

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.
Oddělení buněčné a molekulární neuroendokrinologie
a
Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů



Mgr. Vojtěch Vávra

**Funkční úloha P2X receptorů v supraoptických jádrech
hypotalamu potkana a strukturně-funkční vlastnosti
rekombinantních P2X receptorů.**

**Functional role of purinergic P2X receptors in the supraoptic
nuclei of the rat and structure-function relations of
recombinant P2X receptors.**

Dizertační práce

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

Praha 2011

Prohlášení:

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

V Praze dne 27. června 2011

.....

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mi na cestě k vytvoření této práce pomohli. Za dlouhých šest let studia jich nebylo málo. V první řadě děkuji vedoucí své práce RNDr. Haně Zemkové, CSc., z Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i., za příležitost pracovat v její laboratoři a za odborné vedení po celou dobu studia. Dále pak děkuji ing. Janu Teisingrovi, CSc. za zaučení do techniky bodových mutací, Karle Kretschmannové, PhD. za akutní mozkové řezy, Aleši Balíkovi, PhD. a Zdeňce Bendové, PhD. za imunohistologické techniky, ing. Katarině Mitrové a Gyorgy Verebovi, PhD. za konfokální mikroskopii, a svým kolegům Ireně Jelínkové, PhD, Marii Jindřichové, PhD., Anirbanu Bhattacharya, PhD., Miloši Rokičovi, MSc., Ireně Svobodové, PhD. a Vendule Tvrdoňové, Mgr. za samozřejmou každodenní výpomoc. A nakonec děkuji mé partnerce, Petře Hlavničkové, Mgr., za její trpělivou podporu.

Finanční prostředky na provedení experimentů poskytly Grantová agentura České republiky (granty č. 305/07/0681 a 305/08/H037) a Grantová agentura Akademie věd (granty č. IAA500110702 a IAA500110910).

Obsah:

| | | |
|-------|--|-----------|
| I. | ABSTRAKT | 5 |
| II. | SEZNAM AUTORSKÝCH PUBLIKACÍ..... | 7 |
| III. | SEZNAM ZKRATEK | 9 |
| IV. | LITERÁRNÍ ÚVOD | 10 |
| | <i>A KOMPLEX PURINERGNÍ SIGNALIZACE</i> | <i>10</i> |
| | <i>B STRUKTURA A FUNKCE P2X RECEPTORŮ.....</i> | <i>14</i> |
| | <i>C FARMAKOLOGIE P2X RECEPTORŮ</i> | <i>20</i> |
| | <i>D P2X RECEPTORY V CENTRÁLNÍM NERVOVÉM SYSTÉMU.....</i> | <i>22</i> |
| | <i>E P2X RECEPTORY V HYPOTALAMU A V ADENOHYPOFÝZE.....</i> | <i>26</i> |
| | <i>F P2X RECEPTORY V SUPRAOPTICKÝCH JÁDRECH</i> | <i>28</i> |
| V. | CÍLE PRÁCE | 33 |
| VI. | VÝSLEDKY | 34 |
| VII. | DISKUZE | 43 |
| VIII. | ZÁVĚR | 46 |
| IX. | SEZNAM LITERATURY | 47 |

SAMOSTATNÁ PŘÍLOHA - PUBLIKOVANÉ PRÁCE

I. Abstrakt

Purinergní P2X receptory jsou membránové kationtové kanály stimulované extracelulárním ATP. U savců bylo dosud nalezeno sedm různých podtypů, označovaných jako P2X1-7, které svojí stavbou představují novou rodinu ligandem řízených iontových kanálů s výjimečnými strukturně-funkčními vlastnostmi. Tyto receptory jsou součástí rozsáhlého purinergního signalizačního komplexu, který se uplatňuje jak v nervovém systému tak v somatických tkáních. V centrálním nervovém systému jsou P2X receptory velmi hojně zastoupeny v hypotalamu a hypofýze, kde se podílí na řízení základních homeostatických a reprodukčních funkcí organismu.

Hlavní část mé práce pojednává o expresi a funkční úloze neuronálních P2X receptorů v supraoptických jádrech hypotalamu v mozku potkana. V magnocelulárních supraoptických neuronech jsou syntetizovány hormony oxytocin a arginin-vasopresin, které regulují porod a laktaci, respektive hospodaření organismu s vodou a udržování krevního tlaku. Výlev obou hormonů do systémového oběhu ze zadního laloku hypofýzy závisí na elektrické aktivitě supraoptických neuronů, která je řízena synaptickými vstupy aferentních neuronů. V nedávné době bylo nalezeno, že sekrece hormonu je stimulována také extracelulárním ATP. Cílem mé práce bylo zjistit podtypy přítomných P2X receptorů a jejich význam pro elektrickou aktivitu a synaptický přenos v supraoptických neuronech.

Druhou část mé práce tvoří studie strukturně-funkčních vlastností vybraných rekombinantních P2X receptorů. Funkční P2X receptor je tvořen 3 podjednotkami, kde každá podjednotka má dvě transmembránové domény. Krystalografická data ukazují, že pór iontového kanálu se nachází mezi druhými transmembránovými doménami. Krystalová struktura však byla vyřešena pro receptor v uzavřeném stavu a bez navázaného ATP, a proto mechanismus otevírání iontového kanálu a přesná struktura vazebného místa pro ATP nejsou dosud známy. Technikou bodové mutagenese jsme řešili otázku vazebného místa P2X4 receptoru pro alosterický modulátor ivermektin, funkční význam konzervovaných aromatických aminokyselin v horní části první transmembránové domény u P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7 receptorů, a úlohu pěti konzervovaných cysteinových párů v ektodoméně P2X4 receptoru.

Svojí dizertační práci předkládám jako soubor čtyř původních prací a jednoho přehledu publikovaných v recenzovaných časopisech. Text těchto publikací je uveden v samostatné příloze.

Abstract

Purinergic P2X receptors are non-selective cationic channels gated by extracellular ATP. Up to now, seven mammalian subunits, termed P2X1-X7, have been cloned and characterized. These receptors comprise a new membrane channel family with distinct structural and functional features. P2X receptors take part in a signalling network called “purinergic signalling” which is widely exploited in both somatic and neuronal tissues. In the central nervous system, they are highly expressed in the hypothalamus and hypophysis, where they participate in the regulation of homeostatic and reproductional functions.

The main focus of my Thesis is on the expression and functional role of P2X receptors in supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. These nuclei contain two populations of magnocellular neurons which produce either oxytocin or arginine-vasopressin. Delivery of the hormones into the systemic blood relies on the electrical activity of supraoptic neurons, which is in turn governed by the incoming synaptic inputs. It has been recently shown, that the process of hormone release from supraoptic neurons is regulated by extracellular ATP. However, purinergic signals that regulate hormone secretion are not well understood. The aim of my study was to identify subtypes of P2X receptors expressed in the supraoptic nuclei and to elucidate their impact on electrical activity and synaptic transmission of supraoptic neurones.

The second part of the Thesis comprises three studies focused on structure-function relationship of several P2X subtypes. Crystallographic data for closed channel showed that P2X receptor is composed of three subunits, each having two transmembrane domains. The channel pore is formed by second transmembrane regions, but the role of the first transmembrane domain is still unknown, as well as the binding sites for ATP and allosteric modulators. We used site-directed mutagenesis coupled with cell electrophysiology to solve the following questions: (1) where is the binding site for ivermectin, a positive allosteric modulator of P2X4 receptors, (2) what is the functional role of conserved aromatic residues in the upper-half of the first transmembrane region in P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 and P2X7 receptors, and (3) what is the role of five conserved ectodomain cysteine-pairs in P2X4 receptor function.

My Thesis summarizes answers to these questions based on our results that have been published in four peer-reviewed articles and one review. The articles are presented as a separated attachment to the Thesis.

II. Seznam autorských publikací

- (1) Vavra, V., Bhattacharya, A. and Zemkova, H., 2011.
Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices.
Neuroscience. 188, 1-12., (IF: 3,292)
- (2) Rokic, M. B., Tvrdonova, V., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H., 2010.
Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating.
Physiological Research. 59, 927-935., (IF:1,653)
- (3) Jindrichova, M., Vavra, V., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H., 2009.
Functional relevance of aromatic residues in the first transmembrane domain of P2X receptors.
Journal of Neurochemistry. 109, 923-934., (IF: 4,500)
- (4) Jelinkova, I., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Zemkova, H. W., Zemkova, H. and Stojilkovic, S. S., 2008.
Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin.
Pflugers Archives – European Journal of Physiology. 456, 939-950., (IF: 3,526)
- (5) Zemkova, H., Balik, A., Jindrichova, M. and Vavra, V., 2008.
Molecular structure of purinergic P2X receptors and their expression in the hypothalamus and pituitary. REVIEW.
Physiological Research. 57 Suppl 3, S23-38., (IF:1,653)

Podíl Vojtěcha Vávry na autorských publikacích

- (1) Vavra, V., Bhattacharya, A. and Zemkova, H., 2011. Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices. *Neuroscience*. 188, 1-12., (IF: 3,292)

Prováděl všechny elektrofyziologické pokusy, analyzoval data, připravoval fotografickou dokumentaci a podílel se na přípravě rukopisu.

- (2) Rokic, M. B., Tvrdonova, V., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H., 2010. Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating. *Physiological Research*. 59, 927-935., (IF:1,653)

Podílel se na pokusech imunocytochemického značení a snímání obrazů na konfokálním mikroskopu, připravoval obrázky k rukopisu.

- (3) Jindrichova, M., Vavra, V., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H., 2009. Functional relevance of aromatic residues in the first transmembrane domain of P2X receptors. *Journal of Neurochemistry*. 109, 923-934., (IF: 4,500)

Prováděl všechny pokusy imunocytochemického značení a snímání obrazů na konfokálním mikroskopu, připravoval obrázky k rukopisu.

- (4) Jelinkova, I., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Zemkova, H. W., Zemkova, H. and Stojilkovic, S. S., 2008. Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflügers Archives – European Journal of Physiology*. 456, 939-950., (IF: 3,526)

Podílel se na přípravě mutací a na elektrofyziologických měřeních, prováděl všechny pokusy imunocytochemického značení a snímání obrazů na konfokálním mikroskopu.

- (5) Zemkova, H., Balik, A., Jindrichova, M. and Vavra, V., 2008. Molecular structure of purinergic P2X receptors and their expression in the hypothalamus and pituitary. REVIEW. *Physiological Research*. 57 Suppl 3, S23-38., (IF:1,653)

Připravoval obrázky a podílel se na tvorbě rukopisu.

V Praze dne 21. června 2011

.....
za spoluautory uvedených prací
RNDr. Hana Zemková, CSc.

III. Seznam zkratek

α,β -meATP – α,β -methylen-adenosin-5'-trifosfát

Δ zfp2X4.1 – třírozměrná krystalová struktura P2X4 receptoru z ryby *Danio rerio*

2MeSADP – 2-methylthio ADP

2MeSAMP – 2-methylthio AMP

2MeSATP – 2-methylthio ATP

ADP – adenosin-5'-difosfát

AMP – adenosin-5'-monofosfát

ATP – adenosin-5'-trifosfát

ATP γ S – adenosin-5'-O-2-thiotrifosfát

BzATP – 2'- & 3'-O-4-benzoylbenzoyl-ATP

CNS – centrální nervový systém

E-NTPD – ektonukleosid trifosfát difosfohydroláza

GABA – kyselina γ -aminomáselná

IVM – ivermektin

P1 – adenosinové receptory

P2X – ionotropní purinergní receptory

P2Y – metabotropní purinergní receptory spřažené s G proteinem

PPADS – pyridoxal fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonová kyselina

PVN – paraventriculární jádra

sEPSCs – spontánní excitační post-synaptické proudy

sIPSCs – spontánní inhibiční post-synaptické proudy

SON – supraoptická jádra

TM – transmembránové domény

UDP – uridin-5'-difosfát

UTP – uridin-5'-trifosfát

IV. Literární úvod

A *Komplex purinergní signalizace*

Purinergní signalizace je systém komunikace mezi buňkami, který využívá některé molekuly purinů a pyrimidinů jako mediátory, a jejich membránové – purinergní – receptory jako efektory. Součástí mechanismu jsou také hydrolyzující enzymy, které svým působením postupně degradují vyšší fosforylované formy purinů na nižší, a transportní systémy, které přenášejí nukleotidy a jejich metabolity přes buněčnou membránu. Dohromady pak receptory, jejich agonisté a enzymy vytváří velmi rozsáhlou signální síť. Zvláštností purinergní signalizace, kterou se odlišuje od ostatních signálních drah jež jsou specializovány pro určité funkce nebo tkáně, je její zdánlivá všudypřítomnost – puriny a/nebo pyrimidiny působí jako transmittery nejen v centrálním a periferním nervovém systému, ale prakticky i ve všech typech nevzrušivých tkání (Burnstock a Verkhratsky, 2009). Podílí se tak na celé řadě fyziologických funkcí, od rychlého synaptického přenosu, přes humorální sekreci, kontrakci hladkého a srdečního svalu, regulaci cévního tonu až po dlouhodobé děje, jakými jsou proliferace a diferenciace buněk nebo apoptóza (Burnstock, 2006; Khakh, 2001; Khakh a North, 2006; Volonte a spol., 2006).

Mechanismy uvolňování purinů a pyrimidinů do extracelulárního prostředí

Hlavním mediátorem purinergní signalizace je molekula adenosin-5'-trifosfátu (ATP). V současnosti je známo několik způsobů, jak se ATP dostává do extracelulárního prostředí. Zcela základním je vylití ATP z poškozených buněk, což dále vysvětluje významnou úlohu ATP v imunitních reakcích. V neuronech je ATP ukládáno do synaptických váčků nacházejících se v blízkosti presynaptické membrány a při příchodu akčního potenciálu je vylučováno procesem exocytózy jako klasický neurotransmitter. Obdobný mechanismus uvolňování ve váčcích byl popsán také u astrocytů, u sekrečních buněk, endoteliálních a epiteliálních buněk a osteoblastů (Burnstock, 2006; Zhang a spol., 2007a). Bylo zjištěno, že za transport nukleotidů do membránových váčků v astrocytech je zodpovědný jeden člen rodiny aniontových vesikulárních transportérů, kam např. patří i vesikulární transportéry glutamátu. Je kódován genem SLC17A9 a jako samojediný tvoří funkční skupinu vesikulárních nukleotidových transportérů (Sawada a spol., 2008).

Přestože exprese jeho mRNA byla doložena na mnoha místech v centrálním nervovém systému (CNS), na potvrzení funkční exprese tohoto transportéru v membránách neuronálních synaptosomů se stále čeká (Sreedharan a spol., 2010).

ATP může být z buněk sekretováno také pomocí membránových ABC transportérů obsahujících motiv ATP-vázající kazety (Roman a spol., 1997). Další možnost představují mechanismy založené na volné difuzi: koncentrace ATP v buněčném cytosolu se odhaduje na 5-10 mM, zatímco v extracelulárním prostředí se nachází pouze několik jednotek nM. Tento výrazný koncentrační rozdíl vytváří hnací sílu pro difuzi molekul ATP z buňky ven (Lalo a spol., 2011). Volnou difuzní cestu pak mohou vytvořit mnohé typy chloridových kanálů mechanicky aktivovaných změnami buněčného objemu, nespárované mono-hexamery konexinových a panexinových polokanálů nebo dilatované póry vlastních P2X7 kanálů (Fields, 2011; Iglesias a spol., 2008; Scemes a spol., 2007; Thompson a spol., 2006). ATP je v extracelulárním prostředí hlavním zdrojem svých metabolitů: adenosin-5'-difosfátu (ADP), adenosin-5'-monofosfátu (AMP) a adenosinu. Mechanismy, které vedou k uvolňování pyrimidinů uridin-5'-trifosfátu (UTP) a uridin-5'-difosfátu (UDP) nebyly dosud popsány (Abbracchio a spol., 2009). Opakem mechanismů uvolňování je zpětný transport adenosinu do buněk prostřednictvím specifických přenašečů (Baldwin a spol., 1999).

