

**Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.  
1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze**

**Úloha transmembránových domén ve  
struktuře a funkci P2X receptorů**

**MUDr. Marie Jindřichová**

**Dizertační práce**

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

**Praha 2009**

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Hany Zemkové, CSc., vedoucí Oddělení buněčné a molekulární neuroendokrinologie Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 06.02.2009

.....

podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Zemkové, CSc. za to, že mi umožnila pracovat ve své laboratoři, za lidský přístup, trpělivost a odborné vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janu Teisingerovi, CSc. a RNDr. Tomáši Obšilovi, CSc. z oddělení Proteinové struktury Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. za pomoc v oblasti molekulární biologie a počítačového modelování. Chtěla bych poděkovat Mgr. Vojtovi Vávrovi za pomoc v oblasti imunocytochemie a konfokální mikroskopie. Irině Kalové a Haně Janouškové děkuji za pomoc při práci s buněčnými kulturami a zajištění laboratorního zázemí. V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit poděkování Dr. Stanko S. Stojilkovicovi z Laboratoře buněčné signalizace, NICHD/NIH, Bethesda, USA za kritické připomínky a pomoc při sepisování publikace. Všem kolegyním a kolegům z Oddělení buněčné a molekulární neuroendokrinologie děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

## Souhrn

Purinergní P2X receptory, aktivované extracelulárním ATP (adenosin-5'-trifosfátem), reprezentují nový strukturální typ ligandem otevíraných iontových kanálů. V excitabilních i neexcitabilních tkáních bylo doposud nalezeno sedm podtypů P2X receptorů. S novými poznatky o fyziologických účincích extracelulárního ATP a roli jednotlivých P2X podtypů dramaticky roste zájem o podrobné studium P2X receptorů. Je známo, že purinergní signalizace má významnou úlohu v přenosu bolesti, poranění CNS a v imunitních procesech. Málo se však ví o molekulární struktuře P2X receptorů, mechanismu otevírání a zavírání iontového kanálu, lokalizaci P2X receptorů a způsobu ukončení působení ATP prostřednictvím ektonukleotidáz. V případě detailní znalosti těchto mechanismů a znalosti struktury P2X proteinu se otevírá možnost vývoje nových léčiv například v oblasti chronické bolesti.

Cílem této práce je shrnout nové poznatky v oblasti P2X signalizace a popsat náš podíl v objasnění struktury P2X receptorů. Byla studována sekundární struktura transmembránových domén P2X<sub>4</sub> receptoru, hlavního P2X podtypu v CNS, mechanismus otevírání a uzavírání iontového kanálu a citlivost receptoru k agonistům a alosterickému modulátoru ivermektinu. K identifikaci aminokyselin, které mohou hrát roli v těchto funkcích, byla provedla skenovací mutagenese obou transmembránových domén P2X<sub>4</sub> receptoru. Bylo zaměněno celkem 42 aminokyselin, jedna po druhé, za cystein nebo alanin, mutované receptory byly exprimovány v HEK293 buňkách a kinetika zkoumána elektrofyziologickou technikou patch clamp. Bylo zjištěno, že obě transmembránové domény P2X<sub>4</sub> receptoru mají pravděpodobně strukturu  $\alpha$ -helixu, a byla identifikována funkčně důležitá rezidua. Dále byla studována úloha konzervovaného tyrosinu v první transmembránové doméně u pěti podtypů P2X rodiny, u P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub> receptoru, a bylo zjištěno, že toto aromatické reziduum hraje důležitou úlohu v 3D struktuře většiny P2X receptorů a specificky ovlivňuje vazbu agonisty anebo gating kanálu.

## Summary

Purinergic P2X receptors represent a novel structural type of ligand-gated ion channels activated by extracellular ATP. So far, seven P2X receptor subunits have been found in excitable as well as non-excitabile tissues. In the past ten years, the number of studies on P2X receptors has dramatically increased as investigators have begun to determine the physiological roles played by extracellular ATP and specific P2X receptor subtypes. It is already known that purinergic signaling is a key mechanism in pain sensation, brain injury, and immune processes. Little is known about their structure, mechanism of channel opening, localization and termination of ATP action by ectonucleotidases. Detailed knowledge about these events and the structure of purinergic receptor proteins evoke hope that new drugs will be developed that could prevent chronic pain and would be effective in protection against many diseases.

The aim of this work is to summarize recent investigations and describe our contribution to elucidating the structure of P2X receptors. We examined the structure of transmembrane domains of the P2X4 receptor subtype, the main purinergic receptor-channel in the central nervous system, the mechanism of channel opening and closing and its sensitivity to agonists and allosteric modulator ivermectin. To identify residues that might play a role in channel functioning, we performed scanning mutagenesis of both transmembrane domains of the P2X4 receptor. All 42 amino acids in both transmembrane domains were substituted, one by one, for cysteine or alanine, the mutated receptors expressed in HEK293 cells and their function examined using electrophysiological patch clamp technique. We found that both transmembrane domains of P2X4 receptor adopt helical structure and identified the most important residues for receptor function. We also examined the role of conserved tyrosine in the first transmembrane domain across five members of P2X receptor family, in P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 and P2X7 receptors, and found that this aromatic residue plays an important role in 3D-structure of receptor channels and modulates specifically binding of agonist and/or channel gating.

# Obsah

Souhrn.....	4
Summary.....	5
Obsah.....	6
1. Seznam zkratek.....	8
2. Úvod.....	9
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
3.1 Extracelulární ATP.....	10
3.1.1 Uvolňování a degradace extracelulárního ATP.....	10
3.1.2 Uvolňování ATP z neuronů a glií.....	11
3.1.3 Uvolňování ATP z ostatních buněk.....	12
3.2 Purinergní receptory a jejich podtypy.....	13
3.2.1 P1 purinergní receptory.....	13
3.2.2 P2Y purinergní receptory.....	14
3.2.3 P2X purinergní receptory.....	15
3.3 Výskyt a funkce P2X receptorů.....	19
3.4 Struktura P2X podjednotek.....	24
3.4.1 Extracelulární doména.....	24
3.4.2 Transmembránové domény.....	26
3.4.3 Intracelulární N- a C- konec.....	28
3.5. Selektivita P2X kanálů.....	28
3.6 Farmakologické vlastnosti P2X receptorů.....	29
3.6.1 Agonisté P2X receptorů.....	29
3.6.2 Antagonisté P2X receptorů.....	30
3.6.3 Alosterický modulátor ivermektin.....	31
3.7 Kinetika P2X kanálů.....	34
4. CÍLE PRÁCE.....	38
5. MATERIÁL A METODY.....	39
5.1 Molekulárně biologické metody.....	39
5.1.1 DNA konstrukty.....	39
5.1.2 Polohově řízená mutageneze.....	39
5.1.3 Transformace bakterií.....	40
5.1.4 Izolace plasmidu a měření koncentrace DNA.....	41
5.2 Tkáňové kultury.....	42
5.2.1 Pasážování buněk.....	42
5.2.2 Transfekce buněk.....	42
5.3 Elektrofyzologie.....	43
5.3.1 Roztoky.....	43
5.3.2 Snímání proudových odpovědí.....	44
5.3.3 Vyhodnocení dat.....	45
5.4 Průkaz exprese receptorů v buněčné membráně.....	46
5.5 Počítačové modely.....	47
6. VÝSLEDKY.....	48
6.1 Identifikace aminokyselinových zbytků transmembránových domén P2X4 receptoru interagujících s ivermektinem.....	48
6.1.1 Vliv IVM na TM mutanty P2X4 receptoru necitlivé k substituci.....	53
6.1.2 Vliv IVM na TM mutanty P2X4 receptoru citlivé k substituci.....	56
6.1.3 Model helikální struktury transmembránových domén P2X4 receptoru.....	58

6.2 Úloha konzervovaného TM1 tyrosinu v kinetice P2X receptorů .....	60
6.2.1 Alaninová mutageneze TM1 domény P2X4 receptoru.....	60
6.2.2 Účinek záměny konzervovaného TM1 tyrosinu napříč P2X receptory.....	62
6.2.3 Aminokyseliny Phe a Trp mohou částečně nahradit Tyr na pozici 42 u P2X4 receptoru .....	68
6.3 Role aromatických reziduí horní části TM1 v kinetice P2X receptorů.....	70
6.3.1 Účinek jednobodových mutací aromatických reziduí v TM1 na funkci P2X receptorů .....	70
6.3.2 Vliv dvojitých alaninových mutací v TM1 na kinetiku P2X4 receptoru.....	73
7. DISKUZE .....	75
8. ZÁVĚR .....	81
9. LITERATURA .....	83
Seznam publikací .....	99

## 1. Seznam zkratek

$\alpha,\beta$ -meATP	$\alpha,\beta$ -metylen-adenosin-5'-trifosfát
ADP	adenosin-5'-difosfát
AMP	adenosin-5'-monofosfát
AMPAR	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionové receptory
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BzATP	3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5'-trifosfát
CNS	centrální nervový systém
DMSO	dimetylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	koncentrace agonisty vyvolávající 50 % maximální odpovědi
ECS	extracelulární roztok
GABAR	receptor pro kyselinu $\gamma$ -aminomáselnou
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk (human embryonic kidney cells)
HEPES	N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-(2-etansulfonová kyselina)
ICS	intracelulární roztok
I <sub>max</sub>	maximální proudová amplituda
IVM	ivermektin
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
NMDG <sup>+</sup>	N-metyl-D-glukosamin
NMDR	N-metyl-D-aspartátový receptor
PPADS	pyridoxal fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonová kyselina
P2XR	ionotropní purinergní receptory
P2YR	metabotropní purinergní receptory
TM	transmembránová doména
$\tau_{\text{off}}$	časová konstanta deaktivace proudů po odmytí agonisty
UDP	uridin-5'-difosfát
UTP	uridin-5'-trifosfát
WT	divoký typ (wild type)



## 2. Úvod

Purinergní P2X receptory (P2XR), aktivované extracelulárním adenosin-5'-trifosfátem (ATP), reprezentují nový typ ligandem otevíraných kanálů. Sedm podtypů P2X receptorů bylo doposud nalezeno u obratlovců (North, 2002). Mnoho studií však popisuje potenciální význam ATP jako extracelulární signální molekuly rovněž u bezobratlých (Burnstock 1996; Agboh a spol., 2004) a rostlin (Kim a spol., 2006; Roux a spol., 2007), což nastiňuje důležitost purinergní signalizace v průběhu evoluce. Kyslí P2X receptory byly naklonovány teprve v druhé polovině 90. let, a proto se doposud neví mnoho o jejich struktuře. Postupně se objevuje široká exprese P2X receptorů v excitabilních a neexcitabilních tkáních a výrazná role těchto receptorů v mnoha fyziologických a patofyziologických procesech. Jen příkladem může být zapojení signalizace zprostředkované P2X receptory v přenosu a vnímání bolesti. Možnost vývoje nových analgetik je jedním z důvodů, proč se v posledních letech zaměřuje pozornost právě k P2X receptorům a zkoumání jejich struktury. Mnoho autorů se zabývalo a stále zabývá analýzou extracelulární domény a hledáním ATP vazebného místa, přesto však jeho přesné zmapování uniká. Důvodem je především fakt, že dosud neexistuje krystalová struktura žádného z P2X podtypů. Také struktura transmembránových domén (TM1, TM2) nebyla dosud důkladně prověřena, zejména u P2X4 receptoru, a úloha TM1 v kinetice otevírání a zavírání iontového kanálu je nejasná. Proto je tato práce zaměřena na průzkum vztahu mezi strukturou a funkcí TM domén P2X4 receptoru a věnována podrobné analýze úlohy aromatických aminokyselinových zbytků TM1 domény u několika P2X receptorů.

## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Extracelulární ATP

Intracelulární ATP slouží jako energetický zdroj univerzálně ve všech biologických systémech. Ve vnitrobuněčných signalizačních drahách je ATP používán jako zdroj fosfátu pro proteinkinázové reakce a tím se podílí na regulacích mnoha biochemických procesů. ATP je zdrojem energie pro iontové pumpy, které slouží k udržení elektrického membránového potenciálu. V buňce je ATP také jedním z nukleotidů potřebných pro syntézu klíčových organických makromolekul, jako jsou nukleové kyseliny. Je základním stavebním kamenem ribonukleové kyseliny, po přeměně na deoxyATP se stává základním kamenem deoxyribonukleové kyseliny. Mnohem méně je však známo, že ATP působí rovněž jako extracelulární „messenger“ a neuropřenašeč (Ralevic a Burnstock, 1998). Působí na purinergní receptory, které jsou aktivovány extracelulárním ATP, ev. UTP (uridin-5'-trifosfát), a produkty vzniklémi jejich hydrolyzou.

#### 3.1.1 Uvolňování a degradace extracelulárního ATP

Extracelulární ATP je povrchovými enzymy rychle hydrolyzován na ADP (adenosin-5'-difosfát), AMP (adenosin-5'-monofosfát) a adenosin. V rychlé degradaci molekuly ATP je zapojeno několik enzymových rodin ektonukleotidáz. Jedná se o ekto-nukleosid trifosfát difosfohydrolázy (NTPDázy 1, 2, 3, 8), ektonukleotid pyrofosfatázy (E-NPP 1, 2, 3), alkalické fosfatázy, ekto-5'-nukleotidázy a ekto-nukleosid difosfokinázy (E-NDPK). Například NTPDáza1 hydrolyzuje ATP přímo na AMP, dále hydrolyzuje UTP na UDP, NTPDáza2 hydrolyzuje ATP na ADP a 5'-nukleotidáza hydrolyzuje AMP na adenosin (Zimmermann, 2001). Do buňky je adenosin přenášen prostřednictvím specifických transportérů (Baldwin a spol., 1999).

Dříve panoval názor, že se ATP uvolňuje do extracelulárního prostoru pouze při poškození a smrti buněk. Dnes víme, že se ATP uvolňuje do extracelulárního prostoru i za fyziologických podmínek a to několika mechanismy.

### 3.1.2 Uvolňování ATP z neuronů a glií

Z neuronů, kde je uskladněn v synaptických váčcích, se ATP uvolňuje prostřednictvím exocytózy. Koncentrace nukleotidů ve váčcích se odhaduje až na 1000 mM (Burnstock, 2006a). ATP je jako rychlý excitační neuropřenašeč uskladněný ve váčcích samostatně, nebo je jako kotransmitter skladovaný a uvolňovaný společně s jiným přenašečem. V centrálním nervovém systému (CNS) byla dokázána kotransmise ATP s glutamátem, 5-hydroxytryptaminem, dopaminem, noradrenalinem,  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinou (Burnstock, 2004; Jo a Schlichter, 1999; Labrakakis a spol., 2003). Další příklad kotransmise je uvolňování ATP společně s noradrenalinem ze sympatických nervů (Burnstock, 1995), společně s acetylcholinem z parasympatických nervů a motorických nervových zakončení (Silinsky a Redman, 1996) nebo kotransmise oxidu dusnatého, vasoaktivního intestinálního polypeptidu a ATP v myenterickém nervovém systému (Burnstock, 1999). Ve tkáních inervovaných sympatickými nervy je rychlá složka odpovědi vyvolána ATP, které působí prostřednictvím purinergních P2X receptorů, a následná pomalá komponenta odpovědi je zprostředkována metabotropními  $\alpha$ -adrenoreceptory. Podobně při parasympatické inervaci ATP vyvolává rychlou odpověď prostřednictvím P2X receptorů, zatímco pomalá složka je zprostředkována metabotropními muskarinovými receptory (Burnstock, 2006b). V CNS mohou ATP uvolňovat vedle neuronů i glie (Queiroz a spol., 1997; Queiroz a spol., 1999; Cotrina a spol., 1998; Cotrina a spol., 2000). Glie kromě uvolňování přenašečů rovněž exprimují na svém povrchu mnoho typů receptorů jako např. glutamátové, dopaminové, noradrenalinové, serotoninové i purinergní (Haydon, 2001). Purinergní receptory se nacházejí zejména u astrocytů, které nejsou v nervovém systému jen pasivní komponentou, ale aktivně se podílejí na udržení extracelulárního prostředí v okolí synapse prostřednictvím regulace koncentrace extracelulárních iontů a koncentrace neuropřenašečů. Glie detekující neuropřenašeče uvolněné z axonů odpovídají na neuronální aktivitu zvýšením své intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, což spustí uvolnění přenašeče (např. glutamátu, ATP) z glie samotné a tím je zpětnou vazbou ovlivněna neuronální aktivita (Araque a spol., 1999; Fields a Stevens, 2000). Příkladem je  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní uvolnění glutamátu z astrocytů, které v retině zesílí excitační synaptický přenos prostřednictvím NMDA (N-metyl-D-aspartátových) receptorů (Newman a Zahs, 1998), nebo snížené uvolňování glutamátu z hipokampálních neuronů po vazbě ATP z astrocytů

na presynapticky lokalizované purinergní receptory. Astrocyty uvolňují ATP jako odpověď na různé podněty i spontánně díky spontánním astrocytárním  $\text{Ca}^{2+}$  vlnám. ATP uvolněné v nepřítomnosti neuronální aktivity se v hipokampu pravděpodobně uplatňuje jako tonická down-regulace excitačního synaptického přenosu (Koizumi a spol., 2003).

Uvolněním ATP z astrocytů do extracelulárního prostředí rovněž dochází k regulaci lokálního krevního toku prostřednictvím aktivace purinergních receptorů pericytů, které obsahují kontraktilní proteiny (Peppiatt a spol., 2006; Simard a spol., 2003). Extracelulární ATP dále zesiluje proliferaci astrocytů (Bolego a spol., 1997), spouští chemotaxi mikroglíí (Honda a spol., 2001; Haynes a spol., 2006) a z toho důvodu se o ATP hovoří na jedné straně jako o „gliopřenašeči“, který zprostředkovává mezibuněčnou komunikaci za fyziologických podmínek, a na druhé straně jako o varující molekule, která signalizuje kritický stav za patofyziologických podmínek (Inoue a spol., 2007).

### **3.1.3 Uvolňování ATP z ostatních buněk**

Rovněž mnoho typů buněk mimo nervový systém uvolňuje ATP. Jedná se například o trombocyty (Detwiler a Feinman, 1973), erytrocyty (Bergfeld a Forrester, 1992), mononukleární buňky (Maugeri a spol., 1990), hladké svalové buňky (Pearson a Gordon, 1979),  $\beta$  buňky pankreatu (Hazama a spol., 1998), Sertoliho buňky (Lalevée a spol., 1999), chondrocyty (Graff a spol., 2000), epitelální buňky (Ferguson a spol., 1997; Schwiebert a Zsembery, 2003), hypofyzární buňky (Stojilkovic a Koshimizu, 2001) a mnoho dalších.

Podněty k uvolnění ATP z ne-neuronálních buněk jsou různé: mechanický stres, hypoxie, acidóza, osmotický šok, zánět (Bodin a Burnstock, 2001), avšak přesný mechanismus uvolňování ATP nebyl doposud nalezen; diskutuje se několik variant. Uvolnění ATP jako odpověď na mechanické podráždění buňky bylo poprvé popsáno u uroteliálních buněk během distenze močového měchýře (Ferguson a spol., 1997). Obdobný mechanismus byl demonstrován u epitelálních buněk ureteru (Knight a spol., 2002) a epitelálních buněk colorekta (Wynn a spol., 2003). ATP se na tento podnět dále vylučuje například z odontoblastů, keratinocytů, z epitelálních buněk jazyka, z epitelálních buněk plic. Na uvolněné ATP jsou citlivá terminální senzoričká zakončení obklopující tyto buňky (Burnstock, 2006a).

Předpokládá se, že existuje více možných způsobů uvolňování ATP z ne-neuronálních buněk do mezibuněčného prostoru; potvrzen byl například průchod cytoplazmatického ATP connexinovými a pannexinovými kanály a u sekrečních buněk uvolnění ze zásobních granúl a cytoplazmatických váčků procesem exocytózy (Burnstock, 2006a). Uvažuje se také o uvolňování ATP dilatovaným pórem samotného P2X7 receptoru (Iglesias a spol., 2008).

### ***3.2 Purinergní receptory a jejich podtypy***

Purinergní receptory jsou membránové proteiny, které zprostředkovávají různé biologické děje prostřednictvím svojí aktivace vazbou extracelulárních purinů (ATP, ADP, adenosin) a pyrimidinů (UTP, UDP). Mezi krátkodobé následky této aktivace patří například synaptický přenos, kontrakce hladkého a srdečního svalu, chemosenzorická signalizace, ovlivnění humorální sekrece, změna cévního tonu, aktivace glií apod. Dlouhodobé účinky ATP zahrnují vliv na proliferaci, diferenciaci buněk a apoptózu (Volonté a spol., 2006; Khakh a North, 2006; Khakh a spol., 2001; Burnstock, 2006a; North, 2002).

Podle hlavního přirozeného agonisty byly purinergní receptory rozděleny na dvě zcela odlišné skupiny (Burnstock, 1977): P1 receptory primárně aktivované adenosinem a P2 receptory aktivované ATP, ADP a v některých případech pyrimidiny, UTP nebo UDP. Existují ionotropní a metabotropní ATP-citlivé purinergní receptory, což je zdrojem další klasifikace P2 receptorů na P2X a P2Y (Khakh a spol., 2001).

#### **3.2.1 P1 purinergní receptory**

P1 jsou metabotropní s G-proteinem spřažené receptory citlivé k adenosinu. Podle farmakologických vlastností a molekulární struktury se dělí na čtyři podtypy: A1, A2A, A2B a A3. Aktivace A1 receptorů působí inhibici adenylylcyklázy. Aktivace A2A, A2B receptorů vyústí ve stimulaci adenylylcyklázy a aktivace A3 receptoru působí jak inhibici adenylylcyklázy, tak aktivaci cesty fosfatidylinositol-fosfolipázy C. A2 receptory se dělí na A2A a A2B dle afinity adenosinu, kdy k A2A receptorům se adenosin váže se signifikantně vyšší afinitou (Ralevic a Burnstock, 1998).

### 3.2.2 P2Y purinergní receptory

Dle farmakologie a spřažení s G-proteiny byly savčí P2Y receptory rozděleny do osmi podtypů: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14 (Dubyak, 2003; Abbracchio a spol., 2003). S G<sub>q</sub>-proteinem jsou spřaženy receptory P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, s G<sub>i</sub>-proteinem P2Y12, P2Y13, P2Y14. Jednotlivé P2Y receptory jsou s různou účinností aktivovány ATP nebo ADP; některé P2Y receptory, P2Y4 a P2Y6, jsou s největší potencí aktivované UTP, takže jsou někdy rovněž označeny jako pyrimidinergní (O'Connor a spol., 1991; Dubyak, 2003).

Role ATP- a UTP-citlivých P2Y receptorů je intenzivně prostudována zejména u trombocytů, endoteliálních a epiteliálních buněk. Molekuly ATP, ADP, UTP jsou skladovány v granulech trombocytů (Goetz a spol., 1971) a nukleotidy uvolněné z adheovaných trombocytů působí pozitivním zpětným mechanismem další aktivaci destiček. Agregace trombocytů je zprostředkována zejména P2Y12 receptory (Gachet 2001) a je prokázáno, že léky ticlopidin, clopidogrel (tedy antagonisté P2Y12) jsou účinnými antitrombotickými léky: klinická studie CAPRIE (CAPRIE Steering Committee, 2001), CURE (Yusuf a spol., 2001), CREDO (Beinart a spol., 2005). Rovněž selektivní antagonist P2Y1 receptorů (látka MRS2500) vykazuje antiagregační účinky (Cattaneo a spol., 2004). Dále se ukazuje, že u zdravých jedinců existují variace v genové sekvenci P2Y1 a P2Y12 receptorů, což může vysvětlovat individuální rozdíl v riziku atherotrombózy (Fontana a spol., 2003; Hetherington a spol., 2005).

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

Cystická fibróza, onemocnění s genetickým defektem CFTR proteinu („cystic fibrosis transmembrane regulator“), je spojené s abnormálním transportem Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> iontů v epiteliích. Klinickými studiemi k terapii plicní manifestace cystické fibrózy prochází látka INS37217, specifický aktivátor P2Y2 receptorů, účinný v inhalačním

podání, dlouho metabolicky stabilní (Kellerman a spol., 2002). Aktivace P2Y2 receptorů epiteliálních buněk dýchacích cest zapříčiní uvolnění Cl<sup>-</sup> iontů prostřednictvím Ca<sup>2+</sup> aktivovaných Cl<sup>-</sup> kanálů (Knowles a spol., 1991; Mason a spol., 1991). Při aktivaci P2Y2 receptorů navíc dochází ke zvýšené tvorbě surfaktantu, zrychlení pohybu cílů a tím zlepšení clearance dýchacích cest (Gobran, 1994; Morse a spol., 2001).

### 3.2.3 P2X purinergní receptory

P2X receptory jsou ATP-citlivé kationtové kanály propustné pro Ca<sup>2+</sup>, monovalentní kationty jako Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> a malé organické kationty (Valera a spol., 1994). Doposud bylo naklonováno 7 podjednotek savčích P2X receptorů označovaných jako P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7. Jako první byl z rodiny P2X v roce 1994 naklonovaný P2X4 receptor. P2X receptorové geny jsou rozmístěny na různých chromozómech. Pouze geny pro P2X4 and P2X7 podjednotky jsou shodně lokalizované blízko konce dlouhého raménka chromozomu 12, vzdálené od sebe <130 kb (Buell a spol., 1998). To naznačuje jejich vznik genovou duplikací a pravděpodobně souvisí s tím, že napříč P2X receptory je P2X4 podjednotka svojí aminokyselinovou sekvencí nejvíce blízká P2X7 podjednotce (North, 2002). Jednotlivé P2X podjednotky se navzájem liší Ca<sup>2+</sup> permeabilitou, kinetikou desenzitizace, afinitou k agonistům, k antagonistům a alosterickým modulátorům. P2X podjednotky jsou složeny z 379 (cP2X6) až 595 (cP2X7) aminokyselin a identita aminokyselinové sekvence mezi podjednotkami kolísá v rozmezí 26-47 % (Khakh a spol., 2001). Aminokyselinová sekvence krysích P2X1-7 podjednotek (rP2X1-7) je uvedena na Obr. 1.

P2X podjednotky představují nový typ ligandem aktivovaných iontových kanálů, který se liší od kanálů typu glutamátového a acetylcholinového receptoru. Skládají se ze dvou transmembránových domén (TM1 a TM2), intracelulárního N- a C-konce a velké extracelulární kličky (Obr. 2), zatímco skupina tvořená glutamátovými nebo nikotinovými ionotropními receptory má jednu podjednotku složenou ze čtyř transmembránových domén a alespoň jeden konec extracelulární

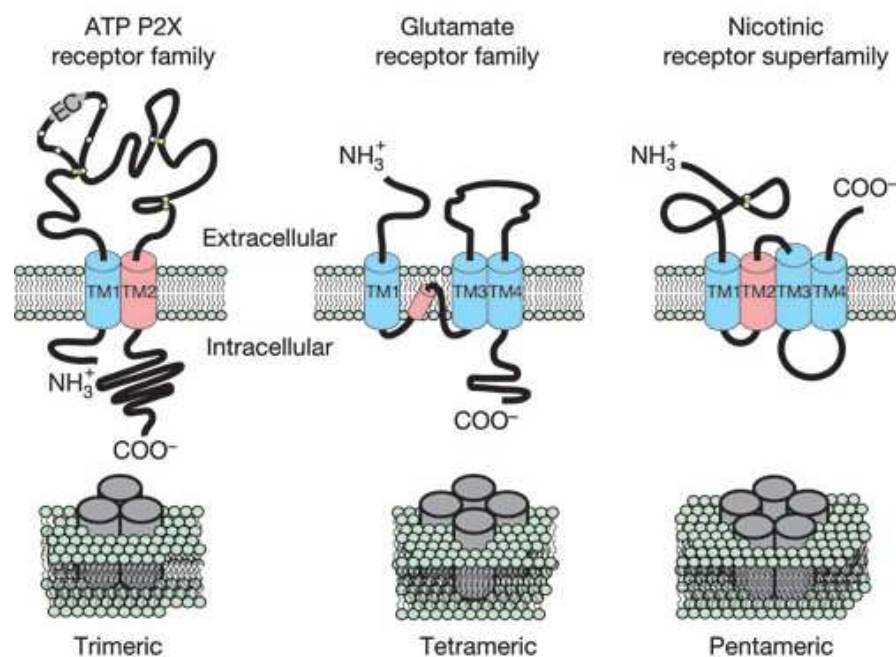
		Exon 2	
P2X1	MARRLQDELSA-FFFEYDTPRMVLVRNKKVGVIFRLIQVLVLYVIGWVVFYKGYQTS		59
P2X2	MVRRRLARGCWS-AFWDYETPKVIVVRNRRLGFVHRMVQLLILLYFVWVYFVQKSYQDSE		59
P2X3	-----MNCIS-DFFTYETTKSVVVKSWTIGIINRAVQLLIISYFVGVWFLHEKAYQVRD		53
P2X4	MAGCCSVLG-S-FLFEYDTPRIVLIRSRRVGLMNRVQLLILAYVIGWVVFWEKGYQETD		58
P2X5	MGQAAWKGFV-LSLFDYKTAKFVVAKSKVGLLYRVLQLIILLYLLIIVWFLIKKSYQDID		59
P2X6	MASAVAAALVSWGFLDYKTEKYVMTRNCWVGISQRLLQLGVVYVIGWALLAKKGYQEWD		60
P2X7	MPACCSWN----DVFOYETNKVTRIQSVNYGTIKWILHMTVFSYVS-FALMSDKLYQRKE		55
		Exon 3	
P2X1	D-LISSSVKIKLGLAVT--QLQGLG-PQ----VWDVADYVFAHGDSSFVVMINFIIVTPQ		111
P2X2	TGPESSIITKVKGITMS-----EDK-----VWDVEEYVRFPEGGSVVSIITRIEIVTPS		107
P2X3	TAIESSVVTVKVGFGRY-----ANR-----VMDVSDYVTFPQGTSVFVVIITKMIVTEN		101
P2X4	S-VVSSVTRAKGVAVT--NTSQLG-FR----IWDVADYVIPAQEENSLFIMTNMIVTVN		110
P2X5	TSLQSAVVTVKVGVAVTNTTMLGER-----LWDVADFVIPSQGENVFFVVTNLIVTPN		112
P2X6	MDPQISVITKIKGVSVTQVKELEKR-----LWDVADFVRFPSQGENVFFLVITNFLVTPA		113
P2X7	P-LISSVHTKIKGVAEVTENVTEGGVTKLVHGFIDTADYTLRLQG-NSFFVMTNLYLKSEG		113
		Exon 4	Exon 5
P2X1	QTQGHCAENPE-GG-ICDDSGCTPGKAERKAQGIKIRTGNCVFP-FNGTVK-TCEIFGWCFV		167
P2X2	QTLGTCPESEMRVHSSSTCHSDDDCIAGQLDMQNGIIRTGHCVPYHGDGSK-TCEVSAWCFV		166
P2X3	QMOGFCEPENEKYR--CVSDSQC--GPERFPGGILITGRCVN-YSSVLR-TCEIQGWCFV		155
P2X4	QTQSTCPEIPDKTS-ICNSDADCTPGSVDTHSSGVATGRCVP-FNESVK-TCEVAAWCFV		167
P2X5	QRQIGCAEREGIPDGECSDDDCCHAGESVAVAGHGLKTRCLR-VGNSTRGTCEIFAWCFV		171
P2X6	QVQGRCPPEHPSVPLANCWADEDCPEGEMGTYSHGIKTQCVV-FNGTHR-TCEIWSWCFV		171
P2X7	QEOKLCPPEYPSRGK-QCHSDQGCIKGWMQDPSKGIQTGRGIP-YDQKRR-TCEIFAWCFV		170
		Exon 6	Exon 7
P2X1	EVDDKIPSPALLREAEFTLFIKNSISFPRFKVNRRLVVEEVNGTYMKKCLYHKIQHPIC		227
P2X2	EDG-TSDNHFLGKMAPNFTILIKNSIHYPKFKFSKGNIASQKSD-YLKHCTFDQSDDPYC		224
P2X3	EVD-TVEMPIIM-MEAENFTIFIKNSIRFPLFNFEKGNLLPNLTDKDIKRCRFHPEKAPFC		209
P2X4	ENDVGVPFPFAPLKAENFTLLVKNNIWYKFNFKRNLIPNITTSYLKSCIYNAQTDPFV		227
P2X5	ETK-SMPTDPLLKDAESFTISIKNFIRFPKFNFSKANVLETDNKHFLKTCFHSSTN-LYC		229
P2X6	ESS-AVPRKPLLAQAKNFTLFIKNTVTFNKFNFSTRNALDWTWNTYFKYCLYDSLSSPYC		230
P2X7	BEGKEAPRPAALLRSAENFTVLIKNNDIIFPGHNYTTRNLLPGMNIS----CTFHKTWNPOC		226
		Exon 8	
P2X1	PVFNLYGVVRESQDFFRSLAEKGGVVGITIDWKCDDLWHVRHCKPIYQFHGL---YGEKN		284
P2X2	PIFRLGFIVEKAGENFTELAHKGGVIGVLIINWNCDDLSESECNPKYSFRRILD--PKYDF		282
P2X3	PILRVGDVVKFAGQDFAKLARTGGVLGKIKIGWVCDLAKAWDQCIPKYSFTRLIDGVSEKSS		269
P2X4	PIFRLGTIVGDAGHSFOEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASLCLPRYSFRRLDTRDLEHN		287
P2X5	PIFRLGIVRWAGADFQDIALKGGVIGIYIWDCCDLKKAASKCNPHYYFNRLDNKHTHS-		288
P2X6	PVFRIGDVLVAMTGGDFEDLALLGGAVGINIHWDCNLDTKGSDGSPQYSFRLQEQE-----		283
P2X7	PIFRLGIDIFQEIENETEVAVOGGIMGIEIYWDCCNLDVSWSHRCQPKYSFRRLLDDKYNTS		286
		Exon 9	Exon 10
P2X1	LSPGNFRFARHFVQ-NGTNRRLHFLFKVFGIHFIDILVDGKAGKFDIIPMTTIGSGIGIFG		343
P2X2	ASSGYNFRFAKYYKINGTTRTLIKAYGIRIDVIVHGQAGKFSLIPTIINLATALTSIG		342
P2X3	VSPGYNFRFAKYYKMENGSEYRITLLKAFGIRFDVLYGNAGKFNIIPTIISVAAFSTVG		329
P2X4	VSPGYNFRFAKYYRDLAGEQRTLLTKAYGIRFDIIVFGKAGKFDIIPMTINVGSLALLG		347
P2X5	ISSGYNFRFARYYRDPNGVEFRDLMKAYGIRFDVIVNGKAGKFSIIPTINIVGSLALMG		348
P2X6	--RGNFRITANYWVAASGVESRSLKLYGIRFDIIVTGOAGKFAIIPTAIVTGTGAAWLG		341
P2X7	LFPGYNFRFAKYYKE-NGMEKRTLIKAFGVRFDILVFGTGGKFDIILQLVVYIGSTLSYFG		345
		Exon 11	
P2X1	VATVLCDDLHLH-----ILPKRHYYKQKFKPXAEDMGPGEGEHDPV		384
P2X2	VGSFLCDWILLT-----FMNKNKLYSHKPKDKVRTPKHPSSRWPVTL		384
P2X3	VGTVLCDIILLN-----FLKGADHYKARKFEEVTETTLKGTASTNPV		371
P2X4	VATVLCDVIVLY-----CMKKYYVYRDKKYKYVEDYEQGLSGEMNQ		389
P2X5	AGAFFCDLVLIY-----LIRKSEFYRDKKFEKVRGQKEDANVEVEAN		390
P2X6	MVTFLCDLILLY-----VDREAGFYWRTKYEEARAPKATTNSA 379		
P2X7	LATVCIIDLIINTYASTCCRSRVYPSCKCCEPCAVNEYVYRKKCEPIVEPKPTLKYVSVFD		405
P2X1	ATSSTLGLQENMRTS 399		
P2X2	ALVLGQIPPPPSHYSDQPPSPPSGEGPTLGEGAEPLAVQSPRPCSISALTEQVVDTLG		444
P2X3	FASDAQATVEKQSTDSGAYSIGH 393		
P2X5	EMEQRPEDEPLERVRQDEQSQELAQSGRQKNSNCQVLLLEPARFGLRENAIVNVKQSQIL		450
P2X7	EPHIWVDQQLLKGSLQDVKGQEVPRPQTDFFLELSLSLSLHHSPPIPGQPEEMQLLQIE		465
P2X2	QHMGQRPPVPEPSQQDSTSTDPKGLAQL 472		
P2X5	HPVKT 455		
P2X7	AVPRSRDSDWCQCNGNCLPSQLPENRRALEELCCRRKPGQCITTESELFISKIVLSREALQL		525
P2X7	LLLYQEPLLALEGEAINSKLRHCAYRSYATWRVFSQDMADFAILPSCCRWKIRKEFPKTO		585
P2X7	GQYSGFKPY 595		

**Obr. 1** Aminokyselínové sekvence krysích P2X1-7 podjednotek:

Vertikálními prázdnými obdélníky jsou zvýrazněny konzervované aminokyseliny, plnými šedými konzervované cysteiny. Tmavé horizontální linie nad aminokyselínovou sekvencí označují oblast hydrofobních transmembránových domén.

