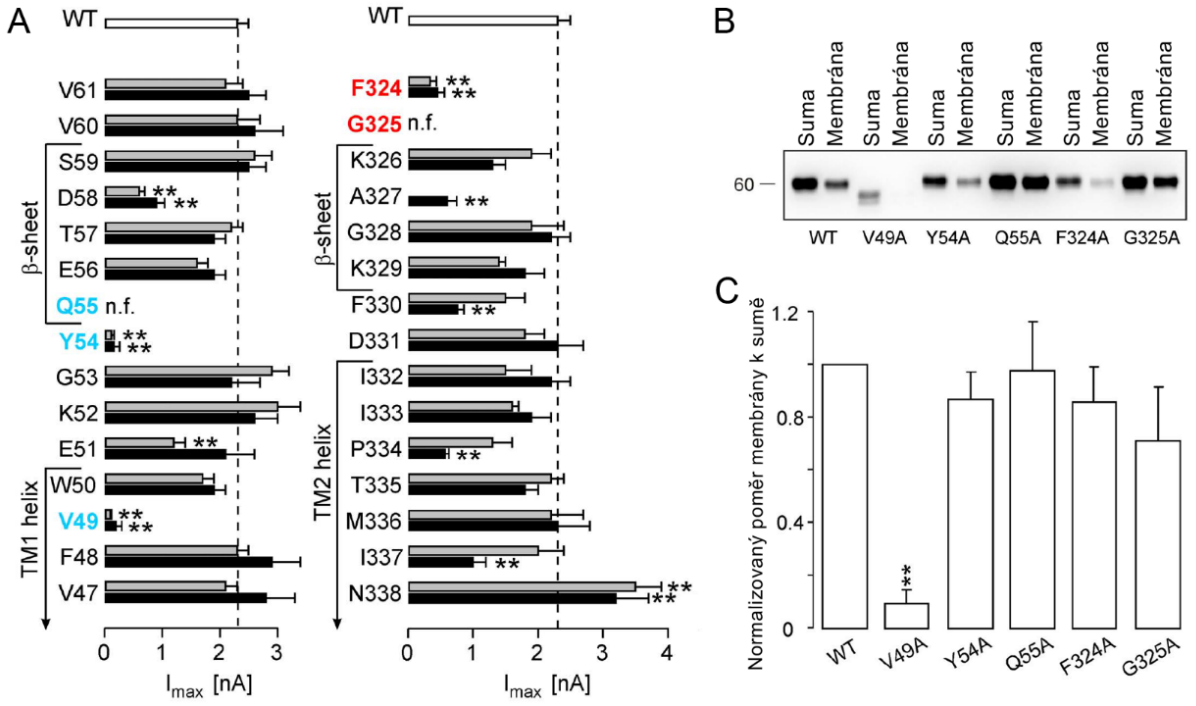
Obrázek 7: Struktura LF a DF ve světle dat z měření ortosterických agonistů.

Čelní a zadní pohled (otočeno o 180°, průhlednost sekundárních struktur zvýšena na 80%) na styčnou plochu mezi levou a hřbetní ploutví, která formuje část ATP-vazebného místa. ATP je zobrazeno skeletovým modelem, barevnost dle prvků. Kalotové modely ukazují jednotlivé pozice AMK zasažených mutací – zeleně jsou označeny residua *skupiny I*, červeně pak *skupina II*. Šedé sféry ukazují pozice AMK, jejichž záměna za alanin měla největší dopad na citlivost a účinnost ATP (R203, N204 a N293).

4.2. Identifikace kritických AMK ve struktuře extracelulárního vestibulu

Důležitou strukturou, na jejíž funkci závisí vstup iontů a jejich usměrněný tok do otevřeného iontového kanálu receptoru po navázání agonisty, je extracelulární vestibul. Oblast V47-V61 (horní část TM1 a celý řetězec nad TM1) a F324-N338 (horní část TM2 a celý řetězec nad TM2) jsme zkoumali pomocí alaninové a cysteinové skenovací mutageneze s následným využitím pozitivního alosterického účinku ivermektinu při testování nefunkčních či málo funkčních mutací. Pokud bylo možné u mutace definovat EC_{50}, nebyla tato hodnota nijak významně odchýlena od hodnoty pro WT a to jak u alaninových, tak u cysteinových mutací. Proto jsme mohli funkci mutantních receptorů dobře definovat skrze amplitudy maximálního proudu (Obr. 8A).