Hydrolyzující enzymy

V extracelulárním prostoru je ATP velmi rychle hydrolyzováno na ADP, a dále na AMP a adenosin (Obr.1). V současnosti je známo pět rodin nukleotidáz zapojených do tohoto procesu: ektonukleosid-trifosfát-difosfohydrolázy (E-NTPDázy 1, 2, 3, 8), ektonukleotid pyrofosfatázy (E-NPP 1, 2, 3), alkalické fosfatázy, ekto-5'-nukleosid-difosfokinázy (E-NDPK) a ekto-5'-nukleotidázy. Tyto enzymy se navzájem liší svojí molekulární strukturou, tkáňovou lokalizací, způsobem štěpení substrátu, specificitou a dokonce preferencí k substrátu. Například E-NTPDáza1 hydrolyzuje ATP přímo na AMP či UTP na UDP, zatímco E-NTPDáza2 hydrolyzuje ATP pouze na ADP. Poslední krok přeměny z AMP na adenosin zajišťuje ekto-5'-nukleotidáza (Zimmermann, 2001). Obvykle jsou ektonukleotidázy vázány na cytoplazmatickou membránu, ale mohou se i odštěpit a přejít tak do podoby volných exonukleotidáz.

Purinergní receptory

Purinergní receptory jsou membránové proteiny, které vazbou extracelulárních purinů či pyrimidinů zprostředkovávají přenos signálu do nitra buňky. Podle hlavního přirozeného agonisty se purinergní receptory rozdělují na dvě hlavní skupiny: P1 receptory aktivované adenosinem, a P2 receptory aktivované ATP, ADP a případně i UTP a UDP (Burnstock, 1977). P2 receptory se dále rozdělují na dvě podskupiny - na ionotropní P2X a metabotropní P2Y receptory (Khakh a spol., 2001).

P1 receptory

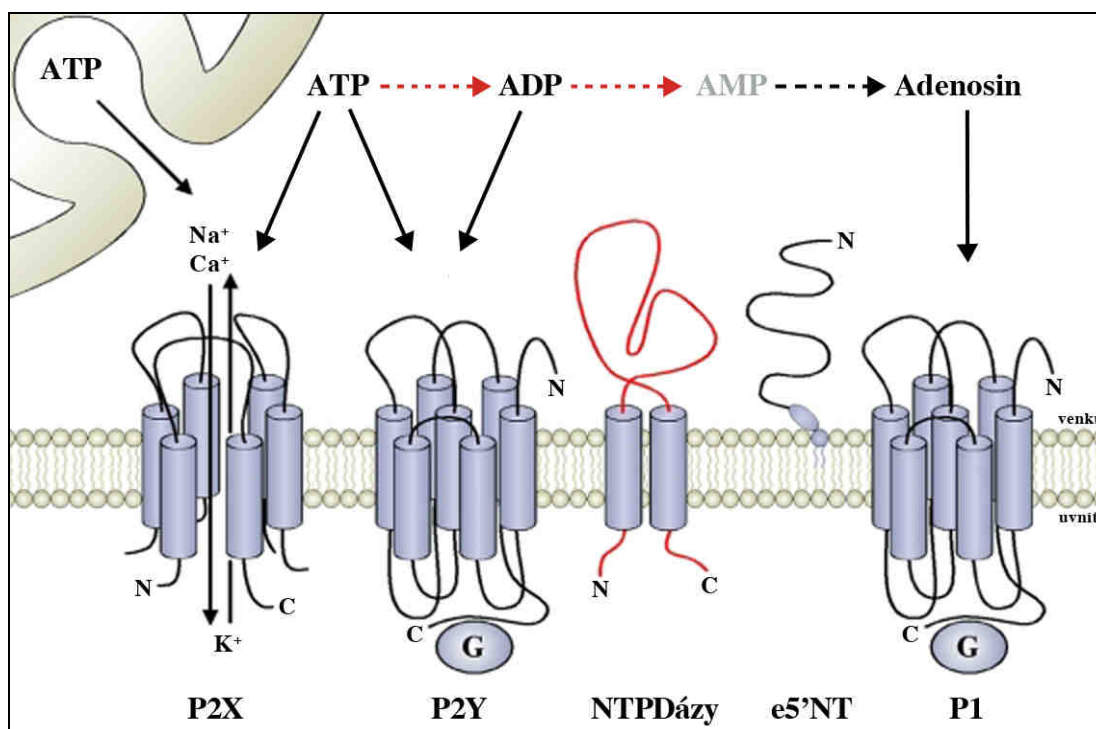
P1 receptory aktivované adenosinem jsou membránové metabotropní receptory spojené s G-proteinem. V současnosti jsou známy čtyři podtypy P1 receptorů: A1, A2A, A2B a A3, které se navzájem liší svojí strukturou a farmakologickými vlastnostmi. A1 receptory jsou spojeny s $G_{i/o}$ proteinem, takže jejich aktivace inhibuje adenylcyklázu a produkci cAMP. Aktivace A2A a A2B receptorů spojených s G_s proteinem naopak stimuluje činnost adenylcyklázy. A3 receptory se mohou asociovat jak s $G_{i/o}$ tak s $G_{q/11}$ proteiny, takže jejich aktivace vyvolává snížení cAMP a/nebo aktivaci fosfolipázy C, která je následována tvorbou inositol-trifosfátu (IP3) a uvolněním Ca^{2+} iontů z endoplasmatického retikula. A2A a A2B receptory se rozlišují podle míry afinity k vazbě adenosinu, která je v případě A2A receptorů vyšší (Fields a Burnstock, 2006).

P2Y receptory

P2Y receptory jsou rovněž membránové receptory spojené s G-proteiny. Podle jejich farmakologie a druhu asociovaného G-proteinu rozlišujeme osm podtypů savčích P2Y receptorů: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14 (Abbracchio a spol., 2003). Aktivace P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 a P2Y11, které jsou asociovány s $G_{q/11}$ -proteiny, vede k aktivaci fosfolipázy C, tvorbě IP3 a uvolnění iontů vápníku z endoplasmatického retikula. P2Y12, P2Y13 a P2Y14 jsou spojeny s $G_{i/o}$ -proteiny, skrze které nepřímo regulují činnost některých iontových kanálů (Abbracchio a spol., 2006). Účinnost aktivace po navázání ATP nebo ADP je u jednotlivých forem P2Y různá, avšak P2Y4 a P2Y6 podtypy jsou s největší potencí aktivované UTP, takže jsou někdy označovány také jako pyrimidinergní receptory (Dubyak, 2003; O'Connor a spol., 1991).

P2X receptory

P2X receptory jsou iontové kanály, které po navázání extracelulárního ATP otevírají v membráně hydrofilní pór propustný pro kationty Na^+ , K^+ a Ca^{2+} , a také pro malé organické kationty (Valera a spol., 1994). Dosud bylo naklonováno 7 genů kódujících jednotlivé podtypy savčích P2X receptorů, které jsou označovány jako P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 a P2X7. Příslušné proteiny jsou složeny z 379 (P2X6) až 595 (P2X7) aminokyselin, a příbuznost jejich aminokyselinové sekvence se pohybuje v rozmezí 26-47% (Jarvis a Khakh, 2009; Jindřichová, 2009). Každá podjednotka obsahuje intracelulárně orientované N a C konce, dva transmembránové úseky (TM1 a TM2) a jednu velkou extracelulární kličku. Pro vytvoření funkčního kanálu je zapotřebí oligomerizace tří podjednotek. Touto strukturou se P2X receptory výrazně odlišují od nikotinických a glutamátových typů receptorů.



Obrázek 1: Komplex purinerní signalizace. Schematické zjednodušení celého komplexu ukazuje jeho hlavní části – zdroj ATP a jeho postupnou hydrolyzu ektonukleotid trifosfát difosfhydrolázami (NTPDázy) na ADP a AMP. Poslední krok hydrolyzy AMP na adenosin je zprostředkován ekto-5'nukleotidázami (e5'NT). P2X receptory jsou kationtové kanály, zatímco P2Y a P1 receptory jsou spojeny s G-proteiny (G). Upraveno podle Zebisch a Strater (2007).

Funkční P2X receptory mohou mít podobu homomerů nebo heteromerů (Nicke a spol., 1998). V nativních tkáních je pak obvyklé, že buňky exprimují několik různých typů P2X podjednotek současně, což naznačuje, že heteromerní forma P2X receptorů je přirozená. Studium rekombinantních P2X receptorů dále ukazuje, že heteromerní formy mají ve srovnání s homomerními formami odlišné farmakologické vlastnosti. Funkčně a biochemicky byly doposud charakterizovány heteromery: P2X1/P2X2, P2X1/P2X4, P2X1/P2X5, P2X2/P2X3, P2X2/P2X6 a P2X4/P2X6 (Brown a spol., 2002; King a spol., 2000; Le a spol., 1998; Le a spol., 1999; Lewis a spol., 1995; Nicke a spol., 1998). Byl popsán také receptor P2X4/P2X7, ale jeho skutečná existence je stále nejasná (Guo a spol., 2007). Na základě koimunoprecipitace se předpokládá formování také heteromerů P2X1/P2X3, P2X1/P2X6, P2X2/P2X5, P2X3/P2X5, P2X4/P2X5 a P2X5/P2X6 (Torres a spol., 1999), ale tyto heteromerní formy dosud nebyly charakterizovány funkčně ani farmakologicky.

Jednotlivé podtypy P2X receptorů se také odlišují rychlostí desenzitizace, tedy poklesem amplitudy odpovědi při stálé přítomnosti agonisty. V tomto ohledu jsou nejrychleji desenzitizujícími typy P2X1 a P2X3 receptory, u kterých dochází k vymizení odpovědi během několika sekund. Naproti tomu P2X2, a při vysokých koncentracích agonisty i P2X7 receptory vedou setrvalé proudy trvající desítky až stovky sekund. P2X4 receptory desenzitizují středně rychle (North, 2002).

U buněk nesoucích homomerní P2X2, P2X4, P2X7 anebo heteromerní P2X2/3 receptory byla pozorována pozoruhodná vlastnost, kdy v průběhu setrvalé stimulace agonistou dochází k poklesu membránového odporu. Tento jev je vysvětlován jako postupná dilatace póru P2X kanálů, který se tak stává propustným i pro větší molekuly (Khakh a spol., 1999a; Virginio a spol., 1999).

B Struktura a funkce P2X receptorů

V roce 1994 byly jako první ATP-aktivované membránové kanály naklonovány a charakterizovány P2X1 a P2X2 receptory. Do dvou let bylo nalezeno dalších pět podtypů (P2X3 až P2X7), které doplnily rodinu savčích P2X receptorů na současných 7 členů (Soto a spol., 1997). Následující léta byla vyplněna snahou o objasnění jejich struktury a funkce. V tomto ohledu nejčastěji využívanou technikou se stalo spojení bodové mutagenese zaměřující vybrané aminokyselinové zbytky v peptidické páteři receptoru s následnou expresí mutantních receptorů v modelovém buněčném systému a

elektrofyzilogickým měřením změn funkčních vlastností ve srovnání s původní strukturou, tzv. „wild typem“.

V roce 2009 byla publikována první krystalová struktura P2X receptoru (Kawate a spol., 2009). Jak uvádí Silberberg a Swartz (2009), bylo vyřešení krystalové struktury výsledkem sedmi let intenzivní práce. Experimentální obtíže si vynutily použít ne-savčího původce - ryбку dánío pruhované (*Danio rerio*, zebrafish) - a několik zásahů do samotné struktury receptoru v podobě bodových mutací (C51F, N78K, N187R), a zkrácení obou intracelulárních konců (N-konec o 28, C-konec o 8 aminokyselin). Výsledný model, označovaný jako $\Delta z f P 2 X 4.1$, tak zachycuje obě transmembránové domény a extracelulární úsek receptoru ve stavu, kdy na receptor není navázán agonista a membránový kanál je uzavřen (Kawate a spol., 2009). S rozlišením 3.1 Ångstromu představuje tento model dosud nejdetailnější popis 3D struktury P2X receptorů, se kterým jsou všechny předchozí i následující strukturně-funkční studie konfrontovány (Browne a spol., 2010; Evans, 2010; Kawate a spol., 2009; Young, 2009).

Sami autoři studie připodobňují tvar jedné podjednotky k prohnutému tělu delfína vyskakujícího z vodní hladiny, kde jednotlivé části struktury popisují jako ocasní ploutev ponořenou v hladině (transmembránové úseky v plazmatické membráně), a dále jako tělo, pravou, levou a zádovou ploutev a hlavu, které společně reprezentují velkou extracelulární doménu (Obr.2.). Oblast těla je tvořena složeným β -listem, který ve své horní polovině nese místa, kde dochází ke kontaktům mezi sousedními podjednotkami. Modelový receptor je vystavěn ze tří delfínů, jejichž těla se vzájemně ovíjejí, mezi sebou ponechávají centrální vertikální dutinu a na svém povrchu vytváří kapsy interpretované jako ATP-vazebná místa (Browne a spol., 2010).

Krystalová struktura $\Delta z f P 2 X 4.1$ s konečnou platností potvrzuje, že P2X receptory se skládají ze tří podjednotek, z nichž každá obsahuje N i C konce orientované intracelulárně, dále dva transmembránové úseky a velkou extracelulární doménu obsahující ATP-vazebné místo (Obr.3). Potvrdila se také hypotéza, že transmembránové úseky jsou formovány do podoby α -helixů. Potvrzena byla i přítomnost pěti cysteinových můstků, z nichž 3 jsou uloženy v oblasti hlavy (Cys119-Cys168, Cys129-Cys152, Cys135-Cys162; $\Delta z f P 2 X 4.1$ číslování), jeden na zádové ploutvi (Cys220-Cys230) a jeden můstek, který spojuje konce dvou β -listů (Cys264-Cys273), je uložený v dolní polovině oblasti označované jako tělo (Browne a spol., 2010). Je zajímavé, že cysteiny Cys129-Cys152 a Cys135-Cys162 jsou položeny dostatečně blízko u sebe tak, že je možné předpokládat střídání vazeb mezi oběma páry. Řešením otázky významu cysteinových můstků pro funkci krysího P2X4

receptoru exprimovaného v savčích buňkách se zabývá jedna z příložených publikací (Rokic a spol., 2010).