(převzato z North, 2002)





**Obr. 2** Základní dělení ligandem otevíraných iontových kanálů:

Horní část obrázku znázorňuje uspořádání podjednotky P2X receptoru, receptoru glutamátové rodiny a receptoru nikotinové superrodiny v membráně. Dolní část znázorňuje uspořádání podjednotek jednotlivých receptorů kolem centrálního póru kanálu. P2X receptory tvoří trimery, glutamátová rodina tetramery a nikotinová superrodina pentamery. „EC“ značí extracelulární doménu, „TM1-4“ transmembránové domény. Červeně jsou značeny TM domény, které se pravděpodobně podílí na formování stěny vodivého póru iontového kanálu. (převzato z Khakh a North, 2006)

Funkční P2XR se mohou vyskytovat ve formě homo- a heterotrimerů (Nicke a spol., 1998; Stoop a spol., 1999). Práce Torrese a kol. ukázala, že pro multimerizaci je zásadní TM2 (Torres a spol., 1999a). Podjednotka P2X6 jako jediná netvoří funkční homomery (Barrera a spol., 2005; Ormond a spol., 2006), avšak je schopná tvořit funkční heteromery (Le a spol., 1998; King a spol., 2000). Mnoho buněk exprimuje různé typy P2X podjednotek zároveň, což naznačuje, že P2XR se přirozeně často vyskytují ve formě heteromerů. Funkční studie rekombinantních receptorů prokazují, že heteromerní receptory mají odlišné farmakologické vlastnosti v porovnání s vlastnostmi odpovídajících homomerních receptorů. Funkčně a biochemicky byly doposud charakterizovány heteromery: P2X1/P2X2 (Brown a spol., 2002), P2X1/P2X4 (Nicke a spol., 2005), P2X1/P2X5 (Le a spol., 1999; Surprenant a spol., 2000), P2X2/P2X3 (Lewis a spol., 1995; Radford a spol., 1997; Jiang a spol., 2003; Wilkinson a spol., 2006), P2X2/P2X6 (King a spol., 2000) a P2X4/P2X6 (Le a spol., 1998).

Nedávno byl popsán také heteromerní receptor P2X4/P2X7 (Guo a spol., 2007), avšak jeho skutečná existence je stále nejasná. Kromě jediné studie, která ukázala, že v heteromeru P2X2/P2X3 jsou podjednotky v kompozici P2X2(P2X3)<sub>2</sub> (Jiang a spol., 2003), ostatní studie neřeší otázku upřednostňovaného poměru uspořádání jednotlivých podjednotek v heteromeru. Zda je či není možné, aby funkční P2X receptor byl formován ze tří různých podjednotek, není dosud známo. S využitím koimmunoprecipitačních technik se předpokládá formování také heteromerů P2X1/P2X3, P2X1/P2X6, P2X2/P2X5, P2X3/P2X5, P2X4/P2X5 a P2X5/P2X6 (Torres a spol., 1999b), avšak tyto heteromerní receptory prozatím nebyly charakterizovány funkčně ani farmakologicky. Uspořádání P2X receptorů do trimerů je další z rysů, který je odlišuje od ostatních skupin ligandem otevíraných iontových kanálů. Ionotropní glutamátové receptory, které se tradičně dle agonisty dělí na NMDA,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionové (AMPA) a kainátové, tvoří jeden receptor ze čtyř podjednotek. Skupina receptorů zahrnující nikotinový acetylcholinový receptor (nAChR), receptor pro kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA<sub>A</sub>R), 5-hydroxytryptaminový a glycinový receptor, tvoří jeden kanál z pěti podjednotek (Obr. 2).

P2X receptory se dále liší Ca<sup>2+</sup> propustností; mají v průměru vyšší Ca<sup>2+</sup> propustnost než nACh nebo AMPA receptory a stejnou nebo vyšší propustnost než NMDA receptory (Burnashev a spol., 1995). U většiny kanálů je iontová selektivita během opakované stimulace konstantní, avšak některé podtypy P2X receptorů jsou unikátní tím, že jejich selektivní filtr je dynamický a dlouhodobá přítomnost agonisty vede k dilataci póru kanálu, který se tak stává propustný pro větší a větší molekuly (Khakh a spol., 1999a; Virginio a spol., 1999a). Jednotková vodivost P2X kanálu je relativně malá; ~9-12 pS pro P2X4 kanál (Negulyaev a Markwardt, 2000; Evans, 1996), ~30 pS pro P2X2 kanál (Ding a Sachs, 1999b), ve srovnání např. s jednotkovou vodivostí ~50 pS NR1/NR2A glutamátového receptoru (Stern a spol., 1992).

Mezi jednotlivými membránovými receptory byl popsán tzv. funkční cross-talk, což je modulace aktivity odlišných typů kolokalizovaných receptorů při současné aktivaci jejich vlastními přenašeči. Jedná se tedy o efektivní cestu adaptace neuropřenašečové signalizace ke změnám funkčních potřeb. Negativní cross-talk byl popsán například mezi ATP P2X a nACh receptory, kdy proudy vyvolané současnou aplikací ACh a ATP jsou signifikantně menší než součet nezávislých ACh a ATP odpovědí (Nakazawa, 1994; Barajas-Lopez a spol., 1998; Zhou a Galligan, 1998; Khakh a spol., 2000). Dále byl negativní cross-talk popsán mezi P2X2 a GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub>

receptory (Sokolova a spol., 2001; Boué-Grabot a spol., 2004), mezi P2X2 a 5-hydroxytryptaminovými receptory (Boué-Grabot a spol., 2003), mezi P2X3, P2X2/3 a opiátovými receptory (Chizhnikov a spol., 2005), mezi adenosinovými a dopaminovými receptory (Gines a spol., 2000). Pro cross-talk mezi P2X2 a GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub> receptory je nezbytná interakce cytoplazmatického C-konce P2X receptoru a cytoplazmatické klíčky mezi 3. a 4. transmembránovou doménou GABA receptoru (Boué-Grabot a spol., 2004). Naopak synergický účinek byl pozorován mezi ATP a noradrenalinem, ATP a histaminem, kdy noradrenalinová nebo histaminová prestimulace zesiluje P2X1 zprostředkovanou odpověď (Smith a Burnstock, 2004).

### ***3.3 Výskyt a funkce P2X receptorů***

P2X receptory se vyskytují v mnoha tkáních a buňky často exprimují více než jeden P2X podtyp. Aktivace P2X receptorů má za následek zvýšení intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup>, a to dvěma odlišnými způsoby: jednak Ca<sup>2+</sup> ionty vstupují do buňky přímo pórem samotného P2X receptoru, navíc v excitabilních tkáních má depolarizace způsobená aktivací P2X receptoru za následek vstup Ca<sup>2+</sup> do buňky přes napětově řízené Ca<sup>2+</sup> kanály. Extracelulární ATP a P2X receptory tak mohou mít velký význam v mnoha fyziologických procesech. Neustále se objevují nové a překvapivé informace o funkcích P2X receptorů, a proto je v následujícím textu pouze zmíním a blíže se budu věnovat pouze vybraným funkcím.

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

P2X2 receptory se častěji vyskytují v nervovém systému a periferních tkáních. Jsou přítomny na nervových zakončeních i postsynaptických membránách a hrají roli v ATP-zprostředkovaném rychlém synaptickém přenosu na interneurálních synapsích. V CNS jsou lokalizovány především v kortexu, mozečku, hypothalamu, striatu, hipokampu a zadních rožích míšních (Kanjhan a spol., 1999; Burnstock a spol., 2004; Terasawa a spol., 2005; Gever a spol., 2006). P2X2 receptory tak mohou být zapojeny do regulace učení a paměti, v kontrole motorických funkcí, v senzorické integraci,

v autonomní koordinaci základních životních funkcí. V periferním nervovém systému se P2X2 receptory vyskytují na neuronech sensorických a autonomních ganglií (Simon a spol., 1997; Vulchanova a spol., 1997; Calvert a Hans, 2004; Ma a spol., 2005) a neuronech myenterických pletení (Castelucci a spol., 2002; Ohta a spol., 2005; Ren a spol., 2003). P2X2 receptory se dále nalézají například ve dřeni nadledvin (Vulchanova a spol., 1996), v endotelech a epitelech (King a spol., 1998; Hansen a spol., 1999a; Birder a spol., 2004; Housley a spol., 1999), ve skeletálních, hladkých a srdečních svalových buňkách (Ryten a spol., 2002; Hansen a spol., 1999b; Lee a spol., 2000) a v adenohipofýze (Vulchanova a spol., 1996; Stojilkovic a Koshimizu, 2001; Zemkova a spol., 2006). Funkce ATP a P2X2 receptorů v těchto tkáních ještě musí být podrobně prozkoumána, purinergní signalizace pravděpodobně hraje roli v autokrinní/parakrinní regulaci uvolňování hormonů, v kontraktilitě hladkých svalů, v pacemakerové aktivitě atd. (Gever a spol., 2006).

Zdá se, že ATP jako endogenní rychlý neuropřenašeč, je klíčový mediátor v přenosu bolesti a v mechanosenzorické transdukcii viscerálních dutých orgánů (Burnstock a spol., 1996; Cook a spol., 1997; Cook a spol., 2002; Galligan, 2004; Ford a spol., 2006). Gen kódující P2X3 protein byl poprvé naklonován ze sensorických neuronů dorzálních kořenových ganglií (DRG), jejichž centrální projekce končí v lamině II zadního rohu míšního (Chen a spol., 1995; Burnstock, 2006b). P2X3 a P2X2/3 receptory jsou lokalizovány na periferních i centrálních zakončeních nemyelinizovaných C-vláken a A $\delta$  vláken neuronů dorzálních kořenových, trigeminálních a nodózních sensorických ganglií (Bradbury a spol., 1998; Burnstock a spol., 2004; Vulchanova a spol., 1997). ATP uvolněný ze zakončení primárních sensorických nervů v zadních rozích míšních může postsynapticky aktivovat P2X4 a P2X6 receptory (Chen a Gu, 2005; Abbracchio a Burnstock, 1998) zatímco jeho působení na presynaptické P2X3 a P2X2/3 receptory potencuje uvolnění glutamátu v oblasti lamina II (Gu a MacDermott, 1997; Nakatsuka a Gu, 2001; Nakatsuka a spol., 2003). Při chronickém konstričním poranění nervu dochází v ipsilaterální oblasti zadních rohů míšních ke zvýšené neuronální expresi P2X3 receptorů (Novakovic a spol., 1999), a dále je zde pozorována aktivace mikroglíí spojená s jejich zvýšenou proliferací, hypertrofií a se zvýšenou expresí P2X4 receptoru (Inoue a spol., 2007). Toto zvýšení mikroglíální exprese P2X4 receptorů nebylo pozorováno u modelů zánětlivé bolesti (Honore a spol., 2000). Mikroglíální P2X4 receptory mohou být aktivovány ATP uvolněným z primárních nervových zakončení nebo z astrocytů. Předpokládá se,

že po aktivaci P2X4 mikroglialních receptorů se z gliálních buněk uvolňuje faktor BDNF (brain-derived neurotrophic factor), který působí kolaps neuronálního transmembránového aniontového gradientu s následným depolarizujícím působením glycinu a GABA (Coull a spol., 2005). Díky uvolnění dalších prozánětlivých faktorů z aktivovaných mikroglíí (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) dochází navíc k pozitivní modulaci glutamatergní transmise (Viviani a spol., 2003; Vikman a spol., 2003). Dále je zajímavé, že intratekální aplikace kultury in vitro aktivovaných mikroglíí (aktivovaných pomocí ATP) napomáhá vzniku taktilní allodynie během 3-5 hodin u zvířat bez neuronálního poškození, a tento efekt je reverzibilní po intratekální aplikaci purinergních antagonistů (Tsuda a spol., 2003). Navíc terapie P2X4 antisense oligonukleotidy působí preventivně proti vzniku bolesti při konstričním poškození nervu (Inoue a spol., 2007). Látka A-317491 (5-[(3-phenoxybenzyl)[(1S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]amino]carbonyl)-1,2,4 benzenetricarboxylic acid) je vysoce afinitní, selektivní nenukleotidový antagonist P2X3 a P2X2/3 receptorů, a při intratekální aplikaci působí antinocicepčně u krysího modelu chronické zánětlivé a neuropatické bolesti. Ačkoliv je látka A-317491 účinná u modelů chronické bolesti, je neefektivní u zvířecích modelů akutní bolesti (McGaraughty a spol., 2003; Jarvis a spol., 2002). Terapie zvířat P2X3 antisense oligonukleotidy rovněž snižuje termální hyperalgezií a taktilní allodynii (Barclay a spol., 2002; Honore a spol., 2002).

ATP je dále klíčový mediátor v mechanosenzorické transdukcii viscerálních dutých orgánů, jelikož distenze orgánů je doprovázena uvolněním ATP z epitelíí. ATP pak aktivuje subepiteliální nervová zakončení prostřednictvím P2X3 a P2X2/3 receptorů a tím se spouští sensorický přenos do CNS. Tímto způsobem například ATP uvolněné z epiteliálních buněk během distenze močového měchýře způsobí prostřednictvím aktivace P2X receptorů na subepiteliálních sensorických zakončeních iniciaci vylučovacího reflexu (Cockayne a spol., 2000).

P2X4 podjednotka má nejširší distribuci z P2X rodiny. Studie mRNA a proteinové lokalizace ukazují, že P2X4 podjednotka se nachází v rozličných částech krysího mozku, zejména v Purkyňových buňkách cerebella, v hipokampu (Bo a spol., 1995; Soto a spol., 1996a,b; Rubio a Soto, 2001), v buňkách pia mater, v malých cévách mening (Bo a spol., 2003), v zadních rozích míšních (Collo a spol., 1996), v neuronech autonomních a sensorických ganglií (Bo a spol., 2003). P2X4 podjednotka je dále exprimovaná neurony submukózních a myenterických nervových plexů gastrointestinálního traktu (Bo a spol., 2003), epiteliálními buňkami a hladkými

svalovými buňkami trachey a bronchů (Buell a spol., 1996; Zsembery a spol., 2003), také epitelii a hladkými svalovými buňkami gastrointestinálního traktu, močového měchýře, vaginy, ureteru (Bo a spol., 2003; Slater a spol., 2000), hladkými svalovými buňkami cév (Nori a spol., 1998; Lewis a Evans, 2001), endoteliemi cév (Yamamoto a spol., 2000; Ramirez a Kunze, 2002). Exprese P2X4 receptoru byla rovněž prokázána ve sběrných kanálcích ledvin (McCoy a spol., 1999), v interlobulárních duktech pankreatu (Novak, 2008), ve žlučových cestách jater, v adipocytech, v epitelu rohovky, ve folikulárních ovariálních buňkách (Bo a spol., 2003), v acinárních buňkách a interlobulárních duktech příušní žlázy (Turner a spol., 1998; Buell a spol., 1996; Tenneti a spol., 1998), na osteoklastech (Naemsch a spol., 1999), lidských B lymfocytech (Sluyter a spol., 2001), thyroideálních folikulárních buňkách (Glass a Burnstock, 2001) a v laktotropních buňkách hypofýzy (Stojilkovic a Koshimizu, 2001; He a spol., 2003b). Funkce P2X4 receptoru je však ve většině těchto tkání zatím nejasná (Gever a spol., 2006).

Jak již bylo uvedeno, ukazuje se důležitost P2X4 receptorů v patogenezi neuropatické bolesti, kdy dochází ke zvýšení mikrogliaální exprese P2X4 receptorů v ipsilaterální oblasti zadních rohů míšních (Inoue a spol., 2007). Zvýšená exprese mikrogliaálních P2X4 receptorů byla popsána rovněž v ischemických oblastech CNS (Cavaliere a spol., 2003), v oblasti gliomů (Guo a spol., 2004), v oblasti traumatického poranění mozku a míchy (Zhang a spol., 2007; Schwab a spol., 2005). Tyto nálezy ukazují, že změna v expresi mikrogliaálních P2X4 receptorů je obecný fenomén doprovázející poškození CNS. P2X4 receptory tak mohou hrát důležitou úlohu v široké škále CNS poruch.

Receptory P2X5 se nejčastěji vyskytují v diferencujících se tkáních, zahrnujících osteoblasty (Naemsch a spol., 1999), epitelální buňky nosní sliznice (Gayle a Burnstock, 2005), střeva (Groschel-Stewart a spol., 1999), močového měchýře a močodů (Lee a spol., 2000), kůže (Greig a spol., 2003; Groschel-Stewart a spol., 1999; Inoue a spol., 2005), ve skeletálních svalech (Collet a spol., 2002; Meyer a spol., 1999; Ryten a spol., 2001).

P2X6 podjednotka je běžně exprimována v CNS, zejména v mozečku (Purkyňovy buňky), v hipokampu (Bobanovic a spol., 2002; Xiang a Burnstock, 2005; Burnstock a Knight, 2004). Exprese P2X6 receptorů byla dále prokázána v epitelu bronchů (Collo a spol., 1996), v epitelích slinných žláz (Worthington a spol., 1999), ve skeletálních svalových buňkách (Meyer a spol., 1999), v buňkách žláz dělohy (Collo

a spol., 1996). Jelikož P2X6 netvoří funkční homomery, pravděpodobně vytváří heteromerní kanály v kombinaci s jinou P2X podjednotkou exprimovanou v těchto tkáních. Naše předběžné výsledky naznačují, že by mohlo jít o inhibiční podjednotku, která má „brzdící“ účinek a brání buňku před nadměrnou aktivací P2X4 receptoru (Vávra a spol., SFN, Washington 2008).

P2X7 receptor je fyziologicky velmi významný a je intenzivně zkoumán. Pravděpodobně netvoří heteromery a nachází se zejména v buňkách imunitního systému: makrofágách, lymfocytech, žírných buňkách a mikroglíích. P2X7 receptory hrají roli v apoptóze buněk a to několika mechanismy. Přímý způsob je lýza buňky způsobená progresivní dilatací póru (Virginio a spol., 1999a,b). Makrofágy a mikroglie podléhají ATP-indukované apoptóze také prostřednictvím P2X7-zprostředkovaného uvolnění interleukinu-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), což ve finále vede k aktivaci řady kaspáz (Ferrari a spol., 1997a,b; Hughes a spol., 2007). Snížená exprese P2X7 receptoru byla nalezena v nádorových buňkách (Zhou et al., 2008), inhibice aktivní role P2X7 receptoru v apoptóze je tak pravděpodobně jednou z příčin buněčné proliferace.

Kromě výše zmíněných funkcí hrají P2X receptory roli také v modulaci uvolňování hormonů. Příkladem je působení ATP v buňkách adenohipofýzy. Laktotropy exprimují P2X3, P2X4 a P2X7 receptory, gonadotropy a somatotropy exprimují P2X2 receptory (Stojilkovic a Koshimizu, 2001; He a spol., 2003b; Zemkova a spol., 2006, 2008). Molekuly ATP jsou skladovány s hormony v sekrečních vezikulech a jsou na podnět společně uvolňovány. ATP byla v adenohipofýze prokázána autokrinní/parakrinní role, regulovaná přítomnými ektonukleotidázami. Aktivace P2X receptorů exprimovaných na adenohipofyzárních buňkách vede k amplifikaci Ca<sup>2+</sup> signálu buněk a ke zvýšené sekreci hypofyzárních hormonů spuštěné hypothalamickými hormony (Koshimizu a spol., 2000). Naše laboratoř je vedle studia struktury rekombinantních P2X receptorů zaměřena na studium funkce P2X receptorů přirozeně se vyskytujících v hypofyzárních buňkách, především gonadotropech. Gonadotropy exprimují receptory pro gonadotropin-releasing hormon (GnRH) spojené s G<sub>q/11</sub> proteinem, jejichž stimulace vede k produkci inositol trifosfátu a oscilačnímu uvolnění Ca<sup>2+</sup> z intracelulárních zdrojů (Zemkova a Vanecek, 1997; Balik a spol., 2008). U gonadotropních buněk byla prokázána exprese P2X2a a P2X2b receptorů (Koshimizu a spol., 1998a; Zemkova a spol., 2006). P2Y receptory nejsou gonadotropními buňkami exprimovány. U spontánně aktivních gonadotropů ATP zvyšuje frekvenci pálení akčních potenciálů v dávce závislým způsobem, u tichých

buněk ATP indukuje depolarizující proud, který iniciuje pálení akčních potenciálů. Bazální sekrece luteinizačního hormonu (LH) v nepřítomnosti GnRH je nízká, vzhledem k nepřítomnosti vazby mezi spontánními akčními potenciály gonadotropů a LH sekrecí. Vstup  $\text{Ca}^{2+}$  stimulovaný extracelulárním ATP vede k přechodnému propojení mezi salvou akčních potenciálů a sekrecí LH a rovněž navyšuje frekvenci akčních potenciálů během GnRH odpovědi a významně zvyšuje GnRH-indukovanou LH sekreci (Zemkova a spol., 2006).

### **3.4 Struktura P2X podjednotek**

P2X podjednotky se skládají ze dvou hydrofobních transmembránových domén, intracelulárního N- a C- konce a rozsáhlé extracelulární kličky (Brake a spol., 1994; Valera a spol., 1994; Newbolt a spol., 1998). (viz Obr. 2)

#### **3.4.1 Extracelulární doména**

Ektodoména P2X receptorů pravděpodobně obsahuje 3 ATP vazebná místa (Bean a spol., 1990), avšak jejich lokalizace a konformační změny během navazování a odnavazování agonisty a během otevírání a zavírání iontového kanálu nejsou stále dostatečně objasněny.

V extracelulární doméně všech P2X receptorů bylo identifikováno 10 konzervovaných cysteinových zbytků. Tvoří intramolekulární disulfidové můstky a podílejí se tak na tvorbě terciární struktury receptoru, což je unikátní v porovnání s jinými receptory (Smith a Burnstock, 2004; Clyne a spol., 2002). Experimentálně definovanými partnery jsou následující cysteinové páry: Cys<sup>117</sup>-Cys<sup>165</sup>, Cys<sup>126</sup>-Cys<sup>149</sup>, Cys<sup>132</sup>-Cys<sup>159</sup>, Cys<sup>217</sup>-Cys<sup>227</sup> a Cys<sup>261</sup>-Cys<sup>270</sup> (číslování platné pro lidský P2X1 receptor) (Ennion a Evans, 2002a). Podobně jako u jiných receptorů je extracelulární doména všech P2X receptorů glykosylována. Glykosylace je nezbytná pro spojení podjednotek do funkčního receptoru a pro jeho povrchovou expresi (Torres a spol., 1998; Rettinger a spol., 2000). Počet konzervativních motivů pro N-glykosylaci (Asn-X-Ser/Thr) se u jednotlivých podjednotek liší (P2X1 – 4, P2X2 – 3, P2X3 – 4, P2X4 – 6, P2X5 – 2, P2X6 – 3, P2X7 – 3) (North, 2002). Glykosylace jednoho motivu je dostačující pro funkčnost receptoru, zatímco pro zabudování receptoru do plazmatické membrány je potřebná glykosylace dvou těchto míst (Newbolt a spol., 1998; North, 2002).



Disulfidové můstky a glykosylační místa mohou determinovat strukturu ektodomény P2X receptorů, avšak nejsou kritické pro ATP vazbu.

Substituce aminokyselin ektodomény P2X1 receptoru odhalila důležitost některých aminokyselinových zbytků (reziduí) pro ATP vazbu: Lys<sup>68</sup> v blízkosti TM1 domény a Phe<sup>291</sup>, Arg<sup>292</sup>, Lys<sup>309</sup> v blízkosti TM2. Model ATP vazebné domény založený na datech z mutagenese (Roberts a Evans, 2004; Ennion a spol., 2000; Jiang a spol., 2000) a krystalové struktury krysího synapsinu II (Roberts a spol., 2006) navrhuje interakci kladně nabitých reziduí Lys<sup>68</sup>, Lys<sup>309</sup> se záporně nabitými  $\beta$ - a  $\gamma$ -fosfátovými skupinami, rezidua Arg<sup>292</sup> s  $\alpha$ -fosfátem a interakci aromatických reziduí Phe<sup>185</sup>, Phe<sup>291</sup> s adeninovým kruhem molekuly ATP (Roberts a Evans, 2004). Tento model je ve shodě s hypotézou, že adeninový kruh je vmezeřen mezi tyto dva aminokyselinové zbytky podobně, jako je to pozorováno v krystalické struktuře 5'-nukleotidáz (Knofel a Strater, 2001).

Freist a kol. (Freist a spol., 1998) vytvořil teoretický model ATP vazebného místa na základě podobnosti aminokyselinové sekvence katalytického centra aminoacyl-tRNA syntetáz třídy II a ektodomény P2X receptorů. Rovněž Yan a kol. (Yan a spol., 2005) využili této podobnosti a na základě krystalových struktur t-RNA syntetáz vytvořili 3D model ektodomény P2X4 receptoru, který ověřili funkční studií pomocí mutagenese. ATP se obecně váže v komplexu s Mg<sup>2+</sup> ionty a oba modely se shodly v tom, že Asp<sup>280</sup> (P2X4 číslování) koordinuje ATP vazbu interakcí s Mg<sup>2+</sup> iontem. Phe<sup>230</sup> rozpoznává adeninový kruh, Lys<sup>190</sup> rozpoznává  $\alpha$ -fosfát. V modelu Yana a kol. interaguje His<sup>286</sup> s  $\beta$ -fosfátem a Arg<sup>278</sup> s  $\gamma$ -fosfátem. V modelu Freista a kol. se předpokládá interakce Arg<sup>318</sup> s  $\gamma$ -fosfátem, v modelu Yana se předpokládá interakce Arg<sup>318</sup> s deoxyribózovým kruhem. Oba modely jsou ve shodě s lokalizací celého ATP vazebného místa v extracelulární kličce jedné podjednotky. Úsek ektodomény Lys<sup>313</sup>-Ile<sup>333</sup> hraje roli v přenosu signálu k TM doménám (Yan a spol., 2006).

Mutace Lys<sup>190</sup> u lidského P2X1 receptoru (ekvivalent Lys<sup>190</sup> u P2X4) měla za následek snížení citlivosti k ATP, zde si tedy práce Evanse a Yana odpovídají. Avšak mutace Phe<sup>230</sup> a Arg<sup>314</sup> u lidského P2X1 receptoru (ekvivalent Phe<sup>230</sup>, Arg<sup>318</sup> P2X4) neměla žádný vliv na účinnost ATP (Roberts a Evans, 2004). Jednotlivé modely se tedy v některých výsledcích shodují, v jiných se liší. Může to být vysvětleno tím, že byly vytvořeny pro různé P2X receptory s různou citlivostí k ATP a je otázkou, do jaké míry jsou jejich ATP vazebná místa shodná. Další možností je vazba molekuly

ATP mezi podjednotky a vysvětlení jedné podjednotky pak nemusí být dostačující ke zmapování celého ATP vazebného místa. Kritická role reziduí Lys<sup>69</sup>, Lys<sup>308</sup> (P2X2 číslování) ve formování vazebné kapsy podporuje hypotézu o organizaci ATP vazebného místa mezi podjednotkami (Wilkinson a spol., 2006; Zemkova a spol., 2007). V souladu s touto hypotézou se na vazebném místě pro zinek v ektodoméně P2X2 receptoru podílejí histidiny ze sousedících podjednotek (Nagaya a spol., 2005).

### 3.4.2 Transmembránové domény

U většiny kanálů se známou strukturou mají transmembránové segmenty lemující pár  $\alpha$ -helikální sekundární strukturu (Doyle a spol., 1998; Dutzler a spol., 2002; Jiang a spol., 2003; Miyazawa a spol., 2003). Rovněž u aktivovaného P2X2R se předpokládá, že obě TM domény mají  $\alpha$ -helikální strukturu (Rassendren a spol., 1997a; Egan a spol., 1998; Haines a spol., 2001a; Jiang a spol., 2001; Migita a spol., 2001; Li a spol., 2004; Khakh a Egan, 2005). Během přípravy mé práce byl publikován článek, v němž se autoři zaměřili na strukturu TM domén také u P2X4 receptoru a to prostřednictvím tryptofanové skenovací mutagenese. Zaměnili všechny transmembránové aminokyselinové zbytky, jeden po druhém, za tryptofan a hodnotili změny citlivosti mutovaných receptorů k ATP. Výsledky jejich práce potvrdily hypotézu o  $\alpha$ -helikálním uspořádání TM1 domény a části TM2 domény u P2X4 receptoru (Silberberg a spol., 2005).

Obě TM domény jsou zapojeny v mechanismu „gatingu“ (Egan a spol., 1998; Jiang a spol., 2001; Li a spol., 2004; Silberberg a spol., 2005; Silberberg a spol., 2007). Pojmem „gating“ iontového kanálu se označují konformační změny v molekule proteinu, které nastávají mezi otevřeným-uzavřeným a uzavřeným-otevřeným stavem jako odpověď na specifický podnět (Colquhoun, 1998). Během aktivace kanálu dochází k největším pohybům v částech transmembránových domén, které jsou blízké ektodoméně: v úsecích Tyr<sup>42</sup>-Val<sup>47</sup> a Thr<sup>335</sup>-Leu<sup>346</sup> (P2X4) (Silberberg a spol., 2005). Přesný mechanismus gatingu není popsán. TM2 doména má dominantní roli ve funkcích receptoru jako je pospojování podjednotek, iontová selektivita, permeabilita pro dvojmocné ionty (Egan a spol., 1998; Migita a spol., 2001; Li a spol., 2004; Samways a Egan, 2007; Li a spol., 2008). TM1 doména je méně důležitá v kontrole toku iontů (Jiang a spol., 2003; Khakh a Egan, 2005; Samways a spol., 2008), částečně se podílí na kontrole Ca<sup>2+</sup> permeability (Samways a spol., 2008) a změně póru

z relativně selektivního v dilatovaný stav (Khakh a Egan, 2005). TM1 doména však hraje roli v dalších funkcích; například náhrada TM1 domény P2X2 podjednotky za TM1 z  $\alpha,\beta$ -meATP-senzitivní P2X1 nebo P2X3 podjednotky způsobí citlivost chiméry k  $\alpha,\beta$ -meATP ( $\alpha,\beta$ -metylen-adenosin-5'-trifosfátu) (Haines a spol., 2001b). Nicméně strukturální nebo dynamické aspekty, které hrají roli v této změně, nejsou známy. Alaninová skenovací mutagenese P2X2R odhalila, že konzervovaná aromatická aminokyselina tyrosin na pozici 43 TM1 domény hraje důležitou roli v receptorové funkci, její substituce zvyšuje citlivost k agonistům (Li a spol., 2004).

Uspořádání TM domén kolem póru kanálu není přesně známo, nově byla nastíněna hypotéza, že TM2 lemuje pór a TM1 doména se nachází periferněji (Silberberg a spol., 2005; Li a spol., 2008). Většina reziduí necitlivých k mutagenesi, je lokalizována v části TM1 domény P2X4 receptoru blízké N-konci (pod Ile<sup>39</sup>), což může být vysvětleno velkou lipidovou expozicí tohoto úseku. Naproti tomu úsek TM1 domény blízký ektodoméně obsahuje rezidua silněji citlivá k záměně, a proto se předpokládá, že tento úsek pravděpodobně silněji interaguje s jinou podjednotkou (Silberberg a spol., 2005). Těsný kontakt TM1 a TM2 sousedních podjednotek v úsecích blízkých ektodoméně byl rovněž prokázán možností tvorby disulfidové vazby mezi V48C a I328C (P2X2R) (Spelta a spol., 2003; Jiang a spol., 2001; Khakh a Egan, 2005).