V extracelulárním vestibulu jsme nalezli 11 AMK (D58, Q55, Y54, E51, V49, F324, G325, A327, F330, P334 a I337), jejichž alaninová a/nebo cysteinová mutace se projevovala signifikantně sníženými maximálními proudy. V šesti z těchto případů (D58, E51, A327, F330, P334 a I337) jsme mohli definovat EC_{50}, ale, jak již bylo uvedeno, nezaznamenali jsme žádný významný posun citlivosti k ATP. U zbylých pěti AMK (Q55, Y54, V49, F324 a G325) jsme otestovali přítomnost jejich alaninových mutací v membráně za použití techniky western blot. Tyto pokusy ukázaly, že mimo V49A byly všechny mutace v membráně přítomny (Obr. 8B, C).



Obrázek 8: Vliv mutací v extracelulárním vestibulu na funkci P2X4R.

A) I_{max} vyvolaná aplikací 100 µM ATP na HEK293T buňky nesoucí P2X4R s alaninovými (šedé sloupce) a cysteinovými (černé sloupce) mutacemi v oblasti V47-V61 a N338-F324. Nefunkční (n.f.) a málo funkční mutace zobrazeny v závislosti na umístění nad TM1 modře a nad TM2 červeně. Sekundární struktura je zobrazena šipkami. Statisticky významné rozdíly mezi mutantními a WT receptory byly testovány použitím ANOVY a jsou vyznačeny ** ($p < 0,01$). **B)** Western blot málo funkčních mutací extracelulárního vestibulu. **C)** Graf poměru výskytu receptoru na povrchu vůči celkovému obsahu v buňce. Normalizováno k WT receptoru.

Pro zjištění, jaké chemické vlastnosti pěti kritických AMK jsou důležité pro funkci nebo expresi receptoru, jsme vytvořili několik dalších mutací a využili možnost modulace P2X4R ivermektinem.

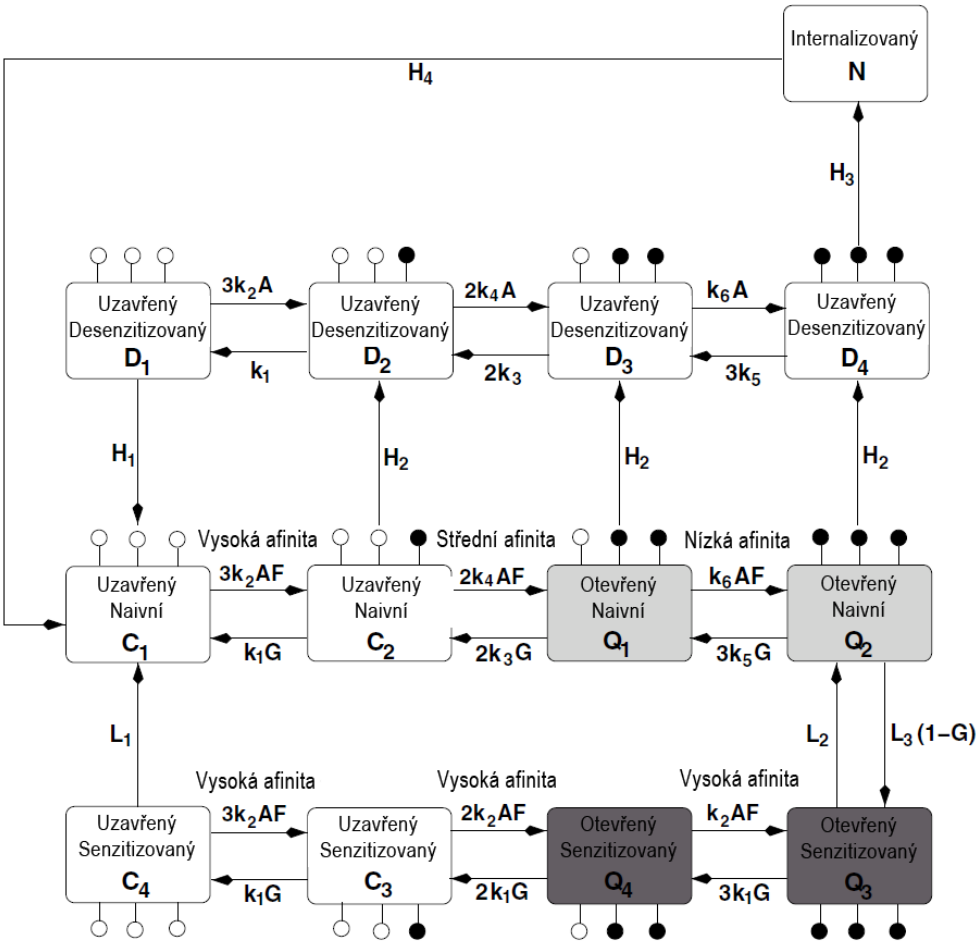
Mutace V49D, V49W i V49L byly v membráně přítomny a jejich odpovědi se blížily divokému typu. Tyto pokusy ukázaly, že velikost a hydrofobicita AMK na pozici 49 je důležitá pro transport receptoru na povrch buňky. U tyrosinu na pozici 54 se ukázal být stěžejním aromatický kruh, neboť mutace Y54W a Y54F byly plně funkční, ale mutace Y54L byla nefunkční. U AMK Q55 se nám dlouho nedařilo najít žádnou funkční mutaci, na aplikaci ATP ani po preinkubaci s ivermektinem neodpovídaly Q55N, Q55T ani Q55K. Částečně návratová byla mutace Q55E. Sebemenší změna ve velikosti a geometrii AMK na pozici 55 tak mění konzervované složení oblasti a vede k nefunkčnosti kanálu.