ATP vazebné místo

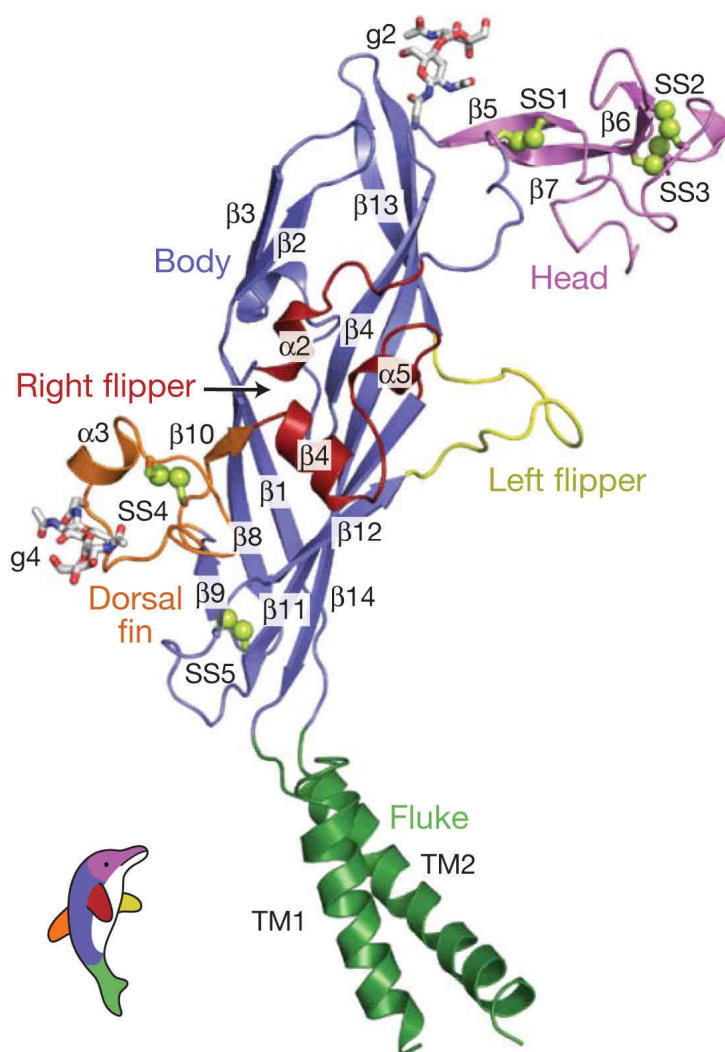
ATP vazebné místo bylo studováno bodovou mutagenezí, která jako zásadní pro vazbu označila osm aminokyselinových zbytků - Lys70, Lys72, Phe188, Thr189, Asn296, Phe297, Arg298 a Lys316 (Δ zfP2X4.1 číslování) (Jiang a spol., 2000b; Marquez-Klaka a spol., 2007; Roberts a Evans, 2004; Roberts a Evans, 2006; Wilkinson a spol., 2006; Zemkova a spol., 2007). V krystalovém modelu Δ zfP2X4.1 náleží první čtveřice aminokyselin jedné a druhá čtveřice sousední podjednotce, a všechny dohromady tvoří výstelku dutiny vzniklé na povrchu receptoru v prostoru mezi oběma podjednotkami. Přestože byla krystalová struktura vyřešena pro receptor bez navázaného agonisty, je souhra těchto vlastností dostatečně přesvědčivá pro tvrzení, že právě zde se nachází ATP vazebné místo (Young, 2009). Model dále ukazuje, že v blízkosti této vazebné kapsy se nachází i oblasti levé ploutve, hlavy první podjednotky a zádové ploutve druhé podjednotky. Blízká poloha těchto oblastí k ATP-vazebnému místu napomáhá vysvětlení, proč odlišnosti ve složení aminokyselin v těchto oblastech zapříčiňují rozdíly v citlivosti k agonistům či divalentním iontům mezi různými podtypy P2X receptorů.

Například u krysího P2X2 receptoru, jehož aktivitu zvyšují ionty Zn^{2+} , bylo již dříve předpovězeno mezipodjednotkové Zn^{2+} vazebné místo tvořené His120 a His213 (Pro125 a His219 při Δ zfP2X4.1 číslování) (Nagaya a spol., 2005). Krystalová struktura ukázala, že se tyto aminokyselinové zbytky nachází právě v částech hlavy a zádové ploutve, které jsou blízké k ATP-vazebnému místu. Podobně je tomu i v případě vysvětlení odlišné citlivosti P2X7 receptoru k agonistovi 2,3-*O*-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP), která je u krysího typu zvýšená oproti myššímu typu. Mutagenezní studie (Young a spol., 2007) vysvětlovala tento rozdíl záměnou jedné aminokyseliny Lys127 (krysa) za Ala127 (myš). V modelu Δ zfP2X4.1 této pozici odpovídá Ser127 lokalizovaný v oblasti hlavy, která je k ATP vazebnému místu velice blízko (Young, 2009).

Transmembránové domény a oblast póru

Výsledky mutagenezních studií předpokládaly, že druhá transmembránová doména nese hlavní podíl na tvorbě iontového póru, a že se pór kanálu zužuje asi v polovině transmembránových domén (Li a spol., 2008; Migita a spol., 2001; Rassendren a spol.,

1997). $\Delta zfp2X4.1$ model tyto názory potvrzuje: obě domény jsou v membráně uloženy šikmo, TM2 mezi sebou vytváří místo pro vlastní pór a TM1 je obestupují zvenčí (Kawate a spol., 2009). Pór uzavřeného kanálu je zahrazen ponejvíce hydrofobními aminokyselinovými zbytky, přičemž nejužší místo póru se nachází v oblasti Ala344. Analogický model P2X2 receptoru má na této pozici Th336, který spolu se sousedním Thr339 leží na stejné straně α -helixu, a oba byly za nejužší místo póru označeny již dříve (Li a spol., 2008; Migita a spol., 2001). Sousední Ser340, který je u P2X2 také označován za důležitý pro vedení iontů (Cao a spol., 2009; Egan a Khakh, 2004; Migita a spol., 2001), je ale v modelu uzavřeného kanálu orientován mimo oblast vlastního póru (v $\Delta zfp2X4.1$ je Ser340 zastoupen Leu348). Nicméně se předpokládá, že v průběhu otevírání kanálu musí alespoň částečně docházet k posunu a k rotaci alfa-helixu TM2 (Kracun a spol., 2010).



Obrázek 2: $\Delta zfp2X4.1$ model jedné podjednotky P2X4 receptoru je popisován jako tělo skákajícího delfína. Rozlišují se oblasti hlavy, těla, pravé, levé, zádové a ocasní ploutve. Extracelulární doména je složena z α -helixů (α 1-5) a β -listů (β 1-14). Zvýrazněny jsou dvě glykosylovaná místa (g2 a g4) na povrchu receptoru a pět cysteinových párů tvořících sulfidické můstky (SS1-5). Převzato z Kawate a spol. (2009).

Jak již bylo řečeno, TM1 se přímo nepodílí na tvorbě membránového póru, avšak zdá se být důležitou pro kontrolu vazby a působení některých agonistů. Například nahrazením TM1 domény u krysího typu P2X2 receptoru za odpovídající část P2X1 nebo P2X3 receptorů, které se vyznačují citlivostí k α,β -metylen-adenosin-5'-trifosfátu (α,β -meATP), dochází k přenesení této citlivosti i na chimerický receptor. K této změně nedochází, pokud je TM1 přenesena z α,β -meATP-necitlivých podtypů P2X receptorů (Haines a spol., 2001). Také pro alosterický modulátor P2X4 receptorů ivermektin (IVM), který zvyšuje citlivost receptoru k ATP, se předpokládá, že alespoň určitá část jeho vazebného místa je tvořena TM1 (Priel a Silberberg, 2004). Otázka polohy vazebného místa pro IVM je předmětem jedné z příložených publikací (Jelinkova a spol., 2008). V horní polovině TM1 všech podtypů P2X receptorů se nachází konzervovaný Tyr42 (P2X4 číslování) a dále několik slaběji konzervovaných aromatických aminokyselin. Funkčním významem této skupiny residuí pro citlivost receptoru k ATP a otevírání membránového póru u několika P2X receptorů (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7) se zabývá další příložená publikace (Jindrichova a spol., 2009).

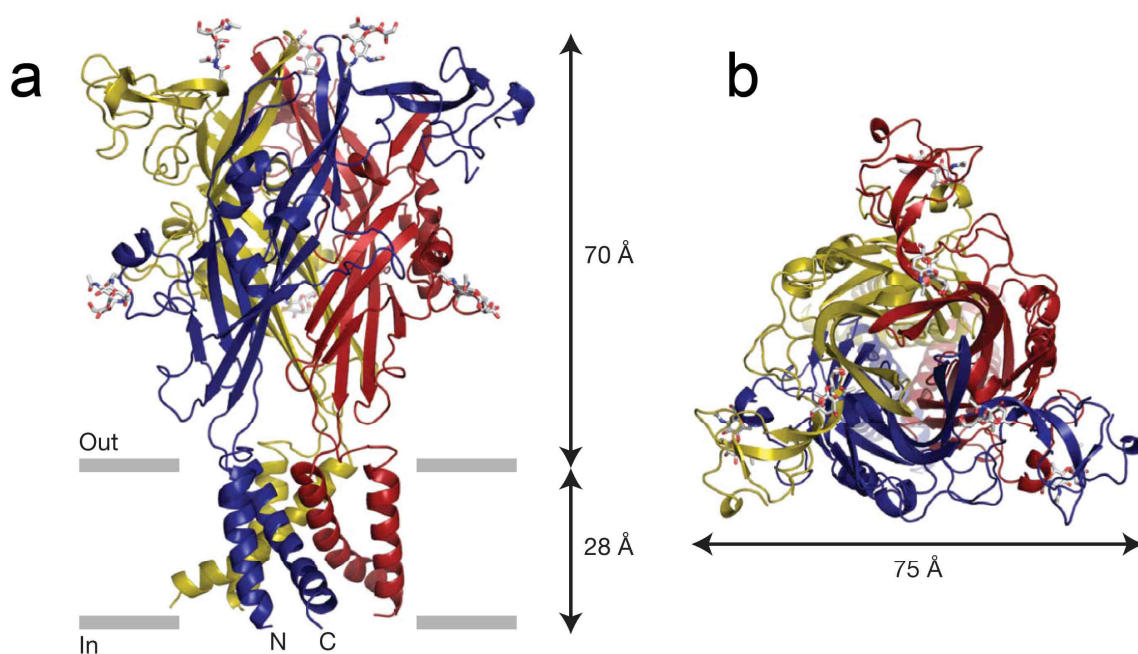
Převod signálu

Oblasti receptoru, které jsou zodpovědné za převedení signálu o navázání agonisty do otevření vlastního póru, jsou spatřovány v sekvencích asi 20 aminokyselin spojujících ektodoménu a oba transmembránové úseky. Tyto sekvence jsou vymezeny Val51 v TM1 a Leu327 v TM2, a začátkem oblastí považovaných za součásti ATP vazebného místa, tedy Lys69 a Lys308 (Kracun a spol., 2010; Yan a spol., 2006; Young, 2009). Krystalová struktura $\Delta zfp2X4.1$ ukazuje, že v obou případech jsou tyto úseky tvořeny z velké části složenými β -listy, které nad membránou přechází do podoby kratších volných segmentů, což umožňuje jejich pohyb. Browne a spol. (2010) nazývají tyto části receptoru přímo jako „spojovací táhla“ (*connecting rods*).

Intracelulární N- a C- konec

Při přípravě krystalové struktury $\Delta zfp2X4.1$ byly oba intracelulární konce z původního receptoru odstraněny. Nevíme tedy jejich přesnou strukturu, ale známe jejich vlastnosti z funkčních studií. Na N-konci se nachází konzervované fosforylační místo YxTxR/K, u kterého záměna jednotlivých aminokyselin způsobuje výrazné zrychlení desenzitizace receptoru (Boue-Grabot a spol., 2000; Liu a spol., 2003).

Jednotlivé podtypy P2X receptorů se vzájemně liší délkou svých C-konců, od 27 aminokyselin u P2X6 po 239 aminokyselin u P2X7. Přesto je u všech podtypů na C-konci konzervován YxxxK motiv, který je významný pro stabilní expresi P2X receptorů na povrchu buňky (Chaumont a spol., 2004). U P2X4 receptoru se na C-konci nachází také tzv. YxxGL motiv (Tyr378, Gly381, a Leu382), který je naopak nutný k rychlé internalizaci receptoru při setrvalé stimulaci agonistou (Royle a spol., 2002). P2X7 receptor má nejdelší C-konec a uvažuje se, že jeho 180 posledních aminokyselin se podílí na stabilizaci receptoru v membráně a interakci s lipidy (Denlinger a spol., 2003; Smart a spol., 2003). Aminokyseliny v úseku 374-469 na C-konci u P2X2 a P2X4 receptoru jsou důležité pro interakci s jinými ligandem řízenými kanály, například s acetylcholinovým nebo s GABA-A receptorem (Boue-Grabot a spol., 2003; Boue-Grabot a spol., 2004; Jo a spol., 2011). C-konec také ovlivňuje desenzitizaci. Sestříhová varianta P2X2 receptoru se zkráceným C-koncem o 69 aminokyselin (tzv. P2X2b forma, zkrácená o Val370-Gln438 včetně) desenzitizuje přibližně 5-krát rychleji než forma nezkrácená (Koshimizu a spol., 1998a).



Obrázek 3: Strukturální model Δ zfP2X4.1 receptoru z krystalografických dat. Pohled na receptor z roviny membrány (a) a shora z extracelulárního prostoru (b). Kanál je složen ze tří podjednotek z nichž každá obsahuje dvě transmembránové domény a jednu velkou extracelulární smyčku. N- a C- intracelulární konce nejsou součástí modelu. Upraveno podle Kawate a spol. (2009).

C Farmakologie P2X receptorů

Je známo, že sedm podtypů P2X podjednotek je schopno tvořit homomerní kanály i různé typy funkčních heteromerních forem (Torres a spol., 1999). Počet možných funkčních variant dále rozšiřuje mechanismus alternativního sestřihu mRNA P2X receptorů (Koshimizu a spol., 1998b; North, 2002). Jednotlivé podtypy homomerních a heteromerních P2X receptorů se vzájemně odlišují svými funkčními a farmakologickými vlastnostmi.

Hlavním přirozeným agonistou pro všechny podtypy P2X receptorů je molekula ATP. Naopak ADP, AMP, adenosin či adenin nejsou efektivními agonisty P2X receptorů. ADP, 2-methylthioadenosin-5'-difosfát (2MeSADP) a 2-methylthioadenosin-5'-monofosfát (2MeSAMP) aktivují P2Y receptory a používají se tak k rozlišení obou skupin receptorů (Abbracchio a spol., 2006; Gevertz a spol., 2006). Citlivost k ATP je různá mezi jednotlivými podtypy P2X receptorů i mezi izoformami určitého podtypu, které byly izolovány z různých zvířat. Přehled o citlivosti jednotlivých homomerních forem P2X receptorů je uveden v Tabulce 1 v hodnotách EC₅₀, tj. v hodnotách koncentrace ATP, které u dané formy receptoru vyvolávají polovinu maximální proudové odpovědi.

