

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra buněčné biologie



**Purinerní P2X receptory a jiné membránové receptory v
buňkách předního laloku hypofýzy**

**Purinergic P2X receptors and other membrane receptors in
anterior pituitary cells**

Ilona Kalasová

bakalářská práce

2008

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce RNDr. Haně Zemkové, CSc. z Laboratoře buněčné a molekulární neuroendokrinologie Fyziologického ústavu AV ČR, za pomoc a cenné rady, které mi velmi pomohly.

Abstrakt

Hypofýza je hlavní endokrinní žlázou obratlovců. Ontogeneticky vzniká z neuroektodermu přední části neurální lišty. Přední lalok hypofýzy, adenohypofýza, je složena z pěti druhů sekretujících buněk (somatotropů, gonádotropů, laktotropů, kortikotropů a thyreotropů) a podpůrných endoteliálních buněk. Sekrece adenohypofyzárních hormonů je regulována pomocí hypothalamických faktorů uvolňovaných do hypofyzárního portálního oběhu. V membránách hypofyzárních buněk se nacházejí receptory nejen pro tyto hypothalamické neuropeptidy, ale i receptory pro parakrinní a autokrinní přenašeče, které vznikají na úrovni hypofýzy samotné, a jakými jsou například γ -aminomáselná kyselina (GABA) nebo adenosin-5'-trifosfát (ATP). Purinergní mezibuněčná signalizace, kterou představuje uvolnění ATP z buněk a jeho extracelulární působení, byla prokázána teprve nedávno - v polovině 90. let 20. století - naklonováním prvních purinergních receptorů. Ionotropní purinergní receptory (P2X) se vyskytují na povrchu mnoha typů buněk, živočišných i rostlinných, geny pro tyto receptory byly identifikovány u mnoha obratlovců i u bezobratlých. U savců bylo doposud naklonováno 7 různých podjednotek P2X receptorů (P2X₁₋₇) tvořících homo- nebo heterotrimery. Jednu podjednotku P2X receptoru tvoří dvě transmembránové domény, velká extracelulární smyčka a intracelulární N- a C-konce. Předpokládá se, že extracelulární ATP a P2X receptory hrají důležitou roli v mezibuněčné signalizaci hypofyzárních buněk a v regulaci sekrece hormonů. Navzdory intenzivnímu výzkumu však jejich přesný význam v hypofýze nebyl dosud objasněn.

Klíčová slova: hypofýza, purinergní signalizace, ATP, P2X receptory

Abstract

Pituitary lobe is a principal endocrine gland in all vertebrates. During ontogenesis, pituitary lobe originates from an anterior part of neural ridge. Anterior pituitary lobe, adenohypophysis, is composed of five types of secretory cells (somatotropes, gonadotropes, lactotropes, corticotropes and thyrotropes) and one type of supporting endothelial cells. Secretion of adenohypophyseal hormones is under control of hypothalamic releasing factors. Hypothalamic neuropeptides and neurotransmitters are transported to their receptors in the anterior pituitary lobe via hypophyseal portal system. In addition, there are also receptors for paracrine and autocrine transmitters released within pituitary, such as γ -aminobutyric acid (GABA) or adenosin-5'-triphosphate (ATP). Purinergic signaling, which represents release of ATP and its extracellular action, has been approved only recently – in 90's of 20th century - by cloning of the first purinergic receptors. Ionotropic purinergic receptors (P2X) are expressed in the plasma membrane of animal as well as plant cells. They have been identified in numerous vertebrates and also in invertebrate species. So far, seven subunits of mammalian P2X receptors, termed P2X₁₋₇, have been cloned. These subunits form receptor as homo- or heterotrimers. One subunit is composed of two helical transmembrane domains, a large extracellular loop and intracellular N- and C-termini. It is supposed that extracellular ATP and purinergic P2X receptors play an important role in signalling between pituitary cells and are involved in regulation of hormone secretion. However, despite of intensive investigations, detailed knowledge about the role of extracellular ATP and functioning of purinergic P2X receptors in anterior pituitary gland is still lacking.

Keywords: Pituitary gland, purinergic signalisation, ATP, P2X receptors

Obsah:

Seznam zkratk	6
Seznam třípísmenných zkratk aminokyselin	7
1 Úvod	8
2 Hypofýza, stavba, ontogeneze, fylogeneze a receptory adenohipofýzy	9
2.1 Ontogeneze a fylogeneze hypofýzy	11
2.2 Metabotropní receptory v buňkách adenohipofýzy	12
2.2.1 GnRH receptor	12
2.2.2 TRH receptor.....	13
2.3 Iontové kanály adenohipofýzy	13
2.3.1 Sodíkový napětím ovládaný kanál	14
2.3.2 Draselné napětím ovládané kanály.....	14
2.3.3 Vápníkové napětím ovládané kanály	15
2.4 Ligandem ovládané iontové kanály - ionotropní receptory v adenohipofýze	15
2.4.1 GABA _A receptory	16
3 Purinergní P2X receptory	17
3.1 Stavba purinergních P2X receptorů	17
3.2 Vazebné místo pro extracelulární ATP	19
3.3 Desensitizace	20
3.4 Dilatace póru iontového kanálu.....	22
3.5 Struktura transmembránových domén	23
3.6 Výskyt a charakterizace jednotlivých typů P2X receptorů	23
3.6.1 P2X ₁ receptor	24
3.6.2 P2X ₂ receptor.....	24
3.6.3 P2X ₃ receptor.....	25
3.6.4 P2X ₄ receptor	26
3.6.5 P2X ₅ receptor	26
3.6.6 P2X ₆ receptor	27
3.6.7 P2X ₇ receptor.....	27
4 Fyziologický význam purinergní signalizace v hypofýze	28
5 Závěr	29
Seznam použité literatury	30

Seznam zkratk

2-MeSATP	2-methylthio-ATP
5-HT3	5-hydroxytryptamine (serotonin)
ACTH	adrenokortikotropní hormon (adrenocorticotropic hormone)
ADP	adenosin-5'-difosfát
AMP	adenosin-5'-monofosfát
Ap5A	diadenosinpentaosfát
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BzATP	2',3'-O-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP
CRH	kortikotropin uvolňující hormon (corticotropin-releasing hormone)
DdP2X	P2X receptor Dictyostelia Discoidia
DR	K ⁺ kanály navracející membránový potenciál (delayed rectifier K ⁺ channels)
EC₅₀	koncentrace účinné látky, při níž je dosaženo poloviny maximálního účinku
E-NTPDasa	ektonukleotidáza
FSH	folikulostimulující hormon (follicle stimulating hormone)
GABA	γ-aminomáselná kyselina (γ-aminobutyric acid)
GH	růstový hormon (growth hormone)
GHRH	růstový hormon uvolňující hormon (growth hormone-releasing hormone)
GnRH	gonadotropiny uvolňující hormon (gonadotropin-releasing hormone)
HVA	high-voltage activated Ca ²⁺ channels
IVM	ivermektin
LH	luteinizační hormon (luteinizing hormone)
LhRH	luteinizační hormon uvolňující hormon (také GnRH)
LVA	low-voltage activated Ca ²⁺ channels
NMDG	N-methyl-D-glukosamin
P2XR	ionotropní purinergní receptor
P2YR	metabotropní purinergní receptor
PPADS	pyridoxal-fosfát-6-azofenyl-2,4-disulfonová kyselina
PRL	prolaktin (prolactin)
STH	somatotropní hormon (somatotropic hormone)
TM	transmembránová doména
TNP-ATP	2,3-O-(2,4,6-trinitrofenyl)-ATP
TRH	thyreotropin uvolňující hormon (thyreotropin-releasing hormone)
TSH	thyreostimulující hormon (thyroid stimulating hormone)
TTX	tetrodotoxin
αβmeATP	α,β-methylene ATP
βγmeATP	β,γ-methylene ATP

Seznam třípísmenných zkratek aminokyselin

Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparagová kyselina
Cys	cystein
Gln	glutamin
Glu	glutamová kyselina
Gly	glycin
His	histidin
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Lys	lysin
Met	methionin
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
Ser	serin
Thr	threonin
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin

1 Úvod

Mnoho fyziologických funkcí, například reprodukce, příjem potravy, energetický metabolismus, spánek, cirkadiální a sezónní rytmy a stresové reakce, je výsledkem hormonální rovnováhy kontrolované jak vnějšími tak vnitřními podněty na úrovni hypothalamu. Neurony v této malé části mozku produkují mnoho peptidů a neuropřenašečů, které řídí aktivitu jiných neuroendokrinních orgánů včetně hypofýzy, která je hlavní žlázou s vnitřní sekrecí. Adenohypofýza, přední lalok hypofýzy, je složena z pěti druhů sekretujících buněk a z buněk podpůrných, endoteliálních. Obsahuje receptory pro hypothalamické neuropeptidy a neuropřenašeče, které jsou sem přiváděny portálním oběhem. Hypofyzární buňky po stimulaci uvolňují kromě hormonů také signální molekuly, které působí v mezibuněčné signalizaci hypofýzy jako parakrinní nebo autokrinní přenašeče. Takovými molekulami jsou například kyselina γ -aminomáselná (GABA) a adenosin-5'-trifosfát (ATP), které aktivují GABA receptory a purinergní receptory na povrchu hypofyzárních buněk.

Purinergní mezibuněčná signalizace byla obecně prokázána teprve nedávno, v polovině 90. let 20. století. Podle způsobu funkce rozlišujeme dva typy purinergních receptorů – metabotropní P2Y receptory spřažené s G-proteiny a ionotropní P2X receptory, které vytvářejí v membráně vodivý pór. Purinergní P2X receptory se vyskytují na povrchu mnoha typů buněk, u rostlin i živočichů, u organismů na různém stupni vývoje, od jednobuněčných živočichů po člověka. U obratlovců hrají purinergní receptory roli v nervovém, kardiovaskulárním, respiračním, imunitním, urogenitálním, nervosvalovém a gastrointestinálním systému, a také ve funkci specializovaných smyslů. Bylo prokázáno, že jsou důležité ve vnímání bolesti, při buněčné apoptóze, ve vývoji organismu, v poslední době jsou také cílem farmak proti různým nemocem. Je známo, že extracelulární ATP a jeho metabolity hrají fyziologickou roli v mezibuněčné signalizaci hypofyzárních buněk a regulují sekreci hormonů. Jejich přesný význam v hypofýze nebyl dosud objasněn.

Doposud bylo naklonováno 7 různých typů savčích P2X receptorů, označovaných jako P2X₁₋₇ receptory. Jsou to jednoduché iontové kanály složené ze tří podjednotek, z nichž každá má dvě transmembránové domény. O jejich struktuře a mechanismu otevírání vodivého póru působením extracelulárního ATP je toho známo poměrně málo. Je to dáno tím, že neexistuje homologní receptor, který by měl objasněnu krystalovou strukturu. Dalším důvodem je dilatace póru iontového kanálu některých P2X receptorů anebo poměrně rychlá desensitizace a jen velmi pomalá resensitizace, což znesnadňuje analýzu funkčních vlastností

P2X receptorů. V hypofýze byly objeveny všechny pojednotky P2X receptorů, které se podílejí na specifických účincích extracelulárního ATP. Tyto účinky však byly dosud popsány pouze v podmínkách *in vitro*.