Každá transmembránová doména obsahuje dvě aminokyseliny konzervované napříč všemi P2X podjednotkami. Jedná se o Gly<sup>30</sup>, Tyr<sup>43</sup>, Gly<sup>342</sup>, Asp<sup>349</sup> (P2X2 číslování). Při alaninové skenovací mutagenesi TM domén, která byla dosud provedena pouze u nedesenzitizujícího P2X2 receptoru, se záměna G30A neprojevila změnou v ATP citlivosti ani v rychlosti deaktivace kanálu. Mutace Y43A se lišila v ATP citlivosti a rychlosti deaktivace od divokého typu (WT) P2X2 receptoru. Vzhledem k tomu, že se ATP vazebné místo s největší pravděpodobností nachází v ektodoméně, svědčí to o důležitosti této konzervované aminokyseliny v „gating“ mechanismu. Mutace G342A se také projevila výraznou změnou v ATP citlivosti, mutací D349A vznikl nefunkční P2X2 kanál. Změny naznačují důležitost konzervovaných aminokyselin Tyr<sup>43</sup>, Gly<sup>342</sup>, Asp<sup>349</sup> v kinetice P2X2 kanálu (Li a spol., 2004). Tryptofanová mutagenese P2X4 receptoru potvrdila důležitost konzervovaných aminokyselin. U mutace G29W (odpovídá pozici G30 P2X2) nedošlo k výrazným změnám ATP citlivosti oproti WT receptoru, avšak záměna Y42W (Y43 u P2X2) způsobila zvýšení ATP citlivosti. Záměna G347W (G342 u P2X2) se projevila

výrazným snížením citlivosti kanálu, záměna D354W (D349 u P2X2) vyústila ve vznik nefunkčního kanálu (Silberberg a spol., 2005).

### 3.4.3 Intracelulární N- a C- konec

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

V délce intracelulárního C-konce jsou mezi jednotlivými P2X podjednotkami značné rozdíly (27 aminokyselin u P2X6 až 239 u P2X7), přesto u všech podjednotek byl na tomto konci identifikován konzervovaný YxxxK motif. Nachází se v blízkosti TM2 a je asociován s efektivitou exprese receptoru na buněčném povrchu (Chaumont a spol., 2004). P2X7 receptor má nejdelší C-konec a zvažuje se, že terminálních 180 aminokyselin je zapojeno ve stabilizaci receptoru a interakci s lipidy (Denlinger a spol., 2001; Denlinger a spol., 2003; Smart a spol., 2003). Interakce P2X2 receptoru s jinými ligand vázícími kationovými kanály (5-HT<sub>3A</sub>, α3β4 nAChR, GABA<sub>C</sub>R) je spojována s reziduy 374-469 na C-konci receptoru (Boue-Grabot a spol., 2003, 2004). C-konec je rovněž zapojen v modifikaci desenzitizace. Například sestříhová varianta P2X2 receptoru se zkráceným C-koncem (P2X2b receptor, kterému chybí 69 aminokyselin: Val<sup>370</sup>-Gln<sup>438</sup> včetně) desenzitizuje přibližně 5krát rychleji než varianta nezkrácená (Koshimizu a spol., 1998b).

### 3.5. *Selektivita P2X kanálů*

P2X receptory se označují jako neselektivní kationtové kanály. Propustnost monovalentních kationtů P2X2 kanálu je odstupňována v pořadí: K<sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup>. Toto pořadí je odlišné od relativní pohyblivosti iontů ve vodě a proto se uvažuje, že ionty interagují při průchodu pórem se specifickým vazebným místem o slabé elektrické síle (Ding a Sachs, 1999a,b). Při záměně aminokyselin Thr<sup>339</sup> a Ser<sup>340</sup> se změnilo pořadí propustnosti monovalentních kationtů na obdobné pořadí relativní pohyblivosti iontů ve vodě (Migita a spol., 2001).

Aktivace P2X receptorů způsobuje prostup  $\text{Ca}^{2+}$  iontů pórem kanálu a následné zvýšení intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrace. Propustnost pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty je relativně vysoká, z celkového ATP-indukovaného proudu je  $\text{Ca}^{2+}$  ionty neneseno 2.7 % (P2X3) až 11-12 % (P2X4, P2X1) (Egan a Khakh, 2004). Stejně bodové mutace, které u P2X2 receptoru ovlivnily propustnost monovalentních kationtů, ovlivňují i propustnost  $\text{Ca}^{2+}$  iontů: záměna aminokyselin Thr<sup>336</sup>, Thr<sup>339</sup>, Ser<sup>340</sup> snižuje  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitu. Tato rezidua jsou pravděpodobně součástí selektivního filtru P2X2 póru (Migita a spol., 2001; Egan a Khakh, 2004; Samways a Egan, 2007; Li a spol., 2008). Zmíněná rezidua však nejsou konzervovaná, takže u jiných podjednotek se mohou na filtru podílet jiná rezidua, což by vysvětlilo rozdíly v propustnosti mezi P2X receptory.

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

### **3.6 Farmakologické vlastnosti P2X receptorů**

Jednotlivé P2X podjednotky jsou funkčně odlišné v citlivosti k agonistům, antagonistům a alosterickým modulátorům (North, 2002).

#### **3.6.1 Agonisté P2X receptorů**

P2X podjednotky mají různou citlivost k ATP, o čemž vypovídají lišící se koncentrace, které vyvolávají polovinu maximální odpovědi ( $\text{EC}_{50}$ ). Hodnota  $\text{EC}_{50}$

agonisty ATP je pro P2X1R  $\sim 1 \mu\text{M}$  (Evans a spol., 1995; Valera a spol., 1994), pro P2X2R 4.6–7.4  $\mu\text{M}$  (King a spol., 1996; King a spol., 1997; Lynch a spol., 1999; Li a spol., 2004; Gever a spol., 2006), pro P2X3R 0.03–2.6  $\mu\text{M}$  (He a spol., 2002; Sokolova a spol., 2006; Pratt a spol., 2005), pro P2X4R 3.0–11.8  $\mu\text{M}$  (Yan a spol., 2005; Priel a Silberberg, 2004; Jelinkova a spol., 2006; Silberberg a spol., 2005; Gever a spol., 2006).

Některé nativní i rekombinantní P2X receptory jsou citlivé k  $\alpha, \beta$ -meATP, pomalu se degradujícím analogu ATP. Tento agonista mimikuje účinek ATP u P2X1 a P2X3 receptorů, které se tím odlišují od ostatních P2X podjednotek (North, 2002). Rozlišující vlastností mezi podjednotkami P2X1 a P2X3 je rozdílná citlivost k  $\beta, \gamma$ -metylen-adenosin-5'-trifosfátu, kdy P2X1 receptory jsou aktivovány koncentrací  $\sim 30$ krát nižší než je koncentrace potřebná k aktivaci P2X3 receptorů (Bianchi a spol., 1999; Garcia-Guzman a spol., 1997).

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

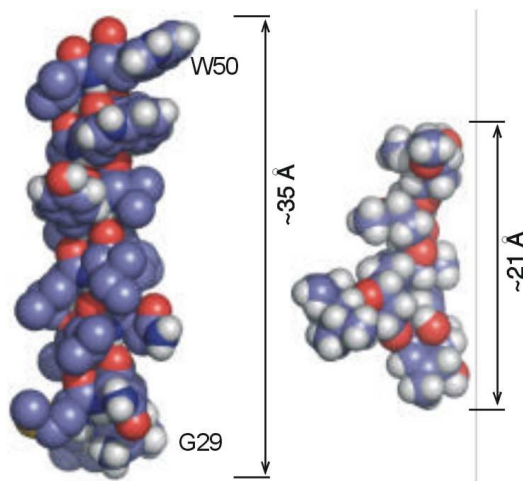
Dalším účinným agonistou je 3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5'-trifosfát, (BzATP) který specificky aktivuje P2X7 receptor. Receptor P2X7 má nízkou citlivost k ATP, k receptorové aktivaci se používají koncentrace  $\sim 100 \mu\text{M}$  a více. Naproti tomu 10-30krát účinnějším agonistou je BzATP (North,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

### 3.6.2 Antagonisté P2X receptorů

Neselektivními antagonisty P2X receptorů jsou suramin a PPADS (pyridoxal fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonová kyselina) (Evans a spol., 1995). Citlivost k těmto antagonistům se liší napříč P2X podjednotkami, například P2X4 podjednotka je oproti ostatním relativně necitlivá k inhibici suraminem a PPADS. Citlivost je obnovitelná záměnou aminokyseliny Glu<sup>249</sup> za lysin, který se nachází na ekvivalentní pozici u P2X1, P2X2 receptorů (Buell a spol., 1996).

### 3.6.3 Alosterický modulátor ivermektin

Užitečným rozlišujícím znakem P2X4 receptoru je jeho potence alosterickým modulátorem ivermektinem (IVM) (Khakh a spol., 1999b). IVM (22,23-dihydroavermektin B1a) sice působí jako agonista nebo jako alosterický modulátor i na dalších ligandem otevíraných receptorech; například na kuřecích a myších GABA<sub>A</sub> receptorech (Sigel a Baur, 1987; Krusek a Zemkova, 1994), rekombinantních glycinem aktivovaných Cl<sup>-</sup> kanálech (Shan a spol., 2001), kuřecích a lidských neuronálních  $\alpha$ 7 nACh receptorech (Krause a spol., 1998) a histaminem aktivovaných Cl<sup>-</sup> kanálech (Zheng a spol., 2002), ale v rodině P2X receptorů je jeho účinek na podtyp P2X4 specifický. Byla také popsána IVM modulace proudů P2X receptoru naklonovaného z bezobratlého organismu *Schistosoma mansoni* (schP2X), který se podobá savčímu P2X4 receptoru (Agboh a spol., 2004). Ivermektin je člen avermektinů, vzniká fermentačním působením bakterií *Streptomyces avermitilis*. Vyznačuje se vysokou molekulovou hmotností a vysokou lipofilitou (Omura a Crump, 2004). Srovnání velikosti molekuly IVM s rozsahem membrány a velikostí TM1 domény P2X receptoru je znázorněno na Obr. 3.



**Obr. 3** Model helixu TM1 domény P2X4 receptoru a molekuly ivermektinu:

Schematické srovnání 1. transmembránové domény P2X4 receptoru, znázorněné jako  $\alpha$ -helix (vlevo) a velikosti molekuly ivermektinu (vpravo). V modelu TM1 je označen Gly<sup>29</sup>, první reziduum TM1 a Trp<sup>50</sup>, první reziduum ektodomény.

Avermektiny jsou třída insekticidů a antihelmintik. V humánní medicíně se IVM využívá zejména v léčbě říční onchocerciasy (Dent a spol., 2000), kdy jeho

antiparazitický účinek je zprostředkován interakcí s glutamátem aktivovanými Cl<sup>-</sup> kanály parazita (Cully a spol., 1994; Dent a spol., 1997; Dent a spol., 2000). Tyto kanály byly nalezeny pouze u bezobratlých a jsou důležité pro funkci jejich somatických a faryngeálních svalů. Ivermektin, na rozdíl od glutamátu, indukuje pomalé otevírání kanálu, které je téměř ireverzibilní a způsobí paralýzu svalů parazita (Pemberton a spol., 2001).

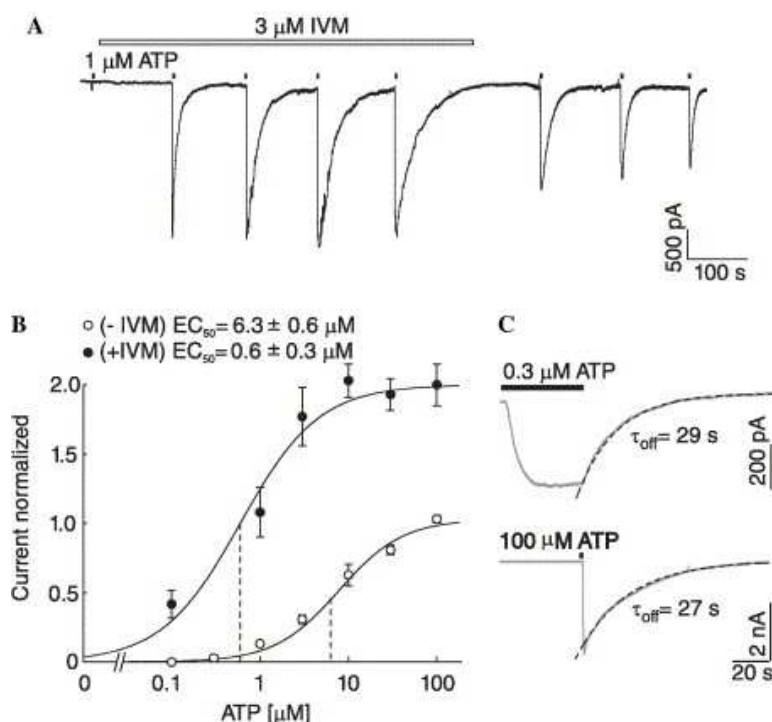
IVM sám neaktivuje P2X<sub>4</sub> receptor, působí pouze jako jeho modulátor - zvyšuje citlivost receptoru k ATP, dále působí zvýšení amplitudy proudové odpovědi a zpomalení deaktivace receptoru (Khakh a spol., 1999b; Jelinkova a spol., 2006). Analýza jednotkových kanálových proudů objasnila, že IVM působí prostřednictvím stabilizace otevřeného stavu kanálu (Priel a Silberberg, 2004). Účinek IVM je koncentračně závislý. S rostoucí koncentrací účinek IVM stoupá, maxima je dosaženo kolem 10 μM a dále již účinek klesá (Khakh a spol., 1999b; Priel a Silberberg, 2004). Při nižších koncentracích IVM (0.2 μM) je ovlivněna zejména maximální proudová amplituda ( $I_{max}$ ), při vyšších koncentracích (1 μM) je ovlivněna vedle hodnoty  $I_{max}$  i rychlost deaktivace receptoru (Priel a Silberberg, 2004).

Účinek IVM v modulaci P2X<sub>4</sub> odpovědi se rozvíjí postupně a je zcela reverzibilní (Khakh a spol., 1999b; Priel a Silberberg, 2004). Časová konstanta nástupu účinku IVM na amplitudu je pro lidský receptor exprimovaný v HEK293 buňkách stanovena na  $\tau_{on} \sim 1.9$  min a časová konstanta pro odeznění účinku po odmytí ivermektinu je  $\tau_{off} \sim 11.5$  min. Časová konstanta nástupu účinku IVM na deaktivaci je pro lidský receptor exprimovaný v HEK293 buňkách stanovena na  $\tau_{on} \sim 4.6$  min a časová konstanta pro odeznění účinku po odmytí je  $\tau_{off} \sim 2.2$  min (Priel a Silberberg, 2004).

Při expresi krysího P2X<sub>4</sub> receptoru v HEK293 buňkách je po preinkubaci 3 μM IVM amplituda proudové odpovědi vyvolané 1 μM ATP zvýšena až 20krát (Priel a Silberberg, 2004; Jelinkova a spol., 2006). Toto zvýšení odráží zvýšenou ATP citlivost receptoru, spojenou s posunem „dose response“ křivky doleva. V přítomnosti 3 μM IVM je hodnota  $EC_{50}$  pro ATP u P2X<sub>4</sub>-WT receptoru posunuta z  $\sim 6.3$  μM na hodnotu  $\sim 0.6$  μM a  $I_{max}$  je po stimulaci supramaximální koncentrací ATP (100 μM) zvýšena  $\sim 2$ krát. V nepřítomnosti IVM má P2X<sub>4</sub> receptor deaktivační časovou konstantu ( $\tau_{off}$ )  $\sim 0.4$  s, v přítomnosti 3 μM IVM po dobu 4–6 minut se zvýší hodnota  $\tau_{off}$  na  $\sim 29$  s a to nezávisle na ATP koncentraci. Po odmytí IVM se amplituda proudu



postupně snižuje k hodnotě amplitudy před IVM přítomností. Pokles je charakterizován časovou konstantou ~14 min. Po odmytí IVM je pozorován také postupný pokles doby deaktivace kanálu, charakterizovaný časovou konstantou ~3.4 min (Jelinkova a spol., 2006). Příklad modulačního účinku IVM na ATP-indukované proudy krysího P2X4 receptoru je ukázán na Obr. 4.



**Obr. 4** Modulační účinek ivermektinu (IVM) na ATP-indukované proudy krysího P2X4 receptoru exprimovaného v HEK293 buňkách:

(A) Vliv IVM na amplitudu proudové odpovědi a čas deaktivace při opakované stimulaci 1  $\mu\text{M}$  ATP (2sekundové aplikační pulsy s odstupem 2 min jsou znázorněny plnými obdélníky nad záznamem proudových odpovědí). (B) Závislost amplitudy proudových odpovědí P2X4-WT receptoru na použité koncentraci ATP v nepřítomnosti (○) a v přítomnosti (●) 3  $\mu\text{M}$  IVM. Vertikální čáry vyznačují průměrné hodnoty  $EC_{50}$ . Jednotlivé body představují aritmetický průměr  $\pm$  SEM. (C) Průběh deaktivací fáze proudových odpovědí po odmytí 0.3  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  ATP v přítomnosti IVM. Přerušované čáry představují monoexponenciální křivky, jimiž byly odpovědi proloženy.

(převzato z Jelinkova a spol., 2006)

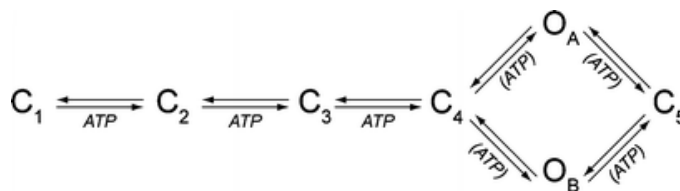
Působení IVM je nezávislé na předchozí ATP stimulaci receptoru, což naznačuje, že pro vazbu IVM není potřebné otevření iontového kanálu (Khakh a spol., 1999b). IVM moduluje P2X4 funkci při extracelulární aplikaci, ne při aplikaci

intracelulární (Priel a Silberberg, 2004). Obě zjištění by mohla znamenat lokalizaci vazebného místa IVM v ektodoméně receptoru. Avšak, na rozdíl od ATP citlivosti, při přenosu P2X4 ektodomény na páteř P2X2 receptoru, nedošlo k přenosu citlivosti k IVM (Jelinkova a spol., 2006). Při hledání vazebného místa pro IVM proto byla soustředěna pozornost na interakci s TM doménami. Spolu s jinými autory jsme tuto interakci potvrdili (Silberberg a spol., 2007; Jelinkova a spol., 2008) a navrhli pravděpodobné místo působení molekuly IVM v oblasti protein-lipidového rozhraní (tyto výsledky jsou součástí mé dizertační práce). V souladu s tímto nálezem přenos TM domén P2X4 na jiný receptor zajistil přenos citlivosti k IVM (Silberberg a spol., 2007). Přes veškerý pokrok vazebné místo IVM na P2X4 receptor však nebylo doposud přesně rozpoznáno.

### **3.7 Kinetika P2X kanálů**

„Dose response“ analýza proudových odpovědí P2X receptorů odhalila Hillův koeficient  $> 1$ , což vypovídá o tom, že pro aktivaci receptoru je nezbytná vazba více než jedné molekuly agonisty (Brake a spol., 1994). Jelikož P2X receptor je trimer a vazebné místo pro ATP je s největší pravděpodobností mezi podjednotkami (Wilkinson a spol., 2006; Marquez-Klaka a spol., 2007), jeho ektodoména pravděpodobně obsahuje 3 ATP vazebná místa (Bean a spol., 1990). Předpokládá se, že obsazením jednoho ATP vazebného místa je pozitivně kooperována vazba další molekuly ATP (Ding a Sachs, 1999b).

Bylo vytvořeno několik kinetických modelů popisujících chování P2X kanálů, avšak žádný z nich není úplný. Důvodem je obtížná analýza vlastností jednotlivých P2X kanálů. V kinetickém modelu navrženém Dingem a Sachsem (Obr. 5), je popsáno pět uzavřených stavů ( $C_{1,2,3,4,5}$ ) a dva otevřené ( $O_{A,B}$ ). Tento model byl vytvořen na základě měření charakteristik jednotlivých P2X2 kanálů (outside out patch clamp technika) v membránách HEK293 buněk a oocytů *Xenopus laevis*.



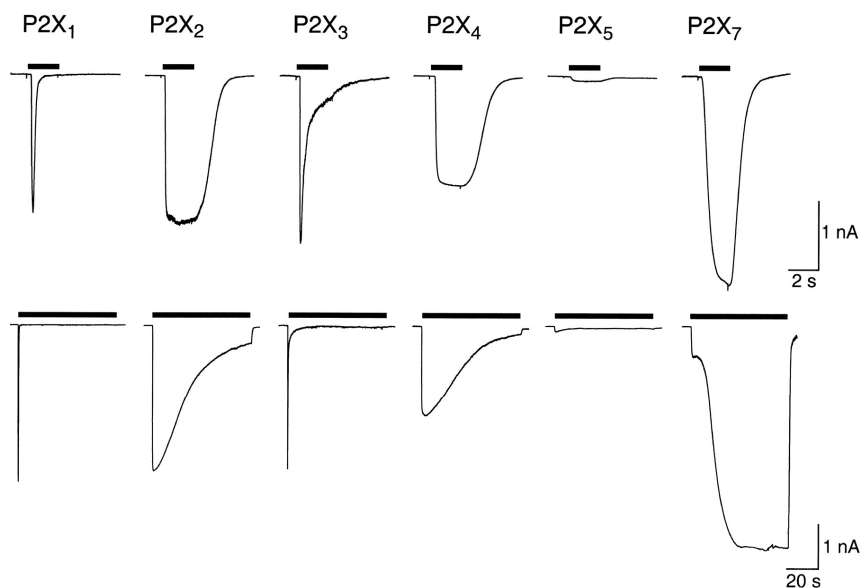
**Obr. 5** Kinetický model P2X receptoru:

C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> označují uzavřené stavy, O<sub>A</sub>, O<sub>B</sub> označují otevřené stavy kanálu. V modelu předchází otevření kanálu postupné navázání 3 molekul ATP. Kanál se otevírá po obsazení všech vazebných míst a může se vyskytovat ve dvou otevřených stavech O<sub>A</sub> a O<sub>B</sub> (stav se zvýšenou propustností pro velké ionty). Poslední stav C<sub>5</sub> je zavřený, k ATP necitlivý. (převzato z Egan a spol., 2006)

V modelu předchází otevření kanálu postupné navázání 3 molekul ATP, kdy každá vazba urychlí vazbu následující. Kanál se otevírá po obsazení všech vazebných míst a může se vyskytovat ve dvou otevřených stavech: O<sub>A</sub> a O<sub>B</sub> (stav se zvýšenou propustností pro velké ionty). Poslední stav C<sub>5</sub> je zavřený, k ATP necitlivý (Egan a spol., 2006; Ding a Sachs, 1999b). Model počítá ze stejnou cestou aktivace a deaktivace kanálu. Rychlost deaktivace je tak závislá na rychlosti odvazování ligandu a afinitě ATP vazebného místa. Ding a Sachs v tomto modelu nezávázili vzájemnou interakci P2X kanálů. Simultánní otevření dvou a více P2X kanálů je pozorováno častěji, než je očekáváno u kanálů na sobě nezávislých (Ding a Sachs, 2002). Předpokládá se tedy, že aktivita jednoho kanálu ovlivní aktivitu druhého P2X kanálu způsobem, který odpovídá přímé protein-proteinové interakci. V modelu dále není zahrnuta časová závislost zvýšení permeability pro NMDG<sup>+</sup>, která je typická pro přechod k O<sub>B</sub> stavu. Nedávno bylo navíc prokázáno, že P2X kanál se může otevřít i v případě, kdy nejsou ligandem obsazena všechna vazebná místa (Wilkinson a spol., 2006). K tomu dochází například i u AMPA (Rosenmund, 1998) nebo glycinového receptoru (Beato a spol., 2002).

V přetrvávající přítomnosti agonisty dochází k desenzitizaci receptoru, způsobené přechodem ligandem obsazeného kanálu do stabilní konformace, v níž je propustnost pro ionty změněna. Jednotlivé podtypy P2X receptorů se liší rychlostí desenzitizace. Pořadí WT receptorů od nejrychleji desenzitizujících je následující: P2X1=P2X3 > P2X2b > P2X4 > P2X2a. Receptor P2X7 nedesenzitizuje (North, 2002; North a Barnard, 1997) Kinetika desenzitizace P2X receptorů je znázorněna na Obr. 6.

Přesný mechanismus desenzitizace a resenzitizace P2X receptorů nebyl doposud popsán.



**Obr. 6** Kinetika desenzitizace P2X receptorů při krátké a dlouhé stimulaci agonistou ATP:

Krátká stimulace (horní panel) trvá 2 s, dlouhá stimulace (dolní panel) 60 s. V obou případech bylo použito 30  $\mu$ M ATP (v případě P2X7 receptoru 1 mM ATP). (převzato z North, 2002)

Ze studia chimérních receptorů je známo, že pro rychlou desenzitizaci P2X1 receptoru jsou zásadní dva 34aminokyselinové úseky zahrnující TM domény a přiléhající rezidua (~14) na intracelulárních koncích. Z toho vyplývá, že pro uzavření kanálu v přetrvávající přítomnosti agonisty jsou nutné konformační změny zahrnující obě TM domény (Werner a spol., 1996). Dále je známo, že desenzitizaci receptoru ovlivňuje fosforylační motiv proteinkinázy C na N-konci, kdy záměna rezidua Thr<sup>18</sup>, které se v tomto motivu nachází a je navíc konzervované napříč P2X podjednotkami, způsobí zrychlení desenzitizace P2X1 i P2X2R (Ennion a Evans, 2002b; Boue-Grabot a spol., 2000). Rovněž fosforylační motiv proteinkinázy A na C-konci se účastní řízení receptorové desenzitizace (Chow a Wang, 1998). Sestřihová varianta P2X2 receptoru označovaná jako P2X2b, které chybí úsek Val<sup>370</sup>-Gln<sup>438</sup> z C-konce, vykazuje ve srovnání s nezkrácenou variantou výrazně rychlejší desenzitizaci. Pro pomalý způsob desenzitizace P2X2a receptoru je kritický segment Arg<sup>371</sup>-Pro<sup>376</sup> (Koshimizu a spol., 1998b). Tento úsek je důležitý v rychlosti desenzitizace také u P2X1, P2X3 a P2X4

receptorů. To bylo prokázáno jednak studii chimér těchto receptorů (Koshimizu a spol., 1999), jednak mutagenézí tohoto úseku (Fountain a North, 2006). P2X7 receptor nedesenzitizuje a zodpovědnost za tento profil se přisuzuje C-konci; nicméně není za to zodpovědná sekvence 6ti aminokyselin odpovídající úseku Arg<sup>371</sup>-Pro<sup>376</sup> u P2X2 (Koshimizu a spol., 1999).

Experimenty s chimérami receptorů P2X2a a P2X2b nesoucích ektodoménu P2X3 nebo P2X4 receptoru ukazují na vzájemné propojení mezi ektodoménou a C-koncem při desenzitizaci. Citlivost ligand-binding domény chiméry se odrazila v síle desenzitizace kontrolované C-koncem. Například chiméry P2X2 receptorů s ektodoménou (EC) P2X3 receptorů (P2X2a+X3EC a P2X2b+X3EC) vykazují zvýšenou citlivost k ATP a  $\alpha,\beta$ -meATP, ale rovněž urychlenou desenzitizaci. Přesto si však chiméry zachovaly vzorec desenzitizace ovlivněný C-koncem, tzn. P2X2b+X3EC receptor desenzitizoval mnohem rychleji než P2X2a+X3EC receptor (He a spol., 2002). Účinnost ligandu tedy pozitivně koreluje s rychlostí desenzitizace, ale neovlivní vzorec desenzitizace kódovaný C-koncem (He a spol., 2003). Tato nově nalezená interakce je známá i u jiných ligandem aktivovaných receptorů. Například AMPA a glutamát jsou plnými agonisty AMPA receptorů, zatímco kainát a domoát pouze parciálními. Při aplikaci parciálních agonistů je desenzitizace AMPA receptorů mnohem pomalejší než v přetrvávající přítomnosti plných agonistů (Patneau a Mayer, 1990; Armstrong a Gouaux, 2000). Také rychlost desenzitizace v přítomnosti  $\alpha,\beta$ -meATP, který je parciálním agonistou P2X2 receptoru, je pomalejší než desenzitizace vyvolaná ATP (He a spol., 2003b).

## 4. CÍLE PRÁCE

Cílem dizertační práce bylo přispět k objasnění vztahu mezi molekulární strukturou a funkcí transmembránových domén potkaních purinergních P2X receptorů, především P2X4 receptoru. Pomocí cysteinové a alaninové skenovací mutagenese a elektrofyziologické techniky patch clamp byly v této práci řešeny následující úkoly:

1. Identifikovat TM1 a TM2 rezidua P2X4 receptoru důležitá pro modulační účinek IVM.
2. Charakterizovat rezidua TM1 a TM2 důležitá pro funkci receptoru, a určit pravděpodobnou sekundární strukturu transmembránových domén P2X4 receptoru.
3. Ozřejmit úlohu TM1 konzervovaného tyrosinu v mechanismu „gatingu“ kanálu a citlivosti receptorů k agonistům napříč P2X receptory.
4. Záměnou za jiné aminokyseliny objasnit, jaké fyzikálně-chemické vlastnosti musí mít toto konzervované místo v TM1.
5. Prozkoumat význam jiných aromatických reziduí v horní části TM1 u několika P2X receptorů a přispět tak k objasnění jejich strukturální a funkční různosti.

## 5. MATERIÁL A METODY

### 5.1 Molekulárně biologické metody

#### 5.1.1 DNA konstrukty

cDNA kódující sekvence krysích P2X1, P2X2a, P2X3, P2X4, P2X6, P2X7 receptorů byly klonovány ve vektoru pIRES2-EGFP (Clontech, Mountain View, CA, USA). Poskytnuty byly laboratoři Dr. S. S. Stojilkovice, NICHD, NIH, Bethesda, USA. Seznam použitých genů je uveden v Tab. 1

Gen	Původ , citace
P2X1 podjednotka	GenBank accesion no. NM 012997 (Koshimizu a spol., 1999)
P2X2a podjednotka	GenBank accesion no. NM 053656 (Koshimizu a spol., 1999)
P2X3 podjednotka	GenBank accesion no. NM 031075 (Koshimizu a spol., 1999)
P2X4 podjednotka	GenBank accesion no. NM 031594 (Koshimizu a spol., 1999)
P2X4 podjednotka značená GFP	(Yan a spol., 2005)
P2X6 podjednotka	GenBank accesion no. X92070 (Koshimizu a spol., 1999)
P2X7 podjednotka	GenBank accesion no. NM 019256 (Koshimizu a spol., 1999)

**Tab. 1** Seznam použitých genů

#### 5.1.2 Polohově řízená mutageneze

K polohově řízené mutagenezi byly použity oligonukleotidové primery (33-36 bází, mutované místo zhruba uprostřed) zakoupené u firmy VBC-Genomics (Viedeň, Rakousko) a QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA).

Jako templát sloužily cDNA kódující sekvence krysích P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X6, P2X7 receptorů, konkrétně jejich divokých typů. Reakční směs byla připravena dle uvedené tabulky Tab. 2.

Složka	Objem
Deionizovaná voda	x $\mu\text{l}$
10x <i>PfuUltra</i> pufr	5 $\mu\text{l}$
Směs dNTP (25 mM)	2,5 $\mu\text{l}$
Primery (100 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$ každý
<i>PfuUltra</i> DNA polymerasa	1 $\mu\text{l}$
DNA templát (500 ng/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
<b>Celkový reakční objem</b>	<b>50 <math>\mu\text{l}</math></b>

**Tab. 2** Reakční směs pro polohově řízenou mutagenezi

Celá příprava reakční směsi probíhala na ledu. Poté proběhla v termálním cykleru (MJ Mini, Bio-Rad) polymerázová řetězová reakce (PCR) dle následujícího schématu: 1. krok – 95 °C (1 min), 2. krok – 55 °C (1 min), 3. krok – 68 °C (10 min), kroky 1-3 opakovat 18-krát, 4. krok – 68 °C (12 min), dále udržovat 4 °C. Po skončení PCR reakce byl k reakční směsi přidán 1  $\mu\text{l}$  enzymu DpnI, sloužící k rozštěpení templátové DNA. Směs byla inkubována 1.5 hod při 37 °C. Reakční směs byla dále použita pro transformaci kompetentních buněk.

### 5.1.3 Transformace bakterií

Transformace bakterií se prováděla metodou teplotního šoku. K transformaci byly používány kompetentní buňky *E.coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA). K 50ti  $\mu\text{l}$  kompetentních buněk bylo přidáno 7-10  $\mu\text{l}$  reakční PCR směsi a směs byla ponechána 20-30 min na ledu. Následoval teplotní šok ve vodní lázni při 42 °C po dobu 45 s, poté ochlazení na ledu na 3 minuty. Dále bylo k směsi přidáno 170  $\mu\text{l}$  přehřátého tekutého LB média a směs byla kultivována za stálého třepání při 37 °C po dobu 1 hodiny. Následovalo nanesení buněčné suspenze na Petriho misky s LB agarem obsahující kanamycin (30  $\mu\text{g/ml}$  kanamycinu). Miska byla inkubována



v termostatu při 37 °C přes noc. Následující den byly vybrané narostlé kolonie z Petriho misky zaočkovány do tekutého LB média s kanamycinem. Jejich kultivace probíhala za stálého třepání (200 rpm) 16-20 hod při 37 °C. Narostlé bakteriální kultury byly použity pro izolaci plasmidové DNA.

#### LB médium

1% tryptonu (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio), 0.5 % kvasničného extraktu (Serva, Heidelberg), 1% NaCl (Sigma-Aldrich, Ayrshire, UK). Rozpuštěno v deionizované vodě, upraveno pH na 7.4 pomocí NaOH a sterilizováno 20 min při 121°C.

#### LB agar s kanamycinem

1% tryptonu, 0.5 % kvasničného extraktu, 1 % NaCl, 1.5-2.0 % agaru (Difco, Detroit, USA). Rozpuštěno v deionizované vodě, sterilizováno 20 min při 121 °C, po ochlazení na 50 °C přidán kanamycin (30 µg/ml). Následně byl agarový roztok rozlit na Petriho misky.