Pro P2X1 a P2X3 je charakteristická vysoká citlivost k α,β -meATP (EC₅₀ asi 0,3 μ M), který je stabilním analogem ATP (North, 2002). Pro rozlišení obou forem se dále využívá β,γ -methylen-adenosin-5'-trifosfát (β,γ -meATP), kdy P2X1 receptory jsou aktivovány koncentrací přibližně 30-krát nižší než je koncentrace potřebná k aktivaci P2X3 receptorů (Bianchi a spol., 1999; Garcia-Guzman a spol., 1997).

| | EC ₅₀ (μ M ATP) | Reference |
|------|------------------------------------|---|
| P2X1 | <1 | Evans a spol., 1995; Valera a spol., 1994 |
| P2X2 | 0,5-8 | Bianchi a spol., 1999; Evans a spol., 1995; King a spol., 1997; King a spol., 1996; Lynch a spol., 1999; Neelands a spol., 2003 |
| P2X3 | 0,5-2 | Bianchi a spol., 1999; Garcia-Guzman a spol., 1997; Neelands a spol., 2003; Robertson a spol., 1996 |
| P2X4 | 3-20 | Bo a spol., 1995; Buell a spol., 1996; Khakh a spol., 1999b; Miller a spol., 1998; Seguela a spol., 1996; Soto a spol., 1996 |
| P2X5 | 2-16 | Bo a spol., 2003; Collo a spol., 1996; Garcia-Guzman a spol., 1996; Ruppelt a spol., 2001 |
| P2X6 | ~0,5 | Brake a spol., 1994; Evans a spol., 1995; Jones a spol., 2000; Jones a spol., 2004 |
| P2X7 | 80 – 200 | Bianchi a spol., 1999; Bo a spol., 1995; Collo a spol., 1996; Evans a spol., 1995 |

Tabulka 1: Citlivost homomerních forem P2X receptorů na ATP.

P2X2 receptory mají charakteristickou závislost na pH. Snížením hodnoty pH ze 7,4 na 6,5 dochází k posunu hodnoty EC₅₀ z 5 uM na 1,2 uM, a naopak, při zvýšení pH citlivost P2X2 receptorů klesá (King a spol., 1997; King a spol., 1996). U ostatních pH-citlivých forem - P2X1, P2X3, P2X4 a P2X7 – má tato závislost opačný průběh (Gever a spol., 2006).

P2X4 receptory jsou charakteristicky modulovány působením ivermektinu (Khakh a spol., 1999b). Tento alosterický modulátor několikanásobně zvyšuje velikost membránového proudu a prodlužuje dobu uzavírání kanálu při odmyvání agonisty, neboli deaktivaci (Jelinkova a spol., 2008). Je velice cenné, že tato látka ze skupiny avermektinů, přestože moduluje nebo aktivuje i jiné druhy iontových kanálů, např. nikotinické acetylcholinové receptory, glycinové kanály nebo ionotropní receptory pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) (Krause a spol., 1998; Krusek a Zemkova, 1994; Shan a spol., 2001; Sigel a Baur, 1987), je v rámci rodiny purinergních receptorů selektivní pouze pro P2X4 podtyp (Khakh a spol., 1999b).

Rekombinantní P2X5 receptor izolovaný z potkana je charakteristický tím, že na rozdíl od lidské, kuřecí či žabí izoformy, odpovídá na aplikaci ATP velmi malými proudy (Gever a spol., 2006). Zatímco maximální amplituda proudu u P2X5 receptorů exprimovaných v buněčné linii lidských embryonálních ledvinných buněk (HEK293 buňky) činí 50-200 pA, proudy P2X2 receptoru vyvolané za stejných podmínek jsou v řádu nA (Collo a spol., 1996; Garcia-Guzman a spol., 1996).

Rekombinantní P2X6 receptor je obtížně exprimovatelný. Tvarem své proudové odpovědi je blízký P2X2 a P2X4 podtypům, od kterých lze odlišit díky své vyšší citlivosti k ATP a k α,β -meATP (EC₅₀=0,6 μ M u P2X6; >32 μ M u P2X4 a P2X2) (Gever a spol., 2006).

P2X7 receptor je charakteristický svojí citlivostí k BzATP, který je s hodnotou EC₅₀ 2-7 μ M plným agonistou, jenž je ve srovnání s ATP asi 30-krát účinnější. Avšak BzATP je vysoce potentní i u P2X1 a P2X3 receptoru (EC₅₀ ~100 nM), a proto samotná odpověď na tohoto agonistu není určujícím znakem pro přítomnost P2X7 receptoru (Gever a spol., 2006).

Mezi další agonisty P2X receptorů patří stabilní ATP analogy 2-methyl-thioadenosin-5'-trifosfát (2MeSATP) a 5-O-3'-thio-trifosfát (ATP γ S), které nejsou příliš selektivní, ale pro dotvoření farmakologických profilů se hojně využívají. Například, P2X2 receptor je aktivován 2MeSATP téměř jako ATP, pro P2X4 receptor je 2MeSATP parciálním agonistou.

Klasičtí antagonisté P2X receptorů - suramin a pyridoxal fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonová kyselina (PPADS) – rovněž nejsou příliš selektivní (Evans a spol., 1995). P2X4 receptor je k jejich účinku nejméně citlivý (Soto a spol., 1996). Dále se využívá například 2',3'-O-2,4,6-trinitrofenyl-adenosin-5'-trifosfát (TNP-ATP), který je v nanomolárních koncentracích selektivním antagonistou pro P2X1, P2X3 a P2X2/3 (Virginio a spol., 1998). Briliantová modř G2 je v desítkách nM selektivním antagonistou P2X7 receptoru (Jiang a spol., 2000a).

D P2X receptory v centrálním nervovém systému

Obecně lze říci, že všechny typy neuronálních buněk - neurony, astrocyty, oligodendrocyty i neuroglie - exprimují P2X receptory, avšak jejich distribuce v různých oblastech CNS je dosti rozdílná. Je přitom obvyklé, že jedna buňka exprimuje několik podtypů P2X receptorů současně (Abbracchio a spol., 2009).

P2X receptory na neuronech

Neuronální P2X receptory mají důležitou úlohu v elektrické excitabilitě a rychlém synaptickém přenosu. Postsynaptické a extrasynaptické P2X receptory se podílejí na depolarizaci neuronu a vstupu Ca^{2+} iontů, které procházejí do buňky vlastním iontovým kanálem P2X receptorů. Presynaptické P2X receptory stimulují výlev neuropřenašečů z nervových zakončení.

Čistě ATP zprostředkovaný synaptický přenos byl v CNS popsán dosud jenom v prodloužené míše v oblasti *medial habenula* (Edwards a spol., 1992). Častěji je ATP uvolňováno z nervových zakončení společně s jiným, hlavním přenašečem. Rozlišuje se při tom, zda je ATP uskladněno a dále uvolňováno ze společných nebo ze samostatných synaptických váček. Příkladem uskladnění a vylévání ze společných váček jsou glutamatergní zakončení v organotypických kulturách hipokampálních neuronů, nebo GABAergní zakončení kultivovaných neuronů z míchy a z hypotalamu (Jo a Role, 2002; Jo a Schlichter, 1999; Mori a spol., 2001). Uvolňování ATP a hlavního přenašeče ze stejného nervového zakončení, přitom ale z různých populací synaptických váček, bylo na úrovni CNS zdokumentováno na glutamatergních terminálách v somatosensorickém kortexu a v hipokampu (Pankratov a spol., 2006; Pankratov a spol., 2007). Mimo uvedené příklady byla v CNS popsána kotransmise ATP s noradrenalinem

a 5-hydroxytryptaminem, a pravděpodobná je i kotransmise ATP s acetylcholinem a dopaminem (Burnstock, 2004; Burnstock, 2009).

Na presynaptických nervových zakončeních, kde je vstup Ca^{2+} nezbytný k sekreci synaptických transmitterů, vedou P2X receptory vápenaté ionty skrze vlastní pór a současně jimi vyvolaná depolarizace může způsobit aktivaci napěťově závislých Ca^{2+} kanálů (Sperlagh a spol., 2007). Glutamatergní přenos je takto stimulován např. v hipokampu přes presynaptické P2X2 receptory mezi CA3 neurony a interneurony ve *stratum radiatum*, což bylo potvrzeno na modelu myších knock-outů (Khakh a spol., 2003). V hipokampu je výlev glutamátu dále usnadněn přes P2X1, P2X3, P2X2/3 receptory, jak bylo zjištěno na izolovaných hipokampálních terminálách (Rodrigues a spol., 2005). Rovněž P2X7 receptor byl nalezen v CA1 a CA3 oblastech na terminálách nasedajících na pyramidální bunky, na interneurony a také na hilární neurony (Fellin a spol., 2006; Cho a spol., 2010; Sperlagh a spol., 2002).

Mimo hipokampus je glutamatergní přenos facilitován přes presynaptické P2X1, P2X2, P2X5, P2X7 v *area postrema*, a přes P2X1/5, P2X2/3, P2X4/6 na zakončení primárních sensorických neuronů v laminách II a V zadních rohů míšních (Gu a MacDermott, 1997; Kodama a spol., 2007; Li a spol., 1998; Nakatsuka a Gu, 2001; Nakatsuka a spol., 2003). Dále přes P2X3 na subpopulaci neuronů v *nucleus tractus solitarius*, a pravděpodobně i na neuronech v oblasti středního mozku (Jin a spol., 2004; Kato a Shigetomi, 2001; Xing a spol., 2008). P2X7 byl v této úloze potvrzen na synaptosomech z neokortexu a na hypoglosálních motoneuronech v prodloužené míše (Ireland a spol., 2004; Patti a spol., 2006). Stimulace glutamatergního přenosu presynaptickými P2X4 receptory nebyla dosud experimentálně potvrzena.

Potenciace noradrenergího přenosu pravděpodobně přes P2X1 a P2X3 je popsána v hipokampu (Papp a spol., 2004).

Presynaptické P2X receptory také facilitují inhibiční synaptický přenos. GABAergní transmise je potenciována přes P2X1 receptory v mozkovém kmeni ve středním jádře *corpus trapezoideum*, kde byla jeho úloha potvrzena i na myším knock-outovém modelu (Watano a spol., 2004). Rovněž úloha P2X3 receptorů byla potvrzena na synaptosomech izolovaných z mozkového kmene (Gomez-Villafuertes a spol., 2001; Xing a spol., 2008). GABAergní přenos je dále potenciován přes presynaptické P2X2, P2X4 a P2X6 receptory na subpopulaci kultivovaných neuronů z laminy I-III zadních rohů míšních, a přes P2X3 na terminálách košíčkových buněk nasedajících na Purkyňovy neurony v mozečku (Donato a spol., 2008; Hugel a Schlichter, 2000). P2X7 receptory se účastní facilitace

GABAergního přenosu nepřímo. V hipokampu sice byla jejich důležitost potvrzena vymizením potenciace GABAergních spontánních inhibičních post-synaptických proudů (sIPSCs) na P2X7 myších knock-outech, ale na izolovaných hipokampálních terminálech se uvolnění GABA stimulací P2X receptorů prokázat nepodařilo (Cunha a Ribeiro, 2000; Fellin a spol., 2006). Jejich aktivace tedy bude pravděpodobně pouze jedním z prvních kroků delší signální kaskády (Sperlagh a spol., 2002). Zvýšený výlev GABA zprostředkovaný aktivací P2X7 receptorů byl dále pozorován na non-pyramidálních neuronech v cerebro-kortikální kulturách při návratu z podmínek navozujících ischemii (Wirkner a spol., 2005). Glycinerární transmise je P2X receptory potenciována v oblastech prodloužené míchy v trigeminálním jádře, v *nucleus ambiguus*, a dále také v zadních rožích míšních (Jameson a spol., 2008; Rhee a spol., 2000; Wang a spol., 2001).

Na tělech neuronů mimo oblasti post-synaptických densit se mohou nacházet extra-synaptické P2X receptory (Rodrigues a spol., 2005; Shrivastava a spol., 2011). Jejich fyziologický význam dosud nebyl lépe popsán, lze však ale předpokládat jejich úlohu v komunikaci s těsně přiléhajícími gliálními buňkami (Gordon a spol., 2009), o které se zmiňují v další kapitole.

Proud vedený postsynaptickými P2X receptory obvykle není příliš velký. Amplitudami dosahuje 50-100 pA a celkově představuje pouze 5-15% proudu zprostředkovaného glutamátem (Pankratov a spol., 2009). Není tedy běžné, že by aktivací postsynaptických P2X receptorů docházelo k výraznější depolarizaci neuronů. Hlavní význam postsynaptických P2X receptorů se spatřuje v jejich vysoké vápníkové vodivosti, a ve schopnosti propustit Ca^{2+} ionty do buňky při klidovém membránovém potenciálu, kdy jsou NMDA receptory (glutamátové receptory charakterizované citlivostí k *N*-methyl-D-asparagové kyselině) stále blokovány hořčnatými ionty (Pankratov a spol., 2009). Zvýšená hladina vápníku uvnitř buněk pak může aktivovat široké spektrum signálních a regulačních kaskád, cílených mj. i na aktivitu dalších post-synaptických receptorů (Abbracchio a spol., 2009; Pankratov a spol., 2009; Robertson a spol., 2001).

P2X receptory na gliích

Gliální buňky využívají purinergní signalizaci velmi intenzivně, což se odráží mimo jiné v zařazení ATP do skupiny tzv. gliotransmiterů. Puriny a pyrimidiny se tak uplatňují při vzájemné komunikaci mezi gliemi nebo mezi gliemi a neurony prostřednictvím tzv. vápníkových vln, dále spouštějí gliální sekreci širokého spektra látek - mimo gliotransmiterů např. růstových hormonů nebo cytokinů, způsobují aktivaci astrocytů při

vzniku reaktivní gliózy následkem traumatu či ischemie, vyvolávají aktivaci a migraci mikroglíí při zánětlivé reakci, hrají úlohu v procesu myelinizace axonů prostřednictvím stimulace či inhibice proliferace oligodendrocytů a Schwannových buněk, anebo modulují neuronální aktivitu navozením dlouhodobé potenciace (Cotrina a spol., 2000; Farber a Kettenmann, 2006; Fields a Burnstock, 2006; Ikeda a spol., 2007; Kucher a Neary, 2005; Pocock a Kettenmann, 2007; Schipke a spol., 2002). Většina těchto dějů však v gliálních buňkách využívá adenosinové anebo P2Y receptory. Přítomnost funkčních P2X receptorů, ač samotná jejich exprese je doložena jak na úrovni mRNA či proteinů ve všech typech gliálních buněk, není tak častá (Abbracchio a spol., 2009).

Je známo že, heteromerní P2X1/5 receptory vedou dovnitř směřující proudy na kortikálních astrocytech a spolupodílí se na zvyšování hladiny intracelulárního vápníku vyvolané předchozí aktivitou okolních neuronů v mozkových řezech (Lalo a spol., 2008; Palygin a spol., 2010).

P2X4 receptor má zvýšenou expresi v aktivovaných mikroglíálních buňkách což bylo popsáno v ipsilaterální oblasti zadních rohů míšních při konstričním poranění nervů, v ischemických oblastech CNS, v oblasti gliomů, či v oblastech traumatického poranění mozku a míchy (Cavaliere a spol., 2003; Guo a spol., 2004; Inoue a spol., 2007; Schwab a spol., 2005; Zhang a spol., 2007b). Byl postulován model neuropatické bolesti, ve kterém přerušením míšního nervu dochází k aktivaci mikroglíí a ke zvýšení exprese P2X4 receptoru. Jeho následná aktivace vede k sekreci neurotropního faktoru „brain derived neurotropic factor“ (BDNF), který v míšních neuronech způsobuje snížení exprese draselno-chloridového kotransportéru. Nedostatečná funkce tohoto transportéru má za následek zvýšení intracelulární koncentrace chloridů. Tím se převrátí rovnováha aniontů na membráně, což způsobí oslabení inhibičního účinku glycinových a GABA receptorů, a v konečném důsledku celkovou hyperexcitabilitu míšních neuronů (Trang a spol., 2006). U myši s vyřazeným genem pro P2X4 receptor, P2X4 knock-outů, byla in-vivo zjištěna snížená odpověď na podněty chronické bolesti (v modelech zánětlivé a neuropatické bolesti), zatímco citlivost na stimulace akutních druhů bolesti zůstala zachována (Tsuda a spol., 2009).