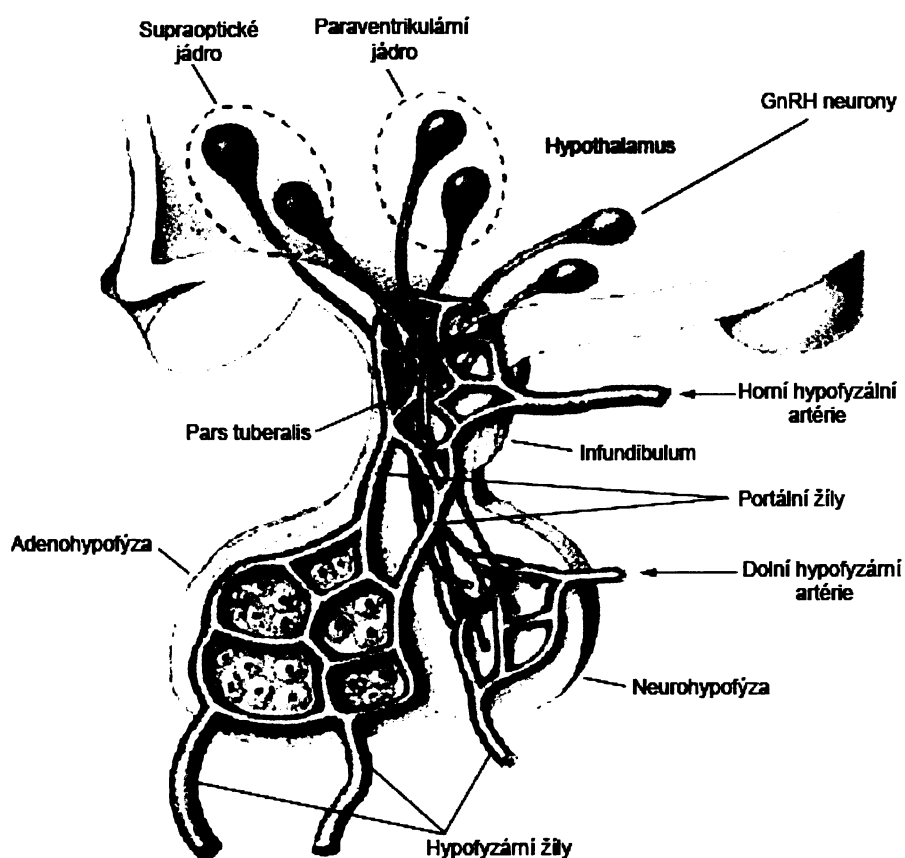
V této bakalářské práci bych se chtěla zaměřit na iontové kanály a ligandem aktivované receptory, především purinergní P2X receptory, které se vyskytují v plazmatické membráně buněk adenohipofýzy. V první části bych chtěla shrnout známé poznatky o ontogenetickém a fylogenetickém vývoji hypofýzy a krátce se budu věnovat popisu metabotropních receptorů (GnRH receptor a TRH receptor), napětím řízených iontových kanálů (Na^+ , K^+ a Ca^{2+} kanály) a ligandem aktivovaných kanálů (GABA_A receptor). V druhé části práce se budu věnovat charakterizaci sedmi různých typů P2X receptorů, které také patří mezi ligandem aktivované kanály, a pokusím se popsat rozdíly v jejich funkčních a farmakologických vlastnostech, i v jejich molekulární struktuře. V poslední kapitole se pokusím shrnout nejnovější poznatky o výskytu P2X receptorů a fyziologické úloze extracelulárního ATP v předním laloku hypofýzy.

2 Hypofýza, stavba, ontogeneze, fylogeneze a receptory adenohipofýzy

Hypofýza, podvěsek mozkový, je hlavní žlázou s vnitřní sekrecí u obratlovců. Ovlivňuje a řídí všechny ostatní endokrinní žlázy v těle. Je uložena na bázi mozku, v tureckém sedle kostí klínové. Funkční spojení s hypothalamem je zajišťováno pomocí infundibula, neboli hypofyzárního stonku. Existuje několik neuronálních spojení mezi hypothalamem a zadním lalokem hypofýzy, s předním lalokem je hypothalamus spojen cévně. Neurohypofýza, zadní lalok hypofýzy, je tvořena z velké části *pars nervosa*, dále také *infundibulem* a *eminentia mediana*, tj. oblastí ventrálního hypothalamu, která je místem vzniku portálních cév hypothalamu. Tato oblast se nachází mimo hematoencefalickou bariéru. Hormony sekretované v neurohypofýze, oxitocin a vazopresin, jsou syntetizovány v paraventriculárním a supraoptickém jádře hypothalamu a axonálním transportem dopravovány do zadního laloku hypofýzy, kde jsou uvolňovány již jako hotové hormony. Adenohipofýza, přední lalok hypofýzy, je rozdělena do tří oblastí: *pars distalis*, tvořící většinu předního laloku, dále *pars intermedia*, ležící mezi předním a zadním lalokem hypofýzy a menší část hypofýzy tvoří *pars tuberalis* (obr.1).

U savců je hypofýza s hypothalamem propojena prostřednictvím hypothalamo-hypofyzárního portálního systému. Tímto cévním systémem jsou do předního laloku dopravovány hypothalamické faktory, které regulují sekreci adenohipofyzárních hormonů. V adenohipofýze se nachází pět typů sekretujících buněk: (i) kortikotropy, stimulované

hypothalamickým kortikotropiny uvolňujícím hormonem (CRH) sekretují adrenokortikotropní hormon (ACTH), (ii) gonadotropy, které po aktivaci hypothalamickým gonadotropiny uvolňujícím hormonem (LhRH, nebo také anglicky GnRH) sekretují folikulostimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH), (iii) somatotropy, které po stimulaci růstové hormony uvolňujícím hormonem (GHRH) sekretují růstový hormon somatotropin (STH, nebo také anglicky GH), (Van Goor, Zivadinovic et al.) laktotropy, které mají spontánní sekreční aktivitu, produkují prolaktin (PRL) a (v) thyreotropy, které po stimulaci hypothalamickým thyreotropin uvolňujícím hormonem (TRH) produkují thyreotropin, thyreustimulující hormon (TSH). Největší zastoupení mají v hypofýze somatotropní buňky (45%), dále pak jsou zastoupeny gonadotropy (20%) a laktotropy (20%), kortikotropy (10%), nejméně je thyreotropních buněk (5%) (Ganong 2002).



Obr. 1: Schéma hypofyzární žlázy a jejího propojení s hypothalamem. Převzato z (Zemkova, Balík et al. 2008).

2.1 Ontogeneze a fylogeneze hypofýzy

Hypofýza je orgán, který se nachází pouze u obratlovců. Původně se mělo za to, že hypofýza vzniká v průběhu ontogenetického vývoje fúzí neuroektodermu a epiteliální tkáně. Epiteliálního původu měl být přední lalok hypofýzy. Podle této představy vznikla vychlípěním tkáně v přední části jícnu Rathkeho výchlípka a z ní se potom vyvinula adenohypofýza. Současné studie však ukazují, že adenohypofýza má původ v přední části neurální lišty, jejíž buňky migrují během ontogeneze ventrálně pod přední mozek. Rathkeho výchlípka je tedy podle současné představy neuroektodermálního původu. Z oblasti neurální lišty, která se nachází posteriorně od budoucí adenohypofýzy, vzniká hypothalamus a infundibulum. Zadní lalok hypofýzy, neurohypofýza, vzniká embryonálně jako vychlípěninna spodiny třetí mozkové komory. Je vytvořena z větší části ze zakončení axonů, které pocházejí z buněčných těl uložených v supraotickém a paraventrikulárním jádře hypotalamu, a procházejí do zadní hypofýzy cestou hypothalamo-hypofyzárního traktu. Většina supraotických vláken končí v samotném zadním laloku, zatímco některé paraventrikulární vlákna končí v oblasti medium eminence.

Hypofýza obratlovců má různou podobu podle stupně fylogenetického vývoje. U *Cyclostomat* je pars distalis, které tvoří většinu adenohypofýzy, odděleno od hypothalamu. Hypothalamické faktory jsou k němu dopravovány pomocí difuze, pravděpodobně uvolňováním do systémového krevního oběhu. Tomu odpovídá i fakt, že jednotlivé typy buněk v pars distalis jsou relativně smíchány. Kdyby zde existovalo přímé nervové spojení mezi pars distalis a hypothalamem, jednotlivé typy buněk by pravděpodobně vytvářely shluky. *Chondrichties* (chrupavčité ryby), fylogeneticky nejstarší třída čelistnatců, se relativně brzy po svém vzniku rozdělily na *Elasmobranchii* (příčnoústé ryby), zahrnující žraloky a rejnoky, a *Holocephali* (chiméry). Spojením pars nervosa a pars intermedia u *Elasmobranchii* vzniklo tzv. neurointermedium. Vyvinul se přímý portální systém spojující pars distalis s hypothalamem. Od pars distalis se oddělil ventrální lalok, který je se zbytkem hypothalamu spojen pouze tenkým stonkem bez přímého vaskulárního a nervového spojení. Ventrální lalok je ovlivňován hypothalamickými faktory uvolňovanými do systémového krevního oběhu. Hypofýza *Holocephali* má podobnou stavbu jako u *Elasmobranchii*. Pouze ventrální lalok, který je u chimér označován jako bukální, se nachází v horní části ústní dutiny a od mozku je oddělen vrstvou chrupavky. Komunikaci mezi bukálním lalokem a hypothalamem opět zajišťuje systémový krevní oběh. Existuje zde však určitý náznak organizace buněk, např. gonádotropy se nacházejí především ve ventrálním resp. bukálním laloku, což by mohlo ukazovat na nervové propojení hypofýzy a hypothalamu. U *Actinopterygii* (paprskoploutví)

portální systém zanikl a vytvořilo se přímé nervové spojení mezi pars distalis a pars nervosa. S tím je spojené oddělení a shlukování jednotlivých typů buněk pars distalis, čímž je zajištěna cílená stimulace jen určitých hypofyzárních buněk. Portální systém u *Sarcopterygii* (nozdratí, zahrnující podtřídy lalokoploutví a dvojdyšní) a čtyřnožců se dále rozvíjel. Ztráta pars intermedia je charakteristická pro ptáky a také některé savce (velryby, sloni). Celkově u savců došlo k regresi pars intermedia a naopak k rozvoji pars nervosa. Významně se u nich také rozvinul portální systém (Lovejoy 2005).

2.2 Metabotropní receptory v buňkách adenohipofýzy

Jako buňky neuronálního původu jsou také hypofyzární buňky elektricky dráždivé, excitabilní, vytvářejí akční potenciály a v jejich plazmatické membráně se vyskytují napětím řízené iontové kanály (viz (Hille 2001)), ionotropní i metabotropní receptory. Mezi nejprozkoumanější metabotropní receptory adenohipofýzy patří GnRH a TRH receptory.