### **5.1.4 Izolace plasmidu a měření koncentrace DNA**

K izolaci plasmidové DNA byl použit kit JETquick Plasmid Miniprep (Genomed, Löhne, Německo). Nejprve byla v mikrozkuhavce postupně odstředěna narostlá bakteriální kultura (12 000 rpm, 1 min, při pokojové teplotě). Vzniklá peleta byla resuspendována ve 250 µl G1 roztoku. Bylo přidáno 250 µl G2 roztoku, vše promícháno. Následovalo 5 minut inkubace při pokojové teplotě. Dále bylo k směsi přidáno 350 µl G3 roztoku, promícháno. Vzniklá sraženina byla odstraněna centrifugací (10 min, 12 000 rpm, pokojová teplota). Supernatant byl slit na JETquick spin kolonku, odstředěn (1 min, 12 000 rpm). Poté bylo na kolonku přidáno 500 µl GX roztoku a odstředěno (1 min, 12 000 rpm). Dále bylo přidáno 500 µl G4 roztoku. Následovala dvě odstředění, každé 1 min při 12 000 rpm. K eluci plasmidu bylo použito 50-70 µl TE pufru vytemperovaného na 65-70 °C, kolonka centrifugována (2 min, 12 000 rpm). K určení koncentrace získané plasmidové DNA byl použit spektrofotometr BioPhotometr 6131 (Eppendorf), program dsDNA. Správnost sekvence izolované DNA byla ověřována sekvenováním v komerční laboratoři na přístroji ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.).

## **5.2 Tkáňové kultury**

K expresi P2X receptorů byla použita buněčná linie HEK293 (American Type Culture Collection). Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu skládajícím se z Dulbeccova modifikovaného Eaglova média (DMEM) doplněného 10 % FBS (fetal bovine serum; tepelně inaktivované), 50 U/ml penicilinu a 50 µg/ml streptomycinu. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% CO<sub>2</sub>, 95 % vzduchu. Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium, penicilin, streptomycin byly zakoupeny u firmy Invitrogen (Carlsbad, CA), FBS u firmy Sigma-Aldrich. Buňky byly kultivovány v 75 cm<sup>2</sup> plastových kultivačních lahvích (NUNC, Rochester, NY) 48-72 hod dokud nedosáhly 80-95% konfluence. Následně byly přepasážovány.

### **5.2.1 Pasážování buněk**

Z kultivační láhve bylo odsáto kultivační médium. Poté byly buňky opláchnuty Versenovým roztokem (Invitrogen) a inkubovány s roztokem 0.25% trypsinu (Invitrogen) při 37 °C do doby, než došlo k jejich uvolnění z povrchu láhve. Následně bylo přidáno 5 ml kultivačního média a směs byla jemně promíchána pipetou. Buněčná suspenze byla centrifugována 5 min při 100 g. Supernatant byl slit a opět bylo přidáno 5 ml kultivačního média, ve kterém byla provedena resuspendace buněk. Část buněk (1,5–2·10<sup>6</sup> buněk) byla přenesena do nové kultivační láhve sloužící k udržení linie. Další část buněk byla nasazena na 12 mm poly-L-lysinovaná sklíčka (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sandheim, Německo) uložená po třech v 35 mm plastové kultivační misce (Sarstedt, Newton, NC) (cca 1,5·10<sup>5</sup> buněk na 1 misku). Tyto buňky byly druhý den po nasazení transfekovány.

### **5.2.2 Transfekce buněk**

Buňkám bylo nahrazeno jejich klasické kultivační médium za médium vhodné pro transfekce – OptiMEM (Invitrogen), vytemperované na 37 °C. S tímto médiem byly buňky inkubovány 20 min. Mezitím byla připravena transfekční směs DNA s Lipofectaminem2000 (Invitrogen). V první mikrozkuhavce byla rozpuštěna DNA (1 µg) v OptiMEMu tak, aby výsledný objem směsi byl 0.25 ml. Ve druhé mikrozkuhavce byl rozpuštěn Lipofectamin2000 (7 µl) v 0.25 ml OptiMEMu.

Po inkubaci (5 min) byly obsahy zkumavek smíchány, vzniklá směs ponechána 20 min při laboratorní teplotě a poté přidána k buňkám v OptiMEMu. Takto byly buňky inkubovány v termostatu 4-6 hod. Následně bylo médium s transfekční směsí vyměněno za klasické kultivační médium a buňky před měřením inkubovány v termostatu dalších 24-48 hod. Účinnost transfekce buněk v našich pokusech byla > 95%.

### ***5.3 Elektrofyziologie***

#### **5.3.1 Roztoky**

##### Extracelulární roztok (ECS):

Během elektrofyziologického měření byly buňky ponořeny v extracelulárním roztoku (ECS), který měl následující složení: 142 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glukóza, 10 mM HEPES (N-(2-hydroxyetyl)piperazin- N'-(2-etansulfonová kyselina). Chemikálie byly rozpuštěny v deionizované vodě, pH upraveno na 7.3 (pomocí NaOH). Následně byla změřena osmolarita na osmometru Vapro 5520 (Wescor, Logan, UT). Osmolarita ECS se pohybovala v rozmezí 290-300 mOs/l. ECS byl připravován 1x - 2x měsíčně a byl uchováván při -20 °C. Všechny použité chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich.

##### Intracelulární roztok (ICS):

Skleněné mikropipety, které byly používány pro snímání ATP-stimulovaných proudů z transfekovaných HEK293 buněk, byly plněny intracelulárním roztokem (ICS) následujícího složení: 154 mM CsCl, 10 mM HEPES, 11 mM EGTA (ethylene glykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid). Chemikálie byly rozpuštěny v deionizované vodě, pH upraveno na 7.2 (pomocí CsOH). Osmolarita ICS se pohybovala v rozmezí 280-290 mOs/l. ICS byl připravován 1x za 2-3 měsíce a byl uchováván při -80 °C. Všechny použité chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich.

##### Aplikační roztoky:

ATP,  $\alpha,\beta$ -meATP a BzATP byly skladovány v  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  M zásobních roztocích při -80 °C. Před každým experimentem byly připraveny čerstvé aplikační roztoky o požadované koncentraci rozpuštěním těchto látek v ECS. Aplikačním roztokům

s vysokou koncentrací agonisty bylo vždy zkorigováno pH na hodnotu 7.3 pomocí roztoku NaOH. IVM byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) a skladován v  $10^{-2}$  M zásobních roztocích při 4 °C. Před experimentem byl rozpuštěn na požadovanou koncentraci v ECS. Vzhledem k nestabilitě IVM byl zásobní roztok připravován 2x měsíčně. Koncentrace DMSO v aplikačním roztoku IVM nepřesáhla 1 %. V této koncentraci nemá DMSO vliv na odpovědi receptoru stimulované ATP (Khakh a spol., 1999b).

#### Phosphate Buffered Saline (PBS):

Pro konečnou přípravu buněk k zobrazení pomocí konfokálního mikroskopu byl použit extracelulární roztok s fosfátovým pufrem (PBS) následujícího složení: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Chemikálie byly rozpuštěny v deionizované vodě, pH upraveno na 7.3 (pomocí NaOH).

### **5.3.2 Snímání proudových odpovědí**

Elektrofyzilogické experimenty byly prováděny na HEK293 buňkách 24-48 hod po transfekci. Patch clamp technikou byly snímány proudové odpovědi z celých buněk po stimulaci extracelulárním ATP nebo jinými agonisty. Buňky byly udržovány na membránovém potenciálu -60 mV. Měřilo se z buněk podobné velikosti, tvaru a míry exprese receptoru, která byla kontrolována podle fluorescenčního signálu EGFP pomocí UV lampy a filtru U-MWIB2 pro excitační vlnové délky 460-490 nm a emisi při 505 nm. Buňky byly vizualizovány pomocí fluorescenčního invertovaného mikroskopu Olympus (model IX71, Olympus, Melville, NY, USA), s objektivy o zvětšení 10x a 40x. Měření probíhalo za pokojové teploty 22-24 °C. Snímací skleněné elektrody byly vyrobeny z trubiček borosilikátového skla (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) s vnějším průměrem 1.65 mm, tloušťkou stěny 0.2 mm. Pomocí horizontálního tahače (model P-97, Sutter Instruments, Novato, CA) byly vytaženy do požadovaného tvaru a špička elektrody byla otavena pomocí „mikrokovárny“ (model MF-830, Narishige, Tokyo). Po otavení se průměr špičky elektrody pohyboval v rozmezí 1-2  $\mu\text{m}$ . Odpor elektrod po naplnění ICS byl v rozmezí 3-5 M $\Omega$ . Jemné pohyby skleněné mikroelektrody byly prováděny pomocí mikromanipulátoru (model MP-285, Sutter Instrument, Novato, CA). Špička skleněné mikroelektrody s Ag/AgCl drátkem byla přitlačena k membráně buňky, jemným podtlakem byla nasáta část

membrány v místě kontaktu a následně byl tento kousek membrány protržen. Tím došlo k propojení vnitřku elektrody s vnitřkem buňky. Kontrolní ECS a testovací roztoky byly k buňkám přiváděny pomocí aplikačního systému vyrobeného na Fyziologickém ústavě AV ČR, v.v.i. (vyvinul a vyrobil ing. Ivan Dietert, CSc.) a v pozdějších pokusech pomocí RSC-200 Rapid Solution Changer System (BIO-LOGIC, Claix, Francie). Průtok aplikačních roztoků přivodnými trubičkami byl řízen ventilovým systémem BioLogic EVH-9. Aplikační vývod byl při experimentech nastaven  $\sim 500 \mu\text{m}$  od a  $\sim 50 \mu\text{m}$  nad snímanou buňkou, k výměně roztoku v okolí buňky došlo během 100-300 ms. V průběhu celého experimentu byly buňky omývány ECS. Indukované proudy byly nahrávány pomocí pClamp 8.0 softwaru a zesilovače Axopatch-200B (Axon Instruments, Union City, CA, USA), filtrovány Besselovým filtrem na 1 kHz. K zesilovači byl připojen Ag/AgCl drátek snímací elektrody a Ag/AgCl drátek referenční elektrody zanořené v ECS. Sonda zesilovače obsahovala proudovo-napěťový převodník, díky kterému byly snímané proudy převedeny na napěťový signál. Ten byl zesílen, filtrován a digitalizován (Digidata 1200, Axon Instruments, Union City, USA). Snímací elektroda současně slouží k udržování konstantního membránového potenciálu.

### 5.3.3 Vyhodnocení dat

Ke stanovení hodnoty  $EC_{50}$  byly ve 2-5ti sekundových pulzech aplikovány různé koncentrace agonistů opakovaně po 2-3 minutových promývacích intervalech. Odpovědi na vysoké koncentrace agonistů byly prokládány aplikací nízkých koncentrací agonisty. Vyvolané proudové odpovědi pak byly korigovány dle poklesu odpovědi na tuto nízkou koncentraci, protože jsme předpokládali, že pokles, k němuž dochází při opakovaných aplikacích agonisty, je lineární. Tato korekce byla provedena zejména k vyloučení vlivu internalizace a pomalého návratu P2X3 a P2X4 receptoru z desenzitizovaného stavu způsobeného aplikacemi vyšších koncentrací ATP (Jones a spol., 2000). Obdobný postup měření, kdy se odpovědi na vyšší koncentrace ATP korigovaly podle poklesu proudových odpovědí na nižší koncentraci, použili ve své práci Silberberg a kol. (Silberberg a spol., 2005). Pro snímání byly vybírány buňky o stejné velikosti, korekci na elektrickou kapacitu jsme proto nepoužívali. Při měření P2X7 receptoru byly z buněk na jednom poly-L-lysinovaném sklíčku nahrány maximálně 2 odpovědi k vyloučení vlivu dilatace póru, ke které dochází při opakované stimulaci.

Data v grafech koncentračních závislostí byla proložena křivkou pomocí 3-parametrové logaritmické rovnice s využitím nelineárního fitujícího programu, který současně určuje hodnotu  $EC_{50}$  a hodnotu Hillova koeficientu vytvořených křivek (SigmaPlot 2000 v9.01; SPSS Inc., Chicago, IL). Forma rovnice pro proložení dat je následující:  $y = I_m / (1 + (EC_{50}/x)^{n_H})$ ; kde „y“ je amplituda vyvolaného proudu, „ $I_m$ “ je maximální proudová amplituda, „ $EC_{50}$ “ je koncentrace agonisty vyvolávající 50% maximální odpovědi, „ $n_H$ “ značí Hillův koeficient, „x“ je koncentrace agonisty. Kinetika poklesu proudu při odmyvání agonisty (deaktivace) byla proložena 1-exponenciální funkcí:  $y = A \exp(t/\tau)$ , nebo 2-exponenciální funkcí:  $y = A_1 \exp(t/\tau_1) + A_2 \exp(t/\tau_2)$  pomocí programu Clampfit v.9 (Axon Instruments, Union City, CA; „ $A_1$ “ a „ $A_2$ “ jsou relativní amplitudy první a druhé exponenciály, „ $\tau_1$ “ a „ $\tau_2$ “ jsou časové konstanty). Odvozená konstanta doby deaktivace je značena  $\tau_{off}$ .

Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr $\pm$ SEM a statistická významnost rozdílů byla ověřována pomocí testu ANOVA (one-way analysis of variance) v programu SigmaStat 2000 v9.01 a Tukey's post hoc testem s hladinou významnosti (P) < 0.01.

#### **5.4 Průkaz exprese receptorů v buněčné membráně**

Exprese P2X1 receptorů byla testována pomocí imunocytochemie. Transfekované buňky kultivované na 12 mm poly-L-lysinovaných sklíčkách byly 2krát omyty studeným PBS roztokem (pH 7.2) a fixovány 4% paraformaldehydem na ledu po dobu 15 minut. Poté 2krát promyty PBS roztokem. K blokaci nespecifické vazby proběhla 20minutová inkubace buněk při pokojové teplotě v PBS roztoku obsahujícím 2 % oslího séra, 0.05 % Tween 20, 1 % BSA and 0.1 % Triton. Dále byly buňky inkubovány s králičími anti-P2X1-7 monoklonálními protilátkami (1:200; Alomone Labs, Izrael) po dobu 1 hod při pokojové teplotě a 3krát omyty PBS roztokem, kdy jedno promytí trvalo 5 minut. Následovala inkubace buněk (1 h) s oslí anti-králičí fluorescein-konjugovanou protilátkou (1:400) (Jackson Immuno Research, Baltimore, PA) ve tmě, při pokojové teplotě. Po třech důkladných promytí PBS roztokem sklíčka s buňkami byla s Vectashield médiem připevněna na skleněné destičky.

Při průkazu exprese P2X4-Y42R a P2X4-Y42D mutací v membráně HEK293 buněk bylo použito laserové skenovací konfokální mikroskopie a EGFP-značené P2X4 konstrukty. Byly vytvořeny z P2X4-pIRES2-EGFP konstruktů delecí úseku mezi

sekvencí kódující C-konec proteinu a začátkem sekvence EGFP genu. Delece tohoto úseku nemá vliv na funkci P2X4 receptoru (Yan a spol., 2005). P2X4-EGFP konstrukty transfekované buňky (kultivované na 12 mm poly-L-lysinovaných sklíčkách) byly druhý den po transfekci fixovány ledovým 4% paraformaldehydem rozpuštěným v PBS (pH 7.4) po dobu 5 minut. Následně proběhla dehydratace buněk pomocí stoupající alkoholové řady (70 %, 80 %, 95 %, vždy 1 min s každou koncentrací alkoholu). Sklíčka s buňkami byla s Vectashield médiem připevněna na skleněné destičky. Lokalizace GFP a imunocytochemicky značených receptorů byla zkoumána pomocí laserové skenovací konfokální mikroskopie (Leica SP2 AOBS, Německo). Obrazy byly snímány pod 60x objektivem s dodatečným 2-násobným zvětšením.

### ***5.5 Počítačové modely***

Helikální kruhové projekce P2X4 TM domén byly vytvořeny pomocí internetové aplikace (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>). Model molekuly IVM vytvořil RNDr. Tomáš Obšil, CSc. (oddělení Proteinové struktury, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.) pomocí sady softwarových nástrojů pro molekulární modelování Ghemical (Hassinen a Perakyla, 2001), Desktop Molecular Modeller v4.2 (Polyhedron software, Witney, UK). K vytvoření 3D modelu  $\alpha$ -helixu TM1 domén P2X1-7 receptorů byl použit program DeepView/Swiss-PdbViewer v3.7 (Guex a Peitsch, 1997) a PyMol v0.99 (<http://www.pymol.org>).

## 6. VÝSLEDKY

### *6.1 Identifikace aminokyselinových zbytků transmembránových domén P2X4 receptoru interagujících s ivermektinem*

Jak již bylo v literárním přehledu uvedeno, IVM je poměrně velká lipofilní molekula s rozměrem kolem 20 Å (Obr. 3) (Albers-Schonberg a spol., 1981; Hu a spol., 1998). Působí jako alosterický modulátor ATP-stimulovaných P2X4 proudů, zatímco ostatní podtypy P2X rodiny jsou k IVM necitlivé (Khakh a spol., 1999b). Je-li aplikován z extracelulární strany membrány, IVM zvyšuje citlivost P2X4 receptorů k ATP, navyšuje ~2krát amplitudu proudové odpovědi při supramaximální koncentraci agonisty a výrazně prodlužuje deaktivaci proudu po odmytí agonisty (Khakh a spol., 1999b; Jelinkova a spol., 2006). „Single-channel“ analýza ozřejmila, že IVM stabilizuje otevřený stav P2X4 kanálu (Priel a Silberberg, 2004). Nedávno bylo zjištěno, že přenos ektodomény P2X4 receptoru na P2X2 není dostačující k přenosu IVM citlivosti (Jelinkova a spol., 2006; Silberberg a spol., 2007). Vzhledem k tomuto nálezu bylo možné předpokládat, že IVM interaguje s TM doménami P2X4 receptoru a působí na protein-lipidovém rozhraní.

Abychom zjistili důležitost jednotlivých TM reziduí v kinetice P2X4 kanálu a přispěli k ozřejmění jejich interakce s IVM, provedli jsme skenovací cysteinovou mutagenезi obou TM domén. Náhrada za cysteiny byla zvolena ze tří důvodů: (i) počítali jsme s tím, že v budoucnu bude možné pomocí různých redukčních methanethiosulfonátových činidel reagujících s cysteiny rozhodnout, zda je reziduum orientováno k lipidům nebo do vodného póru, (ii) cysteinová mutagenезe je běžně používaná metoda pro mapování transmembránových domén (Jiang a spol., 2001; Egan a spol., 1998; Li a spol., 2008), dosud však nebyla aplikovaná u P2X4 receptoru, (iii) záměna za cysteiny je šetrnější než tryptofanová mutagenезe, která vedla v případě TM domén P2X4 receptoru k velkému počtu nefunkčních mutantů (Silberberg a spol., 2005). Skenování TM1 P2X4 začalo u Gly<sup>29</sup> a skončilo u Trp<sup>50</sup>, první aminokyseliny lokalizované extracelulárně. Skenování TM2 začalo u Asn<sup>338</sup> a skončilo u Leu<sup>358</sup>. Skenovací mutagenезe je běžně používaná metoda ke studiu důležitosti jednotlivých reziduí ve funkci receptoru a k určení sekundární struktury proteinu (Akabas a spol., 1992; Monks a spol., 1999; Li-Smerin a spol., 2000; Panchenko a spol., 2001; Jenkins



a spol., 2002; Guzman a spol., 2003; Egan a spol., 1998; Rassendren a spol., 1997a; Li a spol., 2004; Silberberg a spol., 2005).

Mutované receptory byly exprimovány v HEK293 buňkách a technikou patch clamp byly z celých buněk snímány ATP-stimulované proudy. Byla měřena hodnota  $EC_{50}$  a hodnota  $I_{max}$  při stimulaci 100  $\mu$ M ATP (supramaximální koncentrace agonisty pro WT a většinu mutovaných receptorů) nebo 1 mM ATP (u mutovaných receptorů s výrazně sníženou ATP citlivostí). Fitováním poklesu proudu po odmytí agonisty ( $\tau_{off}$ ) byla analyzována deaktivací kinetika receptorového kanálu. Vše v přítomnosti a v nepřítomnosti IVM. Hodnota  $EC_{50}$  odráží afinitu agonisty k vazebnému místu i schopnost otevření kanálu (Colquhoun, 1998). V pokusech byl použit IVM v koncentraci 3  $\mu$ M působící po dobu 4-6 min, což je koncentrace a čas dostačující k rozvinutí jeho modulačního účinku na P2X4 proudy (Khakh a spol., 1999b; Jelinkova a spol., 2006). Výsledky měření jsou zobrazeny v Tab. 3 a Tab. 4.

P2X4R	-IVM EC <sub>50</sub> (μM)	+IVM EC <sub>50</sub> (μM)	-IVM I <sub>max</sub> (nA)	+IVM I <sub>max</sub> (nA)	-IVM τ <sub>off</sub> (s)	+IVM τ <sub>off</sub> (s)
WT	4.6±0.3	0.5±0.1	1.6±0.2	2.8±0.2	0.4±0.04	26±1.6
W50C	7.3±1.9	2.2±0.1*	1.6±0.4	2.5±0.3	0.5±0.20	4±0.4*
V49C <sup>a</sup>	n.d.	1.8±0.3*	0.3±0.1*	0.9±0.3*	0.4±0.05	15±1.9*
F48C	3.8±1.3	0.5±0.2	1.2±0.3	1.9±0.3	0.4±0.1	31±2.8
V47C	3.6±1.2	1±0.1	1.3±0.2	2±0.1*	0.3±0.01	16±1.6*
W46C	6.2±0.2	0.4±0.1	1±0.2	1.4±0.3*	0.5±0.16	26±2.7
G45C	1.6±0.3*	0.2±0.03	1.8±0.3	2.9±0.5	0.4±0.04	76±9.3*
I44C	4.1±0.4	0.4±0.03	2.1±0.5	2.6±0.3	0.3±0.03	31±4.6
V43C	4.5±0.5	2.2±0.4*	1.4±0.4	2.2±0.5	0.3±0.15	2.7±0.5*
Y42C <sup>b</sup>	0.6±0.1*	0.5±0.1	0.5±0.2*	0.4±0.2*	21±1.8*	32±4.2
A41C	5.1±0.8	0.7±0.4	1.6±0.3	2.4±0.2	0.3±0.05	26±2.9
L40C	7.2±1.2	1.7±0.5*	1.2±0.1	2.7±0.2	0.2±0.09	13±1.3*
I39C	4.6±1.3	0.5±0.1	1.3±0.3	2.1±0.4	0.2±0.18	30±3.6
L38C	7.4±2.5	0.9±0.1	1.8±0.2	2.4±0.4	0.2±0.03	19±2.1
L37C	6.3±0.7	0.9±0.2	1.8±0.9	2.3±0.2	0.3±0.05	22±2.5
Q36C	7.4±2.5	1.9±0.2*	1.4±0.2	2.5±0.4	0.2±0.03	13±2.0*
V35C	4.1±1.0	0.6±0.3	1.5±0.2	2±0.5	0.3±0.04	37±3.2
A34C	3.9±1.1	0.5±0.5	2.0±0.4	2.5±0.4	0.3±0.05	24±2.1
R33C	9.9±1.8*	2.9±1.4*	0.6±0.1*	0.8±0.2*	0.7±0.2	22±2.8
N32C	6±0.9	0.8±0.1	2±0.3	2.8±0.4	0.4±0.07	20±4.7
M31C <sup>a</sup>	15±2*	1±0.2	1.1±0.2	2.6±0.3	0.3±0.15	17±2.5*
L30C	5.7±0.7	0.9±0.2	1.3±0.3	2.6±0.4	0.3±0.02	21±3.0
G29C <sup>a</sup>	n.d.	4.9±0.7*	0.1±0.05*	0.5±0.1*	0.3±0.02	16±1.3*

**Tab. 3** Vliv ivermektinu (IVM) na P2X4-WT receptor a cysteinové mutace 1. transmembránové domény:

EC<sub>50</sub> značí ATP koncentraci vyvolávající 50% maximální proudové odpovědi; I<sub>max</sub> značí maximální amplitudu proudu indukovanou 100 μM ATP (nebo 1 mM ATP u mutací označených „<sup>acc</sup>“). τ<sub>off</sub> značí deaktivční časovou konstantu proudu po odmytí ATP, n.d. značí „not determined“ (neurčeno). U každého receptoru bylo měřeno 5-29 buněk v přítomnosti 3 μM IVM (+IVM) a v jeho nepřítomnosti (-IVM). U mutací označených „<sup>bcc</sup>“ se τ<sub>off</sub> neliší od τ<sub>des</sub> během prodloužené aplikace agonisty. „<sup>acc</sup>“ značí hodnotu P<0.01 při srovnání WT a mutace.

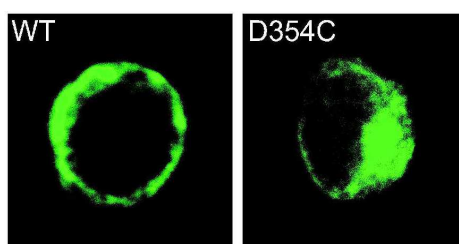
	-IVM	+IVM	-IVM	+IVM	-IVM	+IVM
P2X4R	EC <sub>50</sub> (μM)	EC <sub>50</sub> (μM)	I <sub>max</sub> (nA)	I <sub>max</sub> (nA)	τ <sub>off</sub> (s)	τ <sub>off</sub> (s)
WT	4.6±0.3	0.5±0.1	1.6±0.2	2.8±0.2	0.4±0.1	26±1.6
N338C	4.6±0.8	2.5±1.1*	1±0.3	2.4±0.3	0.5±0.1	1.9±0.1*
V339C	3.8±0.2	0.7±0.1	2.3±0.4	3.4±0.5	0.6±0.1	27±0.4
G340C <sup>a</sup>	0.7±0.1*	0.6±0.2	0.8±0.2*	0.9±0.2*	3.8±0.3*	15±1.5*
S341C <sup>b</sup>	6±1.1	1.8±0.5*	0.5±0.1*	1.3±0.2*	0.6±0.1	12±1.4*
G342C	3.1±0.5	2.2±0.5*	1.4±0.2	2.8±0.3	1.7±0.2*	3.8±0.5*
L343C <sup>b</sup>	>100	15±2.6*	1.6±0.3	2.7±0.3	0.7±0.1	4.2±0.5*
A344C <sup>c</sup>	3.4±0.5	n.d.	1.3±0.3	n.d.	0.7±0.1	26±3.7
L345C	6.5±1.7	1±0.4	1.8±0.5	2.8±0.4	0.9±0.3	19±2.1
L346C	3.3±0.7	2.1±0.5*	1.5±0.3	2.7±0.4	0.8±0.2	4.3±1.2*
G347C	7.5±0.4	0.8±0.2	0.5±0.1*	2.4±0.4	0.6±0.1	20±2.9
V348C	3.2±0.6	0.7±0.2	1.7±0.5	3±0.3	0.7±0.1	22±1.8
A349C	4.5±0.5	1.4±0.4*	1.1±0.3	2.3±0.4	0.4±0.1	10±1.5*
T350C	4.8±1	0.7±0.5	0.9±0.2*	1.8±0.3*	0.7±0.1	34±3.3
V351C	5.1±0.7	1.3±0.2*	1.4±0.3	2.7±0.4	0.5±0.04	19±1.9
L352C	5.5±1.2	0.7±0.1	1.1±0.2	2.3±0.2	0.4±0.1	20±3.1
C353A	10±3.2*	2.3±1.1*	0.7±0.1*	1.3±0.4*	0.2±0.05	24±2.5
D354C <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-
V355C	4.7±1.5	0.7±0.2	1.2±0.5	1.8±0.2*	0.4±0.04	21±2.2
I356C	4.4±1.2	0.8±0.1	1.2±0.5	2.2±0.4	0.3±0.03	51±7.1*
V357C	3.2±1.3	0.5±0.3	0.6±0.1*	1.5±0.2*	0.4±0.07	34±1.4
L358C	2.5±1.6	0.6±0.2	1.2±0.1	1.7±0.2*	0.3±0.07	30±2.2

**Tab. 4** Vliv ivermektinu (IVM) na P2X4-WT receptor a cysteinové mutace 2. transmembránové domény:

U každého receptoru bylo měřeno 7-17 buněk v přítomnosti 3 μM IVM (+IVM) a v jeho nepřítomnosti (-IVM). „\*“ značí hodnotu P<0.01 při srovnání WT a mutace. „<sup>a</sup>“ označuje receptory, kde se τ<sub>off</sub> neliší od τ<sub>des</sub> během prodloužené aplikace agonisty. „<sup>b</sup>“ značí receptory, kdy byla ke stanovení I<sub>max</sub> použita koncentrace 1 mM ATP. „<sup>c</sup>“ označuje receptor, kde EC<sub>50</sub> a I<sub>max</sub> nebylo možno v nepřítomnosti a v přítomnosti IVM naměřit z jedné buňky vzhledem k rychlému poklesu proudu a τ<sub>off</sub> zde reprezentuje pomalou komponentu derivovanou z biexponenciálního fitování. „<sup>d</sup>“ značí receptory, kdy byla ke stimulaci použita koncentrace 3 mM ATP.

Z celkového počtu 43 cysteinových mutací, 29 mutací nevykazovalo změny v receptorové kinetice oproti P2X4-WT receptoru v nepřítomnosti IVM: L30C, N32C, A34C, V35C, Q36C, L37C, L38C, I39C, L40C, A41C, V43C, I44C, W46, V47C, F48C, W50C, N338C, V339C, G342C, A344C, L345C, L346C, V348C, A349C, V351C, L352C, V355C, L356C, L358C. Tyto mutace jsou v práci označeny jako „k substituci necitlivé“.

Druhou skupinu tvořily „k substituci citlivé“ mutace, které je možno rozdělit do 3 skupin: (i) mutace mající signifikantně nižší hodnotu  $I_{max}$ , ale  $EC_{50}$  hodnotu obdobnou WT receptoru (S341C, G347C, T350C, V357C); (ii) mutace vykazující signifikantní posun v hodnotě  $EC_{50}$  (R33C, M31C, L343C, C353A se sníženou citlivostí k ATP a mutace G45C, Y42C, G340C se zvýšenou ATP citlivostí); (iii) málo citlivé až nefunkční mutace (V49C a G29C s velmi nízkou hodnotou  $I_{max}$ , u kterých nebylo možno stanovit jejich hodnotu  $EC_{50}$ , a D354C, u které nebyla pozorovaná žádná proudová odpověď, a to ani při aplikaci 3 mM ATP). Tichá mutace D354C byla prokázána v buněčné membráně (Obr. 7), což naznačuje, že receptor nezůstal v endoplazmatickém retikulu, a že substituce této nabitě aminokyseliny výrazně ovlivnila ATP vazbu nebo „gating“ kanálu. Na rozdíl od tryptofanové skenovací mutagenese P2X4 receptoru (Silberberg a spol., 2005), nebyl vzorec změn po cysteinovém skenování na první pohled konzistentní s představou helikálního uspořádání TM domén.



**Obr. 7** Průkaz exprese D354C mutace P2X4 receptoru v HEK293 buňkách:

Expresa P2X4-WT receptoru (*vlevo*) a D354C mutace (*vpravo*) v HEK293 buňkách. Stanoveno prostřednictvím laserové skenovací konfokální mikroskopie.

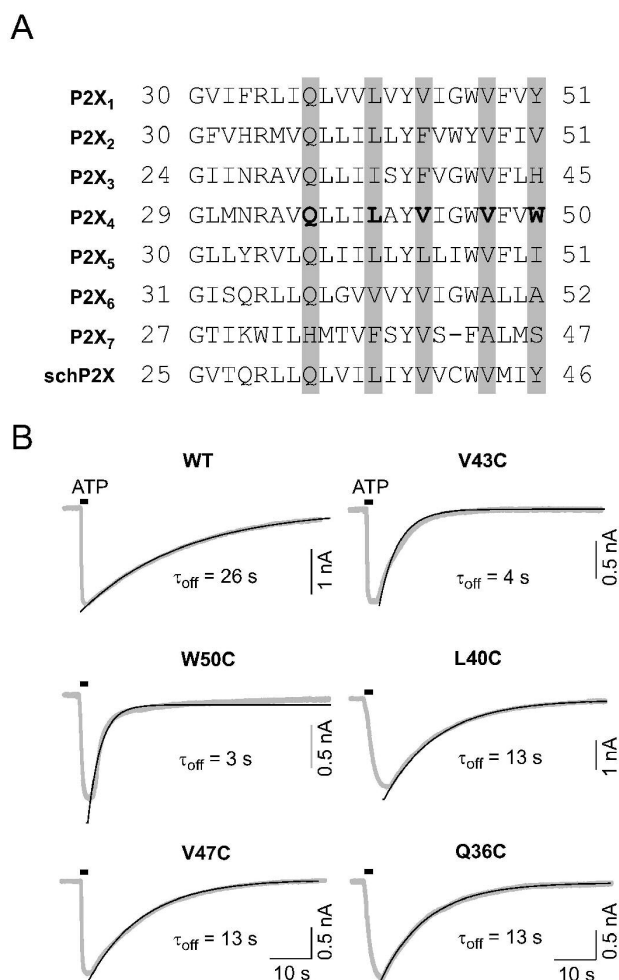
### 6.1.1 Vliv IVM na TM mutanty P2X4 receptoru necitlivé k substituci

Skutečnost, že každé 3.-4. reziduum je funkčně zasaženo záměnou za jiné, by vypovídalo o helikálním uspořádání TM domén. Nalezli jsme takové střídání u mutací „k substituci necitlivých“ po analýze účinku IVM.

V přítomnosti IVM došlo u buněk exprimujících P2X4-WT ke zvýšení ATP citlivosti (posun  $EC_{50}$  9.2krát směrem k nižším hodnotám), ke zvýšení hodnoty  $I_{max}$  (1.8krát) a k prodloužení monoexponenciální časové konstanty deaktivace (65krát). Tyto změny jsou v souladu s již publikovanými daty (Khakh a spol., 1999b; Priel a spol., 2004; Jelinkova a spol., 2006; Zemkova a spol., 2007). Možnost jednoexponenciálního fitování deaktivace proudu v přítomnosti IVM byla již prezentována dříve (Zemkova a spol., 2007), takže data v Tab. 3 a Tab. 4 představují u všech mutací (kromě A344C) průměrnou hodnotu  $\pm$ SEM deaktivační časové konstanty  $\tau_{off}$  odvozené z tohoto jednoexponenciálního fitování. Pro určení deaktivační konstanty se vždy používaly nedesenzitizující koncentrace ATP. U mutace A344C byla v přítomnosti IVM pozorována stálá bifazická deaktivace s  $\tau_{off2}$  komponentou představující 51 $\pm$ 4 %. U této mutace nebylo také možno vzhledem k neúplnému návratu proudu stanovit hodnotu  $EC_{50}$  a  $I_{max}$  v přítomnosti IVM. U všech ostatních „k substituci necitlivých“ mutací byla v přítomnosti IVM prokázána zvýšená citlivost k ATP, amplifikace hodnoty  $I_{max}$  a zvýšení  $\tau_{off}$  hodnoty oproti stavu v nepřítomnosti IVM. Přesto u některých mutací byly v přítomnosti IVM pozorovány signifikantní rozdíly oproti P2X4-WT receptoru.