Gliálním P2X7 receptorům je věnována velká pozornost zvláště kvůli jejich účasti v patologických procesech. Bylo zjištěno, že P2X7 receptory vedou dovnitř směřující proud jak na astrocytech tak na mikroglíích (Boucsein a spol., 2003; Duan a spol., 2003; Oliveira a spol., 2011; Pannicke a spol., 2000). Aktivace P2X7 v astrocytech následkem některých patologických podmínek může vyvolávat následnou sekreci ATP, glutamátu, nebo GABA

a ovlivňovat tak aktivitu okolních neuronů (Duan a spol., 2003; Suadicaní a spol., 2006; Wang a spol., 2002). Při zánětlivé reakci dochází stimulací mikrogliálních P2X7 receptorů k zesílení aktivity interferonem- γ indukované syntetázy oxidu dusnatého typu II, a k interferonem- γ indukovanému uvolňování interleukinu-1 β (Gendron a spol., 2003; Sanz a Di Virgilio, 2000). Mikroglie a oligodendrocyty dále podléhají ATP-indukované apoptóze prostřednictvím P2X7-zprostředkovaného uvolnění interleukinu-1 β (Ferrari a spol., 1997a; Ferrari a spol., 1997b; Hughes a spol., 2007; Matute a spol., 2007). Snížená exprese P2X7 receptoru byla naopak nalezena v nádorových buňkách, a inhibice P2X7 receptoru je také pravděpodobně jednou z příčin buněčné proliferace (Zhou a spol., 2008). Naopak zvýšená exprese P2X7 byla nalezena u reaktivních astrocytů v okolí lézí způsobených rozvojem roztroušené sklerózy nebo v okolí amyloidních plaků v myším modelu Alzheimerovy choroby (Narcisse a spol., 2005; Parvathenani a spol., 2003).

E P2X receptory v hypotalamu a v adenohipofýze

Přítomnost P2X receptorů v hypotalamu byla studována mnoha biochemickými studiemi, obvykle v souvislosti s dalšími signálními drahami. Protein P2X2 receptoru tak byl nalezen v paraventriculárních (PVN) a supraoptických (SON) jádrech na neuronech imuno-pozitivních na neuronální syntetázu oxidu dusného (Yao a spol., 2003). P2X2 byl dále prokázán na orexinergních neuronech ve ventro-mediální části *nucleus arcuatus* a v okolí forníku, což naznačuje jeho možnou úlohu v řízení příjmu potravy a tělesné hmotnosti (Collden a spol., 2010; Florenzano a spol., 2006). P2X2 protein byl také kolokalizován na parvocelulárních PVN buňkách imuno-pozitivních na kortikotropin uvolňující hormon, thyreotropin uvolňující hormon, nebo na kokainem/amfetaminem-řízené transkripty (Collden a spol., 2010).

Xiang a spol. (2006) kolokalizovali P2X5 receptor na neuronech imuno-pozitivních na arginin-vasopresin (dále již jen jako „vasopresin“) a syntetázu oxidu dusného v mnoha jádrech hypotalamu. Nejsilnější exprese P2X5 byla nalezena v PVN a SON, méně pak ve ventromediálním jádře, suprachiasmatickém jádře a v *nucleus arcuatus*. Kolokalizace P2X5 s vasopresinem byla největší v PVN a SON, zatímco v suprachiasmatických jádrech byly oba signály navzájem vylučné. Kolokalizace P2X5 a syntetázy oxidu dusného byla nalezena v PVN, SON, ventromediálním jádře, v bočním hypotalamu a v *accessory neurosecretory nuclei*. P2X7 receptor byl v hypotalamu imunohistochemicky kolokalizován s glutamátovým transportérem typu 2 (Atkinson a spol., 2004).

In-situ hybridizací a imunohistochemicky bylo zjištěno, že P2X2, P2X4, P2X5 a P2X6 jsou exprimovány na tělech, a P2X2 a P2X6 na axonech neuronů sekretujících hormon řídící sekreci luteinizačního hormonu (Fu a spol., 2009). Imunohistochemická studie mapující rozdíly v expresi P2X receptorů na oxytocinových a vasopresinových neuronech mezi PVN a SON, konstatovala expresi P2X4, P2X5, P2X6 v PVN oproti expresi P2X2, P2X4, P2X5 a P2X6 v SON na vasopresinových neuronech. U oxytocinových neuronů v PVN našli pouze P2X4 receptor oproti P2X2, P2X4 a P2X5 v SON (Guo a spol., 2009). Cham a spol. (2006) pomocí kombinace klasické imunohistochemie s retrográdním virálním značením zjistili, že všechny testované podtypy P2X1 až P2X6 jsou exprimovány na PVN neuronech projikujících do oblasti rostrální ventro-laterální míchy, kde jsou uloženy neurony důležité pro sympatickou regulaci v periferním nervovém systému.

Řada studií prokázala přítomnost funkčních P2X receptorů v hypotalamu, a to zejména měřením koncentrace intracelulárního vápníku anebo elektrofyziologicky. Matsumoto a spol. (2004) našli P2X2 receptor v řezech z dorso-mediální oblasti hypotalamu, která hraje roli v regulaci příjmu potravy a pití, a při kardiovaskulárních reakcích na emoční a smyslové podněty. Aplikací extracelulárního ATP zde vyvolala koncentračně-závislý dovnitř směřující proud, depolarizaci a následné zvýšení hladiny intracelulárního vápníku. Wakamori a Sorimachi (2004) v disociovaných neuronech z *nucleus arcuatus* elektrofyziologicky prokázali přítomnost funkčních P2X receptorů a farmakologicky identifikovali P2X2 a P2X2/6 podtypy. Wollmann a spol., (2005) měřením na hypotalamických hypokretin/orexinových buňkách zjistili, že aplikace extracelulárního ATP vyvolala depolarizaci, zvýšení elektrické aktivity a membránový proud patrně aktivací P2X2 podtypu. Na histaminergních neuronech v tuberomamilárním jádře v zadním hypotalamu byl nalezen ATP-indukovaný proud přes P2X2 a patrně i P2X5 receptory (Vorobjev a spol., 2003).

Aplikace stabilního analogu ATP a inhibitorů P2X receptorů do oblasti hypotalamu u krys in-vivo způsobila změny tělesné teploty, z čehož lze předpokládat podíl P2X receptorů na mechanismu termoregulace (Gurin a spol., 2003). V PVN byla popsána forma synaptické plasticity, ve které noradrenalinem stimulovaný výlev ATP z glií aktivoval neuronální P2X7 receptory a způsobil tak následný vtok vápníku, aktivaci protein-kináz a v konečném důsledku vložení AMPA receptorů (glutamátové receptory charakterizované citlivostí k α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyselině) do post-synaptické membrány. Takto zvýšená účinnost glutamatergní synaptické

transmise v PVN přetrvala dobu několika desítek minut (Gordon a spol., 2005; Gordon a spol., 2009).

Přítomnost P2X receptorů byla potvrzena i v předním laloku hypofýzy. U laktotropů byla nalezena exprese P2X3, P2X4 a P2X7 receptorů, zatímco gonadotropy a somatotropy exprimují pouze P2X2 receptory (He a spol., 2003; Stojilkovic a Koshimizu, 2001; Zemkova a spol., 2006). U krysu byly nalezeny dvě sestřihové varianty P2X2 receptoru – P2X2a a P2X2b, u myši dokonce tři varianty – P2X2a, P2X2b a P2X2e (Koshimizu a spol., 2006). Jednotlivé formy se od sebe liší délkou intracelulárního C-konce a rychlostí desensitizace, která je pomalá u homomerních P2X2a, střední u P2X2b a nejrychlejší u P2X2e receptorů. Fyziologický význam přítomnosti různých sestřihových variant spočívá v jejich schopnosti spojovat se v heteromery s odstupňovanou rychlostí desenzitizace, což buňce umožňuje lépe regulovat množství vstupujícího vápníku. Tvorba P2X2 heteromerů byla nalezena v gonadotropních a somatotropních buňkách adenohipofýzy (Koshimizu a spol., 1998b). Také elektrofyziologicky byly P2X2 receptory prokázány v gonadotropních a P2X4 receptory v laktotropních buňkách (Zemkova a spol., 2006; Zemkova a spol., 2010). Původ přítomných P2X7 receptorů není jednoznačně objasněn, ale podle nálezů z jiných oblastí mozku se usuzuje na jejich expresi gliálními buňkami (Stojilkovic, 2009).

Z popsaných prací je patrné, že P2X receptory jsou v hypotalamo-hypofyzárním systému široce rozšířeny a z jejich schopnosti vyvolávat depolarizaci a regulovat elektrickou aktivitu hypotalamických neuronů a hypofyzárních buněk lze soudit, že jsou významné i pro řízení homeostatických funkcí organismu.

F P2X receptory v supraoptických jádrech

Supraoptická jádra jsou párová jádra uložená v rostro-ventrální části hypotalamu v blízkosti chiasmatu optických nervů. Společně s blízkými paraventrikulárními jádry obsahují tzv. velkobuněčné (magnocelulární) neurony syntetizující vždy jeden ze dvou peptidických hormonů - oxytocin či arginin-vasopresin. Oba hormony jsou syntetizovány v tělech SON neuronů, odkud jsou ve velkých sekrečních granulech axonálně transportovány do zadní části hypofýzy (neurohypofýza). Zde jsou hormony z nervových zakončení uvolňovány Ca²⁺-dependentní exocytózou přímo do systémového oběhu.

Základní funkcí vasopresinu je zadržování vody v těle a patrně i udržování stálého krevního tlaku. Působením přes své V2 receptory vasopresin vyvolává inkorporaci

akvaporinů, membránových kanálů selektivních pro vodu, do luminálních membrán buněk sběrných kanálků v ledvině. Signálem pro sekreci vasopresinu z neurohypofýzy je zvýšení osmolality krevní plasmy nad hodnotu 285 mOsm, které aktivuje osmoreceptory v *organum vasculosum laminae terminalis* a subfornikulárním orgánu v hypotalamu. Přes V1A receptory jsou zprostředkovány vasokonstrikční účinky vasopresinu. In-vivo bylo prokázáno, že vasopresin snižuje srdeční výdej působením v *area postrema*. Signálem je změna tlaku krve způsobená např. krvácením. Ta aktivuje nízkotlaké receptory uložené ve velkých žilách, v pravé i levé síni a v plicních cévách. Zvýšený tlak aktivuje vysokotlaké receptory v karotických sinech a v aortálním oblouku. Signál je veden bloudivým nervem přes *nucleus tractus solitarii* do kaudální ventro-laterální části prodloužené míchy, odkud je přepojen přímo do SON a PVN. Vasopresin v játrech spouští glykogenolýzu přes V1A receptory. Přes V1B receptory způsobuje zvýšení sekrece adrenokortikotropního hormonu z kortikotropních buněk v předním laloku hypofýzy. Mezi další podněty zvyšující sekreci vasopresin patří bolest, některé emoce, stres, fyzická námaha, nevolnost, zvracení a stání.

Oxytocin působí zejména na mléčné žlázy a dělohu. U savců způsobuje kontrakci myoepitelových buněk, které tvoří vnitřní povrch mléčné žlázy. Jejich stahy vedou k vytlačení mléka z alveolů laktující mamy do velkých vývodů a pak ven z bradavky. Podnětem je stimulace dotykových receptorů v prsou, které jsou somatickými drahami vedeny až do SON a PVN. Oxytocin také způsobuje stah hladkého svalstva dělohy, která se v období před porodem stává citlivější díky zvýšené expresi oxytocinových receptorů. Stimulací pro mohutný výlev oxytocinu je sestup plodu porodními cestami na začátku porodu, což pozitivní zpětnou vazbou vede k zesílení stahů.

Vlastní sekrece hormonů v neurohypofýze je řízena elektrickou aktivitou SON neuronů, jejíž podoba je mezi dvěma subpopulacemi neuronů odlišná. V klidovém stavu, kdy hormony nejsou sekretovány, mají oba druhy neuronů velmi nízkou frekvenci akčních potenciálů asi 0,1-3 Hz. Stimulace oxytocinových neuronů, například podrážděním prsních bradavek v období kojení, vyvolává krátké vysokofrekvenční výboje akčních potenciálů (20-50 Hz) oddělené delšími klidovými fázemi (5-10 min). Tento vzor elektrické aktivity je mezi jednotlivými neurony synchronizován, čímž se oxytocin sekretuje z mnoha neuronů současně a spouští následnou ejakci mléka. Naproti tomu podnět stimulující vasopresinové neurony, jakým je například hypotenze způsobená ztrátou krve, vyvolává zpočátku stálé (tonické) zvýšení frekvence elektrické aktivity, které je následováno střídáním kratších úseků (20-60s) vysoké elektrické aktivity a klidu (5-15 Hz, tzv. fázická aktivita), která je co do množství sekretovaného hormonu neúčinnější.

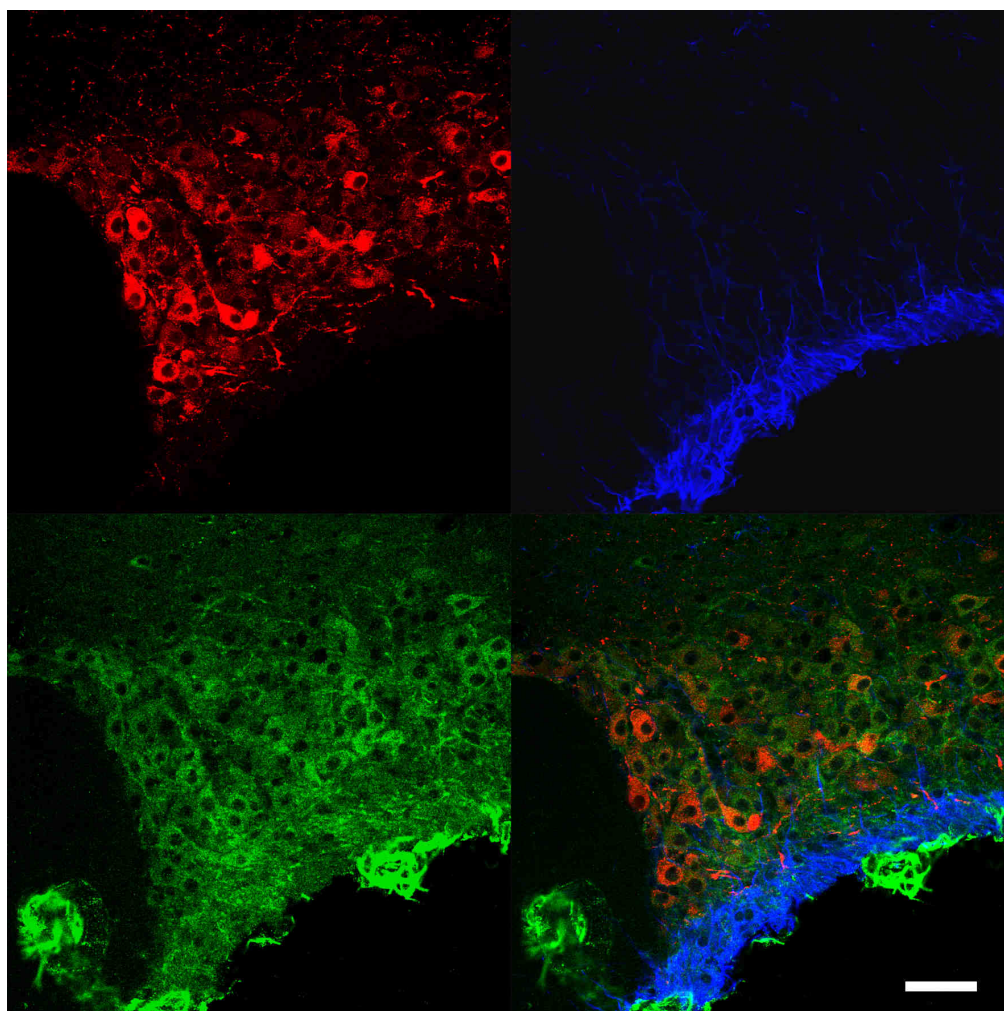
Aktivita jednotlivých vasopresinových neuronů přitom není synchronizována, následkem čehož je výlev hormonu prakticky kontinuální (Ganong, 2001; Leng a spol., 1999).