2.2.1 GnRH receptor

Ligandem GnRH receptoru je GnRH, který se váže na tyto receptory v membránách gonadotropních buněk. Receptor pro GnRH patří do superrodiny receptorů spřažených s G-proteiny, čemuž odpovídá i jeho vysoce konzervovaná struktura sedmi transmembránových domén spojených extracelulárními a intracelulárními smyčkami, extracelulární N-konec a intracelulární C-konec.

GnRH receptor savců postrádá, pro G-proteinové receptory charakteristický, dlouhý intracelulární C-konec a jeho extracelulární N-konec je velmi krátký (pouze 35 aminokyselin), je tak jedním z nejmenších zástupců této superrodiny. Jestliže je ligandem G-proteinového receptoru malý peptid, váže se do oblasti transmembránových domén tvořících tzv. hydrofilní kapsu. U lidského GnRH receptoru jsou to konkrétně Lys¹²¹ třetí transmembránové domény a Arg⁹⁸ a Asp¹⁰² N-terminální části druhé transmembránové domény. Při vazbě ligandu se uplatňuje i N-koncová doména receptoru. Obecně, účinek metabotropních receptorů spočívá ve vytvoření druhého posla signálu prostřednictvím aktivovaného G-proteinu. Po dlouhodobé stimulaci agonistou dochází k fosforylaci C-konce kinázami, navázání β -arrestinu, odpojení G-proteinu a následné desenzitizaci a internalizaci receptoru pomocí klatrinem obalených váčků. Receptor může být buď degradován v lysozomu nebo zpětně recyklován. Savčí GnRH receptory však nedesenzitizují a internalizují pomalu, protože postrádají C-koncovou doménu. GnRH receptory aktivují několik signálních drah vazbou různých G-proteinů a především stimulují fosfolipázu C.

Místem interakce receptoru s G-proteiny je druhá a třetí intracelulární smyčka, nejdůležitější je vysoce konzervovaná sekvence Asp¹³⁸-Arg¹³⁹-Tyr¹⁴⁰. U GnRH receptoru je tyrosin v této sekvenci nahrazen serinem.

Za normálních okolností jsou GnRH receptory přítomny pouze v membránách gonádotropních buněk a hypothalamických GnRH neuronů. Výjimkou jsou hlodavci, kteří tyto receptory exprimují ve stejné míře i v gonádách. Současné výsledky však naznačují přítomnost GnRH receptorů i v jiných tkáních, např. specifická jádra CNS, lidská placenta, somatotropní buňky, nádory hypofýzy a pankreatu, nádory prsou, endometria, vaječníků a prostaty. Nejdůležitějším regulátorem množství exprimovaných receptorů je samotný GnRH, dále se při pozitivní regulaci uplatňuje estradiol. Negativní efekt na počet GnRH receptorů vykazuje progesteron (Rispoli, Nett 2005).

2.2.2 TRH receptor

Ligandem tohoto receptoru je TRH, tripeptid uvolňovaný z hypothalamu. V adenohypofýze se TRH receptory vyskytují na povrchu thyreotropních buněk. Jako GnRH receptor, patří i receptor pro TRH do superrodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Po navázání ligandu na TRH receptor se aktivuje G-protein a tím je spuštěna signální dráha, zahrnující také fosfolipázu C nebo mitogeny aktivovanou protein kinázu, končící syntézou a uvolněním příslušného hormonu. Rozlišujeme dva typy těchto receptorů – TRH-R1 a TRH-R2. V hypofýze se pravděpodobně nachází pouze první typ TRH receptoru.

Předpokládá se, že pro ligand existují na receptoru dvě vazebná místa. TRH se nejprve váže s nižší afinitou na povrchové vazebné místo tvořené extracelulárními smyčkami, klíčová rezidua myšičího TRH se nacházejí ve druhé (Tyr¹⁸¹, Lys¹⁸², Arg¹⁸⁵, Asn¹⁸⁶, Tyr¹⁸⁷) a třetí (Asn²⁸⁹, Ser²⁹⁰, Phe²⁹⁶, Glu²⁹⁸) extracelulární smyčce, nejdůležitější je pravděpodobně stabilizační účinek vodíkových vazeb Tyr¹⁸¹. Poté se TRH přesouvá do vnitřní vazebné kapsy tvořené rezidui v horní polovině transmembránových domén (TM), pro myšičí TRH receptor jsou nejdůležitějšími rezidui Tyr¹⁰⁶ a Asn¹¹⁰ (3.TM), Tyr²⁸² (6.TM) a Arg³⁰⁶ (7.TM). Podobně jako Tyr¹⁸¹ pro povrchové vazebné místo, vytváří Tyr¹⁰⁶ důležité stabilizační vodíkové vazby vnitřního vazebného místa (Engel, Gershengorn 2007).

2.3 Iontové kanály adenohypofýzy

Buňky adenohypofýzy jsou elektricky excitabilní, po stimulaci hypothalamickými neuropeptidy generují akční potenciály. Význam elektrické excitability v hypofýze není

dosud zcela objasněn, předpokládá se, že akční potenciály slouží k doplnění zásob intracelulárního vápníku (Stojilkovic, Zemkova et al. 2005).

2.3.1 Sodíkový napětím ovládaný kanál

Hypofyzární buňky mají vysokou klidovou propustnost membrány pro Na^+ ionty, iontový kanál zodpovědný za tuto propustnost však nebyl dosud identifikován. V předním laloku hypofýzy jsou exprimovány také sodíkové kanály citlivé k tetrodotoxinu (TTX), které se běžně vyskytují v neuronech a v buňkách kosterního svalu, kde jsou zodpovědné za vznik akčních potenciálů. TTX-senzitivní Na^+ kanály v hypofýze však pro vznik akčních potenciálů důležité nejsou a jejich význam zde nebyl dosud objasněn (Stojilkovic, Zemkova et al. 2005). Skládají se z velké α podjednotky obsahující vlastní pór kanálu, napěťový senzor, selektivní filtr, intracelulární místa pro fosforylaci protein kinázou i vazebné místo pro TTX. S ní jsou asociované pomocné β_1 a β_2 podjednotky. Senzorem napětí je 4. transmembránový segment α podjednotky, který je vysoce konzervovaný u všech napěťově ovládaných kanálů a je tvořen opakovaním vždy dvou hydrofobních aminokyselin následovaných aminokyselinou kladně nabitou. Mechanismus inaktivace vysvětluje „hinged lead model“ – skupina hydrofobních aminokyselinových zbytků zablokuje intracelulární konec póru a způsobí tak jeho inaktivaci. Tento kanál je propustný nejen pro Na^+ , ale v menší míře i pro K^+ a jiné jednomocné kationty.

2.3.2 Draselné napětím ovládané kanály

Tyto kanály vykazují velkou strukturní a funkční diverzitu. U savců bylo dosud objeveno přes 100 genů pro různé podjednotky K^+ kanálů. Základní strukturou těchto podjednotek je jádro tvořené dvěma transmembránovými helixy. Napěťově ovládané kanály mají většinou šest transmembránových domén a tvoří homo- i heterotetramery základních podjednotek, které se často spojují ještě s pomocnými β podjednotkami. Draselné kanály se rozlišují podle způsobu aktivace a inaktivace napětím, modulace či koaktivace jinými molekulami, například Ca^{2+} ionty, selektivity vodivého póru, citlivosti k inhibitorům a jiným farmakům. Existuje několik skupin napětím ovládaných K^+ kanálů: Delayed rectifier (DR), kanály navracející zpět napětí na membráně, se dále dělí podle rychlosti jejich aktivace. „Fast“ DR K^+ kanály, které jsou rychle aktivovány, hrají roli ve velmi rychlých akčních potenciálech – jako je tomu např. také v nemyelinizovaných neuronech, motoneuronech a rychlých svalových vláknech. Mechanismus uzavírání „slow“ DR K^+ kanálů je naopak pomalý, tyto kanály neinaktivují a jsou tak částečně otevřené i při klidovém potenciálu

membrány. Do této skupiny patří i tzv. „erg“ kanály přítomné v adenohipofýze. Nejznámější zástupcem, přítomným také v předním laloku hypofýzy, je M-typ K^+ kanálu, dále A-kanály nebo také „fast transient“ K^+ kanály. Tyto se díky jejich rychlé inaktivaci uplatňují při opakovaném vytváření akčních potenciálů. Inaktivují pomocí mechanismu „koule na řetízku“, kdy se N-konce podjednotek váží do intracelulární části póru.

2.3.3 Vápníkové napětím ovládané kanály

Obecně rozlišujeme dva typy Ca^{2+} kanálů podle velikosti depolarizace nutné pro jejich aktivaci – LVA a HVA. Porovnáním sekvencí byly navíc rozděleny do tří podrodin – L, N a T typ Ca^{2+} kanálů. LVA Ca^{2+} kanály („low-voltage activated“), jak jejich název napovídá, jsou aktivovány i slabou depolarizací membrány. Jejich inaktivace je rychlá a kompletní. Označují se také jako T-typ Ca^{2+} kanálu („transient“, přechodný). HVA Ca^{2+} kanály („high-voltage activated“) jsou aktivovány střední nebo silnou membránovou depolarizací. Inaktivují nekompletně, udržují buňky depolarizované delší dobu. Patří sem vápenaté kanály L a N subrodiny. Napětím ovládaný Ca^{2+} kanál (např. L-typ kanál z kosterního svalu) se skládá z 5 podjednotek: jedné velké α_1 podjednotky a čtyř menších pomocných podjednotek označovaných jako α_2 , β , γ , δ . Nejdůležitější α_1 podjednotku tvoří čtyři homologní opakování, každé se šesti transmembránovými segmenty. Ca^{2+} kanál L-typu obsahuje senzor napětí, inaktivační bránu, vlastní pór kanálu a několik fosforylačních míst. V adenohipofýze byly nalezeny T- a L-typy napětím ovládaných Ca^{2+} kanálů. Tyto kanály byly identifikovány u laktotropních, somatotropních i gonadotropních buněk, které vytvářejí Ca^{2+} dependentní akční potenciály. Akční potenciál u laktotropů a somatotropů je relativně dlouhodobý, trvá 1-2s, a vytváří plato. Je to doba dostatečně dlouhá na to, aby vtok Ca^{2+} iontů spustil v buňkách mechanismus exocytózy a sekreci. Naproti tomu u gonadotropů je akční potenciál krátký (10-20 ms) a sekreci nevyvolává. U ostatních typů hypofyzárních buněk Ca^{2+} kanály nebyly dosud funkčně identifikovány.