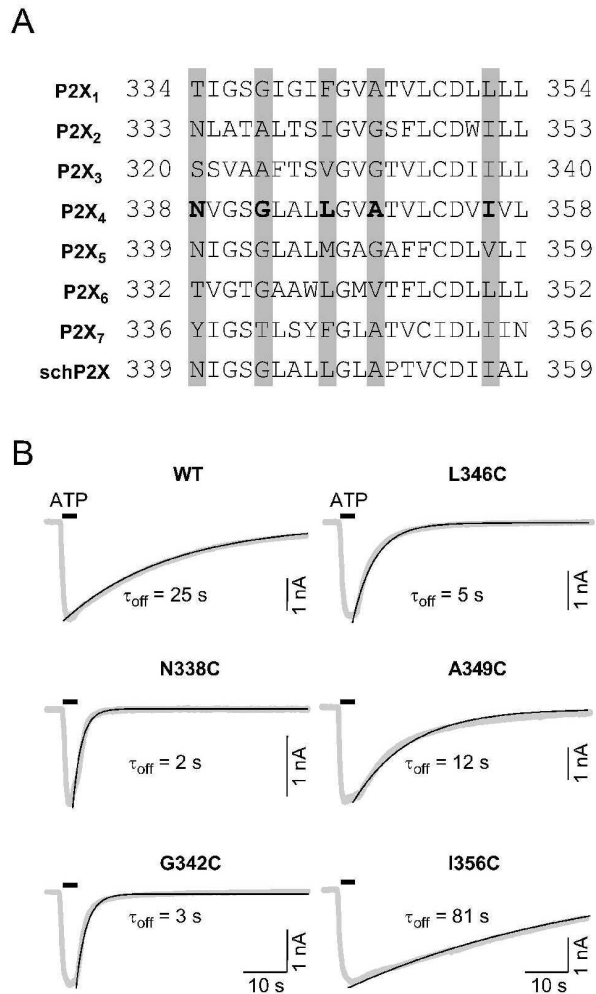
Nejvíce se mutace lišily v účinku IVM na kinetiku receptorové deaktivace. Deaktivace mutací TM1 Q36C, L40C, V43C, V47C a W50C byla v přítomnosti IVM signifikantně rychlejší oproti WT receptoru (Tab. 3, Obr. 8B, Obr. 10). Z těchto reziduí je pouze Trp<sup>50</sup> specifický pro P2X4 receptor, reziduum Gln<sup>36</sup> je konzervované napříč P2X1-6 podjednotkami (Obr. 1, Obr. 8A). Mutace N338C, G342C, L346C, A349C z TM2 domény rovněž deaktivovaly v přítomnosti IVM signifikantně rychleji než WT receptor. Naproti tomu mutace I356C měla deaktivaci signifikantně prodlouženou oproti WT receptoru (Tab. 4, Obr. 9B, Obr. 10). Z těchto TM2 reziduí není žádné specifické pro P2X4 receptor ani konzervováno napříč P2X podjednotkami (Obr. 9A). Kromě I356C, změna ATP citlivosti zmíněných TM1 a TM2 mutací byla v přítomnosti IVM signifikantně nižší v porovnání s WT receptorem (Obr. 10). Jelikož samotná cysteinová substituce těchto reziduí nezměnila ATP citlivost, hodnotu  $\tau_{off}$  ani  $I_{max}$

hodnotu receptoru, považovali jsme tyto změny kinetiky oproti WT receptoru v přítomnosti IVM za důsledek interakce těchto reziduí s molekulou IVM v lipidové dvojvrstvě.



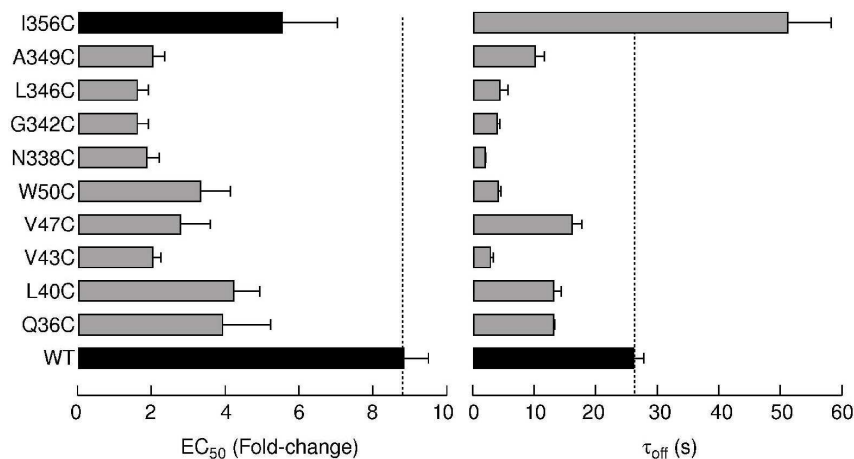
**Obr. 8** Oslabený vliv IVM na proudovou deaktivaci u vybraných TM1 P2X4 mutací:

(A) Porovnání aminokyselinové sekvence TM1 domény sedmi krysích P2X receptorů a P2X receptoru *Schistosoma mansoni* (schP2X). Zvýrazněný font písmen v šedě značené zóně představuje rezidua, jejichž cysteinová substituce změnila kinetiku deaktivace v přítomnosti IVM. (B) Příklady ATP-indukovaných proudů v přítomnosti 3  $\mu$ M IVM u P2X4-WT receptoru a vybraných cysteinových mutací. Šedé trasy znázorňují průběh odpovědi, černé linie značí fitované křivky. Pod jednotlivými trasami jsou uvedeny hodnoty  $\tau_{off}$  odvozené z monoexponenciálního fitování. Horizontální značky nad průběhem tras indikují trvání ATP aplikace (1-3  $\mu$ M ATP).



**Obr. 9** Změněný vliv IVM na proudovou deaktivaci u vybraných TM2 P2X4 mutací:

(A) Porovnání aminokyselinové sekvence TM2 domény sedmi krysích P2X receptorů a P2X receptoru *Schistosoma mansoni* (schP2XR). Zvýrazněný font písmen v šedě značené zóně představuje rezidua, jejichž cysteinová substituce změnila kinetiku deaktivace v přítomnosti IVM. (B) Příklady ATP-indukovaných proudů v přítomnosti 3  $\mu\text{M}$  IVM u P2X4-WT receptoru a vybraných cysteinových mutací. Šedé trasy znázorňují průběh odpovědi, černé linie značí fitované křivky. Pod jednotlivými trasami jsou uvedeny hodnoty  $\tau_{\text{off}}$  odvozené z monoexponenciálního fitování. Horizontální značky nad průběhem tras indikují trvání ATP aplikace (1-3  $\mu\text{M}$  ATP).



**Obr. 10** Charakterizace účinku IVM na hodnoty  $EC_{50}$  a  $\tau_{off}$  u vybraných „k substituci necitlivých“ reziduí TM1 a TM2 domény P2X4 receptoru:

IVM-indukované změny v citlivosti receptorů ATP (*vlevo*) jsou vyjádřeny jako poměr mezi hodnotami  $EC_{50}$  v nepřítomnosti a v přítomnosti IVM. Hodnoty  $\tau_{off}$  (*vpravo*) jsou derivované z monoexponenciálního fitování deaktivace v přítomnosti IVM. Sedě jsou znázorněny signifikantní rozdíly v hodnotě  $EC_{50}$  a  $\tau_{off}$  mezi P2X4-WT receptorem a mutovanými receptory ( $P < 0.01$ ).

### 6.1.2 Vliv IVM na TM mutanty P2X4 receptoru citlivé k substituci

Jak již bylo výše uvedeno, „k substituci citlivé“ mutace lze rozdělit do tří podskupin: většina mutací vykazuje změny v  $EC_{50}$ , některé mutace mají signifikantně sníženou hodnotu  $I_{max}$  bez změny ATP citlivosti a některé jsou tiché nebo s malými proudovými odpověďmi na ATP stimulaci. Cysteinovou záměnou indukované změny v kinetice receptoru ukazují na důležitost rezidua pro normální funkci P2X4 receptoru v nepřítomnosti IVM. Interpretace účinku IVM pro tyto mutace je však složitější než pro mutace „k substituci necitlivé“.

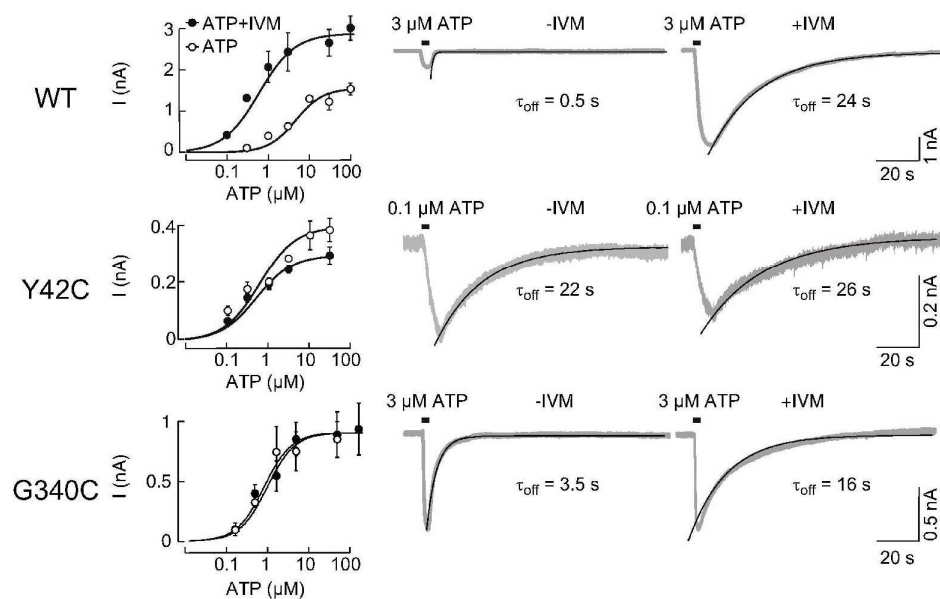
U ionotropních receptorů se obecně uvažuje, že změny v citlivosti k agonistům jsou paralelně doprovázeny změnami v deaktivaci. Mutované receptory se zvýšenou citlivostí k ligandu mají prodlouženou deaktivaci, receptory se sníženou citlivostí mají rychlejší deaktivaci (Colquhoun, 1998). Toto pravidlo bylo rovněž prokázáno u mutací P2X2 receptoru (Li a spol., 2004), u mutací ektodomény P2X4 receptoru v přítomnosti IVM (Zemkova a spol., 2007). Rovněž bylo již dříve prokázáno, že aplikace IVM „oživí“ receptorové funkce u mnoha jinak tichých mutací, což vypovídá o silném pravostranném posunu „dose response“ křivky (Zemkova a spol., 2007). Na základě uvedených znalostí byla ze skupiny „k substituci citlivých“ mutací identifikovaná IVM-



-interagující rezidua dle těchto strategií: 1) dle „oživení“ receptorové funkce u málo citlivých a tichých receptorových mutací, 2) dle dodržování paralelního posunu změn ATP citlivosti a deaktivace proudové odpovědi a 3) dle výrazných posunů hodnot  $I_{max}$  v přítomnosti IVM.

Na rozdíl od mutací v ektodoméně P2X4 receptoru (Zemkova a spol., 2007), aplikace IVM „neoživila“ receptorovou funkci D354C mutace. To naznačuje důležitost tohoto rezidua v „gating“ mechanismu P2X4 receptoru. Receptorové funkce mutací G29C a V49C byly aplikací IVM „oživeny“ částečně. Aplikace IVM způsobila zvýšení jejich  $I_{max}$  hodnoty 3-5krát, prakticky dosáhla 20-30 % hodnoty WT receptoru (Tab. 3). Posun ATP citlivosti těchto mutací doprava byl paralelně doprovázen zrychlením deaktivace. Logicky vyplývá, že tato rezidua nejsou pravděpodobně zapojena v rozpoznávání molekuly IVM, avšak jsou důležitá v mechanismu „gatingu“.

Také rezidua Met<sup>31</sup> a Gly<sup>45</sup> nejsou pravděpodobně zapojena v rozpoznávání molekuly IVM, u jejich cysteinových mutací jsou v přítomnosti IVM změny v ATP citlivosti paralelně doprovázeny změnami v deaktivaci. U mutací R33C a C353A nebyl pozorován tento paralelní posun. Snížení citlivosti receptoru nebylo v přítomnosti IVM doprovázeno paralelním zkrácením deaktivace. Toto „nelogické“ chování naznačuje možnost úlohy reziduí Arg<sup>33</sup> a Cys<sup>353</sup> v rozpoznávání IVM molekuly. Mezi „k substituci citlivými“ reziduy byly účinky cysteinové mutace reziduí Tyr<sup>42</sup> a Gly<sup>340</sup> nejvíce specifické. Mutace Y42C měla v nepřítomnosti IVM výrazně zvýšenou ATP citlivost a sníženou hodnotu  $I_{max}$ . Aplikace IVM tyto hodnoty neovlivnila (Tab. 3, Obr. 11). Deaktivace proudu byla v nepřítomnosti IVM výrazně zpomalena a v přítomnosti IVM k dalšímu prodloužení deaktivace již nedošlo. Stejná rychlost poklesu proudu byla pozorován rovněž během dlouhé aplikace ATP ( $29 \pm 5$  s,  $n=3$ ), což naznačuje, že pokles proudu odráží spíše desenzitizaci než deaktivaci. Tento fenomén byl již dříve popsán u některých chimér P2X receptorů (Zemkova a spol., 2004). Rovněž u mutace G340C byl ztracen účinek IVM na  $EC_{50}$  a  $I_{max}$  (Obr. 11). Deaktivace proudu v nepřítomnosti IVM byla zpomalena, avšak IVM aplikací nadále prodloužitelná (Tab. 4, Obr. 11).



**Obr. 11** Ztráta IVM účinku u Y42C a G340C P2X4 mutací:

Levý panel ukazuje závislost amplitudy proudu na koncentraci ATP v nepřítomnosti (○) a v přítomnosti (●) IVM v případě P2X4-WT a Y42C, G340C mutací. Centrální panel a pravý panel znázorňují deaktivaci proudu po odmytí agonisty v nepřítomnosti (-IVM) a v přítomnosti (+IVM) 3 μM IVM.

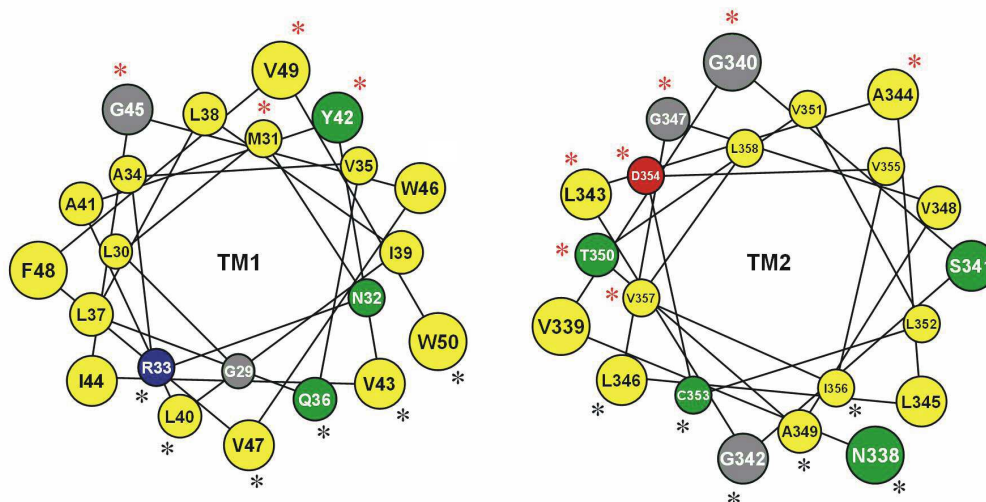
Mutace S341C, G347C, T350C, V357C odpovídaly v nepřítomnosti IVM se signifikantně sníženou hodnotou  $I_{max}$ , zatímco jejich  $EC_{50}$  hodnoty byly srovnatelné s hodnotami WT receptoru. Vysvětlení snížené hodnoty  $I_{max}$  je komplikované, může reflektovat nižší expresi receptoru v membráně buňky nebo důležitost zmutovaného rezidua v mechanismu otevírání a zavírání iontového kanálu. Z hlediska relativního zvýšení hodnoty  $I_{max}$  v přítomnosti IVM, je účinek IVM u mutace T350C porovnatelný s účinkem IVM u WT receptoru, takže Thr<sup>350</sup> reziduum nehraje zásadní roli v interakci TM domén s molekulou IVM. U mutací S341C, G347C, V357C naopak IVM aplikace způsobila zvýšení  $I_{max}$  hodnoty 2.5-4.8krát, účinek IVM byl výrazně silnější než v případě WT receptoru. Pravděpodobně tedy rezidua Ser<sup>341</sup>, Gly<sup>347</sup>, Val<sup>357</sup> hrají roli v „gatingu“ a vykazují preferenci k uzavřenému stavu kanálu (Silberberg a spol., 2007).

### 6.1.3 Model helikální struktury transmembránových domén P2X4 receptoru

Vzorec změn receptorových funkcí nebo ztráta účinků zprostředkovaných IVM naznačují, že následující rezidua se mohou účastnit interakce TM domén P2X4

receptoru s molekulou IVM: Arg<sup>33</sup>, Gln<sup>36</sup>, Leu<sup>40</sup>, Val<sup>43</sup>, Val<sup>47</sup>, Trp<sup>50</sup> z TM1 a Asn<sup>338</sup>, Gly<sup>342</sup>, Leu<sup>346</sup>, Ala<sup>349</sup>, Cys<sup>353</sup>, Ile<sup>356</sup> z TM2. Jedná se především o rezidua necitlivá k záměně cysteinem. Rezidua „k substituci citlivá“: Gly<sup>29</sup>, Met<sup>31</sup>, Tyr<sup>42</sup>, Gly<sup>45</sup>, Val<sup>49</sup> z TM1 a Gly<sup>340</sup>, Ser<sup>341</sup>, Leu<sup>343</sup>, Ala<sup>344</sup>, Gly<sup>347</sup>, Thr<sup>350</sup>, Asp<sup>354</sup>, Val<sup>357</sup> z TM2, mají pravděpodobně důležitou úlohu v jiných receptorových funkcích.

Periodicita IVM-indukovaných změn v receptorové funkci, kdy každé třetí nebo čtvrté reziduum má cysteinovou záměnou zasažen účinek IVM, je konzistentní s  $\alpha$ -helikální topologií obou TM domén. Na základě tohoto zjištění byla vytvořena helikální kruhová projekce TM1 a TM2 domény P2X4 receptoru (Obr. 12).



**Obr. 12** Helikální kruhová projekce TM1 a TM2 domény P2X4 receptoru:

Předpokládaná  $\alpha$ -helikální struktura TM1 segmentu (od G29 k W50 reziduu) a TM2 segmentu (od N338 k L358 reziduu) z extracelulárního pohledu. Černé hvězdičky značí rezidua interagující s molekulou IVM, červené hvězdičky rezidua s IVM-nezávislými změnami receptorové kinetiky po cysteinové substituci. Barvy kruhů označují glycin (šedá), nepolární (žlutá), polární nenabitá (zelená), bazická (modrá) a acidická (červená) rezidua.

Z levého panelu Obr. 12 je patrné, že „k substituci necitlivá“ rezidua Gln<sup>36</sup>, Leu<sup>40</sup>, Val<sup>43</sup>, Val<sup>47</sup>, Trp<sup>50</sup>, s oslabeným deaktivčním účinkem IVM, lemují jednu stranu předpokládaného  $\alpha$ -helixu TM1 domény. Rovněž „k substituci citlivé“ reziduum Arg<sup>33</sup>, s narušeným paralelním posunem mezi ATP citlivostí a rychlostí deaktivace v přítomnosti IVM, je lokalizováno na téže straně helixu TM1 domény. Rezidua „k substituci citlivá“ (mimo Gly<sup>29</sup>), která se nepodílí na interakci s IVM, lemují

rozdílnou stranu helixu. Obdobně u TM2 modelu (Obr. 12, pravý panel) jsou „k substituci necitlivá“ rezidua Asn<sup>338</sup>, Gly<sup>342</sup>, Leu<sup>346</sup>, Ala<sup>349</sup>, Ile<sup>356</sup> (se změnou deaktivace oproti WT v přítomnosti IVM) a reziduum Cys<sup>353</sup> (s narušeným paralelním posunem mezi ATP citlivostí a rychlostí deaktivace) lokalizované na jedné straně helixu, zatímco ostatní „k substituci citlivá“ rezidua (mimo Ser<sup>341</sup>) lemují rozdílnou stranu helixu.

Znamená to, že rezidua obou transmembránových domén interagující s molekulou IVM jsou pravděpodobně v otevřeném stavu kanálu otočena směrem k lipidům, kde tvoří vazebnou kapsu pro lipofilní IVM. IVM-neinteragující rezidua, vykazující po substituci změny v ATP citlivosti nebo ve velikosti proudu, naopak lemují opačnou stranu helixu, která pravděpodobně směřuje do protein-proteinového rozhraní mezi dvěma podjednotkami nebo do hydrofilního póru. Tato rezidua hrají důležitou úlohu v „gatingu“ kanálu.

## ***6.2 Úloha konzervovaného TM1 tyrosinu v kinetice P2X receptorů***

Druhá část práce je zaměřena na TM1 tyrosin, který je konzervován ve všech P2X receptorech a jehož záměna měla největší účinek na ATP citlivost a deaktivací kinetiku ze všech cysteinových mutací TM P2X4R. Cílem bylo zjistit, zda toto reziduum hraje roli v „gating“ mechanismu také u ostatních P2X receptorů. Aby bylo možno tento efekt porovnat s již publikovanými nálezy u P2X2 receptoru, byla zvolena náhrada za malý nepolární alanin.

### **6.2.1 Alaninová mutagenese TM1 domény P2X4 receptoru**

Nejdříve byla provedena alaninová skenovací mutagenese TM1 domény P2X4 receptoru. Skenování receptoru začalo u Gly<sup>29</sup> a skončilo u Trp<sup>50</sup>, první aminokyseliny lokalizované extracelulárně. Tato mutagenese odhalila následující „k substituci necitlivá“ rezidua: Leu<sup>30</sup>, Asn<sup>32</sup>, Ala<sup>34</sup>, Val<sup>35</sup>, Leu<sup>37</sup>, Leu<sup>38</sup>, Ile<sup>39</sup>, Leu<sup>40</sup>, Ala<sup>41</sup>, Val<sup>43</sup>, Ile<sup>44</sup>, Trp<sup>46</sup>, Val<sup>47</sup>, Phe<sup>48</sup>, Trp<sup>50</sup> (Tab. 5).

P2X4R	-IVM EC <sub>50</sub> (μM)	+IVM EC <sub>50</sub> (μM)	-IVM I <sub>max</sub> (nA)	+IVM I <sub>max</sub> (nA)	+IVM τ <sub>off</sub> (s)
WT	4.6±0.3	0.7±0.2	1.6±0.2	2.8±0.2	26±1.6
W50A	5.1±1.3	2.1±0.3*	1.7±0.2	2.6±0.6	5.4±0.4*
V49A <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0.1±0.02*	0.3±0.04*	16±7.7
F48A	4.1±0.5	0.6±1.1	1.5±0.8	2.3±0.4	24±4.8
V47A	3.2±1.5	1.2±0.2*	1.7±0.2	2.1±0.2	1.9±0.4*
W46A	3.0±0.5	0.4±0.1	1±0.2	1.8±0.2	20±3
G45A	1.6±0.2*	0.2±0.1	1.9±0.2	2.6±0.3	71±15*
I44A	7.4±1.9	0.4±0.1	1.3±0.2	2.7±0.4	28±1.3
V43A	5±1	1.5±0.1*	2.2±0.5	2.8±0.5	5.2±0.6*
Y42A <sup>b</sup>	0.6±0.1*	0.6±0.2	0.6±0.3*	0.5±0.2*	29±4.4
A41L	7±1.6	1±0.3	1.2±0.5	2.5±0.3	21±1.8
L40A	5.9±1.9	2.4±0.2*	1.3±0.3	2.4±0.2	3.8±0.7*
I39A	7.7±0.9	0.4±0.1	1.3±0.2	2.3±0.3	27±4.7
L38A	5.4±0.8	0.8±0.1	1.3±0.2	1.9±0.2	20±1.1
L37A	4.6±1	1±0.2	1.5±0.2	2.3±0.3	18±3.3
Q36A <sup>a</sup>	n.d.	2.3±0.5*	0.3±0.1*	1.1±0.1*	26±2
V35A	3.8±0.2	0.5±0.2	1.3±0.2	2.5±0.4	46±5.7
A34F	3.9±1.1	0.9±0.2	1.6±0.4	2.6±0.3	28±7.3
R33A <sup>a</sup>	n.d.	3±1.2*	0.3±0.1*	0.7±0.2*	20±3.6
N32A	3.2±1.1	1±0.2	1.7±0.5	2.5±0.3	21±3.2
M31A <sup>a</sup>	15±2.2*	0.8±0.2	1.3±0.3	2.1±0.2	21±3.9
L30A	6.7±2.2	0.8±0.1	2.1±0.5	3.1±0.2	24±2.5
G29A <sup>a</sup>	13±3*	1.1±0.2	0.6±0.1*	1.9±0.2	24±3.2

**Tab. 5** Vliv alaninové skenovací mutagenyze TM1 na kinetiku P2X4 receptoru:

Vliv alaninové skenovací mutagenyze TM1 P2X4 receptoru na hodnotu EC<sub>50</sub>, na maximální proudovou odpověď I<sub>max</sub> a deaktivací čas τ<sub>off</sub> receptoru v nepřítomnosti (-IVM) a v přítomnosti IVM (+IVM). N.d. značí „not determined“ (neurčeno). U každé mutace bylo změřeno 6-25 buněk. „<sup>a</sup>“ značí receptory, kdy byla ke stanovení I<sub>max</sub> použita koncentrace 1 mM ATP. „<sup>b</sup>“ označuje receptory, kdy se neliší τ<sub>off</sub> v nepřítomnosti a přítomnosti agonisty. Všechny ostatní mutace a WT měly hodnotu τ<sub>off</sub> v nepřítomnosti IVM <0.7 s. „\*“ značí hodnotu P<0.01 při srovnání WT a mutace.

Výsledky alaninové skenovací mutagenyze TM1 jsou ve shodě s výsledky cysteinové skenovací mutagenyze TM1, pouze mutace Q36A byla prakticky nefunkční na rozdíl od mutace Q36C. Také analýza účinku IVM ukázala u každého 3.-4. rezidua menší změnu deaktivace, konkrétně byla signifikantně nižší hodnota τ<sub>off</sub> nalezena u receptorů L40A, V43A, V47A a W50A. Tyto výsledky jsou ve shodě s helikálním uspořádáním TM1.

Ze všech TM1 reziduí došlo podle očekávání v rámci alaninové skenovací mutagenyze k nejvýraznějším změnám u mutace Y42A: byla nalezena asi 8krát vyšší

ATP citlivost a mnohonásobně prodloužený čas deaktivace ve srovnání s P2X4-WT receptorem. Další část práce je věnována bližšímu průzkumu úlohy konzervovaného TM1 tyrosinu u jiných P2X receptorů.

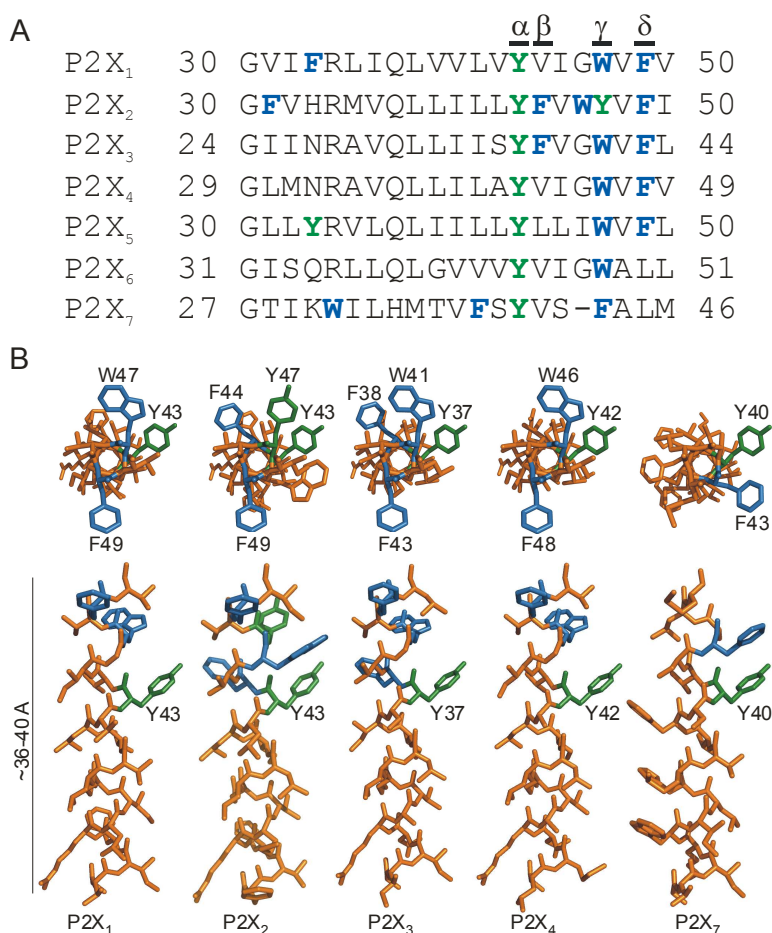
### 6.2.2 Účinek záměny konzervovaného TM1 tyrosinu napříč P2X receptory

Napříč receptory P2X1-7 je tyrosin konzervován v pozici 42 (P2X4 číslování) ve všech TM1 doménách. Jeho polohu v předpokládaných TM1 helixech znázorňuje Obr. 13. U šesti významných receptorů jsme vytvořili jeho alaninové mutace a studovali následující receptory: P2X1-Y43A, P2X2-Y43A, P2X3-Y37A, P2X4-Y42A, P2X6-Y44A, P2X7-Y40A.

Zatímco při záměně konzervovaného tyrosinu u P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7 receptorů vznikly funkční mutované receptory, u P2X1 vznikl nefunkční receptor. Exprese receptorů byla ověřena imunocytochemicky. Všechny WT i mutované receptory byly exprimovány v plazmatické membráně, včetně nefunkční mutace P2X1-Y43A (Obr. 14B). Také mutace P2X6-Y44A, stejně jako P2X6-WT, byla nefunkční.

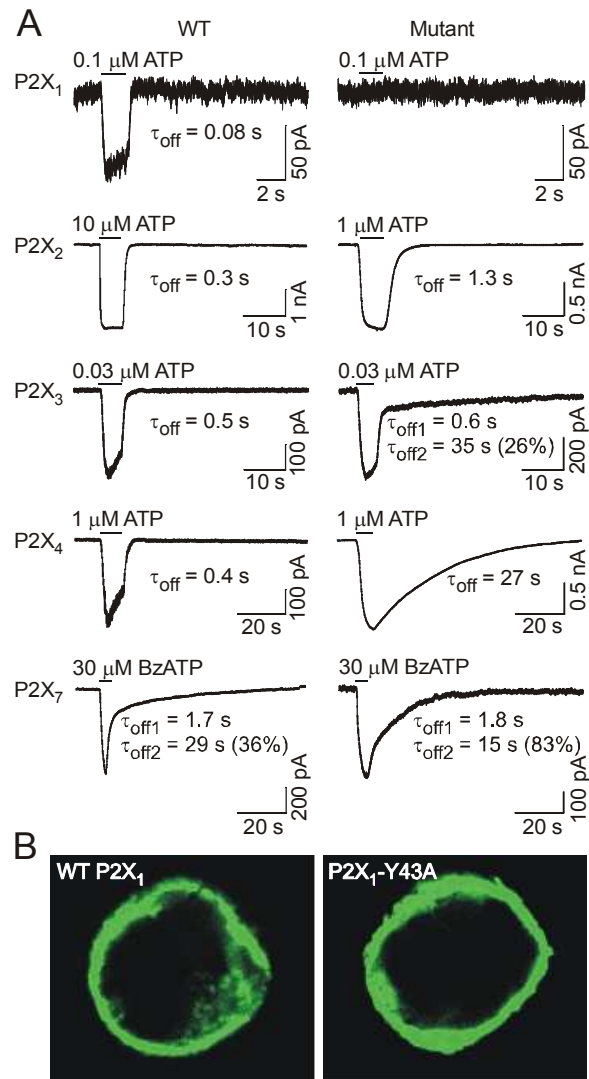
Mutace P2X2-Y43A, P2X3-Y37A a P2X4-Y42A odpovídaly na supramaximální koncentrace ATP (100  $\mu$ M pro P2X2, P2X4 a 10  $\mu$ M pro P2X3) proudy se signifikantně nižší hodnotou  $I_{\max}$  oproti WT receptorům (Tab. 6). Receptor P2X7 byl stimulován BzATP, který je pro tento receptor účinnější agonista než ATP (North, 2002). Mutace P2X7-Y40A odpovídala na 300  $\mu$ M BzATP také se sigifikantně sníženou hodnotou  $I_{\max}$  ve srovnání s P2X7-WT (WT=2.0 $\pm$ 0.3 nA; P2X7-Y40A=0.47 $\pm$ 0.05 nA). Pokles proudu po odmytí agonisty je u P2X2,3,4-WT receptorů rychlý a monoexponenciální. Deaktivace u mutací P2X2-Y43A a P2X4-Y42A byla rovněž monoexponenciální, avšak v porovnání s WT receptory signifikantně prodloužená. Výrazné prodloužení deaktivace bylo pozorováno zejména u P2X4-Y42A (Obr. 14A). Naproti tomu pokles proudu P2X3-Y37A receptoru byl biexponenciální. Průměrná hodnota rychlé komponenty poklesu (0.6 $\pm$ 0.01 s) je srovnatelná s hodnotou  $\tau_{\text{off}}$  P2X3-WT receptoru (Tab. 6), zatímco hodnota pomalé komponenty poklesu (34.2 $\pm$ 2 s; 36 $\pm$ 4 %) je srovnatelná s hodnotou  $\tau_{\text{off}}$  mutace P2X4-Y42A. Deaktivace P2X7-WT i P2X7-Y40A receptoru je biexponenciální; nepozorovali jsme mezi nimi signifikantní rozdíl v hodnotě deaktivčních konstant ( $\tau_{\text{off1}}$ ,  $\tau_{\text{off2}}$ ), pouze P2X7-Y40A receptor vykazoval vyšší procentuální zastoupení pomalé složky deaktivace ( $\tau_{\text{off2}}$ )

(WT=27.1±2 s, 33±6 %; P2X7-Y40A=15.4±4 s, 81±4 %). Zvýšený podíl pomalé složky deaktivace  $\tau_{off2}$  byl pozorován při stimulaci P2X7-Y40A receptoru všemi testovanými koncentracemi BzATP (10-300  $\mu$ M) (Obr. 15B). Navíc hodnoty deaktivace  $\tau_{off1}$ ,  $\tau_{off2}$  byly u P2X7-WT a P2X7-Y40A receptorů poměrně konstantní při stimulaci koncentracemi 10-300  $\mu$ M BzATP (Obr. 15A).