Ve druhé polovině zkoumaného úseku, v blízkosti druhé TM, jsme obdobně testovali alternativní mutace fenylalaninu 324. Mutace F324L, F324Y a F324W byly navýšitelné ivermektinem na odpovědi srovnatelné s WT, mutace F324W měla i nemodulované odpovědi blízké WT. Sousední AMK (G325) jsme nahradili prolinem a ten navrátil mutovanému receptoru všechny funkce. Obě AMK, F324 i G325, se nacházejí ve zlomu β-listu, který vzniká při otevření kanálu (Hattori a Gouaux, 2012). Z toho důvodu se domníváme, že mutace fenylalaninu 324 může blokovat rozšíření vestibulu.

4.3. KINETICKÉ PARAMETRY CHOVÁNÍ P2X4 RECEPTORU

Ve spolupráci s laboratoří biologického modelování *(Laboratory of Biological Modeling, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)* jsme na základě dat získaných pro rP2X4R-WT vytvořili jeho kinetický model. Objevili jsme u něj schopnost dilatace póru za fyziologických podmínek (tj. v přítomnosti extracelulárního Ca^{2+}) po aplikaci ivermektinu. Zjistili jsme, že v přítomnosti ivermektinu dochází ke změně reverzního potenciálu pro velké organické ionty, konkrétně pro $NMDG^{+}$, kterým jsme nahradili extracelulární Na^{+}. Navržený model P2X4R lze rozdělit na tři části (Obr. 9). Prostřední řádek ukazuje naivní stav receptoru s proměnlivou afinitou k agonistovi, v horním řádku je afinita pro agonistu obdobná, ale receptor je již v desenzitizovaném stavu, kdy na aplikaci agonisty neodpovídá vůbec nebo jen velmi málo. Receptor může kdykoli přejít z nativního stavu do stavu desenzitizovaného. V desenzitizovaném stavu může být receptor také stažen zpět pod membránu (internalizován) a za určitý čas (definovaný rychlostí H_4) může být takovýto receptor navrácen do membrány. Dolní řádek představuje senzitizovaný stav P2X4R, který je vypočten dle dat naměřených při aplikaci ivermektinu v různých protokolech. Z našich měření a kinetického modelování je jasně vidět, že aplikace ivermektinu potlačuje vliv desenzitizace a odkrývá proces dilatace póru iontového kanálu, který je charakteristický i pro jiné P2XR (P2X2 a P2X7).

P2X4R tedy ve fyziologickém roztoku prochází změnami mezi zavřeným → otevřeným → desenzitizovaným → internalizovaným stavem a míra návratu z desenzitizace k uzavřenému kanálu je velmi nízká. Internalizovaný receptor je v cytosolu umístěn v endozomech či lysozomech, aniž by byl degradován, a může být přenesen zpět do membrány (Murrell-Lagnado a Qureshi, 2008). Pokud je ale obsazeno vazebné místo pro ivermektin, prochází kanál stavy zavřenými → otevřenými, kdy otevřený kanál může desenzitizovat či dilatovat se srovnatelnými pravděpodobnostmi, přičemž desenzitizační část probíhá stejně jako bez přítomnosti ivermektinu.