2.4 Ligandem ovládané iontové kanály - ionotropní receptory v adenohipofýze

Tyto kanály se otevírají po navázání extracelulárního ligandu. Po dlouhodobé stimulaci signální molekulou se vodivost kanálu snižuje a dochází k tzv. desenzitizaci, která je analogií inaktivace napěťově ovládaných iontových kanálů. V excitabilních i neexcitabilních buňkách byly dosud identifikovány tři hlavní rodiny ligandem ovládaných iontových kanálů, které se zásadně liší svojí strukturou: (1) *Acetylcholinové receptory nikotinového typu*. Tyto receptory jsou pentamerní. Každá podjednotka obsahuje čtyři transmembránové segmenty s

extracelulárním N- i C- koncem. Velký N-koncový segment tvoří vazebné místo pro ligand. Vedle acetylcholinového receptoru nikotinového typu sem patří ionotropní receptory pro GABA, serotoninové 5-HT₃ receptory a receptory pro glycin. (2) *Glutamátové receptory*. Jsou to tetramerní receptory. Podjednotku tvoří čtyři transmembránové domény, přičemž druhý segment neprochází celou membránou, vstupuje a vystupuje na intracelulární straně membrány. N-konec je tak extracelulární, zatímco C-konec intracelulární a může být regulován signálními molekulami (např. protein kinázami). (3) *Purinergní P2X receptory*. Tyto ionotropní receptory pro extracelulární ATP tvoří trimery, každá podjednotka obsahuje dva transmembránové úseky, velkou extracelulární smyčku a intracelulární N- i C-konec. Z výše uvedených ligandem aktivovaných iontových kanálů se v adenohipofýze vyskytují dva typy: ionotropní receptory pro GABA (GABA_A receptory) a purinergní P2X receptory. V této kapitole se budu věnovat pouze krátce GABA_A receptoru, více budou popsány purinergní P2X receptory, které budou tématem celé další části práce.

2.4.1 GABA_A receptory

GABA je hlavním inhibičním neurotransmiterem CNS obratlovců. Aktivuje tři typy receptorů – GABA_A, GABA_B a GABA_C. Receptor GABA_B je metabotropním receptorem spráženým s G-proteinem. GABA_A a GABA_C receptory jsou iontové kanály selektivně propustné pro chloridové ionty. GABA_A jsou pentamerní receptory v CNS většinou tvořené dvěma α , dvěma γ a jednou β podjednotkou. Diverzita podjednotek je však veliká a jejich zastoupení v jednotlivých tkáních se liší. Byly naklonovány podjednotky $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 1$ - $\beta 3$, $\gamma 1$ - $\gamma 3$, δ , ϵ , π , $\rho 1$ - $\rho 3$. V buňkách předního laloku hypofýzy jsou pravděpodobně exprimovány všechny typy podjednotek GABA_A receptoru, mRNA podjednotek $\alpha 1$ a $\beta 1$ byla objevena ve všech sekrečních buňkách adenohipofýzy. I když je GABA hlavním inhibičním přenašečem v mozku, nemusí vždy působit inhibičně. Buňky předního laloku hypofýzy mají zvýšenou intracelulární koncentraci chloridových aniontů a aktivace GABA_A receptoru způsobí depolarizaci membrány, aktivaci napěťově ovládaných Ca²⁺ kanálů, zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺ a následnou stimulaci sekrece příslušných hormonů (Zemkova, Bjelobaba et al., připraveno k tisku).

3 Purinergní P2X receptory

P2X receptory jsou membránové iontové kanály aktivované extracelulárním ATP. Podjednotky P2X receptorů jsou u obratlovců kódovány 7 geny. Rozlišujeme tedy 7 podtypů receptorových podjednotek, P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ a P2X₇, které mohou tvořit homomerní nebo heteromerní receptory. Dosud byly nalezeny tyto kombinace podjednotek: P2X₁/P2X₂, P2X₁/P2X₄, P2X₁/P2X₅, P2X₂/P2X₃, P2X₂/P2X₆, P2X₄/P2X₆ a P2X₄/P2X₇ (North 2002).

3.1 Stavba purinergních P2X receptorů

Každý P2X receptor se skládá ze tří podjednotek uspořádaných způsobem „head to tail“. To znamená, že druhá transmembránová doména jedné podjednotky je přiložena k prvnímu transmembránovému segmentu druhé podjednotky (Jiang, Kim et al. 2003). Jednu podjednotku potkaního P2X receptoru tvoří 379 (P2X₆) až 595 (P2X₇) aminokyselin dlouhé sekvence (obr.2), které obsahují dvě hydrofobní domény procházející plazmatickou membránou ve formě α -helixu. U P2X₂ receptoru, který byl dosud nejvíce zkoumán, první transmembránová doména (TM1) začíná 30. a končí 50. aminokyselinou, druhá transmembránová doména (TM2) začíná 330. a končí 350. aminokyselinou. K otevření iontového póru pak dochází šroubovitým posunem transmembránových domén vůči sobě (Jiang, Kim et al. 2003). Extracelulární doména, která váže ATP, tvoří největší část proteinu. U P2X₂ receptoru sahá od 51. až k 329. aminokyselině a obsahuje různý počet konsenzuálních sekvencí pro N-glykosylaci, které mají význam pro transport receptoru z endoplazmatického retikula na membránu a podílejí se na sekundární a terciální struktuře extracelulární části proteinu. Například receptory P2X₂, P2X₅ a P2X₆ mají tři a receptor P2X₄ má sedm glykosylačních míst. N- i C- konec receptoru je intracelulární (Newbolt, Stoop et al. 1998). Sekvence C-koncové domény je různě dlouhá, nejkratší je u P2X₄, nejdelší u P2X₇ receptoru. N-terminální doména, obě transmembránové domény a extracelulární smyčka jsou mezi jednotlivými podtypy receptorů z 40 – 55% identické (Tabulka 1).

		▶ Exon 2	
P2X1	MARRLQDELSA-FFFEYDTTPRMVLVRNKKVGVIFRLIQLVVLYVIGWVVFVYERGYQTSS		59
P2X2	MVRRRLARGCWS-AFWDYETPKVIVVRNRRIGFVHRMVQLLILLYFVWYVFIQKSYQDSE		59
P2X3	-----MNCIS-DFFTYETTKSVVVKSWTIGIINRAVQLLIISYFVGWVFLHEKAYQVRD		53
P2X4	MAGCCSVLG-S-FLFEYDTTPRIVLIRSRLVGLMNRVAVQLLILAYVIGWVVFVWEKGYQETD		58
P2X5	MGQAAWKGFV-LSLFDYKTKAFVVAKSXKVVGLLYRVLQLIILLYLLIWFVLIKKSVDID		59
P2X6	MASAVAAALVSWGFLDYKTEKYVMTRNCWVGISQRLLQLGVVYVIGWALLAKKGYQEDW		60
P2X7	MPACCSWN----DVFOYETNKVTRIQSVNYGTIKWILHMTVFSYVVS-FALMSDKLYQRKE		55
		▶ Exon 3	
P2X1	D-LISSVSVRLKGLAVT--QLQGLG-PQ----VWDVADYVFPAGHDSFVVMINFIIVTPQ		111
P2X2	TGPESSIIITKVKGITMS-----EDK-----VWDVVEEYVKHPPEGGSVVSIIITRIEVTFS		107
P2X3	TAIESSVVTIKVKGFGRY-----ANR-----VMDVSDYVTEPQGTSVFVIIITKMIVTEN		101
P2X4	S-VVSSVTTKAKGVAVT--NTSQLG-FR----IWDVADYVTPAQEENSLFIMINMIVTVN		110
P2X5	TSLQSAVVTKVKGVAVTNTTMLGER-----LWDVADVFVPSQGENVFFVVTNLIIVTPN		112
P2X6	MDPQISVITKIKGVSVTVQVKEKR-----LWDVADVFVPSQGENVFFVVTNLIIVTPA		113
P2X7	P-LISSVHTKVKGVAEVTENVTEGGVTKLVHGFIDTADYTLQLQG-NSFFVMINYLKSEG		113
		▶ Exon 4	
P2X1	QTQGHAEENPE-GG-IQDDSGTPGKAERKAGGIRITGNVFP-FNGTVK-TTEIFGWQRPV		167
P2X2	QTLGTPESMRVHSSTHSDDDIAGQLDMOQNGIRITGHVPYHGDSTTEEYSAWQEHV		166
P2X3	QMGGFPENEEKYR--VSDSQ--GPERFPGGGIILTGRGVN-YSSVLR-TTEIQGWQFT		155
P2X4	QTQSTPEIPDKTS-INSDDTPGSDVTHSSGVATGRVFP-FNESVK-TTEVAAWQHV		167
P2X5	QRQGIAREGIPDGESEDDHAGESVVAGHGLKTKGRVLR-VGNSTRGTTEEIFAWQHV		171
P2X6	QVQGRPEHPSVPLANWADEDPEGEMGTYSHGIIKTGQVA-FNGTHR-TTEIWSWQRPV		171
P2X7	QEQLKPEYPSRGK-QHSDQGIKGMWDPQSKGIQTGRVIP-YDQKRK-TTEEIFAWQHA		170
		▶ Exon 5	
P2X1	EVDKIPSPALLREKAEENFTLFIKNSISFPRFKVNRNRLVEEVNGTYMKKCLYHKIQHPLC		227
P2X2	EDG-TSDNHFLGKMAPNFTILIKNSIHYPKFKFSKGNIASQKSD-YLKHQTFDQSDPYC		224
P2X3	EVD-TVEMPIM-MEAEENFTIFIKNSIRFLPFNFEKGNLLPNLTDKDIKRFHPEKAPFE		209
P2X4	ENDVGVPTPAFLKAAENFTLLVKNNIWPKFNFKRNILPNITTSYLKSCIYNAQTDPPFC		227
P2X5	ETK-SMPTDPLLKDAESFTISIKNFIRFPKFNFSKANVLETDNKHFLKTHFSSTN-LYE		229
P2X6	ESS-AVPRKPLLAQAKENFTLFIKNTVTFNKFNFSTRNALDWDNTYFKYLYDLSLSSPYC		230
P2X7	EGEAPRPLLRSAENFTVLIKNNDIFPGHNYTTRNILPGMNIS----TFHKTWNPC		226
		▶ Exon 6	
P2X1	FVFNLCYVVRESGQDFRSLAEKGGVVGITIDWKKDLDWHVHRGKPIYQFHGT---YGEKN		284
P2X2	FIFRLGFIVEKAGENFTELAHKGGVIGIIMWNCDDLSESEKPNKYSFRRRLD--PKYDP		282
P2X3	FILRLGDDVVKFAGQDFAKLARTGGVIGIKIGWVGLDLDKAWDQIPKYSFTRLDGVSEKSS		269
P2X4	FIFRLGTIVGDAGHSFQEMAVEGGIMGIIKWDENLDRAASLGLPRYSFRRRLDTRDLEHN		287
P2X5	FIFRLGSIVRWAGADFQDIALKGGVIGIYIEWDENLDKAASKENPHYYFNRLDNKHTHS-		288
P2X6	FVFRIGDLVAMTGGDFEDLALLGGAVGINIHWDENLDTKGSDFSPQYSE-QLQE-----		283
P2X7	FIFRLGDIFOEIGENFTEVAVQGGIMGIEIYWDENLDSWSHRGQPKYSFRRRLDDKYTNES		286
		▶ Exon 7	
P2X1	LSPGFNFRFAHFVQ-NGTNRRLHFRVFGIHFIDILVDGKAGKFDIPTMTTIGSGGIGIFC		343
P2X2	ASSGYNFRFAKYKINGTTTTTRTLIKAYGIRIDVIVHGQAGKFSLIPTIINLATALTSIG		342
P2X3	VSPGYNFRFAKYKMGSEYRITLLKAFGIRFDVLVYGNAGKFNIIPTIISSVAFTSVG		329
P2X4	VSPGYNFRFAKYRDLAGKEQRTILTRAYGIRFDIIVFGKAGKFDIPTMINVGSGLALLG		347
P2X5	ISSGYNFRFARYYRDPNGVEFRDLMKAYGIRFDVIVNGKAGKFSIPTVINIGSGLALMG		348
P2X6	--RGYNFRFANYWAASGVESRSLIKLYGIRFDILVTGQAGKFDIPTAITVGTGAAWLG		341
P2X7	LFFGYNFRFAYKYKE-NGMEKRTILKAFGVRFDILVFGTGKFDIILQLVVYIGSTLSYFC		345
		▶ Exon 8	
P2X1	VATVLCDLLLH-----ILPKREYKQKFKFYAEDMGPGEGEHDPV		384
P2X2	VGSFLCDWILLT-----FMNKNKLYSHKFKDKVRTPKHPSSRWVTL		384
P2X3	VGTVLCDIILLN-----FLKGADHYKARKEEVTETTLKGTASTNPV		371
P2X4	VATVLCDVIVLY-----CMKKKYRDKKYKYVEDYEQGLSGEMNQ		389
P2X5	AGAFCDLVLIY-----LIRKSEFYRDKKFEKVRGQKEDANVEEAN		390
P2X6	MVTFLCDLLLY-----VDREAGFYWRTKYEEARAPKATTNSA	379	
P2X7	LATVCDLIINTYASTCCRSRVYPSCKCEPCAVNEYVYRKKCEPIVEPKPTLKYVSFVD		405
		▶ Exon 9	
P2X1	ATSSTLGLQENMRTS	399	
P2X2	ALVLGQIPPPSHYSQDQPPSPSGEGPTLGEAELPLAVQSPRPCISALTEQVVDTLG		444
P2X3	FASDQATVEKQSTDSGAYSIGH	393	
P2X5	EMEQRPEDEPLERVRQDEQSQELAQSGRKQNSNCQVLLPARFGLRENAIVNVKQSQIL		450
P2X7	EPHIWMVDQQLLGSQDQVKGQEVPRQTDLFELSLSLHHSPPIPGQPEEMQLLQIE		465
		▶ Exon 10	
P2X2	QHMQRPPVPEPSQDSTSTDPKGLAQL	472	
P2X5	HPVKT	455	
P2X7	AVPRSRDSDWCQCGNCLPSQLPENRRALEELCCRRKPGQCITTELSFKIVLSREALQL		525
		▶ Exon 11	
P2X7	LLLYQEPELLALEGEAINSKLRHCAYSYATWRFVVSQDMADFAILPSCCRWKIRKEFPKTQ		585
P2X7	GQYSGFKYPY	595	