**Obr. 13** Pozice aromatických reziduí v 1. transmembránové doméně P2X receptorů:

(A) Aminokyselinová sekvence TM1 P2X1-7 receptorů. Aromatická rezidua jsou označena zeleně (polární) a modře (nepolární). Symboly  $\alpha$ - $\delta$  značí pozice aromatických reziduí v horní části TM1 domény, které byly studovány. (B) 3D modely předpokládané  $\alpha$ -helikální struktury TM1 domény P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7 receptoru. Modely začínají reziduem G29 a končí V49 (P2X4 číslování). Helix TM1 je znázorněn z extracelulárního pohledu (*horní panel*) a pohledu z membrány (*dolní panel*).



**Obr. 14** Vliv alaninové substituce konzervovaného tyrosinu TM1 domény na funkci a expresi P2X receptorů:

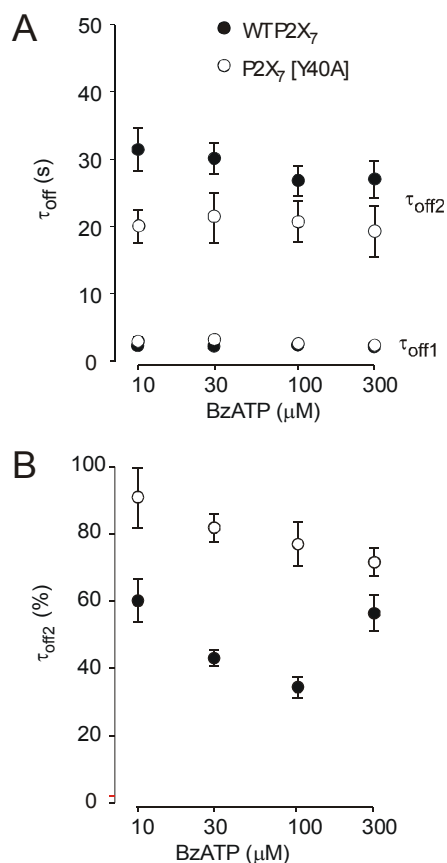
(A) Příklady proudových odpovědí WT receptorů (*levý panel*) a mutací tyrosinu na  $\alpha$ -pozici P2X<sub>1,2,3,4,7</sub> (*pravý panel*). Proudové byly nahrávány z HEK293 buněk exprimujících tyto receptory. Horizontální linie nad trasami znázorňuje čas ATP nebo BzATP aplikace. Pod trasami je vyznačena hodnota deaktivace ( $\tau_{off}$ ) odvozená z mono- (P2X<sub>1,2,4</sub>) nebo bi- (P2X<sub>3,7</sub>) exponenciálního fitování. V případě bi-exponenciálního fitování je uvedeno i procentuální zastoupení pomalé složky deaktivace ( $\tau_{off2}$ ) v celkovém poklesu proudu. (B) Imunocytochemický průkaz exprese WT a mutace P2X<sub>1</sub>-Y43A v HEK293 buňkách.



P2XRs	ATP EC <sub>50</sub> (μM)	WT/Mutant EC <sub>50</sub> ratio	ATP I <sub>max</sub> (nA)	ATP τ <sub>off</sub> (s)	αβ-meATP EC <sub>50</sub> (μM)	αβ-meATP efficacy (%) <sup>b</sup>
P2X2R-WT	5.4±0.8	-	2.6±0.2	0.34±0.05	>100	44
P2X2R-F49A	10.8±2.1*	0.5	2.2±0.2	0.44±0.06	>100	32
P2X2R-Y47A	0.82±0.1*	6.6	0.46±0.1*	0.36±0.02	11.8±2*	83
P2X2R-F44A	0.26±0.05*	20	0.44±0.1*	1±0.07*	3.4±1*	95
P2X2R-Y43A	0.28±0.05*	19	0.80±0.1*	1.3±0.1*	8.2±1*	94
P2X2R-Y43F	8.2±1.8	0.7	2.8±0.4	0.47±0.1	>100	65
P2X3R-WT	0.35±0.12	-	1.6±0.2	0.55±0.05	0.59±0.1	100
P2X3R-F43A	0.35±0.2	1	0.9±0.1*	0.75±0.06	0.32±0.2	100
P2X3R-W41A	0,39±0.15	0.9	0.7±0.07*	0.67±0.08	0.56±15	100
P2X3R-F38A	0.31±0.2	1.1	0.3±0.05*	1.95±0.27*	0.29±0,05	100
P2X3R-Y37A	0.14±0.1*	2.5	1.2±0.2	34.±2* <sup>c</sup>	0.27±0.1	100
P2X4R-WT	4.6±0.3	-	1.6±0.2	0.42±0.03	~57	42
P2X4R-W50A	5.1±1.3	0.9	1.7±0.2	0.35±0.08	~85	24
P2X4R-F48A	4.1±0.5	1.1	1.5±0.8	0.6±0.04	13.4±2.1*	62
P2X4R-W46A	3.0±0.5	0.7	1.0±0.16	0.6±0.1	8.9±1.6*	73
P2X4R-Y42A	0.6±0.1*	7.7	0.6±0.3*	24±2.9*	0.6±0.05*	100
Y42A+V43A	0.9±0.1*	5.4	0.3±0.03*	49±2.6*	0.9±0.3*	100
Y42A+W46A	1.4±0.2*	3.3	1.4±0.3	1.2±0.05*	4.7±2.0*	44
Y42A+F48A	0.3±0.1*	15	0.2±0.03*	54±5*	0.3±0.1*	100
Y42A+W50A	1.6±0.3*	2.8	1.2±0.4	1.6±0.2*	8.3±2.3*	53
Y42A+I39A <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0.1±0.05*	n.d.	n.d.	n.d.
Y42A+V35A	0.6±0.1*	7.7	0.4±0.1*	33±4.4*	0.6±0.2*	100
Y42A+G29A	0.4±0.1*	11	0.5±0.1*	34±3.4*	0.4±0.05*	77

**Tab. 6** Vliv jednobodových a dvojbodových alaninových mutací aromatických reziduí horní části TM1 domény na funkce P2X2-4 receptorů:

Vliv alaninové záměny vybraných aromatických reziduí TM1 P2X2,3,4 receptoru na hodnotu EC<sub>50</sub> pro ATP a α,β-meATP, na maximální proudovou odpověď I<sub>max</sub> a deaktivací čas τ<sub>off</sub>. N.d. značí „not determined“ (neurčeno). U každé mutace bylo změřeno 5-35 buněk. „<sup>a</sup>“ značí receptory, kdy byla ke stanovení I<sub>max</sub> použita koncentrace 1 mM ATP. „<sup>b</sup>“ označuje, že účinnost α,β-meATP byla vypočítaná z poměru I<sub>max</sub> při 300 μM α,β-meATP/I<sub>max</sub> při 100 μM ATP. „<sup>c</sup>“ značí mutaci, kde hodnota τ<sub>off</sub> pomalé komponenty poklesu proudu se na celkovém poklesu proudu po odmytí agonisty podílela 36±4 %.

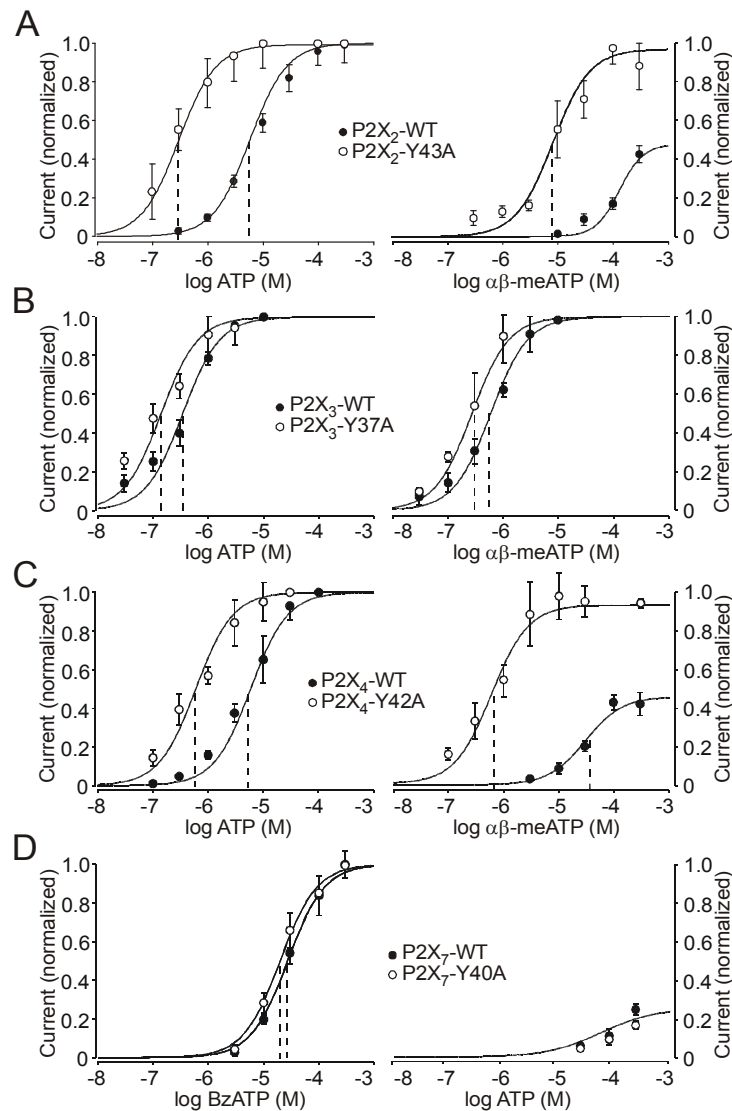


**Obr. 15** Na koncentraci nezávislý účinek BzATP na proudovou deaktivaci WT a mutovaného P2X7 receptoru:

(A) Graf reprezentuje rychlou ( $\tau_{\text{off1}}$ ) a pomalou ( $\tau_{\text{off2}}$ ) složku deaktivace derivovanou z biexponenciálního fitování poklesu proudu u P2X7-WT (●) a P2X7-Y40A (○) při stimulaci různými koncentracemi BzATP. (B) Závislost procentuálního podílu pomalé složky deaktivace na koncentraci BzATP u P2X7-WT (●) a P2X7-Y40A (○).

Třetím účinkem alaninové záměny konzervovaného tyrosinu bylo zvýšení citlivosti k agonistům, kdy hodnoty  $EC_{50}$  byly u mutovaných receptorů P2X2-Y43A, P2X3-Y37A a P2X4-Y42A signifikantně sníženy oproti WT receptorům. Námi naměřené hodnoty  $EC_{50}$  pro P2X2, P2X4 a P2X3-WT receptory (5.4  $\mu\text{M}$ , 4.6  $\mu\text{M}$  a 0.35  $\mu\text{M}$ ) jsou srovnatelné s hodnotami uváděnými v literatuře. V případě receptorů P2X2-Y43A a P2X4-Y42A došlo k výraznému posunu „dose response“ křivek doleva, s 20- a 8-násobným snížením hodnoty  $EC_{50}$  oproti WT receptorům (Obr. 16, levý panel). V případě P2X3-Y37A došlo k 2-násobnému snížení hodnoty  $EC_{50}$ . Receptor P2X7-Y40A byl stejně citlivý k BzATP jako WT receptor (hodnota  $EC_{50}$ :

P2X<sub>7</sub>-WT=29  $\mu$ M; P2X<sub>7</sub>-Y40A=20  $\mu$ M BzATP) (Obr. 16D, levý panel), citlivost k ATP byla rovněž nezměněna (Obr. 16D, pravý panel).



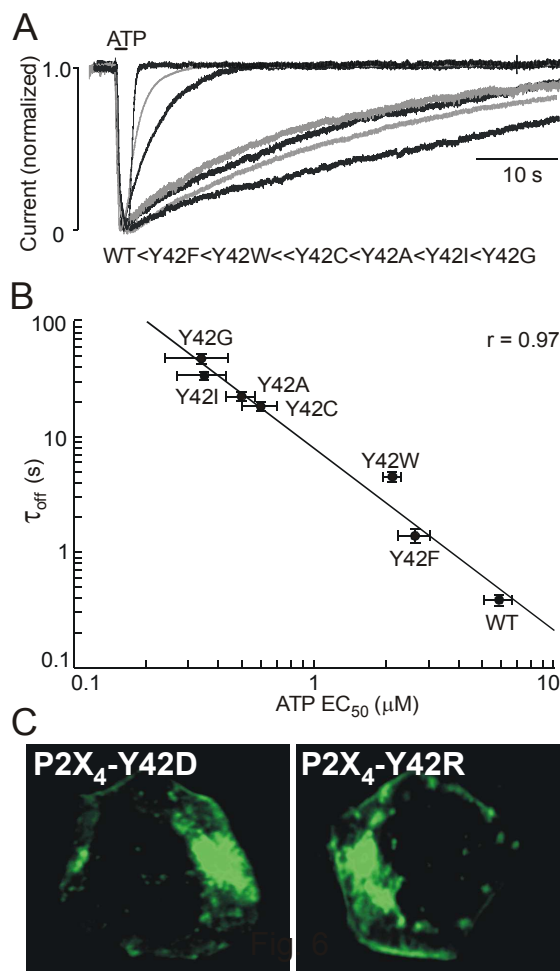
**Obr. 16** Vliv alaninové záměny konzervovaného TM1 tyrosinu na citlivost k agonistům ATP,  $\alpha,\beta$ -meATP a BzATP:

„Dose response“ křivka WT (●) a mutovaných P2X receptorů (○). (*Levý panel*) Citlivost k ATP se zvýšila u mutovaných receptorů P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> (A-C). K žádné změně v citlivosti k BzATP nedošlo u mutaci P2X<sub>7</sub> (D). Proudové odpovědi byly normalizovány k maximálním proudovým odpovědím vyvolaným 100  $\mu$ M ATP (P2X<sub>2,3,4</sub>) a 300  $\mu$ M BzATP (P2X<sub>7</sub>). (*Pravý panel*) Zvýšení citlivosti k  $\alpha,\beta$ -meATP u P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> (A-C).  $\alpha,\beta$ -meATP je pro P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> parciální agonista, jeho účinnost byla měřena srovnáním s maximální odpovědí na stimulaci ATP. Nulový účinek záměny na citlivost k ATP u mutaci P2X<sub>7</sub> (D). Vertikální přerušované linie označují hodnoty EC<sub>50</sub>.

Je známo, že P2X2 a P2X4 receptory jsou málo citlivé k  $\alpha,\beta$ -meATP v porovnání s P2X1 a P2X3 (Ralevic a Burnstock, 1998). Ve shodě s tímto jsme pozorovali proudové odpovědi P2X2R pouze při aplikaci vysokých koncentrací  $\alpha,\beta$ -meATP a nebylo tak možné stanovit hodnotu  $EC_{50}$  (Obr. 16A, pravý panel). P2X4 receptor je rovněž málo citlivý k  $\alpha,\beta$ -meATP; hodnota  $EC_{50} \sim 57 \mu\text{M}$ . Účinnost  $\alpha,\beta$ -meATP je u tohoto receptoru nižší (40 %) v porovnání s ATP (100%). Záměna konzervovaného tyrosinu za alanin způsobila u P2X2-Y43A a P2X4-Y42A receptorů značný nárůst citlivosti k  $\alpha,\beta$ -meATP, hodnoty  $EC_{50}$  se snížily na  $8.2 \mu\text{M}$  a  $0.6 \mu\text{M}$ . Hodnota  $EC_{50}$  je v druhém případě (P2X4-Y42A) srovnatelná s hodnotou  $EC_{50}$  pro  $\alpha,\beta$ -meATP u P2X3-WT receptoru. Rovněž účinnost  $\alpha,\beta$ -meATP byla u mutací P2X2-Y43A a P2X4-Y42A zvýšena a dosáhla účinnosti ATP (Tab. 6). Znamená to, že  $\alpha,\beta$ -meATP se stal pro tyto mutace plným agonistou. U receptoru P2X3-Y37A byl pozorován 2-násobný levostranný posun citlivosti. Tyto výsledky naznačují, že alaninová substituce konzervovaného tyrosinu v TM1 doméně nejvíce ovlivnila účinnost agonistů u P2X2 a P2X4 receptorů, méně u P2X3 receptoru a prakticky bez vlivu byla u P2X7 receptoru. Deaktivace byla prodloužena zejména u P2X4 receptoru, méně, ale signifikantně, u P2X2 a P2X3 receptorů.

### **6.2.3 Aminokyseliny Phe a Trp mohou částečně nahradit Tyr na pozici 42 u P2X4 receptoru**

K ozřejmění toho, zda 1) účinek záměny konzervovaného tyrosinu za cystein a alanin byl specifický pro tyto aminokyseliny a 2) jaké vlastnosti musí mít reziduum v pozici 42 P2X4 receptoru, byl konzervovaný tyrosin nahrazen osmi aminokyselinami s různými chemickými vlastnostmi (alaninem, isoleucinem, cysteinem, glycinem, fenylalaninem, tryptofanem, argininem, aspartátovou kyselinou). Byly tak vytvořeny následující mutace: P2X4-Y42A, P2X4-Y42I, P2X4-Y42C, P2X4-Y42G, P2X4-Y42F, P2X4-Y42W, P2X4-Y42R, P2X4-Y42D. Receptory P2X4-Y42R a P2X4-Y42D neodpovídaly ani při stimulaci 3 mM ATP, ačkoliv konfokální mikroskopií byla prokázána jejich exprese v plazmatické membráně HEK293 buněk (Obr. 17C). Všechny další mutované receptory byly funkční a vykazovaly různé změny kinetiky deaktivace oproti P2X4-WT receptoru.



**Obr. 17** Vliv aminokyselin s různými chemickými vlastnostmi na pozici 42 P2X4 receptoru:

(A) Superponované proudové odpovědi na 0.3 – 1  $\mu$ M ATP u P2X4-WT a mutovaných funkčních receptorů a pořadí deaktivací časové konstanty po odmytí ATP. (B) Logaritmičká křivka závislosti deaktivací časové konstanty  $\tau_{off}$  a ATP  $EC_{50}$  hodnoty u P2X4 mutovaných receptorů. (C) Receptory P2X4-Y42R a P2X4-Y42D, které neodpovídaly na ATP stimulaci, jsou exprimovány v membráně HEK293 buněk.

Nejvýraznější změny kinetiky nastaly při záměně za malé nenabitě aminokyseliny glycin, izoleucin, cystein a alanin, s následujícím pořadím deaktivací konstant  $\tau_{off}$ : Y42G > Y42I > Y42A > Y42C (Obr. 17A). Záměna konzervovaného tyrosinu za aminokyseliny s aromatickou strukturou (fenylalanin a tryptofan) způsobila malou změnu v kinetice, což vypovídá o tom, že tyto aminokyseliny mohou částečně nahradit konzervovaný tyrosin. Křivka závislosti hodnot  $\tau_{off}$  a hodnot  $EC_{50}$  pro ATP všech funkčních mutovaných receptorů ukazuje nepřímou závislost mezi těmito hodnotami (Obr. 17B), a že P2X4-WT receptoru jsou nejbližší receptory P2X4-Y42F a P2X4-Y42W. Výsledky tedy naznačují, že pro správné fungování P2X4 receptoru

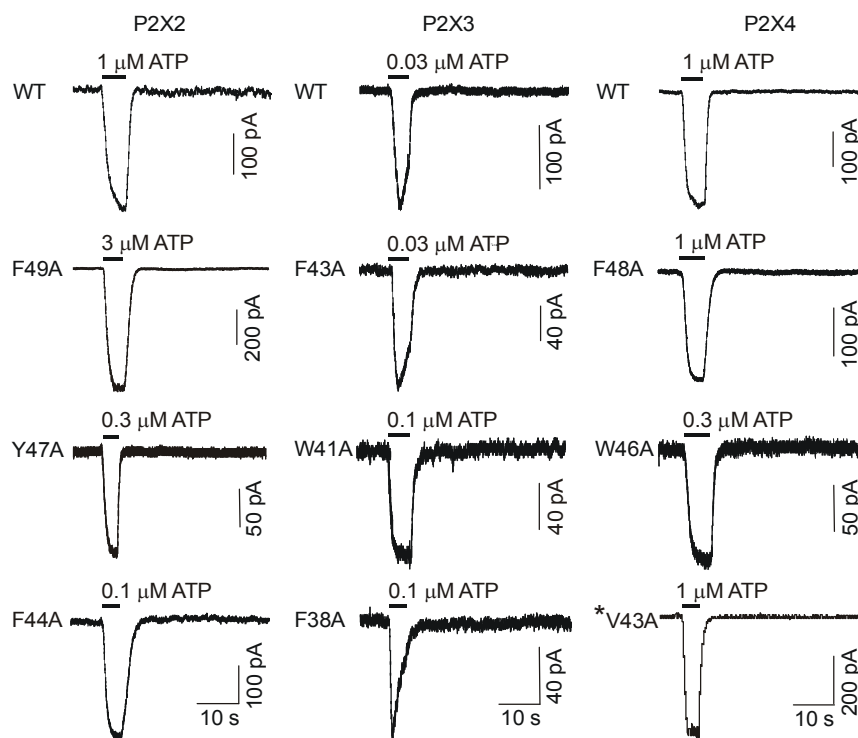
není rozhodující hydrofobicita aminokyseliny na pozici 42 (viz Y42F vs. Y42W), ale její objem (viz Y42A, Y42C, Y42I a Y42G). Vnesení nabitého rezidua na pozici 42 zablokovalo receptorové funkce. Rovněž u P2X2 receptoru je mutace P2X2-Y42F kinetikou deaktivace a citlivostí k ATP neodlišitelná od P2X2-WT (Tab. 6).

### ***6.3 Role aromatických reziduí horní části TM1 v kinetice P2Xreceptorů***

Třebaže naše výsledky jasně ukázaly, že konzervovaný tyrosin, který se nachází zhruba v polovině TM1 domény, hraje důležitou roli ve funkci a 3D struktuře několika P2X receptorů, v literatuře byly popsány podobné účinky například u mutace P2X2-F44A (Jiang a spol., 2001; Haines a spol., 2001a; Li a spol., 2004; Li a spol., 2008). Rozhodli jsme se proto prozkoumat další vybraná aromatická rezidua v horní části TM1 domény, jejichž polohu v předpokládaných TM1 helixech receptorů P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7 znázorňuje Obr. 13.

#### **6.3.1 Účinek jednobodových mutací aromatických reziduí v TM1 na funkci P2X receptorů**

V horní části TM1 P2X receptorů se kromě konzervovaného tyrosinu na pozici  $\alpha$  nachází další aromatické aminokyseliny na pozici  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (Obr. 13A). U P2X2 a P2X3R jsme zaměnili tyto aromatické aminokyseliny za alanin a vytvořili šest nových mutací: P2X2-F44A, P2X2-Y47A, P2X2-F49A, P2X3-F38A, P2X3-W41A a P2X3-F43A. Z předcházejících pokusů byly použity mutace P2X4-W46A, P2X4-F48A a P2X4-W50A. Všechny mutované receptory byly funkční (Obr. 18) a většina z nich odpovídala na supramaximální koncentraci ATP nižší amplitudou v porovnání s WT receptorem, podobně jako při záměně  $\alpha$ -aromatického rezidua (Tab. 6., Obr. 19A). Záměna aromatického rezidua na pozici  $\beta$  a  $\gamma$  měla na hodnotu  $I_{max}$  větší vliv než záměna aromatického rezidua na pozici  $\delta$  (Obr. 19A).



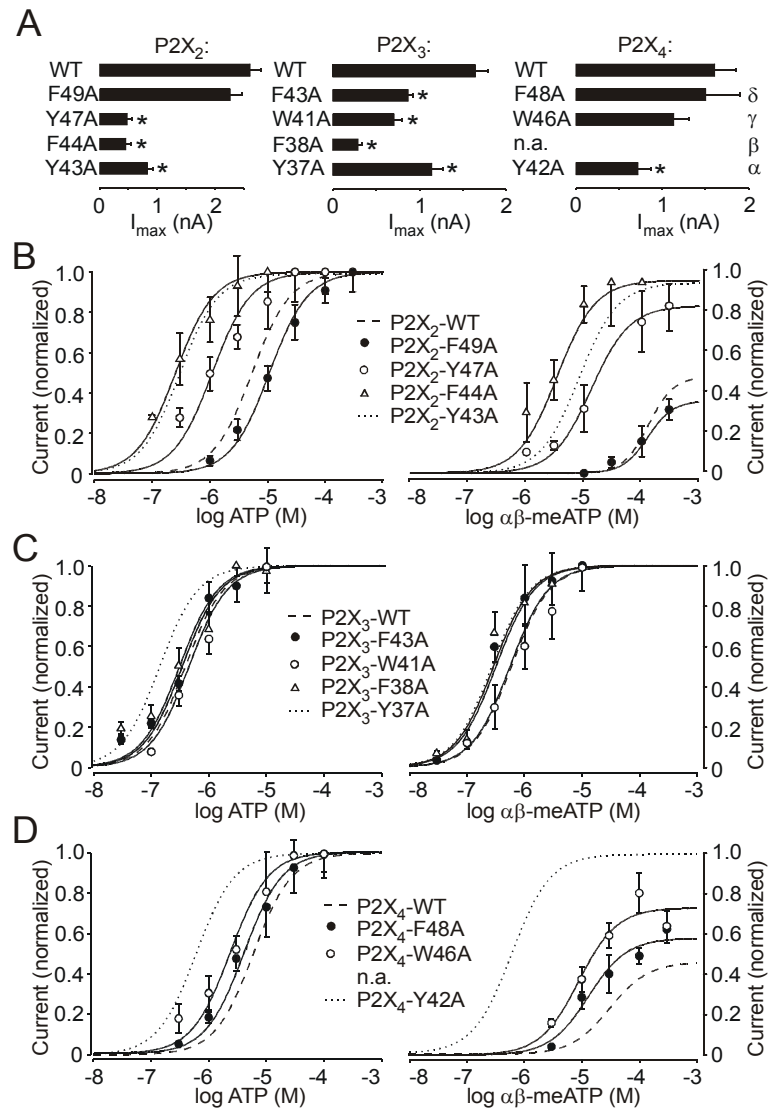
**Obr. 18** Alaninová záměna aromatických reziduí v horní části TM1 domény P2X receptorů generuje funkční receptory:

Příklady proudových odpovědí P2X2 (*vlevo*), P2X3 (*uprostřed*) a P2X4 (*vpravo*) WT receptorů a alaninových mutací aromatických reziduí v  $\beta$ - $\delta$  pozici TM1 domény. Deaktivace ATP-indukovaných proudů byla monoexponenciální u všech mutací, signifikantní prodloužení bylo nalezeno pouze u P2X2-F44A a P2X3-F44A. Buňky byly stimulovány nedesenitizující koncentrací ATP. (\*) Na  $\beta$  pozici P2X4 receptoru se nachází nearomatické reziduum Val<sup>43</sup>.

Mutace rezidua na pozici  $\beta$  u P2X2 (P2X2-F44A) napodobila efekt záměny konzervovaného tyrosinu ve zvýšení citlivosti receptoru k ATP a v prodloužení deaktivace kanálu. Mutace rezidua na pozici  $\beta$  u P2X3 (P2X3-F38A) prodloužila deaktivaci kanálu, přestože nezvýšila ATP citlivost. Nicméně ATP indukované proudy byly nízké, desenzitizace rychlá a proto bylo obtížné naměřit „dose response“ křivku.

U P2X4R se na  $\beta$ -pozici nenachází aromatické reziduum. Zvýšení citlivosti k ATP bylo pozorováno při záměně  $\gamma$ -rezidua P2X2, tedy u mutace P2X2-Y47A. Při záměně  $\gamma$ -rezidua u P2X3 a P2X4 receptorů zvýšení citlivosti pozorováno nebylo (Tab. 6, Obr. 19). Alaninová záměna na  $\delta$ -pozici měla pouze minoritní účinek na ATP citlivost a kinetiku receptorů. Rovněž mutace P2X4-W50A (záměna receptor-specifického rezidua, prvního ektodoménového nad TM1) se citlivostí k agonistům a kinetikou nelišila od P2X4-WT (Tab. 6). Citlivost k  $\alpha,\beta$ -meATP byla u P2X2 a P2X4

receptorů zvýšena mutacemi  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -reziduí; záměna  $\delta$ -rezidua citlivost k  $\alpha,\beta$ -meATP nevyšila (Tab. 6, Obr. 19). Výsledky naznačují receptor-specifickou roli aromatických reziduí na  $\beta$ - a  $\gamma$ -pozici v citlivosti k agonistům, a malý význam reziduí v pozici  $\delta$ .



**Obr. 19** Změny maximální amplitudy a citlivosti P2X receptorů k ATP a  $\alpha,\beta$ -meATP při alaninové záměně aromatických reziduí v horní části TM1 domény:

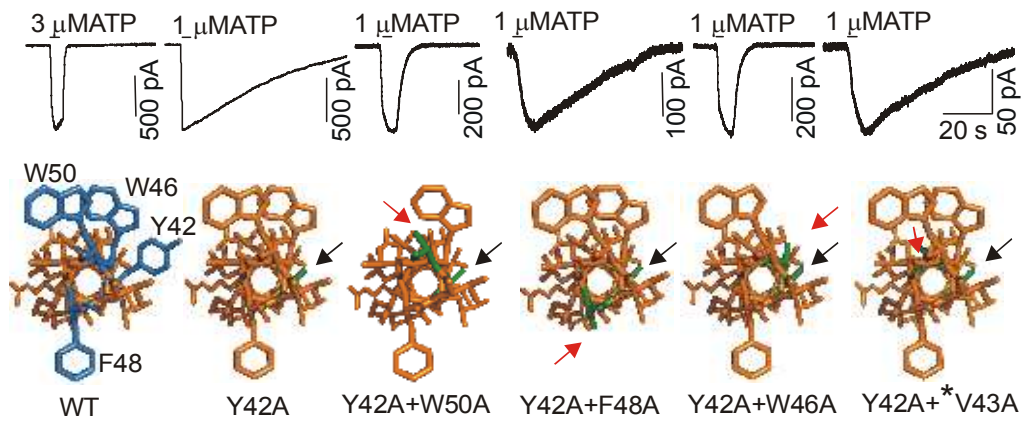
(A) Srovnání maximálních ATP proudových odpovědí  $I_{max}$  WT -P2X2 (vlevo), -P2X3 (uprostřed) a -P2X4 (vpravo) receptorů a alaninových mutací aromatických reziduí v  $\alpha$ - $\delta$  pozici TM1 domény. (B-D) „Dose response“ křivky pro ATP (levý panel) a  $\alpha,\beta$ -meATP (pravý panel) WT -P2X2 (B), -P2X3 (C) a -P2X4 (D) receptorů a alaninových mutací aromatických reziduí v  $\alpha$ - $\delta$  pozici TM1 domény. Účinnost  $\alpha,\beta$ -meATP byla změřena srovnáním s maximální ATP odpovědí.



### 6.3.2 Vliv dvojitých alaninových mutací v TM1 na kinetiku P2X4 receptoru

Pokusili jsme se dále ovlivnit účinky způsobené záměnou konzervovaného Tyr<sup>42</sup> za alanin tím, že jsme současně zaměnili druhé aromatické reziduum v horní části TM1 domény P2X4 receptoru. Vytvořili jsme následující dvojmutace: P2X4-Y42A+W46A, P2X4-Y42A+F48A, P2X4-Y42A+W50A. Prodloužení deaktivace receptoru způsobené záměnou Tyr<sup>42</sup> za alanin bylo výrazně sníženo vnesením druhé mutace na pozici Trp<sup>46</sup> a Trp<sup>50</sup>: dvojitě mutované receptory P2X4-Y42A+W46A a P2X4-Y42A+W50A vykazovali signifikantně rychlejší deaktivaci v porovnání s receptorem P2X4-Y42A (Tab. 6, Obr. 20). Dvojmutace P2X4-Y42A+W46A a P2X4-Y42A+W50A rovněž vykazovaly zvýšení hodnoty  $I_{\max}$  a sníženou ATP a  $\alpha,\beta$ -meATP citlivost v porovnání s P2X4-Y42A (Tab. 6). Dvojmutace byly oproti jednobodové mutaci také citlivé k IVM (zvýšení  $I_{\max} \sim 1.8$ krát a prodloužení  $\tau_{\text{off}}$  z  $\sim 1.4$  s na  $\sim 11$  s). Z výsledků vyplývá, že funkce P2X4-Y42A receptoru byly téměř kompletně obnoveny vnesením druhé mutace na pozici 46 a 50. Naproti tomu dvojmutace P2X4-Y42A+F48A se kinetikou podobala jednobodové mutaci P2X4-Y42A (Tab. 6, Obr. 20).

Kromě toho byly v kombinaci s Y42A zaměněny alaninem i čtyři nearomatická rezidua TM1 domény P2X4 receptoru: Gly<sup>29</sup> (druhé konzervované reziduum v TM1), Val<sup>35</sup> (nachází se na stejné straně TM1 helixu jako Tyr<sup>42</sup>, ale o dvě otáčky níž), Ile<sup>39</sup> (nachází se na stejné straně TM1 helixu jako Tyr<sup>42</sup>, ale o jednu otáčku níž) a Val<sup>43</sup> (v jedné rovině sousedí s Tyr<sup>42</sup> a jeho pozice u P2X2 receptoru ovlivňuje ATP citlivost). Žádná z těchto dvojmutací neobnovila receptorové funkce (Tab. 6, Obr. 20). U P2X2 receptoru dvojmutace Y43A+F44A a Y42A+Y47A byly nefunkční. Výsledky dokládají, že výrazný účinek alaninové záměny P2X4-Tyr<sup>42</sup>, může být zvrácen alaninovou záměnou další aromatické aminokyseliny v horní části TM1 (Trp<sup>46</sup>) nebo nad TM1 doménou (Trp<sup>50</sup>). Jak je patrné z 3D modelu předpokládaného helikálního uspořádání TM1 domény (Obr. 20), nacházejí se tyto aminokyseliny na téže straně  $\alpha$ -helixu jako konzervovaný tyrosin. Tento efekt nebyl pozorován, pokud druhou mutací bylo zasaženo aromatické reziduum na opačné straně helixu (Phe<sup>48</sup>).