Obrázek 9: Kinetický model P2X4R. Prostřední řádek představuje naivní, agonistou dosud nestimulovaný, receptor. Horní řádek představuje desenzitizovný stav nezávislý na Ca^{2+}, spodní pak senzitizovaný stav. Prázdná kolečka značí volná vazebná místa pro ATP, plná pak již s navázaným agonistou. Stavy Q_i jsou otevřené stavy receptoru, C_i uzavřené a D_i uzavřené desenzitizované stavy. Konstanty H_i a L_i značí rychlost přeměny receptoru, konstanty k_i popisují afinitu vazebného místa k agonistovi.

Dilatace je spojena se senzitizací a receptor je pak schopen opakovaných změn stavů uzavřený → otevřený → dilatovaný → uzavřený, aniž by docházelo k velkým ztrátám receptoru skrze internalizaci. Rychlá internalizace tedy limituje signalizaci skrze P2X4R. Únik ze stavu desenzitizace přes převedení do stavu senzitizace může být farmakologickým nástrojem k navýšení odpovědi P2X4R. U mutací, které nemají internalizující vlastnosti, je tento efekt ivermektinu vyřazen (Toulme a kol., 2006).

5. ZÁVĚR

P2X4R hraje roli v neuropatické bolesti, imunitních reakcích, při poranění mozku i ve správné funkci srdce a oběhového systému. Abychom mohli snáze najít potenciální terapeutické látky s využitím co nejnižšího počtu pokusných zvířat, potřebujeme vědět co nejpřesněji, jak receptor funguje. Dokud to nebudeme vědět dostatečně přesně, budou pokusy probíhat do jisté míry naslepo. Budeme-li mít opravdu velké množství přesných informací o kinetice a dynamice receptoru, můžeme část práce svěřit počítačům (*in silico*) a jejich výsledky ověřovat, čímž se proces značně zrychlí. Kromě času je tu i finanční a etická úspora.

Pomocí molekulárně biologických a elektrofyziologických technik bylo v této práci řešeno několik otázek strukturně-funkčních vztahů u rP2X4R a výsledky můžeme shrnout do následujících bodů:

1. Všechny vytvořené alaninové mutace (LF: D280A-N293A; DF: R203A-L214A) byly exprimovány v membráně a správně složeny. Oblast styčné plochy mezi LF a DF má důležitou roli ve funkci P2X4R:
    a. Její horní část, zastoupená Y292, G291, P290, L214, T210 a I205, je důležitá pro přesné formování ATP-vazebné kapsy, zámku pro klíč tvaru ATP.
    b. Dolní část tvořená H286, R282, T281, D280, I205, L206, N208 pak má za úkol předávání informace o navázání ATP skrze protein receptoru, výsledkem čehož je reakce brány v transmembránové oblasti na přijatou informaci. Arg203 a Asn204 mají pravděpodobně za úkol informaci z obou těchto řetězců integrovat a předávat dále.
    c. Aminokyselinové zbytky v LF mají navíc roli i v desenzitizaci, jsou odpovědné za transpozici proteinu ze stavu otevřeného do stavu desenzitizovaného.
2. V extracelulárním vestibulu jsme identifikovali další 4 AMK (Y54, Q55, F324 a G325), které jsou důležité pro správnou strukturu vestibulu po navázání ATP a funkci receptoru. Aminokyselina V49 je důležitá pro transport receptoru do membrány.
3. Přispěli jsme k vypracování kinetického modelu P2X4R, ve kterém desenzitizovaný stav následně přechází z velké části do internalizace, již lze zvrátit převedením receptoru do stavu senzitizovaného. Tato senzitizace může být potenciálně farmakologicky využitelná, protože receptor pak stále signalizuje a nepřicházíme o množství signálu kvůli desenzitizaci a internalizaci.

Přestože známe krystalovou strukturu zfP2X4R v uzavřeném a ATP-vázajícím stavu, nemáme žádné indicie, který z otevřených stavů (naivní, senzitizovaný, desenzitizovaný) to je. Stále zůstává mnoho bílých míst a stále nevíme, jakými konformačními změnami dochází k převodu informace receptorem. Další studie vztahu mezi strukturou a funkcí důležitých oblastí P2X4R by mohly přispět k detailnějšímu pochopení těchto mechanismů.

6. POUŽITÁ LITERATURA

Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P. and Stojilkovic, S. S. (2011). "Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels." Pharmacological reviews **63**(3): 641-683.