obr.2. Aminokyselínové sekvence podjednotek P2X receptorů potkana. Rámečkem jsou označeny konzervované sekvence aminokyselin, silnou čarou nad sekvencemi jsou zvýrazněny hydrofobní transmembránové domény. Převzato z (North 2002).

Podobnost mezi jednotlivými podjednotkami P2X receptorů (%)							
	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇
P2X ₁	100	40,6	47,9	50,3	44,7	46,2	45,1
	100	40,5	46,4	50,6	45,5	46,8	44,9
P2X ₂		100	51,1	50,5	46,9	42,7	41,0
		100	51,1	50,5	46,9	42,7	41,0
P2X ₃			100	48,6	49,3	43,2	44,7
			100	49,2	47,0	41,4	43,1
P2X ₄				100	55,4	47,6	48,6
				100	53,5	47,3	49,8
P2X ₅					100	48,5	42,0
					100	49,2	42,0
P2X ₆						100	41,0
						100	39,2
P2X ₇							100
							100

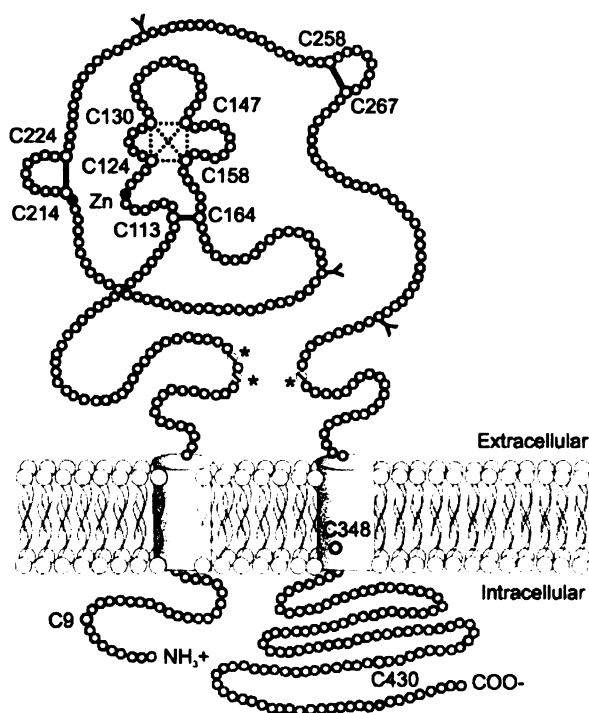
Tabulka 1. Porovnání shody sekvencí transmembránových segmentů a extracelulární smyčky podjednotek receptorů P2X₁₋₇ vyjádřené v procentech. Modrá čísla patří lidskému receptoru, červená k potkanímu receptoru. Převzato z (North 2002).

3.2 Vazebné místo pro extracelulární ATP

Extracelulární doména P2X receptorů obsahuje deset konzervovaných cysteinů, které pravděpodobně vytvářejí intramolekulární disulfidické vazby. Vliv těchto cysteinových zbytků na stabilitu receptoru byl studován pomocí jejich substituce alaninem. Bylo zjištěno, že u potkaního P2X₂ receptoru se vytvářejí specifické vazby mezi těmito rezidui: Cys¹¹³-Cys¹⁶⁴, Cys²⁵⁸-Cys²⁶⁷, Cys²¹⁴-Cys²²⁴. Další dvě disulfidické vazby vznikají mezi čtveřicí cysteinů Cys¹²⁴, Cys¹³⁰, Cys¹⁴⁷ a Cys¹⁵⁸ (obr.3). Největší vliv na funkci receptoru mělo rozrušení vazby Cys²¹⁴-Cys²²⁴, která pravděpodobně umožňuje stabilizaci a správné sbalení receptoru a následné vytvoření dalších disulfidických vazeb a jiné posttranslační modifikace. Správná stavba extracelulární domény P2X receptorů je kritická pro tvorbu vazebné kapsy pro ATP (Clyne, Wang et al. 2002).

ATP se váže na P2X receptory v oblasti extracelulární smyčky. K efektivní vazbě na receptor je třeba interakcí s adeninovým kruhem i trifosfátovým řetězcem ATP. Pomocí bodových mutací byla prověřena konzervovaná aromatická rezidua lidského P2X₁ receptoru a bylo zjištěno, že většina těchto reziduí není nutná pro vazbu ATP, navíc rezidua Phe¹⁹¹, Trp²⁵⁹ jsou důležitá pro správnou dopravu receptoru na plasmatickou membránu. Na koordinaci vazby adeninového kruhu ATP se podílejí rezidua Phe¹⁸⁵ a Phe²⁹¹ (Roberts, Evans 2004).

Dále byla identifikována kladně nabitá rezidua podílející se na vazbě záporně nabitých fosfátových skupin (Lys⁶⁸, Lys⁷⁰, Lys³⁰⁹) (Ennion, Hagan et al. 2000). Tato práce předpokládá, že se na vazbě záporného trifosfátu podílí i kladně nabitý Arg²⁹², později však bylo zjištěno, že jeho náboj nemá na vazbu ATP vliv (Roberts, Evans 2007). Nicméně, Arg²⁹² je součástí vysoce konzervovaného motivu všech P2X podjednotek (Asp²⁹⁰-Phe²⁹¹-Arg²⁹²), který se podílí na tvorbě vazebného místa pro ATP na lidském P2X₁ receptoru (Roberts, Evans 2007).

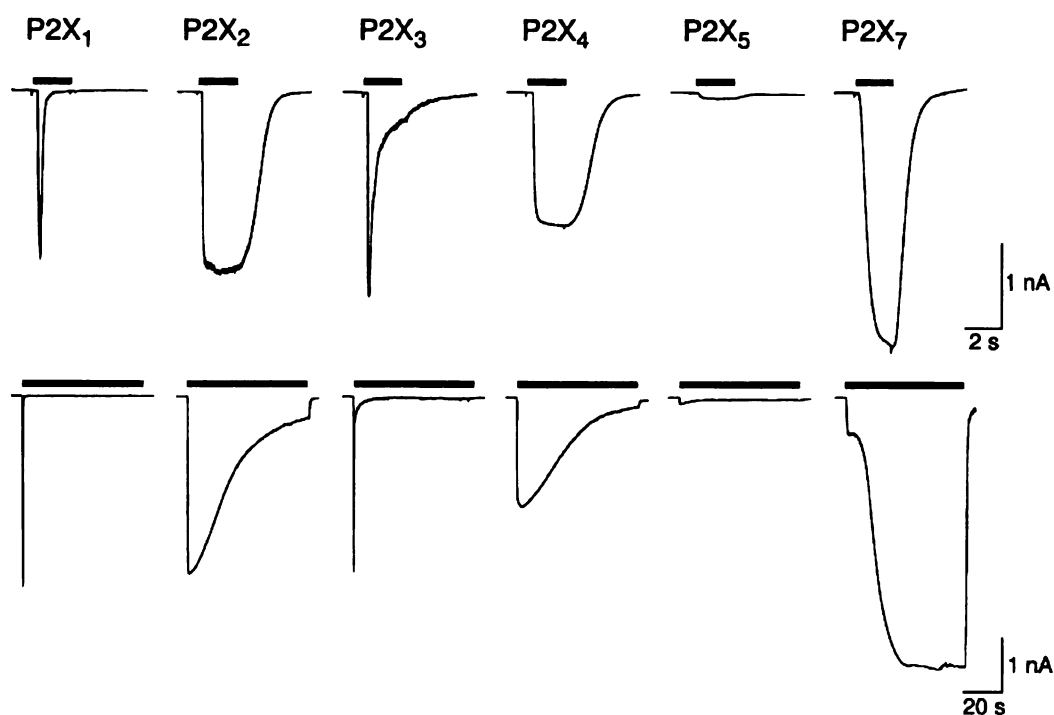


Obr. 3. Model potkaního P2X₂ receptoru v membráně. Na obrázkou jsou vyznačeny všechny konzervované cysteiny (otevřené kroužky) a mezi nimi předpokládané disulfidické vazby. Hvězdičkou jsou označeny rezidua lysinu, která se pravděpodobně podílejí na vazbě ATP. Vyznačeny jsou také místa glykosylace. Převzato z (Clyne, Wang et al. 2002).