**Obr. 20** Alaninová substituce druhé aromatické aminokyseliny TM1 domény P2X4 recepturu může zvrátit účinek alaninové substituce konzervovaného tyrosinu:

Příklady proudových odpovědí P2X4-WT, jednobodové mutace P2X4-Y42A a dvojitě mutovaného P2X4 recepturu po stimulaci ATP (znázorněno horizontální linií nad průběhem trasy) (*horní panel*). 3D model předpokládaného  $\alpha$ -helixu TM1 domény P2X4 recepturu. Černé šipky znázorňují pozici zaměněného konzervovaného tyrosinu (zeleně) a červené šipky znázorňují druhé zaměněné reziduum (zeleně) (Trp<sup>50</sup>, Phe<sup>48</sup>, Trp<sup>46</sup> a nearomatické reziduum Val<sup>43</sup> (\*), které je přítomno na  $\beta$ -pozici) (*dolní panel*).

## 7. DISKUZE

Dosud publikované články o působení IVM na P2X4 receptor ukázaly, že IVM nepůsobí prostřednictvím vazby na intracelulární konce ani na ektodoménu receptoru (Khakh a spol., 1999b; Jelinkova a spol., 2006; Priel a spol., 2004). Během přípravy této práce byl opublikován článek dokládající, že molekula IVM se váže mezi TM1 a TM2 doménu P2X4 receptoru v otevřené konformaci iontového kanálu (Silberberg a spol., 2007). Autoři došli k tomuto závěru na základě studia kinetiky chimérických receptorů a identifikovali rezidua se změněným IVM účinkem pomocí tryptofanové skenovací mutageneze. V nepřítomnosti IVM charakterizovali změnu ATP citlivosti a v přítomnosti 3  $\mu\text{M}$  IVM zjišťovali, které mutace mají méně než 2x a více než 5x zvýšenou amplitudu proudu, byl-li receptor stimulován koncentrací ATP odpovídající hodnotě  $EC_{50}$ . Jejich studie odhalila oslabený účinek IVM u I39W, Y42W, V43W, V47W, G340W, G342W, L345W a V348W mutací. Zesílený IVM účinek pozorovali u G29W, V35W, L37W, L40W, A41W, S341A, G347W, A349V, V351W, C353A mutací. Tato rezidua měla nahodilou distribuci a nepodařilo se je uspořádat do helikálního modelu. Žádné z identifikovaných reziduí není P2X4-specifické, což potvrdilo hypotézu, že specifická pozice reziduí je pro interakci helixů s molekulou IVM důležitější než jejich receptorová specificita (Jelinkova a spol., 2006). V naší práci byla využita cysteinová skenovací mutageneze TM domén, která je šetrnější v porovnání s tryptofanovým skenováním, řada tryptofanových mutací byla totiž nefunkční (Silberberg a spol., 2007). Cysteinovou mutagenezí jsme získali větší počet mutací s nezměněnou kinetikou v nepřítomnosti IVM. Další důvod pro zvolení cysteinového skenování byl ten, že doposud nebylo u P2X4 receptoru provedeno a mohlo pomoci v identifikaci reziduí důležitých ve formování vlastního póru iontového kanálu. Samostatné využití změn hodnot  $EC_{50}$  pro vyhodnocení účinku IVM, jak tomu bylo ve studii Silberberga a spol., může být zavádějící. Například bylo prokázáno, že v ektodoméně mnoho tichých mutací a mutací s nízkou amplitudou má při IVM aplikaci vyšší nárůst proudové odpovědi než samotný WT receptor, ačkoliv se tato rezidua nemohou podílet na vazbě IVM (Zemkova a spol., 2007). Dalším rozdílem od studie Silberberga a spol. bylo, že jsme jako hlavní indikátor IVM účinku použili hodnotu časové deaktivční konstanty,  $\tau_{\text{off}}$ , která není závislá na koncentraci agonisty (Zemkova a spol., 2007; Yan a spol., 2006). Nalezli jsme, že většina cysteinových

mutací TM1 (16 z 22) a TM2 (13 z 21) nevykazovala v nepřítomnosti IVM změny v kinetice receptoru. Z těchto mutací byl IVM účinek na deaktivaci kanálu oslaben u Gln<sup>36</sup>, Leu<sup>40</sup>, Val<sup>43</sup>, Val<sup>47</sup>, Asn<sup>338</sup>, Gly<sup>342</sup>, Leu<sup>346</sup>, Ala<sup>349</sup> a zesílen u Ile<sup>356</sup> mutace (Tab. 3, Tab. 4, Obr. 8, Obr. 9). Domníváme se, že změněný účinek IVM u těchto mutací ilustruje důležitost reziduí pro vazbu IVM. U většiny těchto reziduí byl navíc silně redukován IVM-indukovaný levostranný posun v ATP citlivosti (Obr. 10), což dále podporuje zmíněný závěr. Mezi IVM-interagující rezidua jsme také zařadili Arg<sup>33</sup> a Cys<sup>353</sup>, jelikož nevykazují paralelní posun mezi hodnotami EC<sub>50</sub> a rychlostí deaktivace (Tab. 3, Tab. 4). Vzorec IVM-interagujících reziduí odpovídá helikálnímu uspořádání TM domén, kdy u každého třetího až čtvrtého rezidua je cysteinovou záměnou zasažen účinek IVM. Toto uspořádání umožňuje předpovídat, že v otevřeném konformačním stavu zmíněná rezidua lemují stejnou stranu předpokládaných TM helixů, jsou orientována k lipidům a podílejí se na formování vazebné kapsy pro lipofilní IVM (Obr. 12). Porovnání s P2X receptorem *Schistosoma mansoni* (schP2X), který je rovněž na IVM citlivý, ukázalo, že 11 z 12ti transmembránových reziduí, u kterých předpokládáme interakci s IVM, je přítomno také u schP2X receptoru a reziduum P2X4-Trp<sup>50</sup> (1. reziduum nad TM1 doménou) je u schP2X nahrazeno tyrosinem.

Cysteinové skenování TM domén P2X4 receptoru dále odhalilo 13 reziduí, která jsou důležitá v receptorových funkcích. Jedná se o rezidua Gly<sup>29</sup>, Met<sup>31</sup>, Tyr<sup>42</sup>, Gly<sup>45</sup>, Val<sup>49</sup>, Gly<sup>340</sup>, Ser<sup>341</sup>, Leu<sup>343</sup>, Ala<sup>344</sup>, Gly<sup>347</sup>, Thr<sup>350</sup>, Asp<sup>354</sup>, Val<sup>357</sup>. Je-li předpoklad o lipidové orientaci vazebné kapsy pro IVM správný, nachází se tato rezidua (kromě Gly<sup>29</sup> a Ser<sup>341</sup>) na opačné straně  $\alpha$ -helixů, kdy mohou lemovat hydrofilní pór kanálu nebo směřovat do protein-proteinového rozhraní (Obr. 12). Tryptofanová skenovací mutagenese P2X4 receptoru nastínila možnost zapojení TM1 reziduí citlivých k substituci, konkrétně Tyr<sup>42</sup>, v protein-proteinové interakci (Silberberg a spol., 2005). V případě TM2 reziduí lze náš závěr podpořit výsledky cysteinové skenovací mutagenese P2X2 receptoru kombinované s aplikací pórem prostupných methanethiosulfonátů (Egan a spol., 1998).

Mutovaný receptor P2X4-D354C je tichý, jeho receptorová funkce nebyla IVM aplikací oživena. Tryptofanová záměna tohoto rezidua vyústila ve vznik nefunkčního receptoru (Silberberg a spol., 2007), stejně jako alaninová záměna u P2X2 receptoru (Li a spol., 2004; Khakh a spol., 2005). Odpovídající P2X2 cysteinová mutace (D349C) byla funkční, ale vykazovala signifikantní snížení amplitudy proudů (Rassendren a spol., 1997). Reziduum Asp<sup>349</sup> se u P2X2 receptoru podílí na tvorbě brány póru kanálu

(Rassendren a spol., 1997). Reziduum Gly<sup>347</sup> P2X2 receptoru se rovněž podílí na tvorbě brány póru kanálu a hraje důležitou úlohu v pohybu helixu jako místo lokální flexibility (Egan a spol., 1998; Khakh a spol., 2005). Jako paralela zesíleného vlivu IVM na  $I_{\max}$  u P2X4-G347C byl u odpovídající mutace P2X2 receptoru pozorován potenciační účinek methanethiosulfonátů (Rassendren a spol., 1997; Khakh a spol., 2005).

Substituce P2X4-Tyr<sup>42</sup> cysteinem nebo alaninem měla za následek snížení maximální proudové amplitudy, zvýšení ATP citlivosti (zhruba 8krát) a výrazné prodloužení deaktivace. Zvýšená citlivost receptoru odpovídá prodloužení deaktivace po odmytí agonisty. Rovněž P2X4-G340C mutace v TM2 doméně měla sníženou maximální proudovou amplitudou, zvýšenou citlivost k ATP, prodlouženou deaktivaci. IVM ztratil u mutací Y42C a G340C vliv na hodnotu  $EC_{50}$  a  $I_{\max}$ , ale u G340C přetrval vliv na hodnotu  $\tau_{\text{off}}$ . Reziduum Tyr<sup>42</sup> je konzervované napříč P2X podjednotkami a tudíž nemůže být místem vazby IVM, která je specifická pro P2X4 podjednotku. Změny kinetiky u mutací Y42C a Y42A v nepřítomnosti IVM spíše vypovídají o jeho důležité roli v „gatingu“ kanálu. Dá se usoudit, že další ovlivnění kinetiky aplikací IVM neproběhlo proto, že samotná záměna Tyr<sup>42</sup> způsobila velmi výrazné kinetické změny a jeho mutace prakticky mimikovaly účinek IVM, který navyšuje frekvenci otevírání kanálu (Priel a Silberberg, 2004). Z toho lze odvodit, že frekvence otevírání kanálu je u P2X4-Y42C a P2X4-Y42A mutací vysoká a nemůže být dále zvýšena pomocí IVM. Následující substituce P2X4-Tyr<sup>42</sup> aminokyselinami s různými vlastnostmi odhalila, že pro normální receptorovou funkci je na této pozici potřebné aromatické reziduum.

Roli TM1 konzervovaného tyrosinu v kinetice receptoru jsme prozkoumali rovněž u P2X1, P2X2, P2X3, P2X7 receptorů. Záměnou konzervovaného tyrosinu za alanin u P2X1 receptoru vznikl nefunkční receptor (Obr. 14), což potvrzuje důležitost tohoto rezidua pro receptorové funkce. Záměna konzervovaného tyrosinu za cystein u P2X2 rovněž vyústila ve vznik nefunkčního receptoru (Haines a spol., 2001a; Jiang a spol., 2001; Li a spol., 2008), avšak receptor se záměnou tyrosinu za alanin je funkční a má přibližně 10krát zvýšenou ATP citlivost (Li a spol., 2004); v našich pokusech jsme našli 20-násobné zvýšení. V literatuře byla mutace P2X2-Y43A charakterizovaná sníženou  $NMDG^+$  permeabilitou, signifikantně nižší amplitudou ATP-stimulovaných proudů (Khakh a Egan, 2005) a menší  $Ca^{2+}$  permeabilitou oproti P2X2-WT (Samways a spol., 2008). Také mutace P2X2-Y43F, která obsahuje aromatický kruh, ale ztrácí hydroxylovou skupinu, vykazuje

signifikantní redukci  $\text{Ca}^{2+}$  propustnosti. Z toho lze odvodit možnou interakci hydroxylové skupiny tyrosinu s vápníkem (Samways a spol., 2008). Podobný mechanismus byl popsán pro některá rezidua TM2 domény zapojená do  $\text{Ca}^{2+}$  propustnosti (Migita a spol., 2001; Egan a spol., 2004). Rovněž ATP citlivost mutace P2X3-Y37A byla oproti WT zvýšena (~ 2krát), hodnota  $I_{\max}$  snížena. Dále jsme u mutovaných receptorů P2X2-Y43A a P2X4-Y42A pozorovali dramatickou změnu v citlivosti k  $\alpha,\beta$ -meATP, kdy se z parciálního agonisty stal agonista plný. Pro P2X3-WT je  $\alpha,\beta$ -meATP plný agonista, jeho Y37A mutace vykazovala mírný levostranný posun v hodnotě  $\text{EC}_{50}$ . Změny v citlivosti k agonistům vnesené alaninovou záměnou aromatického rezidua na pozici  $\alpha$  receptorů P2X2, P2X3, P2X4, měly silný dopad rovněž na kinetiku proudu po odmytí agonisty. Levostranný posun citlivosti mutací k agonistům byl doprovázen prodlouženým poklesem proudu po odmytí agonisty. Nálezky jsou ve shodě s výsledky ostatních (Haines a spol., 2001a) a naznačují, že konzervovaný TM1 tyrosin má klíčovou roli v 3D struktuře P2X receptorů a je důležitý pro vazbu agonisty anebo „gating“ kanálu.

Předpokládá se, že ATP vazebné místo je lokalizované v ektodoméně mezi jednotlivými podjednotkami (Wilkinson a spol., 2006; Marquez-Klaka a spol., 2007). Je možné, že substituce TM1 aromatického rezidua začleněného do protein-proteinového rozhraní může indukovat dalekosáhlé změny v ektodoméně a ovlivnit vazbu agonisty. Záměna může například ovlivnit blízkou část ATP vazebné kapsy natolik, že se u P2X2 a P2X4 receptoru stane více dostupná pro plnou vazbu  $\alpha,\beta$ -meATP. Jiným vysvětlením je, že  $\alpha,\beta$ -meATP vazebné místo je dostupné u všech P2X receptorů, liší se však schopnost navodit konformační změny potřebné pro otevření póru kanálu (Lape a spol., 2008). V obou scénářích hraje konzervovaný tyrosin důležitou roli.

Jiná situace nastala u P2X7 receptoru, kdy po záměně konzervovaného TM1 tyrosinu nebyly pozorovány žádné změny v BzATP a ATP citlivosti, a P2X7 receptor se tak zdá být vůči záměně tolerantní. Výsledky jsou v souladu s tvrzením, že u P2X7 receptoru je za účinnost agonisty zodpovědná výhradně ektodoména (Young a spol., 2007). Důvod pro odlišnost P2X7 od ostatních P2XR může být dále vztažen k jeho odlišné struktuře (delší C-konec), k distribuci TM1 aromatických reziduí, ke specifickým „gating“ vlastnostem (rychlé otevření póru kanálu následováno dilatací

póru) (Yan a spol., 2008) nebo k integraci pannexin-1 kanálů v signalizaci (Pelegriin a Surprenant, 2006).

Je překvapující, že mutace jednoho rezidua TM1 domény, má tak výrazný vliv na funkce P2X1-4 receptorů. U P2X2 receptoru záměna sousedícího rezidua Phe<sup>44</sup> rovněž dává vznik receptoru se zvýšenou ATP a  $\alpha,\beta$ -meATP citlivostí a prodlouženou deaktivací (Jiang a spol., 2001; Haines a spol., 2001a). Cysteinová i alaninová záměna tohoto rezidua navyšuje ATP citlivost s hodnotou EC<sub>50</sub> 0.3-0.7  $\mu$ M (Li a spol., 2004; Li a spol., 2008) a prodlužuje deaktivaci ( $\tau_{\text{off}} \sim 1.2$  s) (Jiang a spol., 2001). Tyto výsledky jsou ve shodě s našimi. Na pozici  $\beta$  má vedle P2X2 receptoru aromatické reziduum pouze P2X3 receptor. Mutace P2X3-F38A rovněž vykazuje zpomalenou deaktivaci, zvýšená ATP citlivost nebyla prokázána. Nicméně vzhledem k velmi sníženým amplitudám ATP odpovědi bylo měření citlivosti mutovaného receptoru velmi obtížné. Obecně lze říci, že aromatické reziduum na  $\beta$ -pozici má podobnou úlohu ve funkci P2X2 a P2X3 receptoru jako tyrosin na  $\alpha$ -pozici.

Horní část TM1 domény P2X receptorů je bohatá na aromatická rezidua. Kromě konzervovaného tyrosinu na  $\alpha$ -pozici u P2X1-7, aromatického fenylalaninu na  $\beta$ -pozici u P2X2,3, obsahuje aromatické reziduum na  $\gamma$ -pozici u P2X1-7 a fenylalanin na  $\delta$ -pozici u P2X1-5. V literatuře je mutace P2X2 receptoru na  $\gamma$ -pozici (P2X2-Y47A) popsána jako nefunkční (Li a spol., 2004; Khakh a Egan, 2005), kdežto mutace P2X2-Y47C je funkční (Haines a spol., 2001a) (Li a spol., 2008). V našich pokusech byla mutace P2X2-Y47A funkční, ale vykazovala signifikantně sníženou hodnotu I<sub>max</sub>. Dále se vyznačovala zvýšenou ATP citlivostí ( $\sim 7$ krát) a  $\alpha,\beta$ -meATP citlivostí. Zvýšení citlivosti bylo menší než v případě P2X2-Y43A receptoru; tedy substituce Tyr<sup>47</sup> byla méně efektivní než substituce Tyr<sup>43</sup> u P2X2 receptoru. Záměna aromatického rezidua ve stejné pozici u P2X3 a P2X4 receptorů (mutace P2X3-W41A a P2X4-W46A) nezvýšila citlivost k ATP, ale u P2X4-W46A došlo ke zvýšení citlivosti k  $\alpha,\beta$ -meATP. Zvýšená ATP citlivost byla popsána u P2X4-W46A mutace v literatuře (Silberberg a spol., 2005). Z těchto výsledků můžeme předpokládat rozdílnost strukturálně-funkčních vztahů v TM1 doméně mezi P2X2 a P2X4 receptorem.

Substituce fenylalaninu na  $\delta$ -pozici neovlivnila ATP citlivost u P2X2, P2X3 ani P2X4; pouze u P2X4R slabě zvýšila  $\alpha,\beta$ -meATP citlivost. Nezměněnou receptorovou funkci u P2X2-F49A a P2X2-F49C mutací shodně pozorovali i jiní autoři (Haines a spol., 2001a; Li a spol., 2004; Khakh a Egan, 2005; Samways a spol., 2008). Vnesení

P2X4-F48A mutace do P2X4-Y42A receptoru nezvrátilo účinek Y42A mutace na receptorové funkce, naproti tomu prodloužená deaktivace a zvýšená citlivost k agonistům byla potlačena u dvojmutací P2X4-Y42A+W46A a P2X4-Y42A+W50A. Helikální model TM1 domény, který jsme vytvořili na základě cysteinové a alaninové skenovací mutagenese (Obr. 20), udává polohu Tyr<sup>42</sup>, Trp<sup>46</sup> a Trp<sup>50</sup> reziduí na stejné straně helixu, zatímco Phe<sup>48</sup> reziduum, které nezvrátilo účinek P2X4-Y42A mutace, je na straně opačné. To může naznačit, že P2X4 pozice 42, 46 a 50 jsou zapojeny v „gatingu“ kanálu. Podobné výsledky byly nedávno popsány pro Thr<sup>339</sup> v TM2 doméně P2X2 receptoru (Cao a spol., 2007). Toto reziduum se nachází přibližně ve stejné rovině membrány jako rezidua Tyr<sup>43</sup> a Phe<sup>44</sup> TM1 domény. Mutace P2X2-T339S způsobila vyšší frekvenci otevírání kanálu, zvýšení ATP citlivosti (~ 10krát) a  $\alpha,\beta$ -meATP citlivosti. Účinky však byly potlačeny u dvojmutace P2X2-T339S+K308A. Autoři výsledek vysvětlili tak, že Lys<sup>308</sup>, o kterém se předpokládalo, že se podílí na vazbě ATP (Jiang a spol., 2000), hraje primární roli v „gatingu“ kanálu a že obě mutace (tzn. T339S, K308A) mají na „gating“ nezávislý vliv. Avšak v našem případě vliv jednobodových mutací W46A a W50A na gating byl malý a neodrazil se v hodnotách EC<sub>50</sub>, I<sub>max</sub> nebo  $\tau_{off}$ . Mechanismus nápravy tyrosinové mutace druhou mutací tak zůstává prozatím neobjasněn. Skutečnost, že kanál P2X4 receptoru funguje i bez dvou ze čtyř TM1 aromatických reziduí dokazuje, že tato rezidua nejsou nezbytně nutná pro fungování receptoru, ale regulují jeho citlivost k ATP nebo „gating“. V případě P2X2 receptoru, jehož dvojmutace Y43A+Y47A a F44A+Y47A byly nefunkční, by aromatická rezidua v TM1 mohly hrát dominantní úlohu.



## 8. ZÁVĚR

V této práci byla pomocí elektrofyziologických a molekulárně biologických metod podrobně zkoumána struktura a funkce obou transmembránových domén purinergního P2X<sub>4</sub> receptoru a u pěti podtypů rodiny P2X receptorů studována úloha skupiny aromatických reziduí v horní části TM1 domény. Bylo zjištěno, že tato aromatická rezidua hrají důležitou úlohu v 3D organizaci P2X receptorů a jsou zapojena ve vazbě agonisty anebo v „gatingu“ kanálu. Výsledky experimentální práce lze shrnout do těchto závěrů:

1. Pomocí cysteinové a alaninové skenovací mutagenese TM domén P2X<sub>4</sub> receptoru byla identifikována rezidua, která mohou interagovat s molekulou IVM: Arg<sup>33</sup>, Gln<sup>36</sup>, Leu<sup>40</sup>, Val<sup>43</sup>, Val<sup>47</sup> z TM1 a Asn<sup>338</sup>, Gly<sup>342</sup>, Leu<sup>346</sup>, Ala<sup>349</sup>, Cys<sup>353</sup>, Ile<sup>356</sup> z TM2 domény. Vzorec těchto reziduí, kdy u každého třetího až čtvrtého rezidua je záměnou zasažen účinek IVM, odpovídá helikálnímu uspořádání TM domén. Tato rezidua leží na stejné straně předpokládaných helixů TM domén. Stejná rezidua jsou přítomna rovněž u IVM-sensitivní P2X podjednotky bezobratlého organismu *Schistosoma mansoni* (Agboh a spol., 2004). Předpokládáme, že IVM-interagující rezidua jsou při otevřené konformaci kanálu orientovaná k lipidům a tvoří vazebnou kapsu pro lipofilní IVM.
2. TM rezidua, která nenesou citlivost k IVM, ale jsou citlivá k mutagenese: Met<sup>31</sup>, Tyr<sup>42</sup>, Gly<sup>45</sup>, Val<sup>49</sup>, Gly<sup>340</sup>, Leu<sup>343</sup>, Ala<sup>344</sup>, Gly<sup>347</sup>, Thr<sup>350</sup>, Asp<sup>354</sup>, Val<sup>357</sup>, se nacházejí na opačné straně  $\alpha$ -helixu. Tato rezidua jsou důležitá pro funkci receptoru a lemují stranu orientovanou k vedlejší TM doméně či do hydrofilního póru kanálu.
3. Alaninová skenovací mutagenese TM1 domény P2X<sub>4</sub> receptoru podpořila výsledky cysteinové skenovací mutagenese, a obě mutagenese souhlasně upozornily na důležitost konzervovaného tyrosinu pro funkci receptoru. Jeho záměna způsobila výrazné zvýšení ATP a  $\alpha,\beta$ -meATP citlivosti a značné prodloužení deaktivace u P2X<sub>4</sub>R. Konzervovaný TM1 tyrosin je pravděpodobně kritický

rovněž ve funkci P2X1R, jelikož jeho alaninová záměna vyústila ve vznik nefunkčního receptoru. U P2X2 a P2X3 (ne však u P2X7) alaninová záměna způsobila navýšení citlivosti k ATP a prodloužení deaktivace.

4. Záměna konzervovaného tyrosinu u receptoru P2X4 za aminokyseliny s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi ukázala, že aromatické aminokyseliny (fenylalanin a tryptofan) mohou částečně nahradit konzervovaný tyrosin.
5. Alaninová záměna některých aromatických reziduí v horní části TM1 domény P2X receptorů měla podobný, ale většinou mnohem menší, efekt. Úloha aromatických aminokyselin v TM1 je však receptor-specifická, například receptor P2X7 se v tomto směru od ostatních P2X receptorů zásadně liší. Simultánní alaninová záměna konzervovaného tyrosinu P2X4 receptoru a jiného aromatického rezidua (Trp<sup>46</sup> a Trp<sup>50</sup>, ne však Phe<sup>48</sup>) může eliminovat efekt Y42A mutace. Z předpokládaného helikálního modelu TM1 domény víme, že rezidua Tyr<sup>42</sup>, Trp<sup>46</sup>, Trp<sup>50</sup> leží na opačné straně helixu než reziduum Phe<sup>48</sup>.

Dovoluji si konstatovat, že cíle práce byly beze zbytku splněny.

## 9. LITERATURA

- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* **24**:52-55.
- Abbracchio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* **78**:113-145.
- Agboh KC, Webb TE, Evans RJ, Ennion SJ (2004) Functional characterization of a P2X receptor from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* **279**:41650-41657.
- Akabas MH, Stauffer DA, Xu M, Karlin A (1992) Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science.* **258**:307-310.
- Albers-Schonberg G, Arison BH, Chabala JC, Douglas AW, Eskola P, Fisher MH, Lusi A, Mrozik H, Smith JL, Tolman RL (1981) Avermectins. Structure determination. *J Am Chem Soc.* **103**:4221-4224.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* **22**:208-215.
- Armstrong N, Gouaux E (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron.* **28**:165-181.
- Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD. (1999) Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today.* **5**:216-224.
- Balik A, Jindrichova M, Bhattacharyya S, Zemkova H (2008) GnRH-I and GnRH-II-induced calcium signaling and hormone secretion in neonatal rat gonadotrophs. *Physiol Res.* Nov 4, v tisku.
- Barajas-Lopez C, Espinosa-Luna R, Zhu Y (1998) Functional interactions between nicotinic and P2X channels in short-term cultures of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol.* **513**:671-683.
- Barclay J, Patel S, Dorn G, Wotherspoon G, Moffatt S, Eunson L, Abdel'al S, Natt F, Hall J, Winter J, Bevan S, Wishart W, Fox A, Ganju P (2002) Functional downregulation of P2X<sub>3</sub> receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. *J Neurosci.* **22**:8139-8147.
- Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X<sub>2</sub> receptors are trimers but that P2X<sub>6</sub> receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem.* **280**:10759-10765.
- Bean BP, Williams CA, Ceelen PW (1990) ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: current-voltage relation and single-channel behavior. *J Neurosci* **10**:11-19.
- Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, Sivilotti LG (2002) Openings of the rat recombinant  $\alpha 1$  homomeric glycine receptor as a function of the number of agonist molecules bound. *J Gen Physiol* **119**: 443-466.
- Beinart SC, Kolm P, Veledar E, Zhang Z, Mahoney EM, Bouin O, Gabriel S, Jackson J, Chen R, Caro J, Steinhubl S, Topol E, Weintraub WS (2005) Long-term cost effectiveness of early and sustained dual oral antiplatelet therapy with clopidogrel given for up to one year after percutaneous coronary intervention results: from the Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation (CREDO) trial. *J Am Coll Cardiol.* **46**:761-769.
- Bergfeld GR, Forrester T (1992) Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res.* **26**:40-47.

- Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis M, van Biesen T (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* **376**:127-138.
- Birder LA, Ruan HZ, Chopra B, Xiang Z, Barrick S, Buffington CA, Roppolo JR, Ford AP, de Groat WC, Burnstock G (2004) Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**:F1084-F1091.
- Bo X, Kim M, Nori SL, Schoepfer R, Burnstock G, North RA (2003) Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res.* **313**:159-165.
- Bo X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G, Schoepfer R (1995) A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* **375**:129-133.
- Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD (2002) P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* **22**:4814-4824.
- Bodin P, Burnstock G (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res.* **26**:959-969.
- Bolego C, Ceruti S, Brambilla R, Puglisi L, Cattabeni F, Burnstock G, Abbracchio MP (1997) Characterization of the signalling pathways involved in ATP and basic fibroblast growth factor-induced astrogliosis. *Br. J. Pharmacol.* **121**:1692-1699.
- Boue-Grabot E, Archambault V, Séguéla P (2000) A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X2 ATP-gated channels. *J Biol Chem.* **275**:10190-10195.
- Boue-Grabot E, Barajas-Lopez C, Chakfe Y, Blais D, Bélanger D, Emerit MB, Séguéla P (2003) Intracellular Cross Talk and Physical Interaction between Two Classes of Neurotransmitter-Gated Channels *J. Neurosci.* **23**:1246-1253.
- Boue-Grabot E, Toulmé E, Emerit MB, Garret M (2004) Subunit-specific coupling between gamma-aminobutyric acid type A and P2X2 receptor channels. *J Biol Chem.* **279**:52517-52525.
- Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB (1998) The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* **12**:256-268.
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**:519-523.
- Brown SG, Townsend-Nicholson A, Jacobson KA, Burnstock G, King BF (2002) Heteromultimeric P2X1/2 receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:673-680.
- Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *Embo J* **15**:55-62.
- Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA, Antonarakis SE (1998) Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels* **5**:347-354.
- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol.* **485**:403-418.
- Burnstock G (1977) The purinergic nerve hypothesis. *Ciba Found Symp.* **48**:295-314.
- Burnstock G (1990) Dual control of local blood flow by purines. *Ann N Y Acad Sci.* **603**:31-44.
- Burnstock G (1995) Noradrenaline and ATP: cotransmitters and neuromodulators. *J Physiol Pharmacol.* **46**:365-384.
- Burnstock B (1996) Purinoceptors: Ontogeny and phylogeny. *Drug Dev Res.* **39**:204-242.

- Burnstock G (1999) Purinergic cotransmission. *Brain Res Bull.* **50**:355-357.
- Burnstock G (2004) Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol.* **4**:47-52.
- Burnstock G (2006a) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci.* **27**:166-176.
- Burnstock G (2006b) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev.* **58**:58-86.
- Burnstock G (2006c) Purinergic signalling. *Br J Pharmacol.* **147**:172-181.
- Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* **240**:31-304.
- Burnstock G, Wood JN (1996) Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**:526-532.
- Calvert JA, Evans RJ (2004) Heterogeneity of P2X receptors in sympathetic neurons: contribution of neuronal P2X1 receptors revealed using knockout mice. *Mol Pharmacol.* **65**:139-148.
- Cao L, Young MT, Broomhead HE, Fountain SJ, North RA (2007) Thr339-to-serine substitution in rat P2X2 receptor second transmembrane domain causes constitutive opening and indicates a gating role for Lys308. *J Neurosci.* **27**:12916-12923.
- CAPRIE Steering Committee (2001) A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events. *Lancet.* **348**:1329-1339.
- Castelucci P, Robbins HL, Poole DP, Furness JB (2002) The distribution of purine P2X2 receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem Cell Biol.* **117**:415-422.
- Cattaneo M, Lecchi A, Ohno M, Joshi BV, Besada P, Tchilibon S, Lombardi R, Bischofberger N, Harden TK, Jacobson KA (2004) Antiaggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y<sub>1</sub> receptor. *Biochem Pharmacol.* **68**:1995-2002.
- Cavaliere F, Florenzano F, Amadio S, Fusco FR, Viscomi MT, D'Ambrosi N, Vacca F, Sancesario G, Bernardi G, Molinari M, Volontè C (2003) Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience.* **120**:85-98.
- Clyne JD, Wang LF, Hume RI (2002) Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J Neurosci.* **22**:3873-3880.
- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP (2000) Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature.* **407**:1011-1015.
- Collet C, Strube C, Csernoch L, Mallouk N, Ojeda C, Allard B, Jacquemond V (2002) Effects of extracellular ATP on freshly isolated mouse skeletal muscle cells during pre-natal and post-natal development. *Pflugers Arch.* **443**:771-778.
- Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G (1996) Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci.* **16**:2495-2507.
- Colquhoun D (1998) Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol.* **125**:924-947.
- Cook SP, McCleskey EW (2002) Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain.* **95**:41-47.
- Cook SP, Vulchanova L, Hargreaves KM, Elde R, McCleskey EW (1997) Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature.* **387**:505-508.
- Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:15735-15740.

- Cotrina ML, Lin JH, López-García JC, Naus CC, Nedergaard M (2000) ATP-mediated glia signaling. *J. Neurosci.* **20**:2835-2844.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature.* **438**:1017-1021.
- Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Paress PS, Van der Ploeg LH, Schaeffer JM, Arena JP (1994) Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **371**:707-711.
- Denlinger LC, Fisetle PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, Proctor RA, Bertics PJ (2001) Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* **167**:1871-1876.
- Denlinger LC, Sommer JA, Parker K, Gudipaty L, Fisetle PL, Watters JW, Proctor RA, Dubyak GR, Bertics PJ (2003) Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X7 nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function. *J Immunol.* **171**:1304-1311.
- Dent JA, Davis MW, Avery L (1997) *avr-15* encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **16**:5867-5879.
- Dent JA, Smith MM, Vassilatis DK, Avery L (2000) The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**: 2674-2679.
- Detwiler TC, Feinman RD (1973) Kinetics of the thrombin-induced release of adenosine triphosphate by platelets. Comparison with release of calcium. *Biochemistry.* **12**:2462-2468.
- Ding S, Sachs F (1999a) Ion permeation and block of P2X2 purinoceptors: single channel recordings. *J Membr Biol.* **172**:215-223.
- Ding S, Sachs F (1999b) Single Channel Properties of P2X2 Purinoceptors. *J Gen Physiol.* **113**:695-720.
- Ding S, Sachs F (2002) Evidence for non-independent gating of P2X2 receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *BMC Neurosci.* **3**:17.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science.* **280**:69-77.
- Dubyak GR (2003) Knock-Out Mice Reveal Tissue-Specific Roles of P2Y Receptor Subtypes in Different Epithelia. *Mol Pharmacol.* **63**:773-776.
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002) X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature.* **415**:287-294.
- Egan TM, Haines WR, Voigt MM (1998) A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J Neurosci.* **18**:2350-2359.
- Egan TM, Khakh BS (2004) Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. *J Neurosci.* **24**:3413-3420.
- Egan TM, Samways DS, Li Z (2006) Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch.* **452**:501-512.
- Eickhorst AN, Berson A, Cockayne D, Lester HA, Khakh BS (2002) Control of P2X2 channel permeability by the cytosolic domain. *J Gen Physiol.* **120**:119-131.
- Ennion SJ, Evans RJ (2002a) Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X1 receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol.* **61**:303-311.