Elektrická aktivita SON neuronů, která přímo spouští sekreci hormonů, je řízena excitačními a inhibičními vstupy aferentních neuronů. Podobně jako jinde v centrálním nervovém systému je i v SON za hlavní excitační přenašeč považován glutamát a za hlavní inhibiční přenašeč GABA. Celkově je 20-40% všech synapsí na dendritech a tělech SON neuronů glutamatergních, a asi 40% je GABAergních (El Majdoubi a spol., 1996; Meeker a spol., 1993). Synaptický přenos v SON je dále modulován dlouhou řadou neuromodulátorů, které působí pre-synapticky a/nebo post-synapticky. Mezi látky inhibičně působící patří zejména glutamát, GABA, adenosin, endokanbinoidy, opioidy a některé neuropeptidy, a naopak stimulačně působí noradrenalin, oxytocin a některé neuropeptidy (Iremonger a spol., 2010).

Purinergní signalizace v SON je spojována více s mechanismy uvolňování vasopresinu, zatímco její význam pro uvolňování oxytocinu není zcela zřejmý. Day a spol. (1993) ukázali, že ATP je hlavním přenašečem na noradrenergní dráze z A1 oblasti v prodloužené míše, která v SON inervuje zejména vasopresinové neurony (Alonso a Assenmacher, 1984). Fyziologický význam této hypotézy podpořili Buller a spol. (1996), když bloádou purinergních receptorů v SON antagonistou suraminem zrušili aktivaci vasopresinových neuronů vyvolanou hypotenzí in-vivo. Na izolovaných neurohypofyzárních terminálách bylo zjištěno, že endogenní ATP uvolňovaný v průběhu elektrické stimulace autokrinně podporoval pouze uvolňování vasopresinu a nikoliv oxytocinu (Knott a spol., 2008). Naproti tomu aplikace ATP způsobila koncentračně závislé uvolňování obou hormonů z komplexních hypotalamo-hypofyzárních explantátů (Kapoor a Sladek, 2000). Při současné aplikaci ATP a noradrenalinu dochází k ještě výraznější - synergické - stimulaci uvolňování obou hormonů, které má na rozdíl od individuálních odpovědí obou přenašečů delší dynamiku odrážející aktivaci intracelulárních signálních kaskád a syntézu nových proteinů (Kapoor a Sladek, 2000). Zdá se tedy, že ATP působí jak na tělech SON neuronů v mozku tak na jejich terminálách v neurohypofýze.

Tato myšlenka je podpořena velkým počtem strukturních prací dokumentujících přítomnost mRNA nebo proteinů purinergních receptorů v SON. mRNA P2X2, P2X3, P2X4, P2X6, P2X7 receptorů byla nalezena v jádře pomocí RT-PCR, a pro P2X2, P2X3, P2X4 a P2X6 doložena in-situ hybridizací (Collo a spol., 1996; Kanjhan a spol., 1999; Shibuya a spol., 1999). Proteiny P2X2, P2X3, P2X7 byly nalezeny v jádře technikou

Western Blot (Gomes a spol., 2009). P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 a P2Y1 byly imuno-histochemicky potvrzeny v jádře (Espallergues a spol., 2007; Loesch a Burnstock, 2001; Shibuya a spol., 1999; Song a spol., 2009; Xiang a spol., 2006), přičemž P2X2, P2X4, P2X5 a P2X6 byly asociovány s vasopresinovými neurony (Obr.4) a P2X2, P2X4 a P2X5 s oxytocinovými neurony (Guo a spol., 2009). Na ultrastrukturální úrovni byly v jádře nalezeny presynaptické a postsynaptické P2X2 a P2X6 (Loesch a Burnstock, 2001; Loesch a spol., 1999). Na synaptosomech izolovaných z neurohypofýzy byly imunocytochemicky prokázány P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7 asociované s vasopresinovými terminály, a P2X4 a P2X7 asociované s oxytocinovými terminály (Knott a spol., 2005). Na ultrastrukturální úrovni byly v neurohypofýze potvrzeny P2X2 a P2X6 receptory (Loesch a Burnstock, 2001; Loesch a spol., 1999).



Obrázek 4: Kolokalizace exprese P2X2 receptoru (zeleně) na neuronech syntetizujících arginin-vasopresin (červeně) v SON. Gliální buňky (modře) jsou hustě uloženy ve ventrální části SON a jejich výběžky protínají jádro dorsálně. Imunohistochemické fluorescenční značení na mozkových řezech, snímáno konfokálním mikroskopem. Měřítko 50 μ M. Vávra, V., nepublikované výsledky.

Přítomnost funkčních P2X receptorů v SON byla potvrzena pokusy s měřením intracelulárního vápníku a také elektrofyziologicky. Aplikace extracelulárního ATP zvýšila hladinu intracelulárního vápníku jak v neuronech a gliálních buňkách v hypothalamickém jádře, tak i v izolovaných neurohypofyzárních terminálách a kultivovaných pituicytech (neurohypofyzárních astrocytech) (Espallergues a spol., 2007; Shibuya a spol., 1999; Troadec a spol., 1998; Troadec a spol., 1999). Část amplitudy ATP-stimulovaných vápníkových odpovědí se přisuzuje aktivitě metabotropních P2Y receptorů, z nichž nejvýznamnější je P2Y1 podtyp (Knott a spol., 2005; Song a spol., 2007).

Elektrofyziologická měření doložila ATP-vyvolanou depolarizaci SON neuronů a zvýšení jejich elektrické aktivity (Hiruma a Bourque, 1995). ATP-stimulovaný dovnitř směřující proud byl pozorován na disociovaných SON neuronech tak i na izolovaných neurohypofyzárních terminálách (Knott a spol., 2005; Shibuya a spol., 1999). Farmakologicky nejpravděpodobnějším druhem P2X receptorů v jádře i v neurohypofýze se shodně uvádí P2X2 podtyp (Gomes a spol., 2009; Knott a spol., 2005).

V SON je také popsána signalizace zprostředkovaná adenosinem, která navazuje na ATP signalizací s tím, jak je ATP v extracelulárním prostředí enzymaticky štěpeno. Přítomnost ekto-nukleotidáz byla cytochemicky prokázána na membránách neurohypofyzárních terminál a astrocytů, kde byla i funkčně potvrzena rychlou přeměnou dodaného ATP na adenosin (Sperlagh a spol., 1999; Thirion a spol., 1996). Endogenní adenosin v neurohypofýze je zřejmě přítomen v dostatečném množství k tomu, aby aktivoval své A1 receptory na neurosekrečních terminálách. Přes asociovaný G protein pak dochází k inhibici napěťových Ca^{2+} kanálů N-typu a následné inhibici sekrece hormonů (Knott a spol., 2007). V SON na úrovni hypothalamického jádra byla ekto-5-ATPáza immuno-lokalizována na astrocytech. Adenosinové A1 receptory byly nalezeny zejména na neuronech, a A2A receptory na astrocytech a glutamatergních terminálách (Ponzio a Hatton, 2005; Ponzio a spol., 2006).

Celkově se zdá, že purinergní signalizace v SON vytváří negativní zpětnou vazbu, kdy ATP vyvolává stimulační účinky, jejichž dopad je tlumen vznikajícím adenosinem. Mechanismus je významný zejména při sekreci vasopresinu, avšak jeho význam pro výlev oxytocinu není dosud objasněn. Kromě P2X2, ostatní typy P2X receptorů, které reagují na zvýšenou koncentraci extracelulárního ATP v SON, nebyly dosud identifikovány. Rovněž účinek ATP na synaptický přenos v SON nebyl studován. Řešením těchto otázek se zabývá první z přiložených publikací (Vavra a spol., 2011).

V. Cíle práce

1.

Které podtypy purinergních P2X receptorů kontrolují funkci SON neuronů?

Jakým způsobem regulují P2X receptory synaptický přenos v SON?

2.

Jaká je úloha konzervovaných cysteinů v ektodoméně krysího P2X4 receptoru při vazbě agonisty a otevírání iontového kanálu ?

3.

Jaký je funkční význam konzervovaných aromatických aminokyselinových zbytků v první transmembránové doméně purinergních P2X receptorů?

4.

Které aminokyselinové zbytky v první a druhé transmembránové doméně P2X4 receptoru jsou zodpovědné za vazbu ivermektinu?

VI. Výsledky

Vavra, V., Bhattacharya, A., Zemkova, H., 2011.

Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices.

Neuroscience. 188, 1-12.

KTERÉ PODTYPY PURINERGNÍCH P2X RECEPTORŮ KONTROLUJÍ FUNKCI SON NEURONŮ?

JAKÝM ZPŮSOBEM REGULUJÍ P2X RECEPTORY SYNAPTICKÝ PŘENOS V SON?

Supraoptická a paraventriculární jádra hypotalamu obsahují tzv. magnocelulární neurony, které syntetizují vždy jeden ze dvou hormonů - oxytocin nebo arginin-vasopresin. Oba hormony jsou z těl neuronů axonálně transportovány do zadního laloku hypofýzy, kde je jejich výlev do systémového oběhu přímo řízen elektrickou aktivitou magnocelulárních neuronů. Tato aktivita je určena synaptickými vstupy aferentních neuronů, kde se za hlavní excitační neurotransmitter považuje glutamát a za hlavní inhibiční neurotransmitter GABA. Supraoptická jádra jsou - mimo jiné dráhy - inervována také noradrenergními vstupy A1 neuronů z kaudální míchy, kde ATP bylo indikováno jako hlavní mediátor excitace (Day a spol., 1993). Aplikace extracelulárního ATP způsobuje zvýšení hladiny intracelulárního vápníku v SON buňkách, zvýšení elektrické aktivity SON neuronů, jejich membránovou depolarizaci i uvolňování obou hormonů (Hiruma a Bourque, 1995; Kapoor a Sladek, 2000; Knott a spol., 2005; Shibuya a spol., 1999). Účast P2X receptorů na těchto dějích potvrzují práce dokumentující expresi P2X v SON na úrovni mRNA i jejich proteinů (Gomes a spol., 2009; Guo a spol., 2009; Shibuya a spol., 1999). Dosud však nebyl zkoumán vliv P2X receptorů na synaptickou aktivitu SON neuronů.

V naší práci jsme se snažili zhodnotit funkční přítomnost purinergních P2X receptorů v SON a současně identifikovat jejich podtypy. Za tímto účelem jsme použili kvantitativní RT-PCR k detekci mRNA, a funkční techniky terčíkového zámku (patch-clamp) a mikrofluorimetrické měření hladiny intracelulárního vápníku na akutně izolovaných hypotalamických řezech z potkanů kmene Wistar. Kvantifikace mRNA pomocí RT-PCR umožnila seřadit podtypy P2X receptorů dle intenzity exprese do řady: P2X2 > P2X7 > P2X4 > P2X3. mRNA pro P2X5, P2X6, P2Y1, P2Y2 a P2Y12 receptory

byla zastoupena minimálně. Aplikace ATP zvýšila frekvenci spontánních akčních potenciálů a způsobila depolarizaci klidového membránového potenciálu SON neuronů. V režimu napět'ového zámku ATP navýšil frekvenci glutamatergních nebo GABAergních spontánních post-synaptických proudů ale amplituda těchto proudů nebyla aplikací ATP ovlivněna. ATP rovněž vyvolal dovnitř směřující membránový proud (126 ± 13 pA). Celkový počet ATP citlivých neuronů v SON dosahoval přibližně 80% (132 ze 163 změřených buněk).

Dále jsme našli, že podobnou odpověď jako ATP vyvolaly také aplikace ATP γ S a 2MeSATP, zatímco 2MeSADP, 2MeSAMP a $\alpha\beta$ metATP nebyly účinné. BzATP, nejvíce účinný agonista P2X7 podtypu, nevyvolal membránový proud, avšak zvýšil hladinu intracelulárního vápníku v gliálních buňkách. Inhibitory purinergních receptorů, PPADS a suramin, proudovou odpověď blokovaly, zatímco pH 6,5 a ivermektin, selektivní modulátor P2X4 receptorů, odpověď potencovaly. P2Y1-specifický inhibitor MRS2179 neměl žádný efekt na ATP vyvolanou odpověď.

Na závěr lze shrnout, že naše studie prokázala funkční přítomnost pre-synaptických a extra-synaptických P2X2 a P2X4 podtypů purinergních receptorů v SON neuronech. ATP působící přes pre-synaptické receptory zvyšuje uvolňování excitačního přenašeče glutamatu a inhibičního přenašeče GABA. Extra-synaptické receptory jsou patrně aktivovány ATP uvolňovaným z okolních gliálních buněk. Tyto výsledky objasňují mechanismus, kterým P2X receptory exprimované na SON neuronech mohou modulovat uvolňování neurohypofyzárních hormonů.

Rokic, M. B., Tvrdonova, V., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H., 2010.

Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating.

Physiological Research. 59, 927-935.

JAKÁ JE ÚLOHA KONZERVOVANÝCH CYSTEINŮ V EKTODOMÉNĚ KRYSÍHO P2X4 RECEPTORU PŘI VAZBĚ AGONISTY A OTEVÍRÁNÍ KANÁLU?

Všech sedm podtypů savčích purinergních receptorů obsahuje velkou extracelulární kličku, ve které se nachází 10 konzervovaných cysteinů tvořících 5 disulfidických můstků. Tyto jsou označovány jako SS1 (C116-C165), SS2 (C126-149), SS3 (C132-C159), SS4 (C217-227) a SS5 (C261-C270) při P2X4-číslování. Jejich význam pro funkci receptorů není dosud zcela objasněn.

Nahrazováním jednotlivých cysteinů za jiné aminokyseliny bylo dosud zjištěno, že u lidského P2X1 a krysího P2X2 nejsou sulfidické můstky zodpovědné za multimerizaci těchto receptorů (Clyne a spol., 2002b; Ennion a Evans, 2002). Naopak mutace rušící SS5 můstek lidského P2X1 receptoru snížila jeho membránovou expresi, což ukazuje na možnou úlohu SS5 při transportu receptoru z cytoplazmy na povrch buňky (Ennion a Evans, 2002). Cysteinové páry SS2, SS3 a blízký histidin se společně mohou podílet na tvorbě vazebného místa pro ionty kovů u P2X2 a P2X4 receptorů (Clyne a spol., 2002b; Coddou a spol., 2007; Friday a Hume, 2008). Uvažovalo se také, že sulfidické můstky mohou být významné při působení etanolu na P2X4 receptor (Yi a spol., 2009). Některé mutantní P2X1 a P2X2 receptory, ve kterých byly cysteiny nahrazovány za alanin, mají sníženou citlivost k ATP, případně jsou zcela nefunkční (Clyne a spol., 2002b; Ennion a Evans, 2002). Také P2X receptor z řasy *Ostreococcus tauri*, který pravděpodobně nese pouze jeden disulfidický můstek, má podobně nízkou citlivost k ATP (Surprenant a North, 2009).