3.3 Desensitizace

Po dlouhodobé stimulaci P2X receptoru ATP nebo jiným agonistou dochází k jeho desenzitizaci, snížení odpovědi, kdy receptor nereaguje na další zvýšení koncentrace agonisty. Tento stav je reverzibilní. Desenzitizace u P2X receptorů může být velmi rychlá v řádu milisekund, jako je tomu u P2X₁ a P2X₃ receptorů, anebo pomalá, jako je tomu například u P2X₂ nebo P2X₄ receptorů, které desenzitizují v řádech sekund až minut. Jediný P2X₇ receptor nedesenzitizuje vůbec (North 2002). Typický průběh desenzitizace jednotlivých P2X

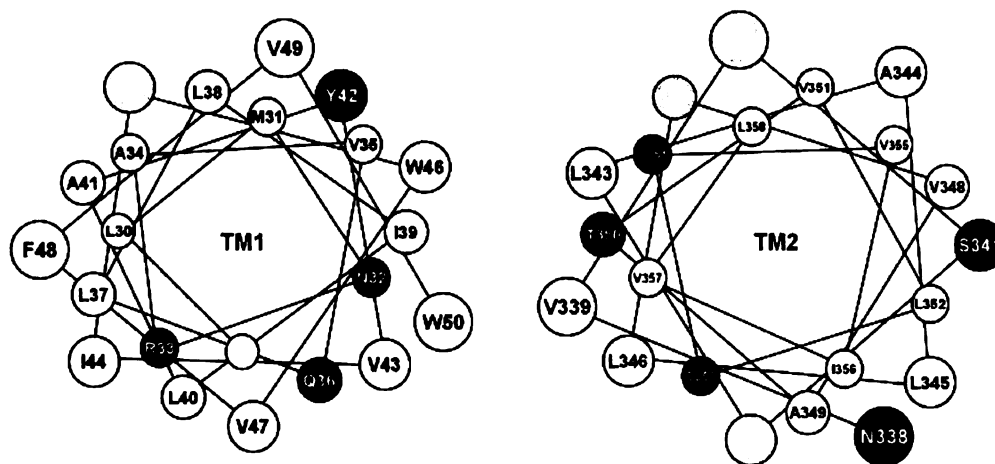
receptorů je znázorněn na obr. 4. Bylo zjištěno, že rozdílná koncentrace agonisty i rozdílní agonisté způsobují velice podobný průběh desenzitizace u P2X₁ receptoru, přičemž membránový potenciál má jen malý nebo žádný vliv na její rychlost. Klíčové oblasti ovlivňující průběh desenzitizace zahrnují transmembránové domény a intracelulární segmenty k nim bezprostředně přiléhající (11-15 aminokyselin s množstvím kladně nabitých reziduí). Minimální oblast potkaního P2X₂ receptoru zodpovědná za pomalou desenzitizaci zahrnuje na N-koncové oblasti 14.-37. aminokyselinu, na C-koncové části jsou to rezidua 332-365. Nahrazením obou těchto oblastí odpovídajícími oblastmi P2X₁ receptoru způsobí zrychlení desenzitizace jako u P2X₁ receptoru. Naopak, ke zpomalení desenzitizace P2X₁ receptoru stačí nahradit jen jednu z těchto oblastí odpovídajícím segmentem P2X₂ receptoru. Důkazem, že nedesenzitující fenotyp je dominantní, je i pomalá desenzitizace P2X₂/P2X₃ heteromerního receptoru (Werner, Seward et al. 1996). Zavření kanálu v přítomnosti agonisty vyžaduje konformační změny obou transmembránových domén, desenzitizaci lze ovlivnit fosforylací N-koncové i C-koncové části receptoru a je také možné, že se na desenzitizaci receptoru podílí extracelulární smyčka (He, Zemkova et al. 2003).



Obr. 4. Porovnání průběhu desenzitizace u P2X receptorů při krátkodobém (2s, horní řada) a dlouhodobém (20s, dolní řada) působení ATP. Můžeme pozorovat velmi rychlou desenzitizaci u P2X₁ a P2X₃ receptorů. U všech receptorů byla použita koncentrace 30 μM ATP, jen v případě P2X₇ receptoru byla koncentrace ATP zvýšena na 1 mM a ani poté nebyla pozorována desenzitizace tohoto receptoru. Převzato z (North 2002).

3.4 Dilatace póru iontového kanálu

P2X receptory jsou propustné pro malé monovalentní ionty, některé jsou vysoce propustné pro vápenaté ionty nebo aniotny a organické molekuly (North 2002). Některé P2X receptory, například P2X₂ a P2X₇ receptor, mohou přecházet ze stavu selektivního pro mono- nebo divalentní ionty (I₁) do stavu propustného pro větší organické kationty (I₂). Existují dvě teorie, jakým způsobem k této změně v propustnosti, dilataci, dochází. První je „cluster model“, který předpokládá, že jednotlivé kanály vytváří v membráně shluky, kterými pak mohou projít i větší organické molekuly. Nebyl však nalezen žádný důkaz shlukování P2X₂ receptorů na membráně, ani jako odpověď na aplikaci ATP. Druhou teorií je „gating model“, který předpokládá, že změny propustnosti probíhají v důsledku konformačních změn P2X receptoru. Na těchto konformačních změnách se podílejí obě transmembránové domény a dochází k nim nejspíše na styčných plochách transmembránových domén sousedních podjednotek receptoru. Klíčovými rezidui potkaního P2X₂ receptoru v tomto ohledu jsou Phe³¹, Arg³⁴, Gln³⁷, Lys⁵³, Ile³²⁸, Ile³³², Ser³⁴⁰, Gly³⁴², Trp³⁵⁰, Leu³⁵² (Khakh, Egan 2005).



Obr. 5. Znázornění rozložení aminokyselin u předpokládaných α helixových struktur obou transmembránových domén (TM1 a TM2) potkaního P2X₄ receptoru při pohledu z extracelulární strany plazmatické membrány. TM1 na tomto modelu zahrnuje 22 aminokyselin (Gly²⁹- Trp⁵⁰), TM2 pak 21 aminokyselin (Asn³³⁸-Leu³⁵⁸). Barevně odlišeny jsou – glycinové zbytky (šedě), hydrofobní nepolární rezidua (žlutě), polární nenabitá rezidua (zeleně), nabitá bazická (modře) a kyselá (červeně) rezidua. K lipidům jsou obráceny stěny Val47-Trp50 a Leu345-Leu346, kde se váže IVM. Převzato z (Jelínková, Vávra et al. 2008, v tisku).

3.5 Struktura transmembránových domén

Transmembránové domény tvoří pór kanálu P2X receptoru, hrají roli v jeho iontové selektivitě, dilataci, desensitizaci a ovlivňují také strukturu a funkci vzdáleného ATP vazebného místa v ektodoméně. Jejich uložení v membráně a sekvence, které tvoří vodivý pór však nebyly dosud s určitostí identifikovány.

Struktura transmembránových segmentů byla dosud zkoumána bodovou mutagenézí u P2X₂ a P2X₄ receptoru. U těchto receptorů byly všechny aminokyseliny v TM1 a TM2, jedna po druhé, zaměněny buď za malou (alanin) nebo velkou (tryptofan) aminokyselinu a byly určeny zbytky, jejichž záměna měla největší vliv na funkci receptoru. Dalším způsobem studia byla cysteinová mutagenéze, při které byly všechny aminokyseliny v TM1 a TM2, jedna po druhé, zaměněny za cystein a funkce receptoru byla zkoumána v přítomnosti a nepřítomnosti metanthiosulfonátového činidla, které ireversibilně reaguje s cysteinem. U potkaního P2X₄ receptoru byla struktura TM1 a TM2 studována pomocí stimulace ATP v přítomnosti ivermektinu (IVM), lipofilní molekuly, která funguje jako allosterický modulátor P2X₄ receptoru (obr.5). Podle současných poznatků se ivermektin váže na transmembránové helixy otevřeného kanálu, na styčné ploše s plazmatickou membránou, a zvyšuje senzitivitu receptoru k ATP. Záměnou některých aminokyselin (Gln³⁶, Leu⁴⁰, Val⁴³, Val⁴⁷, Trp⁵⁰, Asn³³⁸, Gly³⁴², Leu³⁴⁶, Ala³⁴⁹, Ile³⁵⁶) za cystein byla ovlivněna stimulační aktivita IVM. Tato rezidua pravděpodobně tvoří vazebnou kapsu pro IVM a leží tedy na té části transmembránového helixu, která je obrácená do membrány. Naproti tomu záměna reziduí Met³¹, Tyr⁴², Gly⁴⁵, Val⁴⁹, Gly³⁴⁰, Leu³⁴³, Ala³⁴⁴, Gly³⁴⁷, Thr³⁵⁰, Asp³⁵⁴ a Val³⁵⁷ se na vazbě IVM neprojevila, tyto rezidua jsou pravděpodobně situována do otevřeného póru receptoru (Jelínková, Vávra et al. 2008et al., připraveno k tisku).

3.6 Výskyt a charakterizace jednotlivých typů P2X receptorů

P2X receptory se vyskytují v dráždivých i nedráždivých tkáních – neurony, gliové buňky, epitel, endotel, kost, sval, hemopoietické tkáň. Některé buňky obsahují více typů P2X receptorů. Byly nalezeny u mnoha obratlovců, ale i u bezobratlých existují důkazy o tom, že ATP a jiné nukleotidy mohou přímo otevírat iontové kanály (North 2002). Sekvenčně podobný receptor byl nalezen u hlenky *Dictyostelium discoideum* (DdP2X). Zajímavé na DdP2X receptoru je, že není exprimován na plazmatické membráně, ale nachází v membráně kontraktilní vakuoly. Je tedy intracelulárním receptorem a pravděpodobně hraje úlohu v osmoregulaci (Fountain, Parkinson et al. 2007).

V předním laloku hypofýzy se nacházejí pravděpodobně všechny typy P2X receptorů (Balik, nepublikované sdělení). Je již známo, že laktotropní buňky mají na svém povrchu P2X₃, P2X₄ a P2X₇ homoreceptory, zatímco gonadotropy exprimují P2X_{2a} a P2X_{2b} varianty P2X₂ receptorů (Stojilkovic, Koshimizu 2001) tvořících homoreceptory P2X_{2b} a heteroreceptory P2X_{2a}/P2X_{2b} (Zemkova, Balik et al. 2006).