Du, J., Dong, H. and Zhou, H. X. (2012). "Gating mechanism of a P2X4 receptor developed from normal mode analysis and molecular dynamics simulations." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(11): 4140-4145.

Evans, R. J. (1996). "Single channel properties of ATP-gated cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in Chinese hamster ovary cells." Neuroscience letters **212**(3): 212-214.

Hattori, M. and Gouaux, E. (2012). "Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors." Nature **485**(7397): 207-212.

Huang, L. D., Fan, Y. Z., Tian, Y., Yang, Y., Liu, Y., Wang, J., Zhao, W. S., Zhou, W. C., Cheng, X. Y., Cao, P., Lu, X. Y. and Yu, Y. (2014). "Inherent dynamics of head domain correlates with ATP-recognition of P2X4 receptors: insights gained from molecular simulations." PloS one **9**(5): e97528.

Chataigneau, T., Lemoine, D. and Grutter, T. (2013). "Exploring the ATP-binding site of P2X receptors." Frontiers in cellular neuroscience **7**: 273.

Jelinkova, I., Yan, Z., Liang, Z., Moonat, S., Teisinger, J., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (2006). "Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation." Biochemical and biophysical research communications **349**(2): 619-625.

Jiang, R., Lemoine, D., Martz, A., Taly, A., Gonin, S., Prado de Carvalho, L., Specht, A. and Grutter, T. (2011). "Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(22): 9066-9071.

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**(7255): 592-598.

Khakh, B. S., Bao, X. R., Labarca, C. and Lester, H. A. (1999a). "Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds." Nature neuroscience **2**(4): 322-330.

Khakh, B. S., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V., Labarca, C. and Lester, H. A. (1999b). "Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **19**(17): 7289-7299.

Murrell-Lagnado, R. D. and Qureshi, O. S. (2008). "Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors (Review)." Molecular membrane biology **25**(4): 321-331.

North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiological reviews **82**(4): 1013-1067.

Priel, A. and Silberberg, S. D. (2004). "Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels." The Journal of general physiology **123**(3): 281-293.

Silberberg, S. D., Li, M. and Swartz, K. J. (2007). "Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels." Neuron **54**(2): 263-274.

Toulme, E., Soto, F., Garret, M. and Boue-Grabot, E. (2006). "Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin." Molecular pharmacology **69**(2): 576-587.

Valente, M., Watterson, S. J., Parker, M. D., Ford, R. C. and Young, M. T. (2011). "Expression, purification, electron microscopy, N-glycosylation mutagenesis and molecular modeling of human P2X4 and Dictyostelium discoideum P2XA." Biochimica et biophysica acta **1808**(12): 2859-2866.

Vavra, 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.

Vendula Tvrdoňová

Curriculum vitae

Osobní údaje

narozena	27. 02. 1986 ve Valašském Meziříčí
e-mail, telefon	tvrdonov@biomed.cas.cz, +420 608 227 000

Vzdělání

2010 - dodnes	**Karlova univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, doktorské studium**
obor	Fyziologie živočichů
dizertační práce	Úloha variabilních řetězců na rozhraní podjednotek ve formování ATP-vazebné kapsy a funkci P2X4 receptoru
školitel	RNDr. Hana Zemkova, CSc.
2008 -2010	**Karlova univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, navazující magisterské studium**
obor	Klinická a toxikologická analýza
Diplomová práce	Úloha deseti ektodoménových cysteinových zbytků ve funkci P2X4 receptoru stimulovaného adenosin-5´-trifosfátem
školitel	RNDr. Hana Zemková, CSc.
2005 - 2008	**Karlova univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, bakalářské studium**
obor	Klinická a toxikologická analýza
Bakalářská práce	Mezibuněčná a vnitrobuněčná úloha adenosin-5´-trifosfátu
školitel	RNDr. Hana Zemková, CSc.