S cílem zjistit úlohu jednotlivých disulfidických párů (SS1 až 5) pro funkci rekombinantního krysího P2X4 receptoru jsme jednotlivé cysteiny, anebo oba partnery disulfidické vazby, nahradili za alaninová či threoninová residua. Divoký typ receptoru a jeho mutanty jsme vložili do HEK293 buněk a funkci mutantních receptorů jsme elektrofyziologicky charakterizovali v konfiguraci *whole-cell* s pomocí ivermektinu, který je alosterickým modulátorem P2X4 receptorů. Při výměně disulfidického páru SS3 za

threoniny jsme nepozorovali žádnou změnu v odpovědi na aplikaci extracelulárního ATP. Threoninová náhrada párů SS1, SS2 a SS4, nikoliv však SS5, vyvolala snížení citlivosti k ATP a zkrácení doby deaktivace po odmytí agonisty. Snížení hodnoty maximální amplitudy proudové odpovědi bylo pozorováno u SS2, SS4 a SS5 dvojitých mutantů. V případě SS2 a SS5 bylo možné dosáhnout částečné záchrany maximální amplitudy proudu preaplikací ivermektinu. S výjimkou cysteinu 217 nahrazeného za threonin či arginin, a cysteinu 216 nahrazeného za alanin, bylo možné podobný typ odpovědi pozorovat u mutantů, u kterých byl nahrazen pouze jeden cystein.

Naše výsledky ukazují, že sulfidické můstky se mohou podílet na vazbě agonistů anebo otevírání membránového póru P2X receptorů. SS1, SS2 a SS4 můstky jsou významné pro strukturu vazebného místa pro ligand, zatímco SS5 vazba, která je lokalizována blíže k transmembránovým doménám, je důležitá pro otevírání P2X4 kanálu.

Jindrichova, M., Vavra, V., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H., 2009.
Functional relevance of aromatic residues in the first transmembrane domain of P2X
receptors.
Journal of Neurochemistry. 109, 923-934.

JAKÝ JE FUNKČNÍ VÝZNAM KONZERVOVANÝCH AROMATICKÝCH AMINOKYSELINOVÝCH ZBYTKŮ V PRVNÍ TRANSMEMBRÁNOVÉ DOMÉNĚ PURINERGNÍCH P2X RECEPTORŮ?

V horní části první transmembránové domény purinerních P2X receptorů se nachází několik konzervovaných aromatických aminokyselin. U všech savčích podtypů P2X receptorů je konzervován Tyr42 (P2X4 číslování). Nahrazení tohoto residua u P2X2 receptoru za cystein způsobilo ztrátu funkce receptoru, avšak náhradou za alanin došlo naopak asi k 10-násobnému navýšení citlivosti receptoru na ATP (Haines a spol., 2001; Jiang a spol., 2001; Li a spol., 2008; Li a spol., 2004). Další charakterizací se zjistilo, že alaninový mutant má oproti divokému typu P2X2 receptoru sníženou hodnotu maximální proudové odpovědi a dále také sníženou vodivost pro Ca^{2+} a NMDG ionty (Khakh a Egan, 2005). Pokus obnovit vápníkovou vodivost náhradou Tyr42 za fenylalanin se nezdařil, což je vysvětlováno hypotézou, že hydroxylová skupina tyrosinu v této poloze interaguje s vápenatými ionty a usnadňuje tak jejich průchod kanálem (Samways a spol., 2008). Naproti tomu náhrada Tyr42 za tryptofan vyvolala asi 8-násobné navýšení citlivosti k ATP (Silberberg a spol., 2005), a autoři této studie také hovoří o možnosti zapojení tohoto residua do protein-proteinové interakce, která stabilizuje receptor v uzavřeném stavu.

Abychom lépe zhodnotili význam konzervovaného tyrosinu a okolních aromatických aminokyselin v první transmembránové doméně pro funkci P2X receptorů, zaměnili jsme tyto residua za alanin u P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7 podtypů. Mutantní receptory byly exprimovány v buněčné linii HEK293 a dále elektrofyziologicky charakterizovány měřením membránových proudů. Nahrazení Tyr42 za alanin vyvolalo v jednotlivých podtypech receptorů odlišné odpovědi: P2X1 podtyp se tímto zásahem stal nefunkčním, zatímco u P2X2, P2X4 a P2X3 podtypů jsme pozorovali navýšení citlivosti k ATP a prodloužení doby deaktivace, tj. doby uzavírání kanálu po odmytí agonisty. U P2X2 a P2X4 došlo dále k navýšení citlivosti k parciálnímu agonistovi α,β -meATP, který

dosáhl účinnosti plného agonisty. U P2X7 došlo také k prodloužení doby deaktivace, ale citlivost k ATP a k BzATP zůstala nezměněna.

Záměna aromatických aminokyselin, které jsou společně s Tyr42 orientovány na stejné straně helixu TM1, tj. fenylalanin (Phe42, P2X2 číslování) a tyrosin/tryptofan (Trp46, P2X4 číslování) také vyvolala změny ve funkci P2X2, P2X3 a P2X4 receptorů. Naproti tomu náhrada protilehlého fenylalaninu (Phe48, P2X4 číslování) nevyvolala žádnou reakci. Při současné výměně dvou aromatických zbytků za alaniny u P2X4-Tyr42+Trp46 a P2X4-Tyr42+Trp50 došlo k částečnému zrušení efektů na citlivost k ATP a deaktivaci receptoru, které byly vyvolány samotnou mutací Tyr42. Naproti tomu u P2X4-Y42A+F48A ke změnám nedošlo, a P2X2-Y43A+Y47A spolu s P2X2-F44A+Y47A se staly nefunkčními.

Naše nálezy ukazují, že aromatické aminokyselinové zbytky v horní části první transmembránové domény purinergních P2X receptorů hrají důležitou úlohu v konformačním uspořádání struktury receptorů. Z funkčního hlediska je nejvýznamnější konzervovaný tyrosin, který hraje roli v otevírání/zavírání iontového kanálu, a současně ovlivňuje i specifitu vazby agonisty.

Jelinkova, I., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Zemkova, H. W., Zemkova, H. and Stojilkovic, S. S., 2008.

Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin.

Pflugers Archives – European Journal of Physiology. 456, 939-950.

KTERÉ AMINOKYSELINOVÉ ZBYTKY V PRVNÍ A DRUHÉ TRANSMEMBRÁNOVÉ DOMÉNĚ P2X4 RECEPTORU JSOU ZODPOVĚDNÉ ZA VAZBU IVERMEKTINU?

Ivermektin (IVM) je syntetická látka patřící do skupiny makrocyclických laktonů. Je charakterizována vysokou molekulovou hmotností, vysokou lipofilitou a nízkou rozpustností ve vodě. Jak již bylo uvedeno dříve, IVM je schopen modulovat činnost několika skupin membránových kanálů, avšak v rámci rodiny purinergních receptorů je selektivní pouze pro P2X4 podtyp (Khakh a spol., 1999b), čehož se využívá k identifikaci P2X4 receptoru v nativních tkáních.

IVM sám neaktivuje P2X4 receptor, ale působí jako alosterický modulátor, jehož účinek se projevuje zvýšením maximální amplitudy proudové odpovědi na ATP, prodloužením doby deaktivace receptoru a zvýšením citlivosti k agonistům (Khakh a spol., 1999b; Priel a Silberberg, 2004). Přesná poloha vazebného místa P2X4 receptoru pro IVM dosud není známa. Bylo zjištěno, že IVM působí pouze při aplikaci z extracelulární strany membrány, a jeho účinek není závislý na předchozí aktivaci kanálu (Khakh a spol., 1999b; Priel a Silberberg, 2004). To napovídá, že vazebné místo receptoru pro IVM se nachází mimo intracelulární konce a vnitřní pór kanálu. Vzhledem k vysoké lipofilitě molekuly IVM je možné uvažovat, že IVM-vazebné místo se nachází v oblasti, kde molekula receptoru prochází plasmatickou membránou, tedy v úseku transmembránových domén.

S cílem zjistit, které aminokyseliny jsou zodpovědné za interakci s IVM, jsme postupně zaměřovali jednotlivá aminokyselinová residua první a druhé transmembránové domény rekombinantního krysího P2X4 receptoru za alaniny a cysteiny. Mutantní receptory byly exprimovány v buněčné linii HEK293 a elektrofyziologicky charakterizovány velikostí maximálního proudu, citlivostí k agonistovi a časovou konstantou deaktivace. Funkce receptoru zůstala nezměněna jednobodovými mutacemi na 29 pozicích z 43 testovaných. Mezi nimi se nachází 10 aminokyselin, u kterých byl mutací pozměněn účinek IVM (Gly36, Leu40, Val43, Val47, Trp50, Asn338, Gly342, Leu346,

Ala349 a Ile356). K této skupině řadíme i Arg33 a Cys353, u kterých mutace na alanin také pozměnila efekt IVM, ale současně došlo i ke změnám v ATP odpovědi. Patrně není náhodou, že tyto aminokyselinové zbytky jsou přítomné také u IVM-citlivého podtypu P2X receptoru u *Schistosoma mansoni*.

Na tomto souboru aminokyselin je patrné, že v rámci všech residuí tvořících transmembránové domény obsazují pravidelně každou třetí nebo čtvrtou pozici v řadě, což odpovídá uspořádání obou transmembránových domén do podoby α -helixů, které později potvrdila krystalová struktura P2X4.1 receptoru (Kawate a spol., 2009). Uvažované aminokyseliny jsou lokalizovány na obou doménách vždy pouze na stejné straně α -helixů, a je tak možné se domnívat, že v konformaci otevřeného kanálu vytváří směrem k lipidům orientované vazebné místo pro IVM. Druhou skupinu aminokyselin tvoří residua, u kterých substituce způsobila změny v ATP odpovědi nikoliv ale změny v účinku IVM (Met31, Tyr42, Gly45, Val49, Gly340, Leu343, Ala344, Gly347, Thr350, Asn354, a Val357). Tyto aminokyseliny jsou orientovány na opačné straně α -helixů než předchozí skupina residuí, a pravděpodobně vytváří vnitřní stěnu iontového kanálu, anebo hrají důležitou roli při otevírání kanálu.

Zemkova, H., Balik, A., Jindrichova, M. and Vavra, V., 2008.

Molecular structure of purinergic P2X receptors and their expression in the hypothalamus and pituitary. REVIEW.

Physiological Research. 57 Suppl 3, S23-38.

Obsahem přehledu jsou strukturně-funkční vlastnosti P2X receptorů a přítomnost a úloha P2X receptorů v hypothalamu a adenohypofýze. Shrnuje tak nálezy ostatních autorů a zasazuje výsledky naší laboratoře do širšího kontextu purinergní problematiky.

VII. Diskuze

V první části této disertační práce jsme metodou terčíkového zámku studovali účinky ATP na elektrickou aktivitu a synaptický přenos SON neuronů v mozkových řezech. Cílem práce bylo charakterizovat vliv ATP na buněčný membránový potenciál a spontánní synaptické proudy, porovnat účinek ATP s působením agonistů a antagonistů P2X receptorů.

Účinky ATP se lišily nejen v závislosti na koncentraci, ale v rámci jednoho neuronu také na lokalizaci P2X receptorů a jejich přítomných podtypech. Pomocí stanovení mRNA technikou kvantitativního real-time PCR ze vzorků hypotalamické tkáně obsahující SON jsme našli významnou přítomnost P2X receptorů, zastoupených v pořadí P2X2>P2X7>P2X4. Náš nález upřesnil výsledky jiných autorů, kteří pomocí in-situ hybridizace ukázali přítomnost mRNA P2X2, P2X4 a P2X6 receptorů v několika hypotalamických jádrech včetně SON (Collo a spol., 1996), a pomocí PCR analýzy exprese mRNA P2X2, P2X3, P2X4, P2X6 a P2X7 receptorů v SON (Shibuya a spol., 1999).

Následným elektrofyzilogickým měřením na akutních mozkových řezech a pomocí aplikace specifických farmak jsme jako první prokázali přítomnost funkčních extra- a pre-synaptických P2X receptorů na SON neuronech. Konkrétně, citlivost ATP odpovědi k PPADS (10 μ M) a IVM (3 μ M) vypovídá o převažujícím zastoupení P2X2 a P2X4 podtypů na presynaptických nervových terminálech a na tělech SON neuronů. Funkční P2X2 receptor byl sice v SON předpokládán, ale pouze na základě farmakologických vlastností ATP-stimulovaného zvýšení intracelulárního Ca^{2+} a ATP-stimulované sekrece vasopressinu a oxytocinu (Gomes a spol., 2009; Shibuya a spol., 1999; Song a spol., 2007).

Existuje řada studií prokazujících úlohu presynaptických P2X2 receptorů v aktivaci výlevu glutamátu v mnoha jiných oblastech mozku, například v hipokampálních interneuronech, v míše, trigeminálním jádře, *nucleus tractus solitarius* či v *area postrema* (Gu a MacDermott, 1997; Khakh a spol., 2003; Khakh a Henderson, 1998; Kodama a spol., 2007; Nakatsuka a Gu, 2001; Shigetomi a Kato, 2004). Potenciace GABAergního přenosu prostřednictvím P2X2 receptoru byla také popsána, například v kultuře neuronů ze zadních rohů míšních (Hugel a Schlichter, 2000). Přítomnost presynaptických P2X4 receptorů nebyla dosud doložena. Tento receptor byl nalezen v laktotropních hypofyzárních buňkách a gonadotropních neuronech, ve kterých stimuluje elektrickou

aktivitu prostřednictvím membránové depolarizace a zvýšení intracelulárního vápníku (Stojilkovic, 2009; Terasawa a spol., 2005; Zemkova a spol., 2010)

Přestože jsme nenalezli žádné účinky BzATP na membránové proudy měřené elektrofyziologicky, s pomocí vápníkového imagingu se nám podařilo prokázat přítomnost P2X7 receptorů na gliálních SON buňkách.

Prostřednictvím detailní analýzy ATP-stimulovaných proudů a změn frekvence spontánních excitačních a inhibičních post-synaptických proudů (sEPSCs a sIPSCs) jsme objasnili mechanismy vedoucí k různým projevům modulace synaptického přenosu v SON. ATP se v našich experimentech projevil jako velice účinný presynaptický modulátor glutamátergního i GABAergního synaptického přenosu. Nenalezli jsme však žádné důkazy o spontánním uvolňování endogenního ATP, o kterém se dříve uvažovalo např. na neuronech v oblasti *medial habenula* (Edwards a spol., 1992). Aktivace extrasynaptických P2X receptorů vedla k dovnitř směřujícímu proudu, membránové depolarizaci a zvýšení elektrické aktivity SON neuronů. Naše výsledky naznačují, že P2X receptory mohou hrát úlohu v modulaci sekrece obou neurohypofyzárních hormonů, a to nejen na úrovni neuronálních vstupů, ale i prostřednictvím somatických receptorů, které mohou být aktivovány ATP uvolňovaným z gliových buněk.