- Ennion SJ, Evans RJ (2002b) P2X1 receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem Biophys Res Commun.* **291**:611-616.
- Ennion S, Hagan S, Evans RJ (2000) The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *J Biol Chem.* **275**:29361-29367.
- Erhardt JA, Pillarisetti K, Toomey JR (2003) Potentiation of platelet activation through the stimulation of P2X1 receptors. *J Thromb Haemost.* **1**:2626-2635.
- Evans RJ (1996) Single channel properties of ATP-gated cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in Chinese hamster ovary cells. *Neurosci Lett.* **212**:212-214.
- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2X purinoceptors). *Mol Pharmacol.* **48**:178-183.
- Ferguson DR, Kennedy I, Burton TJ (1997) ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism? *J Physiol.* **505**:503-511.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F (1997) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol.* **159**:1451-1458.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F (1997) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med.* **185**:579-582.
- Fields RD, Stevens B (2000) ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci.* **23**:625-633.
- Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P (2003) Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation.* **108**:989-995.
- Ford APDW, Gever JR, Nunn PA, Zhong Y, Cefalu JS, Dillon MP, Cockayne DA (2006) Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. *Br J Pharmacol.* **147**:S132-S143.
- Fountain SJ, North RA (2006). A C-terminal lysine that controls human P2X4 receptor desensitization. *J Biol Chem.* **281**:15044-15049.
- Freist W, Verhey JF, Stühmer W, Gauss DH (1998) ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* **434**:61-65.
- Gachet C (2001) ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost.* **86**:222-232.
- Galligan JJ (2004) Enteric P2X receptors as potential targets for drug treatment of the irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol.* **141**:1294-1302.
- Garcia-Guzman M, Soto F, Laube B, Stühmer W (1996) Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett.* **388**:123-127.
- Garcia-Guzman M, Stühmer W, Soto F (1997) Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor. *Brain Res Mol Brain Res.* **47**:59-66.
- Gayle S, Burnstock G (2005) Immunolocalisation of P2X and P2Y nucleotide receptors in the rat nasal mucosa. *Cell Tissue Res.* **319**:27-36.
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP (2006). Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* **452**:513-537.
- Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casadó V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K, Franco R (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**:8606-8611.

- Glass R, Burnstock G (2001) Immunohistochemical identification of cells expressing ATP-gated cation channels (P2X receptors) in the adult rat thyroid. *J Anat.* **198**:569-579.
- Gobran LI, Xu ZX, Lu Z, Rooney SA (1994) P2u purinoceptor stimulation of surfactant secretion coupled to phosphatidylcholine hydrolysis in type II cells. *Am J Physiol.* **267**:L625-633.
- Goetz V, Da Prada M, Pletscher A (1971) Adenine-, guanine- and uridine-5'-phosphonucleotides in blood platelets and storage organelles of various species. *J Pharmacol Exp Ther.* **178**:210-215.
- Graff RD, Lazarowski ER, Banes AJ, Lee GM (2000) ATP release by mechanically loaded porcine chondrons in pellet culture. *Arthritis Rheum.* **43**:1571-1579.
- Greig AVH, James SE, McGrouther DA, Terenghi G, Burnstock G (2003) Purinergic receptor expression in the regenerating epidermis in a rat model of normal and delayed wound healing. *Exp Dermatol.* **12**:860-871.
- Groschel-Stewart U, Bardini M, Robson T, Burnstock G (1999) Localisation of P2X5 and P2X7 receptors by immunohistochemistry in rat stratified squamous epithelia. *Cell Tissue Res.* **296**:599-605.
- Gu JG, MacDermott AB (1997) Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature.* **389**:749-753.
- Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* **18**:2714-2723.
- Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.* **72**:1447-1456.
- Guo LH, Trautmann K, Schluesener HJ (2004) Expression of P2X4 receptor in rat C6 glioma by tumor-associated macrophages and activated microglia. *J Neuroimmunol.* **152**:67-72.
- Guzman GR, Santiago J, Ricardo A, Martí-Arbona R, Rojas LV, Lasalde-Dominicci JA. (2003) Tryptophan scanning mutagenesis in the  $\alpha$ M3 transmembrane domain of the Torpedo californica acetylcholine receptor: functional and structural implications. *Biochemistry.* **42**:12243–12250.
- Haines WR, Migita K, Cox JA, Egan TM, Voigt MM (2001b) The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel. *J Biol Chem.* **276**:32793-32798.
- Haines WR, Voigt MM, Migita K, Torres GE, Egan TM (2001a) On the contribution of the first transmembrane domain to whole-cell current through an ATP-gated ionotropic P2X receptor. *J Neurosci.* **21**:5885-5892.
- Hansen MA, Bennett MR, Barden JA. (1999b) Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart. *J Auton Nerv Syst.* **78**:1-9.
- Hansen MA, Dutton JL, Balcar VJ, Barden JA, Bennett MR (1999a) P2X (purinergic) receptor distributions in rat blood vessels. *J Auton Nerv Syst.* **75**:147-155.
- Hassinen T, Perakyla M (2001) New energy terms for reduced protein models implemented in an off-lattice force field. *J Comput Chem.* **22**:1229-1242.
- Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* **2**:185-193.
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D (2006) The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci.* **9**:1512-1519.
- Hazama A, Hayashi S, Okada Y (1998) Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic beta cells using a novel biosensor technique. *Pflugers Arch.* **437**:31-35.
- He ML, Gonzales-Iglesias AE, Stojilkovic SS (2003b): Role of nucleotide P2 receptors in calcium signaling and prolactin release in pituitary lactotrophs. *J Biol Chem.* **278**:46270-46277.



- He ML, Koshimizu TA, Tomić M, Stojilkovic SS (2002) Purinergic P2X2 receptor desensitization depends on coupling between ectodomain and C-terminal domain. *Mol Pharmacol.* **62**:1187-1197.
- He ML, Zemkova H, Stojilkovic SS (2003) Dependence of purinergic P2X receptor activity on ectodomain structure. *J Biol Chem.* **278**:10182-10188.
- Hechler B, Lenain N, Marchese P, Vial C, Heim V, Freund M, Cazenave JP, Cattaneo M, Ruggeri ZM, Evans R, Gachet C (2003) A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J Exp Med.* **198**:661-667.
- Hetherington SL, Singh, Lodwick D, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ (2005) Dimorphism in the P2Y1 ADP receptor gene is associated with increased platelet activation response to ADP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**:252-257.
- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S (2001) Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci.* **21**:1975-1982.
- Honore P, Kage K, Mikusa J, Watt AT, Johnston JF, Wyatt JR, Faltynek CR, Jarvis MF, Lynch K (2002) Analgesic profile of intrathecal P2X3 antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. *Pain.* **99**:11-19.
- Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisey DR, Mantyh PW (2000) Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience.* **98**:585-598.
- Housley GD, Kanjhan R, Raybould NP, Greenwood D, Salih SG, Järlebark L, Burton LD, Setz VC, Cannell MB, Soeller C, Christie DL, Usami S, Matsubara A, Yoshie H, Ryan AF, Thorne PR (1999) Expression of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the cochlea: implications for sound transduction and auditory neurotransmission. *J Neurosci.* **19**:8377-8388.
- Hu X, Gu J, Chen L, HuangPu Y (1998) Studies on the crystal structure of ivermectin (H2B1a) *Yao Xue Xue Bao.* **33**:449-452.
- Hughes JP, Hatcher JP, Chessell IP (2007) The role of P2X7 in pain and inflammation. *Purinergic Signal.* **3**:163-169.
- Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem.* **279**:29628-29638.
- Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature.* **377**:428-431.
- Chen M, Gu JG (2005) A P2X receptor-mediated nociceptive afferent pathway to lamina I of the spinal cord. *Mol Pain.* **1**:4.
- Chizhnikov I, Yudin Y, Mamenko N, Prudnikov I, Tamarova Z, Krishtal O (2005) Opioids inhibit purinergic nociceptors in the sensory neurons and fibres of rat via a G protein-dependent mechanism. *Neuropharmacology.* **48**:639-647.
- Chow YW, Wang HL (1998) Functional modulation of P2X2 receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem.* **70**:2606-2612.
- Iglesias, S, Locovei, A, Roque, A. P, Alberto, G, Dahl, D. C, Spray, and E. Scemes (2008) P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* **295**: C752-C760.
- Inoue K, Denda M, Tozaki H, Fujishita K, Koizumi S, Inoue K (2005) Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* **124**:756-763.
- Inoue K, Koizumi S, Tsuda M (2007) The role of nucleotides in the neuron-glia communication responsible for the brain functions. *J Neurochem.* **102**:1447-1458.

- Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S, Honore P, Lynch K, Brennan TJ, Subieta A, Van Biesen T, Cartmell J, Bianchi B, Niforatos W, Kage K, Yu H, Mikusa J, Wismer CT, Zhu CZ, Chu K, Lee CH, Stewart AO, Polakowski J, Cox BF, Kowaluk E, Williams M, Sullivan J, Faltynek C (2002) A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**:17179-17184.
- Jelinkova I, Vavra V, Jindrichova M, Obsil T, Zemkova HW, Zemkova H, Stojilkovic SS (2008) Identification of P2X4 receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Arch*. **456**:939-950.
- Jelinkova I, Yan Z, Liang Z, Moonat S, Teisinger J, Stojilkovic SS, Zemkova H (2006) Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. *Biochem Biophys Res Commun*. **349**:619-625.
- Jenkins A, Andreasen A, Trudell JR, Harrison NL (2002) Tryptophan scanning mutagenesis in TM4 of the GABAA receptor  $\alpha 1$  subunit: implications for modulation by inhaled anesthetics and ion channel structure. *Neuropharmacology*. **43**:669-678.
- Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo X, Surprenant A, North RA (2003) Subunit Arrangement in P2X Receptors. *J Neurosci*. **23**:8903-8910.
- Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA. (2000) Identification of amino acid residues contributing to the ATP binding site of a P2X receptor. *J Biol Chem*. **275**:34190-34196.
- Jiang LH, Rassendren F, Spelta V, Surprenant A, North RA (2001) Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X2 receptor. *J Biol Chem*. **276**:14902-14908.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature*. **423**:33-41.
- Jo YH, Schlichter R (1999) Synaptic co-release of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci*. **2**:241-246.
- Jones CA, Chessell IP, Simon J, Barnard EA, Miller KJ, Michel AD, Humphrey PP (2000) Functional characterization of the P2X4 receptor orthologues. *Br J Pharmacol*. **129**:388-394.
- Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF (1999) Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. **407**:11-32.
- Kellerman D, Evans R, Mathews D, Shaffer C (2002) Inhaled P2Y2 receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev*. **54**:1463-1474.
- Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999a) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci*. **2**:322-330.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Séguéla P, Voigt M, Humphrey PP (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev*. **53**:107-118.
- Khakh BS, Egan TM (2005). Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics. *J Biol Chem*. **280**:6118-6129.
- Khakh BS, North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*. **442**:527-532.
- Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA (1999b) Allosteric control of gating and kinetics at P2X4 receptor channels. *J Neurosci*. **19**:7289-7299.
- Khakh BS, Zhou X, Sydes J, Galligan JJ, Lester HA (2000) State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature*. **406**:405-410.

- Kim SY, Sivaguru M, Stacey G (2006) Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol.* **142**:984-992.
- King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G (2000) Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci.* **20**:4871-4877.
- King BF, Wildman SS, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G (1997) Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor. *Br J Pharmacol.* **121**:1445-1453.
- King BF, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G (1996) Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH. *Br J Pharmacol.* **117**:1371-1373.
- King M, Housley GD, Raybould NP, Greenwood D, Salih SG (1998) Expression of ATP-gated ion channels by Reissner's membrane epithelial cells. *Neuroreport.* **9**:2467-2474.
- Knight GE, Bodin P, De Groat WC, Burnstock G (2002) ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol.* **282**:F281-288.
- Knöfel T, Sträter N (2001) Mechanism of hydrolysis of phosphate esters by the dimetal center of 5'-nucleotidase based on crystal structures. *J Mol Biol.* **309**:239-254.
- Knowles MR, Clarke LL, Boucher RC (1991) Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* **325**:533-538.
- Koizumi S, Fujishita K, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Inoue K (2003) Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**:11023-11028.
- Koshimizu T, Koshimizu M, Stojilkovic SS (1999) Contributions of the C-terminal domain to the control of P2X receptor desensitization. *J Biol Chem.* **274**:37651-37657.
- Koshimizu T, Tomic M, Van Goor F, Stojilkovic SS (1998a). Functional role of alternative splicing in pituitary P2X2 receptor-channel activation and desensitization. *Mol Endocrinol.* **12**:901-913.
- Koshimizu T, Tomic M, Koshimizu M, Stojilkovic SS (1998b) Identification of amino acid residues contributing to desensitization of the P2X2 receptor channel. *J Biol Chem.* **273**:12853-12857.
- Koshimizu T, Tomic M, Wong AO, Zivadinovic D, Stojilkovic SS (2000) Characterization of purinergic receptors and receptor-channels expressed in anterior pituitary cells. *Endocrinology.* **141**:4091-4099.
- Krause RM, Buisson B, Bertrand S, Corringer PJ, Galzi JL, Changeux JP, Bertrand D (1998) Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* **53**:283-294.
- Krusek J, Zemkova H (1994) Effect of ivermectin on gamma-aminobutyric acid-induced chloride currents in mouse hippocampal embryonic neurones. *J Pharmacol.* **259**:121-128.
- Labrakakis C, Tong CK, Weissman T, Torsney C, MacDermott AB (2003) Localization and function of ATP and GABAA receptors expressed by nociceptors and other postnatal sensory neurons in rat. *J Physiol.* **549**:131-142.
- Lalève N, Rogier C, Becq F, Joffre M (1999) Acute effects of adenosine triphosphates, cyclic 3',5'-adenosine monophosphates, and follicle-stimulating hormone on cytosolic calcium level in cultured immature rat Sertoli cells. *Biol Reprod.* **61**:343-352.
- Lape R, Colquhoun D, Sivilotti LG (2008) On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature.* **454**:704-705.
- Le KT, Babinski K, Séguéla P (1998) Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci.* **18**:7152-7159.

- Le KT, Boue-Grabot E, Archambault V, Séguéla P (1999) Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *J Biol Chem.* **274**:15415-15419.
- Lee HY, Bradini M, Burnstock G (2000) Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J Urol.* **163**:2002-2007.
- Lewis CJ, Evans RJ (2001) P2X receptor immunoreactivity in different arteries from the femoral, pulmonary, cerebral, coronary and renal circulations. *J Vasc Res.* **38**:332-340.
- Lewis CJ, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature.* **377**:432-435.
- Li M, Chang TH, Silberberg SD, Swartz KJ (2008) Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci.* **11**:883-887.
- Li Z, Migita K, Samways DS, Voigt MM, Egan TM (2004) Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor. *J Neurosci.* **24**:7378-7386.
- Li-Smerin Y, Hackos DH, Swartz KJ (2000)  $\alpha$ -Helical structural elements within the voltage-sensing domains of a K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol.* **115**:33-50.
- Liu GJ, Brockhausen J, Bennett MR (2003) P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton Neurosci.* **108**:12-16.
- Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, van Biesen T, Kowaluk EA, Jarvis MF (1999) Molecular and functional characterization of human P2X2 receptors. *Mol Pharmacol.* **56**:1171-1181.
- Ma B, Ruan HZ, Burnstock G, Dunn PM (2005) Differential expression of P2X receptors on neurons from different parasympathetic ganglia. *Neuropharmacology.* **48**:766-777.
- Marquez-Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T, Nicke A (2007) Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. *J Neurosci.* **27**:1456-1466.
- Mason SJ, Paradiso AM, Boucher RC (1991) Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br J Pharmacol.* **103**:1649-1656.
- Maugeri N, Bermejo E, Lazzari MA (1990) Adenosine triphosphate released from human mononuclear cells. *Thromb Res.* **59**:887-890.
- McCoy DE, Taylor AL, Kudlow BA, Karlson K, Slattery MJ, Schwiebert LM, Schwiebert EM, Stanton BA (1999) Nucleotides regulate NaCl transport in mIMCD-K2 cells via P2X and P2Y purinergic receptors. *Am J Physiol.* **277**:552-559.
- McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, Mikusa J, Honore P, Chu KL, Lee CH, Faltynek CR, Jarvis MF (2003) Effects of A-317491, a novel and selective P2X3/P2X2/3 receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *Br J Pharmacol.* **140**:1381-1388.
- Meyer MP, Groschel-Stewart U, Robson T, Burnstock G (1999) Expression of two ATP-gated ion channels, P2X5 and P2X6, in developing chick skeletal muscle. *Dev Dyn.* **216**:442-449.
- Migita K, Haines WR, Voigt MM, Egan TM (2001) Polar residues of the second transmembrane domain influence cation permeability of the ATP-gated P2X2 receptor. *J Biol Chem.* **276**:30934-30941.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature.* **423**:949-955.

- Monks SA, Needleman DJ, Miller C (1999) Helical structure and packing orientation of the S2 segment in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol.* **113**:415–423.
- Morse DM, Smullen JL, Davis CW (2001) Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **280**:C1485-1497.
- Naemsch LN, Weidema AF, Sims SM, Underhill TM, Dixon SJ (1999) P2X<sub>4</sub> purinoceptors mediate an ATP-activated, non-selective cation current in rabbit osteoclasts. *J Cell Sci.* **112**:4425-4435.
- Nagaya N, Tittle RK, Saar N, Dellal SS, Hume RI (2005) An intersubunit zinc binding site in rat P2X<sub>2</sub> receptors. *J Biol Chem.* **280**:25982-25993.
- Nakatsuka T, Gu JG (2001) ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J Neurosci.* **21**:6522-6531.
- Nakatsuka T, Tsuzuki K, Ling JX, Sonobe H, Gu JG (2003) Distinct roles of P2X receptors in modulating glutamate release at different primary sensory synapses in rat spinal cord. *J Neurophysiol.* **89**:3243-3252.
- Nakazawa K (1994) ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons. *J Neurosci.* **14**:740-750.
- Negulyaev YA, Markwardt F (2000) Block by extracellular Mg<sup>2+</sup> of single human purinergic P2X<sub>4</sub> receptor channels expressed in human embryonic kidney cells. *Neurosci Lett.* **279**:165-168.
- Newbolt A, Stoop R, Virginio C, Surprenant A, North RA, Buell G, Rassendren F (1998) Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem.* **273**:15177-15182.
- Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci.* **18**:4022-4028.
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J.* **17**:3016-3028.
- Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F (2005). Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>4</sub> subunits. *J Neurochem.* **92**:925-933.
- Nori S, Fumagalli L, Bo X, Bogdanov Y, Burnstock G (1998) Coexpression of mRNAs for P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>4</sub> receptors in rat vascular smooth muscle: an in situ hybridization and RT-PCR study. *J Vasc Res.* **35**:179-185.
- North RA (2002) Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev.* **82**:1013-1067.
- North RA, Barnard EA (1997) Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol.* **7**:346-357.
- Novak I (2008) Purinergic receptors in the endocrine and exocrine pancreas. *Purinergic Signal.* **4**:237–253.
- Novakovic SD, Kassotakis LC, Oglesby IB, Smith JA, Eglen RM, Ford AP, Hunter JC (1999) Immuno-cytochemical localization of P2X<sub>3</sub> purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury. *Pain.* **80**:273-282.
- O'Connor SE, Dainty IA, Leff P (1991) Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol Sci.* **12**:137-141.
- Ohta T, Kubota A, Murakami M, Otsuguro K, Ito S (2005) P2X<sub>2</sub> receptors are essential for [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases in response to ATP in cultured rat myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **289**:G935-G948.
- Omura S, Crump A (2004) The life and times of ivermectin - a success story. *Nat Rev Microbiol.* **2**:984-989.

- Ormond SJ, Barrera NP, Qureshi OS, Henderson RM, Edwardson JM, Murrell-Lagnado RD (2006) An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol.* **69**:1692-1700.
- Panchenko VA, Glasser CR, Mayer ML (2001) Structural similarities between glutamate receptor channels and K<sup>+</sup> channels examined by scanning mutagenesis. *J Gen Physiol.* **117**:345-360.
- Patneau DK, Mayer ML (1990) Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci.* **10**:2385-2399.
- Pearson JD, Gordon JL (1979) Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature.* **281**:384-386.
- Pelegri P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J.* **25**: 5071-5082.
- Pemberton DJ, Franks CJ, Walker RJ, Holden-Dye L (2001) Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl-alpha2 in the function of the native receptor. *Mol Pharmacol.* **59**:1037-1043.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* **443**:700-704.
- Pratt EB, Brink TS, Bergson P, Voigt MM, Cook SP (2005) Use-dependent inhibition of P2X3 receptors by nanomolar agonist. *J Neurosci.* **25**:7359-7365.
- Priel A, Silberberg SD (2004) Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol.* **123**:281-293.
- Queiroz G, Gebicke-Haerter PJ, Schober A, Starke K, von Kügelgen I (1997) Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. *Neuroscience.* **78**:1203-1208.
- Queiroz G, Meyer DK, Meyer A, Starke K, von Kügelgen I (1999) A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors. *Neuroscience.* **91**:1171-1181.
- Radford KM, Virginio C, Surprenant A, North RA, Kawashima E (1997). Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *J Neurosci.* **17**:6529-6533.
- Ralevic V, Burnstock G (1996) Relative contribution of P<sub>2U</sub>- and P<sub>2Y</sub>-purinoceptors to endothelium-dependent vasodilatation in the golden hamster isolated mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol.* **117**:1797-1802.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* **50**:413-492.
- Ramirez AN, Kunze DL (2002) P2X purinergic receptor channel expression and function in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **282**:2106-2116.
- Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North RA, Surprenant A (1997a) Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *Embo J.* **16**:3446-3454.
- Rassendren F, Buell G, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A (1997b) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem.* **272**:5482-5486.
- Ren J, Bian X, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford AP, Galligan JJ (2003) P2X2 subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *J Physiol.* **552**:809-821.
- Rettinger J, Aschrafi A, Schmalzing G (2000) Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J Biol Chem.* **275**:33542-33547.

- Roberts JA, Evans RJ (2004) ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *J Biol Chem.* **279**: 9043-9055.
- Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ (2006) Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* **452**:486-500.
- Rolf MG, Brearley CA, Mahaut-Smith MP (2001) Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with  $\alpha,\beta$ -methylene ATP. *Thromb Haemost.* **85**:303-308.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science.* **280**:1596-1599.
- Roux SJ, Steinebrunner I. (2007) Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. *Trends Plant Sci.* **12**:522-527.
- Rubio ME, Soto F (2001) Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci.* **21**:641-653.
- Ryten M, Dunn PM, Neary JT, Burnstock G (2002) ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X5 receptor on satellite cells. *J Cell Biol.* **158**:345-355.
- Ryten M, Hoebertz A, Burnstock G (2001) Sequential expression of three receptor subtypes for extracellular ATP in developing rat skeletal muscle. *Dev Dyn.* **221**:331-341.
- Saiag B, Bodin P, Shacoori V; Catheline M; Rault B; Burnstock G(1995) Uptake and flow-induced release of uridine nucleotides from isolated vascular endothelial cells. *Endothelium.* **2**:279-285.
- Samways DS, Egan TM (2007) Acidic amino acids impart enhanced Ca<sup>2+</sup> permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. *J Gen Physiol.* **129**:245-256.
- Samways DS, Migita K, Li Z, Egan TM (2008) On the role of the first transmembrane domain in cation permeability and flux of the ATP-gated P2X2 receptor. *J Biol Chem.* **283**:5110-5117.
- Shan Q, Haddrill JL, Lynch JW (2001) Ivermectin, an unconventional agonist of the glycine receptor chloride channel. *J Biol Chem.* **276**:12556-12564.
- Schwab JM, Guo L, Schluesener HJ (2005) Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X4 receptor expression. *J Neuroimmunol.* **163**:185-189.
- Schwiebert EM, Zsembery A (2003) Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* **1615**:7-32.
- Sigel E, Baur R (1987) Effect of avermectin B1a on chick neuronal gamma-aminobutyrate receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol.* **32**:749-752.
- Silberberg SD, Chang TH, Swartz KJ (2005) Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol.* **125**:347-359.
- Silberberg SD, Li M, Swartz KJ (2007) Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. *Neuron.* **54**:263-274.
- Silinsky EM, Redman RS (1996) Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog. *J Physiol.* **492**:815-822.
- Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M (2003) Signaling at the gliovascular interface. *J. Neurosci.* **23**:9254-9262.
- Simon J, Kidd EJ, Smith FM, Chessell IP, Murrell-Lagnado R, Humphrey PP, Barnard EA (1997) Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor. *Mol Pharmacol.* **52**:237-248.

- Slater NM, Barden JA, Murphy CR (2000) Distributional changes of purinergic receptor subtypes (P2X 1-7) in uterine epithelial cells during early pregnancy. *Histochem J.* **32**:365-372.
- Sluyter R, Barden JA, Wiley JS (2001) Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes. *Cell Tissue Res.* **304**:231-236.
- Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, Petrou S (2003) P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem.* **278**:8853-8860.
- Smith NCE, Burnstock G (2004) Mechanisms underlying postjunctional synergism between responses of the vas deferens to noradrenaline and ATP. *Eur J Pharmacol.* **498**:241-248.
- Sokolova E, Nistri A, Giniatullin R (2001) Negative cross talk between anionic GABAA and cationic P2X ionotropic receptors of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* **21**:4958-4968.
- Sokolova E, Skorinkin A, Moiseev I, Agrachev A, Nistri A, Giniatullin R (2006) Experimental and modeling studies of desensitization of P2X3 receptors. *Mol Pharmacol.* **70**:373-382.
- Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez JM, Hollmann M, Karschin C, Stühmer W (1996b) P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**:3684-3688.
- Soto F, Garcia-Guzman M, Karschin C, Stühmer W (1996a) Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* **223**:456-460.
- Spelta V, Jiang LH, Bailey RJ, Surprenant A, North RA (2003) Interaction between cysteines introduced into each transmembrane domain of the rat P2X2 receptor. *Br J Pharmacol.* **138**:131-136.
- Stern P, Behe P, Schoepfer R, Colquhoun D (1992) Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc Biol Sci.* **250**:271-277.
- Stojilkovic SS, Koshimizu T (2001) Signaling by extracellular nucleotides in anterior pituitary cells. *Trends Endocrinol Metab.* **12**:218-225.
- Stoop R, Thomas S, Rassendren F, Kawashima E, Buell G, Surprenant A, North RA (1999) Contribution of individual subunits to the multimeric P2X2 receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol Pharmacol.* **56**:973-981.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* **272**:735-738.
- Surprenant A, Schneider DA, Wilson HL, Galligan JJ, North RA (2000) Functional properties of heteromeric P2X1/5 receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles. *J Auton Nerv Syst.* **81**:249-263.
- Suzuki H, Kokubun S (1994) Subtypes of purinoceptors in rat and dog urinary bladder smooth muscles. *Br J Pharmacol.* **112**:117-122.
- Tenneti L, Gibbons SJ, Talamo BR (1998) Expression and trans-synaptic regulation of P2X4 and P2z receptors for extracellular ATP in parotid acinar cells. Effects of parasympathetic denervation. *J Biol Chem.* **273**:26799-26808.
- Terasawa E, Keen KL, Grendell RL, Golos TG (2005) Possible role of 5'-adenosine triphosphate in synchronization of Ca<sup>2+</sup> oscillations in primate luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol.* **19**:2736-2747.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998) N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry.* **37**:14845-14851.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999a) Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly. *J Biol Chem.* **274**:22359-22365.



- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999b) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem.* **274**:6653-6659.
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature.* **424**:778-783.
- Turner JT, Weisman GA, Landon LA, Park M, Camden JM (1998) Salivary gland nucleotide receptors: evidence for functional expression of both P2X and P2Y subtypes. *Eur J Morphol.* **36**:170-175.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature.* **371**:516-519.
- Vávra V, Jindřichová M, Jelínková I, Zemková H (2008) SFN Neuroscience 2008, Washington, 822.9/C8.
- Vikman KS, Hill RH, Backström E, Robertson B, Kristensson K (2003) Interferon-gamma induces characteristics of central sensitization in spinal dorsal horn neurons in vitro. *Pain.* **106**:241-251.
- Virginio C, MacKenzie A, North RA, Surprenant A (1999b) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol.* **519**:335-346.
- Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999a) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci.* **2**:315-321.
- Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL, Marinovich M (2003) Interleukin-1 $\beta$  enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci.* **23**:8692-8700.
- Volonté C, Amadio S, D'Ambrosi N, Colpi M, Burnstock G (2006) P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther.* **112**:264-280.
- Vulchanova L, Arvidsson U, Riedl M, Wang J, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R (1996) Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**:8063-8067.
- Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R (1997) Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology* **36**:1229-1242.
- Werner P, Seward EP, Buell GN, North RA (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**:15485-15490.
- Wilkinson WJ, Jiang LH, Surprenant A, North RA (2006) Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol Pharmacol.* **70**:1159-1163.
- Worthington RA, Dutton JL, Poronnik P, Bennett MR, Barden JA (1999) Localisation of P2X receptors in human salivary gland epithelial cells and human embryonic kidney cells by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting and immunofluorescence. *Electrophoresis.* **20**:2065-2070.
- Wynn G, Rong W, Xiang Z, Burnstock G (2003) Purinergic mechanisms contribute to mechanosensory transduction in the rat colorectum. *Gastroenterology.* **125**:1398-1409.
- Xiang Z, Burnstock G (2005) Changes in expression of P2X purinoceptors in rat cerebellum during postnatal development. *Dev Brain Res.* **156**:147-157.
- Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Qi Z, Sokabe M, Ando J (2000) P2X4 receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **279**:285-292.

- Yan Z, Li S, Liang Z, Tomic M, Stojilkovic SS (2008) The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J Gen Physiol.* **132**:563-573.
- Yan Z, Liang Z, Tomic M, Obsil T, Stojilkovic SS (2005) Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel. *Mol Pharmacol.* **67**:1078-1088.
- Yan Z, Liang Z, Obsil T, Stojilkovic SS (2006) Participation of the Lys313-Ile333 sequence of the purinergic P2X4 receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate. *J Biol Chem.* **281**:32649-32659.
- Young MT, Pelegrin P, Surprenant A (2007) Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol Pharmacol.* **71**:92-100.
- Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK; Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators (2001) Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* **345**:494-502.
- Zemkova H, Balik A, Jiang Y, Kretschmannova K, Stojilkovic SS (2006) Roles of purinergic P2X receptors as pacemaking channels and modulators of calcium-mobilizing pathway in pituitary gonadotrophs. *Mol Endocrinol.* **20**:1423-1436.
- Zemková H, Balík A, Jindřichová M, Vávra V (2008) Molecular Structure of Purinergic P2X Receptors and their Expression in the Hypothalamus and Pituitary. *Physiol Res.* **57** :S23-S38.
- Zemkova H, He ML, Koshimizu TA, Stojilkovic SS (2004) Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors. *J Neurosci.* **24**:6968-6978.
- Zemkova H, Vanecek J (1997) Inhibitory effect of melatonin on gonadotropin-releasing hormone-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in pituitary cells of newborn rats. *Neuroendocrinology.* **65**:276-283.
- Zemkova H, Yan Z, Liang Z, Jelinkova I, Tomic M, Stojilkovic SS (2007) Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X4 receptor functions. *J Neurochem.* **102**:1139-1150.
- Zhang Z, Zhang Z, Artelt M, Burnet M, Schluesener HJ (2007) Dexamethasone attenuates early expression of three molecules associated with microglia/macrophages activation following rat traumatic brain injury. *Acta Neuropathol.* **113**:675-682.
- Zheng Y, Hirschberg B, Yuan J, Wang AP, Hunt DC, Ludmerer SW, Schmatz DM, Cully DF (2002) Identification of two novel Drosophila melanogaster histamine-gated chloride channel subunits expressed in the eye. *J Biol Chem.* **277**:2000-2005.
- Zhou L, Qi X, Potashkin JA, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI (2008) Micro-RNAs miR-186 and miR-150 downregulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *J Biol Chem.* **283**:28274-28286.
- Zhou X, Galligan JJ (1998) Non-additive interaction between nicotinic cholinergic and P2X purine receptors in guinea-pig enteric neurons in culture. *J Physiol.* **513**:685-697.
- Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res.* **52**:44-56.
- Zsembery A, Boyce AT, Liang L, Peti-Peterdi J, Bell PD, Schwiebert EM (2003) Sustained calcium entry through P2X nucleotide receptor channels in human airway epithelial cells. *J Biol Chem.* **278**:13398-13408.

## Seznam publikací autorky:

Publikace k tématu:

Jindrichova M, Vavra V, Obsil T, Stojilkovic SS, Zemkova H (2008) Functional relevance of aromatic residues in the first transmembrane domain of P2X receptors. *J Neurochem.*, v tisku. (IF 4.451)

Jelinkova I, Vavra V, Jindrichova M, Obsil T, Zemkova HW, Zemkova H, Stojilkovic SS (2008) Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Arch.* **456**:939-950. (IF 3.842)

Zemkova H, Balik A, Jindrichova M, Vavra V (2008) Molecular Structure of Purinergic P2X Receptors and their Expression in the Hypothalamus and Pituitary. *Physiol Res.* **57**:S23-S38. (IF 1.505)

Jiné publikace:

Balik A, Jindrichova M, Bhattacharyya S, Zemkova H (2008) GnRH-I and GnRH-II-induced calcium signaling and hormone secretion in neonatal rat gonadotrophs. *Physiol Res.* Nov 4, v tisku. (IF 1.505)

Abstrakta v impaktovaných časopisech:

Jindrichova M, Vavra V, Zemkova H (2008) Differential effect of tyrosine to alanine substitution in the first transmembrane domain in P2X7 and other P2X subunits. *Physiol Res.* **57**:78P-79P. (IF 1.505)

Jindrichova M, Vavra V, Obsil T, Stojilkovic SS, Zemkova H (2008) A role of conserved tyrosine in the first transmembrane domain in purinergic P2X receptor function. *Purinergic Signal.* **4**:S199-S200.

Jelinkova I, Jindrichova M, Vavra V, Zemkova H (2006) Ivermectin sensitivity of heteromeric P2X4+P2X1 and P2X4+P2X6 purinergic receptors. *FEBS Journal.* **273**:330. (IF 3.396)