3.6.1 P2X₁ receptor

P2X₁ receptor potkana byl izolován z chámovodu, jeho předpokládaná délka je 399 aminokyselin. Jako agonisté se u tohoto receptoru uplatňují kromě samotného ATP také α,β -methyl ATP ($\alpha\beta\text{meATP}$) a 2',3'-O-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP (BzATP). ATP a $\alpha\beta\text{meATP}$ mají přibližně stejný agonistický účinek a jejich koncentrace, které vyvolávají polovinu maximální odpovědi (EC_{50}) jsou blízké 1 μM . Tato vlastnost odlišuje P2X₁ a P2X₃ receptory od ostatních P2X homoreceptorů. V tomto smyslu se uplatňuje i β,γ -methyl ATP ($\beta\gamma\text{meATP}$), které vyvolává stejnou odpověď jako ATP, je plným agonistou, ale pro aktivaci P2X₁ receptoru je třeba asi třicetkrát menší koncentrace než pro aktivaci P2X₃ receptoru (North 2002). Pro vazbu agonisty, záporně nabitého ATP, jsou klíčová kladně nabitá rezidua blízko N-konce extracelulární domény – konkrétně Lys⁶⁸ a Lys⁷⁰ lidského P2X₁ receptoru. Na vazbě ATP se rovněž mohou podílet kladně nabitě aminokyseliny u C-konce extracelulární smyčky (Lys³⁰⁹) (Ennion, Hagan et al. 2000). Hlavními antagonisty P2X₁ receptoru jsou suramin a pyridoxal-fosfát-6-azofenyl-2,4-disulfonová kyselina (PPADS). P2X₁ receptor se nachází např. v krevních destičkách a megakaryocytech. Má mírně větší propustnost pro sodné než pro draselné ionty, relativně velkou propustnost pro vápenaté kationty, poměr propustnosti vápenatých a sodných iontů ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$) je 4, při $[\text{Ca}^{2+}]_e = 112\text{mM}$, a má velmi malou propustnost pro větší organické ionty. Na rozdíl od P2X₂ receptoru nemá extracelulární Ca^{2+} na P2X₁ receptor žádný nebo jen malý inhibiční efekt. Desenzitizace tohoto receptoru je velmi rychlá, v řádu milisekund. Při dlouhodobé stimulaci receptoru agonistou dochází k internalizaci receptoru (po 1-3 minutách). Po ukončení stimulace se receptor znovu na membráně obnoví po 10 minutách (North 2002).

3.6.2 P2X₂ receptor

Lidský P2X₂ receptor byl izolován z hypofýzy, kde se nacházejí jeho sestřihové varianty P2X_{2a} a P2X_{2b}. P2X_{2a} podtyp obsahuje kompletní sekvenci P2X₂ receptoru, u P2X_{2b} podtypu je vystřižen exon 12 (Stojilkovic, Koshimizu 2001). Agonistický účinek ATP na P2X₂ receptor není mimikován $\alpha\beta\text{meATP}$. Specifičtí agonisté pro P2X₂ receptor nebyli zatím

identifikování, avšak jeho efekt je umocněn působením protonů a malými koncentracemi zinku a mědi. Na vazbě zinku se podílejí His¹²⁰ a His²¹³, na vazbě protonu pak His³¹⁹ (číslování odpovídající potkanímu P2X₂R) (Clyne, Lapointe et al. 2002). Při vazbě ATP se opět uplatňují kladně nabitě zbytky lysinu v ektodoméně (Lys⁶⁹, Lys⁷¹ u P2X₂R potkana) (Jiang, Rassendren et al. 2000). Neznáme dosud ani specifické antagonisty P2X₂ receptoru. Avšak, na rozdíl od ostatních P2X receptorů, u nich extracelulární Ca²⁺ ionty blokuji odpovědi vyvolané ATP (IC₅₀ = 5 nM). I jiné divalentní ionty (Mn²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺) způsobují blokaci kanálu. P2X₂ receptory jsou propustné pro Ca²⁺ ionty (P_{Ca}/P_{Na} = 2,5; [Ca²⁺]_e = 112mM), je to méně než P2X₁ a P2X₄, ale více než P2X₃R. P2X₂ receptory jsou také propustné pro některé větší organické kationty, například N-methyl-D-glukosamin (NMDG). Desenzitizace P2X₂ receptoru je pomalá, objeví se až po několika sekundách stimulace agonistou. K pomalé desenzitizaci přispívá i fosforylace proteinkinázou Thr¹⁸ na N-konci, po defosforylaci je desenzitizace tohoto receptoru mnohem rychlejší (North 2002).

3.6.3 P2X₃ receptor

P2X₃ receptor potkana byl izolován z ganglií dorzálních kořenů míšních., lidský ze srdeční tkáně. Kromě ATP jsou jeho agonisty αβmeATP, který podobně jako u P2X₁ receptoru mimikuje účinek ATP, dále 2-methylthio-ATP (2-MeSATP), který má stejný nebo i větší účinek než ATP, a diadenosinpentafosfát (Ap5A), který je také plným agonistou tohoto receptoru. Účinek ATP může být umocněn zinkem, u potkaního P2X₃ receptoru je EC₅₀ = 10μM. Antagonistické účinky mají suramin, PPADS, 2,3-O-(2,4,6-trinitrofenyl)-ATP (TNP-ATP). Aktivovaný P2X₃ receptor je dále blokován protony. Na rozdíl od P2X₂ receptoru však není inhibován extracelulárním Ca²⁺. P2X₃ receptor je poměrně málo propustný pro Ca²⁺, (P_{Ca}/P_{Na}) je 1.2, při [Ca²⁺]_e = 5mM. Podobně jako P2X₁ i P2X₃ receptor vykazuje rychlou desenzitizaci (časová konstanta je kratší než 100ms) a velmi pomalý návrat do původního stavu, který může být urychlen zvýšením extracelulární koncentrace Ca²⁺.

Heteromerní receptor P2X₂/P2X₃ byl objeven v senzoričných neuronech a v buňkách sympatických ganglií (North 2002). Skládá se ze dvou podjednotek P2X₃ a jedné podjednotky P2X₂ (Jiang, Kim et al. 2003). Přesto však svými vlastnostmi připomíná spíše P2X₂ receptor. I když je ATP jako agonista mimikováno αβmeATP, desenzitizace tohoto receptoru je relativně pomalá a účinek agonisty je umocněn nízkým pH. Antagonisté jsou stejní jako pro P2X₃ receptor (suramin, PPADS, TNP-ATP). Aktivita heteromerního P2X₂/P2X₃ receptoru je inhibována vyšší extracelulární koncentrací Ca²⁺, i když s menší citlivostí než u P2X₂

receptoru. Propustnost kanálu pro vápenaté ionty je podobná jako u P2X₃ receptoru ($P_{Ca}/P_{Na} = 1,2 - 1,5$) (North 2002).

3.6.4 P2X₄ receptor

P2X₄ receptor potkana byl izolován jako první z mozku, hypokampu nebo pankreatických buněk. Na rozdíl od P2X₁ a P2X₃ receptorů $\alpha\beta$ meATP nemá aktivační účinky na tento receptor. Charakteristické je umocnění agonistických účinků ATP ivermektinem a také Zn²⁺, nikoli však Cu²⁺. Acidifikace naopak snižuje proudy vyvolané ATP, nejspíše kvůli protonaci His²⁸⁶, který se na této pozici nachází pouze u P2X₄ receptoru. Další charakteristickou vlastností P2X₄ receptoru je jeho necitlivost k jinak pro P2X receptory typickým antagonistům – suraminu a PPADS. PPADS pravděpodobně interaguje s Lys (na pozici 246 u potkaního P2X₂ receptoru), který u P2X₄ receptoru chybí. Receptor je také blokován Mg²⁺ ionty, které snižují velikost proudu procházejícího kanálem a dobu jeho otevření. Propustnost P2X₄ receptoru je při krátké aplikaci ATP relativně velká pro Ca²⁺ ionty ($P_{Ca}/P_{Na} = 4,2$; $[Ca^{2+}]_e = 8mM$), po několika sekundách je však kanál také propustný pro větší organické kationty (např. NMDG). Rychlost desenzitizace tohoto receptoru je střední, mezi časy pozorovanými u P2X₁ a P2X₂ receptorů. Při maximální koncentraci ATP (100 μ M) se velikost proudů snižuje po 5-10s. V přítomnosti ivermektinu receptor prakticky nedesenzitizuje.

3.6.5 P2X₅ receptor

Receptor P2X₅ byl izolován z celiakálních ganglií a srdeční tkáň potkana. Kuřecí P2X₅ receptor byl naklonován z embryonálního kosterního svalu a pojmenován jako P2X₈ receptor, porovnáním aminokyselinových sekvencí však bylo zjištěno, že je to ve skutečnosti P2X₅ receptor. Lidská cDNA tohoto receptoru postrádá buď exon 10 (hP2X_{5a}) nebo exony 10 a 3 (hP2X_{5b}). Proudů vyvolané aktivací P2X₅ receptoru mají malou amplitudu (maximálně 50-200pA) v porovnání s ostatními P2X receptory (amplitudy v řádu nA). Desenzitizace tohoto receptoru je pomalá, receptor není aktivován $\alpha\beta$ meATP a blokován je suraminem a PPADS (za podobných koncentrací jako P2X₂ receptor). Kuřecí receptor vykazuje určité specifické vlastnosti jako je vysoká propustnost pro chloridové anionty, aktivace kanálu $\alpha\beta$ meATP a potlačení desenzitizace při nízké extracelulární koncentraci vápníku ($[Ca^{2+}]_e = 0,1mM$).

Heteromerní receptor P2X₁/P2X₅ má specifické vlastnosti a je citlivý k $\alpha\beta$ meATP. Proudů vyvolané $\alpha\beta$ meATP dosahují 80% maximální odpovědi a neodpovídají proudům

vyvolaným P2X₁ ani P2X₅ homomerem. K ATP je heteromerní receptor citlivý více než oba homomery a maximální odpověď vyvolá i 2-MeSATP. P2X₁/P2X₅ receptor je inhibován snížením i zvýšením extracelulárního pH. Podobně jako u P2X₁ receptoru má zvýšení extracelulární koncentrace vápenatých iontů mírný inhibiční účinek. Antagonisty jsou suramin a PPADS. Propustnost tohoto receptoru pro vápenaté ionty je menší než u P2X₁ receptoru ($P_{Ca}/P_{Na} = 1,1$). Pro NMDG je propustnost obdobná jako u P2X₂ nebo P2X₄ receptoru ($P_{NMDG}/P_{Na} = 0,08$), ale bez dalšího nárůstu při dlouhodobé stimulaci agonistou. Při malých koncentracích ATP (méně než 300nM) dochází k pomalé desenzitizaci, ale po zvýšení koncentrace agonisty je částečná rychlá desenzitizace následována dlouhodobou fází plató (North 2002).

3.6.6 P2X₆ receptor

Potkaní P2X₆ receptor byl izolován z mozku a z horních cervikálních ganglií, lidský z periferních leukocytů. Zdá se, že homomerní receptor je nefunkční a jeho stimulace ATP nevyvolává žádné proudy. Je to dáno tím, že P2X₆ podjednotky nejsou dopravovány do plazmatické membrány a zůstávají v endoplazmatickém retikulu (Barrera, Ormond et al. 2005) mohou se však podílet na stavbě heteromerních P2X₂/P2X₆ nebo P2X₄/P2X₆ receptorů. Vlastnosti těchto heteroreceptorů se jen málo liší od vlastností P2X₂ respektive P2X₄ homoreceptorů (North 2002).