Výzkum

2008 - dodnes	**Strukturně funkční vztahy v purinergních P2X receptorech**

Publikace

2014	**Plos ONE**
IF = 3,534	Tvrdonova V., Rokic M. B., Stojilkovic S. S., and Zemkova H. (2014). "Identification of functionally important residues of the rat P2X4 receptor by alanine scanning mutagenesis of the dorsal fin and left flipper domains." PLoS One, in print
2014	**Pflügers Archive**
IF = 3,073	Zemkova H., Khadra A., Rokic M. B., Tvrdonova V., Sherman A. and Stojilkovic S. S. (2014). "Allosteric regulation of the P2X4 receptor channel pore dilation." Pflugers Arch, in print
2014	**Physiological research**
IF = 1,487	Zemkova H., Tvrdonova V., Bhattacharya A. and Jindrichova M. (2014). "Allosteric modulation of ligand gated ion channels by ivermectin." Physiol Res 63 Suppl 1: S215-224

2013 **Plos ONE**

Rokic M. B., Stojilkovic S. S., Vavra V., Kuzyk P., Tvrdonova V. and Zemkova H. (2013). "Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor." PLoS One 8(3): e59411

IF = 3,730

2011 **Biochemistry**

Petrenko N, Khafizov K, Tvrdonova V, Skorinkin A, Giniatullin R. (2011): Role of the Ectodomain Serine 275 in Shaping the Binding Pocket of the ATP-Gated P2X3 Receptor. Biochemistry 50(39):8427-36

IF = 3,226

2010 **Physiological research**

Rokic M. B., Tvrdonova V., Vavra V., Jindrichova M., Obsil T., Stojilkovic S. S., Zemkova H. (2010): Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating. Physiological Research 59(6): p. 927-35.

IF = 1,853

Konference

23. – 27. 07. 2014 **Purines - Bonn**

poster Identification of amino acid residues in the inter-subunit interface that contribute to gating and agonist specificity of the P2X4 receptor

11. – 14. 09. 2013 **FENS Featured regional meeting - Prague**

06. - 11. 07. 2013 **Federation of European Biochemical Societies Congress – Petrohrad**

poster Influence of residues in low-conserved region near the ATP-binding site of P2X4 receptor on channel

01. - 05. 08. 2011 **International congess of amino acids, peptides and proteins - Peking**

poster Role of a low-conserved areas of extracellular vestibule in function of purinergic $P2X_4$ receptor

03. - 07. 07. 2010 **7. Forum of european neuroscience - Amsterodam**

poster Conserved cysteine residues in the ectodomain of the rat $P2X_4$ receptor are involved in agonist binding and channel gating

Stáže

09-2012-10/2012 **The Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institute of Healt, Bethesda, Maryland, USA**

Section on Cellular Signaling, Program in Developmental Neuroscience

Technické a počítačové dovednosti

ovládané techniky péče o buněčné linie, molekulárně biologické metody, imunocytochemie, elektrofyziologie (patch clamp), mikroskopické metody, western-blotting,

mol. modely PyMol, SwissPdbViewer

počítačové dovednosti statistika a zpracování dat (MS Excel, SigmaPlot, NCSS, Origin, Clampfit); grafické editory (Adobe Photoshop, ImageReady), MS Word, MS PowerPoint

Reference

RNDr. Hana Zemková, CSc.

Fyziologický ústav Akademie věd ČR, oddělení Buněčné a molekulární neuroendokrinologie

zemkova@biomed.cas.cz

SEZNAM PUBLIKACÍ

I. Publikace *in extenso,* které jsou podkladem disertace

Tvrdonova V., Rokic, M. B., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (**2014**). "Identification of functionally important residues of the rat P2X4 receptor by alanine scanning mutagenesis of the dorsal fin and left flipper domains." PLoS One, *in print*; **IF = 3,534**

Rokic, M. B., Stojilkovic, S. S., Vavra, V., Kuzyk, P., Tvrdonova, V. and Zemkova, H. (**2013**). "Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor." PLoS One **8**(3): e59411.; **IF = 3,730**

Zemkova, H., Khadra, A., Rokic, M. B., Tvrdonova, V., Sherman, A. and Stojilkovic, S. S. (**2014**). "Allosteric regulation of the P2X4 receptor channel pore dilation." Pflugers Arch. *in print*; **IF = 3,073**

II. Další publikace

Rokic, M. B., Tvrdonova, V., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H. (**2010**). "Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating." Physiol Res 59(6): 927-935.; **IF = 1,853**

Petrenko, N., Khafizov, K., Tvrdonova, V., Skorinkin, A. and Giniatullin, R. (**2011**). "Role of the ectodomain serine 275 in shaping the binding pocket of the ATP-gated P2X3 receptor." Biochemistry **50**(39): 8427-8436.; **IF = 3,226**

Zemkova, H., Tvrdonova, V., Bhattacharya, A. and Jindrichova, M. (2014). "Allosteric modulation of ligand gated ion channels by ivermectin." Physiol Res **63 Suppl 1**: S215-224.; **IF = 1,487**