3.6.7 P2X₇ receptor

P2X₇ receptor potkana byl izolován z mozku a také z horních cervikálních ganglií, lidský a myší receptor byl klonován z monocytů a mikroglíí. ATP má sice agonistické účinky na tento receptor, ale až v koncentracích větších než 100μM. Mnohem účinnějším (10-30krát) agonistou je BzATP, jeho efekt je významně umocněn při nízké extracelulární koncentraci Ca²⁺ a Mg²⁺ iontů, které zřejmě způsobují allosterickou inhibici receptoru. Stimulace P2X₇ receptotu ATP způsobí dlouhodobější změnu tohoto receptoru a AMP a ADP jej tak mohou aktivovat, i když s mnohem menší účinností než samotné ATP. Touto změnou by mohla být defosforylace Tyr³⁴³. Inhibičně na receptor působí také ionty zinku, kobaltu a také protony. Nejúčinnějším antagonistou P2X₇ receptoru je Brilliant Blue G. Naopak na suramin a PPADS je tento receptor relativně necitlivý. P2X₇ homoreceptor je zpočátku málo propustný pro NMDG, ale s prodlužující se dobou působení agonisty se propustnost pro tento organický kationt výrazně zvyšuje. Zvláštností tohoto receptoru je, že u něj nedochází prakticky k žádné desenzitizaci a neochotně, pokud vůbec, vytváří heteromerní receptory (North 2002).

4 Fyziologický význam purinergní signalizace v hypofýze

ATP je důležitým autokrinním a parakrinním neuropřenašečem v periferním i centrálním nervovém systému, po sekreci do extracelulárního prostoru je štěpen ektonukleotidázami (E-NTPDasy) na adenosin-5'-difosfát (ADP) a adenosin-5'-monofosfát (AMP), které mají také signalizační funkci. Adenosin se váže na adenosinové receptory neboli P1 receptory. U savců byly naklonovány 4 podtypy tohoto s G-proteinem spřaženého receptoru – A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ receptor. V adenohipofýze byl identifikován A₁ receptor, který negativně ovlivňuje adenylátcyklázu a inhibuje tak spontánní elektrickou aktivitu a sekreci PRL a GH v laktotropních, resp. gonadotropních buňkách. Kromě výše podrobně charakterizovaných purinergních ionotropních P2X receptorů, ATP a ADP aktivují purinergní metabotropní P2 receptory (P2Y). Bylo naklonováno 5 savčích P2Y receptorů (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁). Z P2Y je v adenohipofýze, zejména na membránách laktotropních buněk, exprimován jen P2Y₂ receptor, který je přes G-protein spřažen s fosfolipázou C (Stojilkovic, Koshimizu 2001).

Existují důkazy o tom, že se purinergní P2X receptory nachází v membránách všech sekretujících buněk adenohipofýzy (Balík, nepublikované sdělení). V laktotropech jsou exprimovány receptory P2X₃, P2X₄ a P2X₇, nikoli však receptory P2X₂. Naproti tomu, gonadotropy a somatotropy exprimují výhradně P2X_{2a} a P2X_{2b} podjednotky. Bylo zjištěno, že v hypofýze nejsou za normálních okolností exprimovány heteromerní receptory. P2X receptory vytvářejí intracelulární kalciové signály v adenohipofyzárních buňkách přímo díky své relativně velké propustnosti pro Ca²⁺ ionty nebo nepřímo, aktivací napětově závislých vápenatých kanálů (Stojilkovic, Koshimizu 2001). Dalším důležitým rysem purinergní signalizace v předním laloku hypofýzy je skutečnost, že ATP prostřednictvím P2X receptorů vyvolává depolarizační proudy, které vedou k vytváření akčních potenciálů v klidových gonadotropech. V buňkách, které vytvářejí spontánní akční potenciály, pak depolarizace jejich frekvenci zvyšuje nebo vyvolává stabilně depolarizovaný stav membrány. Když je ATP indukovaný vstup Ca²⁺ iontů do buňky dostatečný, může dojít ke spuštění exocytózy hormonů. P2X receptory mohou mít také funkci „pacemakeru“, difuze ATP mezi buňkami by pak mohla synchronizovat jejich elektrickou aktivitu. V gonadotropních buňkách mohou P2X receptory regulovat GnRH indukovanou elektrickou aktivitu, kalciovou signalizaci i sekreci luteinizačního hormonu. Tento vliv ATP je však závislý na extracelulární koncentraci vápenatých iontů. V buňkách, ve kterých došlo vlivem dlouhodobé stimulace GnRH

k vyčerpání intracelulárních zásob vápníku, pomáhá vstup extracelulárního Ca^{2+} prostřednictvím P2X receptorů udržovat oscilace akčních potenciálů (Zemkova, Balik et al. 2006). Kromě bazální sekrece FH a LH se P2X receptory podílejí i na sekreci PRL prostřednictvím amplifikace GnRH resp. TRH signálu. Jednotlivé typy podjednotek P2X receptorů se liší amplitudou proudu, který vyvolá jejich aktivace, a s tím souvisejícími změnami intracelulárního Ca^{2+} , mírou desenzitizace a citlivostí pro ATP a jeho analogy. Exprese různých typů P2X receptorů by tak mohla být způsobem, jakým ATP jemně reguluje Ca^{2+} signalizaci a sekreční děje v hypofyzární buňce (Stojilkovic, Koshimizu 2001).

5 Závěr

Hypothalamus a jím řízená sekrece hormonů předního laloku hypofýzy hrají důležitou úlohu v regulaci mnoha fyziologických funkcí. V membránách adenohypofyzárních buněk jsou exprimovány receptory pro hypothalamické faktory i pro parakrinní a autokrinní signalizační molekuly. Společným účinkem všech těchto receptorů je vliv na aktivitu napěťově závislých iontových kanálů přítomných v membráně hypofyzárních buněk. Regulují tak elektrickou aktivitu, která hraje důležitou roli v sekreční funkci buněk. Ovlivňují ji buď přímo, změnou napětí a vtokem Ca^{2+} , nebo nepřímo, prostřednictvím druhých posílů. V této práci jsem se zaměřila především na purinergní signalizaci v hypofýze, tedy na působení extracelulárního ATP prostřednictvím purinergních P2X receptorů. Již je známo, že P2X receptory jsou přítomny ve všech sekrečních buňkách adenohypofýzy a že jednotlivé typy buněk se liší v zastoupení P2X receptorů. Například v laktotropech byla prokázána přítomnost P2X₃, P2X₄ a P2X₇, zatímco gonadotropy a somatotropy exprimují homomerní receptory P2X_{2b} a heteroreceptory složené z podjednotek P2X_{2a} a P2X_{2b}. Co je příčinou tohoto rozdílu, jaký význam má specifická exprese P2X receptorů v buňkách předního laloku hypofýzy a zda souvisí se specifickou funkcí těchto buněk, není dosud známo. Zatím se předpokládá, že purinergní receptory, jakožto receptory pro parakrinní a autokrinní signalizační molekuly tvořené v samotné hypofýze, regulují inhibičně (A₁ receptory) nebo stimulačně (P2X a P2Y receptory) působení hypothalamických faktorů v buňkách předního laloku hypofýzy, a to prostřednictvím inhibice adenylátcyklázy nebo stimulace fosfolipázy C a intracelulární signalizace Ca^{2+} ionty.

Seznam použité literatury

- BARRERA N. P., ORMOND S. J., HENDERSON R. M., MURRELL-LAGNADO R. D., EDWARDSON J. M. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 2005; 280: 10759-65.
- CLYNE J. D., LAPOINTE L. D., HUME R. I. The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *J Physiol* 2002; 539: 347-59.
- CLYNE J. D., WANG L. F., HUME R. I. Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J Neurosci* 2002; 22: 3873-80.
- ENGEL S., GERSHENGORN M. C. Thyrotropin-releasing hormone and its receptors - a hypothesis for binding and receptor activation. *Pharmacol Ther* 2007; 113: 410-9.
- ENNIION S., HAGAN S., EVANS R. J. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 29361-7.
- FOUNTAIN S. J., PARKINSON K., YOUNG M. T., CAO L., THOMPSON C. R., NORTH R. A. An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in Dictyostelium discoideum. *Nature* 2007; 448: 200-3.
- GANONG W. F. *Přehled lékařské fyziologie*: H+H, 2002.
- HE M. L., ZEMKOVA H., STOJILKOVIC S. S. Dependence of purinergic P2X receptor activity on ectodomain structure. *J Biol Chem* 2003; 278: 10182-8.
- HILLE B. *Ion Channels of Excitable Membranes*: Sinauer Associates, Incorporated, 2001.
- JELÍNKOVA I., VÁVRA V., JINDRICOVA M., OBSIL T., ZEMKOVA H. W., STOJILKOVIC S. Identification of P2X₄ receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Arch* 2008.
- JIANG L. H., KIM M., SPELTA V., BO X., SURPRENANT A., NORTH R. A. Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 2003; 23: 8903-10.
- JIANG L. H., RASSENDREN F., SURPRENANT A., NORTH R. A. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 34190-6.
- KHAKH B. S., EGAN T. M. Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics. *J Biol Chem* 2005; 280: 6118-29.
- LOVEJOY D. A. *Neuroendocrinology: an integrated approach*: Wiley, 2005.
- NEWBOLT A., STOOP R., VIRGINIO C., SURPRENANT A., NORTH R. A., BUELL G., RASSENDREN F. Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 1998; 273: 15177-82.
- NORTH R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82: 1013-67.

- RISPOLI L. A., NETT T. M. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression. *Anim Reprod Sci* 2005; 88: 57-74.
- ROBERTS J. A., EVANS R. J. ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *J Biol Chem* 2004; 279: 9043-55.
- ROBERTS J. A., EVANS R. J. Cysteine substitution mutants give structural insight and identify ATP binding and activation sites at P2X receptors. *J Neurosci* 2007; 27: 4072-82.
- STOJILKOVIC S. S., KOSHIMIZU T. Signaling by extracellular nucleotides in anterior pituitary cells. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 218-25.
- STOJILKOVIC S. S., ZEMKOVA H., VAN GOOR F. Biophysical basis of pituitary cell type-specific Ca²⁺ signaling-secretion coupling. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 152-9.
- VAN GOOR F., ZIVADINOVIC D., STOJILKOVIC S. S. Differential expression of ionic channels in rat anterior pituitary cells. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 1222-36.
- WERNER P., SEWARD E. P., BUELL G. N., NORTH R. A. Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 15485-90.
- ZEMKOVA H., BALIK A., JIANG Y., KRETSCHMANNNOVA K., STOJILKOVIC S. S. Roles of purinergic P2X receptors as pacemaking channels and modulators of calcium-mobilizing pathway in pituitary gonadotrophs. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 1423-36.
- ZEMKOVA H., BALIK A., MAZNA P. *Melatonin inhibition of gonadotropin-releasing hormone- induced calcium signaling and hormone secretion in neonatal pituitary gonadotrophs*. Experimental endocrinology and reproductive biology, 2008.
- ZEMKOVA H. W., BJELOBABA I., TOMIC M., ZEMKOVA H., STOJILKOVIC S. S. Molecular, pharmacological, and functional properties of GABA-A receptors in anterior pituitary cells.