Druhou část práce tvoří tři studie o vztahu struktury a funkce rekombinantních P2X receptorů, zaměřené především na P2X4 podtyp. V první práci jsme se snažili určit funkční význam deseti konzervovaných cysteinových zbytků v extracelulární doméně P2X4 receptoru, které spolu vytváří pět párů cysteinových můstků (SS1-5). Cysteinové můstky jsou obecně důležité pro strukturu proteinů, v případě P2X receptorů ale nehrají žádnou roli při tvorbě trimeru (Clyne a spol., 2002b; Clyne a spol., 2002a; Ennion a Evans, 2002; Rassendren a spol., 1997). Zdá se také, že cysteinové můstky nejsou esenciálně nezbytné pro funkci krysích P2X1, P2X2 a P2X4 receptorů exprimovaných v žabích oocytech (Clyne a spol., 2002b; Clyne a spol., 2002a; Ennion a Evans, 2002; Rassendren a spol., 1997), ale mohou hrát roli v povrchové expresi receptorů v savčích expresních systémech jako jsou např. HEK293 buňky. P2X1 receptor s alaninovou substitucí pátého cysteinového páru (SS5) se prakticky nevyskytuje na povrchu buňky a předpokládá se proto, že tento můstek hraje roli v transportu receptoru z endoplazmatického retikula do membrány (Ennion a Evans, 2002). U P2X2 receptoru byla po záměně prvního cysteinového páru za alaniny nalezena snížená citlivost k ATP.

Postupnou záměnou cysteinů za threoniny jsme zjistili důležitost cysteinových párů SS1, SS2 a SS4 pro tvorbu ATP vazebného místa. Tomu odpovídá i poloha těchto

sulfidických můstků, kterou je díky nedávno vyřešené krystalové struktuře $\Delta z f P 2 X 4 . 1$ receptoru (Kawate a spol., 2009) možné nalézt právě v blízkosti vazebného místa. SS5, který je lokalizován blíže k transmembránové doméně, je důležitý pro otevírání kanálu. Úloha SS3 vazby se nezdá být pro funkci zásadní, protože nahrazení příslušných cysteinů nevyvolalo změny v ATP odpovědi.

Dále jsme zkoumali úlohu konzervovaných aromatických aminokyselin v první transmembránové doméně P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7 receptorů. Konzervovaný Tyr42 (P2X4 číslování) má esenciální význam pro funkci P2X1 receptoru. U P2X2, P2X3 a P2X4 receptoru tato záměna způsobila zvýšení citlivosti receptoru k ATP a prodloužení doby deaktivace. U P2X2 došlo také ke zvýšení citlivosti k α, β -meATP. Podobné, ale ve svém projevu menší účinky jsme pozorovali při záměně dalších aromatických reziduí v horní části TM1 domény P2X receptorů. Párová záměna konzervovaného tyrosinu P2X4 receptoru a jiného aromatického rezidua (Trp46 a Trp50, nikoliv však Phe48) může eliminovat účinek mutace Tyr42 za alanin. Naše nálezy ukazují, že skupina aromatických reziduí v horní části TM1 domény hraje důležitou roli pro strukturu P2X receptorů, a je zapojena do mechanismu vazby agonisty anebo otevírání a zavírání iontového kanálu. Úloha jednotlivých reziduí je však receptorově specifická.

V poslední práci jsme se zabývali významem aminokyselinových zbytků v první a druhé transmembránové doméně P2X4 receptoru pro vazbu P2X4-specifického modulátoru ivermektinu. Záměnou aminokyselinových zbytků za cystein jsme identifikovali 12 reziduí (Arg33, Gln36, Leu40, Val 43, Val47, Trp50, Asn338, Gly342, Leu346, Ala349, Cys353, Ile356) jejichž substituce významně změnila odpověď receptoru na ivermektin. U dalších 11 aminokyselin (Met31, Tyr41, Gly42, Val49, Gly 340, Leu343, Ala 344, Gly 347, Thr350, Asp354, Val 357) způsobila substituce změny ve funkci receptoru, avšak účinek ivermektinu zůstal nezměněn. V α -helikální projekci odpovídají tyto dvě skupiny aminokyselin dvěma protilehlým stranám transmembránových domén. Naše nálezy odpovídají představě vazby hydrofobního ivermektinu na transmembránové domény z prostoru lipidové membrány a orientaci aminokyselin citlivých k substituci do prostoru membránového póru.

Bodová mutagenese krysího P2X4 receptoru kombinovaná se známou strukturou $\Delta z f P 2 X 4 . 1$ receptoru nám poskytla podklady pro detailní náhled do funkce několika oblastí molekuly tohoto podtypu. Lze předpokládat, že tento receptor se stane prototypem pro další strukturně-funkční analýzy molekulární fyziologie P2X receptorů.

VIII. Závěr

Tato dizertační práce se zabývá přítomností a významem purinergních P2X receptorů v supraoptických neuronech a dále pak vztahem mezi strukturou a funkcí rekombinantních P2X receptorů. Dosažené výsledky je možné shrnout do následujících bodů:

- Pomocí stanovení mRNA technikou kvantitativního real-time PCR ze vzorků hypothalamické tkáně obsahující SON jsme našli významnou přítomnost P2X2, P2X7 a P2X4 podtypů.
- Elektrofyziologickým měřením na akutních mozkových řezech a pomocí specifických farmak jsme prokázali přítomnost funkčních extra- a pre-synaptických P2X2 a P2X4 podtypů na SON neuronech. P2X7 podtyp byl technikou vápníkového imagingu indikován na gliálních SON buňkách. Aktivace presynaptických P2X receptorů zvyšovala uvolňování glutamátu nebo GABA z nervových terminálů.
- U rekombinantního receptoru P2X4 studovaného v expresním systému HEK293 buněk jsme postupnou záměnou deseti ektodoménových cysteinů za alaniny a threoniny zjistili důležitost cysteinových párů SS1, SS2 a SS4 pro tvorbu ATP vazebního místa, a páru SS5 pro otevírání kanálu. SS3 vazba se zdá být pro funkci P2X4 receptoru postradatelná.
- Úlohu konzervovaných aromatických aminokyselin v první transmembránové doméně jsme studovali u P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7 receptorů. Konzervovaný Tyr42 (P2X4 číslování) má esenciální význam pro funkci P2X1 receptoru. U P2X2, P2X3 a P2X4, ale ne u P2X7 receptoru jeho záměna za alanin způsobila zvýšení citlivosti k ATP a výrazné prodloužení doby deaktivace. Záměna ostatních aromatických aminokyselin měla podobný, avšak mnohem menší efekt.
- Cysteinovou skenovací mutagenézí obou dvou transmembránových domén P2X4 receptoru jsme identifikovali 12 residuí (Arg33, Gln36, Leu40, Val 43, Val47, Trp50, Asn338, Gly342, Leu346, Ala349, Cys353, Ile356), které hrají roli ve vazbě P2X4-specifického modulátoru ivermektinu. U dalších 11 aminokyselin (Met31, Tyr41, Gly42, Val49, Gly 340, Leu343, Ala 344, Gly 347, Thr350, Asp354, Val 357) způsobila substituce změny ve funkci receptoru, avšak účinek ivermektinu zůstal nezměněn. Naše nálezy odpovídají představě vazby ivermektinu v prostoru mezi dvěma transmembránovými doménami.

IX. Seznam literatury

- Abbracchio, M. P., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M. T., King, B. F., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A. and Burnstock, G., 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* 24, 52-55.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A. and Weisman, G. A., 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58, 281-341.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A. and Zimmermann, H., 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32, 19-29.
- Alonso, G. and Assenmacher, I., 1984. Ultrastructural analysis of the noradrenergic innervation of rat supraoptic nucleus. *Neurosci Lett.* 49, 45-50.
- Atkinson, L., Batten, T. F., Moores, T. S., Varoqui, H., Erickson, J. D. and Deuchars, J., 2004. Differential co-localisation of the P2X₇ receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. *Neuroscience.* 123, 761-768.
- Baldwin, S. A., Mackey, J. R., Cass, C. E. and Young, J. D., 1999. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today.* 5, 216-224.
- Bianchi, B. R., Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E. C., Alexander, K. M., Park, H. S., Yu, H., Metzger, R., Kowaluk, E., Jarvis, M. F. and van Biesen, T., 1999. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 376, 127-138.
- Bo, X., Jiang, L. H., Wilson, H. L., Kim, M., Burnstock, G., Surprenant, A. and North, R. A., 2003. Pharmacological and biophysical properties of the human P2X₅ receptor. *Mol Pharmacol.* 63, 1407-1416.
- Bo, X., Zhang, Y., Nassar, M., Burnstock, G. and Schoepfer, R., 1995. A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett.* 375, 129-133.
- Boucsein, C., Zacharias, R., Farber, K., Pavlovic, S., Hanisch, U. K. and Kettenmann, H., 2003. Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur J Neurosci.* 17, 2267-2276.
- Boue-Grabot, E., Archambault, V. and Seguela, 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., Belanger, D., Emerit, M. B. and Seguela, P., 2003. Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *J Neurosci.* 23, 1246-1253.
- Boue-Grabot, E., Emerit, M. B., Toulme, E., Seguela, P. and Garret, M., 2004. Cross-talk and co-trafficking between rho1/GABA receptors and ATP-gated channels. *J Biol Chem.* 279, 6967-6975.
- Brake, A. J., Wagenbach, M. J. and Julius, D., 1994. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature.* 371, 519-523.

- Brown, S. G., Townsend-Nicholson, A., Jacobson, K. A., Burnstock, G. and King, B. F., 2002. Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther.* 300, 673-680.
- Browne, L. E., Jiang, L. H. and North, R. A., 2010. New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 31, 229-237.
- Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R. A. and Surprenant, A., 1996. An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *Embo J.* 15, 55-62.
- Buller, K. M., Khanna, S., Sibbald, J. R. and Day, T. A., 1996. Central noradrenergic neurons signal via ATP to elicit vasopressin responses to haemorrhage. *Neuroscience.* 73, 637-642.
- Burnstock, G., 1977. The purinergic nerve hypothesis. *Ciba Found Symp.* 295-314.
- Burnstock, G., 2004. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol.* 4, 47-52.
- Burnstock, G., 2006. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci.* 27, 166-176.
- Burnstock, G., 2009. Purinergic cotransmission. *F1000 Biol Rep.* 1.
- Burnstock, G. and Verkhratsky, A., 2009. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol (Oxf).* 195, 415-447.
- Cao, L., Broomhead, H. E., Young, M. T. and North, R. A., 2009. Polar residues in the second transmembrane domain of the rat P2X2 receptor that affect spontaneous gating, unitary conductance, and rectification. *J Neurosci.* 29, 14257-14264.
- Cavaliere, F., Florenzano, F., Amadio, S., Fusco, F. R., Viscomi, M. T., D'Ambrosi, N., Vacca, F., Sancesario, G., Bernardi, G., Molinari, M. and Volonte, C., 2003. Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience.* 120, 85-98.
- Clyne, J. D., Wang, L. F. and Hume, R. I., 2002a. Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J Neurosci.* 22, 3873-3880.
- Clyne, J. D., Wang, L. F. and Hume, R. I., 2002b. Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J Neurosci.* 22, 3873-3880.
- Coddou, C., Acuna-Castillo, C., Bull, P. and Huidobro-Toro, J. P., 2007. Dissecting the facilitator and inhibitor allosteric metal sites of the P2X4 receptor channel: critical roles of CYS132 for zinc potentiation and ASP138 for copper inhibition. *J Biol Chem.* 282, 36879-36886.
- Collden, G., Mangano, C. and Meister, B., 2010. P2X2 purinoreceptor protein in hypothalamic neurons associated with the regulation of food intake. *Neuroscience.* 171, 62-78.
- Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A. and 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.
- Cotrina, M. L., Lin, J. H., Lopez-Garcia, J. C., Naus, C. C. and Nedergaard, M., 2000. ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci.* 20, 2835-2844.
- Cunha, R. A. and Ribeiro, J. A., 2000. Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology.* 39, 1156-1167.
- Day, T. A., Sibbald, J. R. and Khanna, S., 1993. ATP mediates an excitatory noradrenergic neuron input to supraoptic vasopressin cells. *Brain Res.* 607, 341-344.
- Denlinger, L. C., Sommer, J. A., Parker, K., Gudipaty, L., Fiset, P. L., Watters, J. W., Proctor, R. A., Dubyak, G. R. and Bertics, P. J., 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.

- Donato, R., Rodrigues, R. J., Takahashi, M., Tsai, M. C., Soto, D., Miyagi, K., Villafuertes, R. G., Cunha, R. A. and Edwards, F. A., 2008. GABA release by basket cells onto Purkinje cells, in rat cerebellar slices, is directly controlled by presynaptic purinergic receptors, modulating Ca²⁺ influx. *Cell Calcium*. 44, 521-532.
- Duan, S., Anderson, C. M., Keung, E. C., Chen, Y., Chen, Y. and Swanson, R. A., 2003. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci*. 23, 1320-1328.
- Dubyak, G. R., 2003. Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol Pharmacol*. 63, 773-776.
- Edwards, F. A., Gibb, A. J. and Colquhoun, D., 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*. 359, 144-147.
- Egan, T. M. and Khakh, B. S., 2004. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci*. 24, 3413-3420.
- El Majdoubi, M., Poulain, D. A. and Theodosis, D. T., 1996. The glutamatergic innervation of oxytocin- and vasopressin-secreting neurons in the rat supraoptic nucleus and its contribution to lactation-induced synaptic plasticity. *Eur J Neurosci*. 8, 1377-1389.
- Ennion, S. J. and Evans, R. J., 2002. Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol*. 61, 303-311.
- Espallergues, J., Solovieva, O., Techer, V., Bauer, K., Alonso, G., Vincent, A. and Hussy, N., 2007. Synergistic activation of astrocytes by ATP and norepinephrine in the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience*. 148, 712-723.
- Evans, R. J., 2010. Structural interpretation of P2X receptor mutagenesis studies on drug action. *Br J Pharmacol*. 161, 961-971.
- Evans, R. J., Lewis, C., Buell, G., Valera, S., North, R. A. and Surprenant, A., 1995. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol*. 48, 178-183.
- Farber, K. and Kettenmann, H., 2006. Purinergic signaling and microglia. *Pflugers Arch*. 452, 615-621.
- Fellin, T., Pozzan, T. and Carmignoto, G., 2006. Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J Biol Chem*. 281, 4274-4284.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Melchiorri, L., Baricordi, O. R. and Di Virgilio, F., 1997a. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol*. 159, 1451-1458.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S. and Di Virgilio, F., 1997b. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med*. 185, 579-582.
- Fields, R. D., 2011. Nonsynaptic and nonvesicular ATP release from neurons and relevance to neuron-glia signaling. *Semin Cell Dev Biol*.
- Fields, R. D. and Burnstock, G., 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci*. 7, 423-436.
- Florenzano, F., Viscomi, M. T., Mercaldo, V., Longone, P., Bernardi, G., Bagni, C., Molinari, M. and Carrive, P., 2006. P2X2R purinergic receptor subunit mRNA and protein are expressed by all hypothalamic hypocretin/orexin neurons. *J Comp Neurol*. 498, 58-67.
- Friday, S. C. and Hume, R. I., 2008. Contribution of extracellular negatively charged residues to ATP action and zinc modulation of rat P2X2 receptors. *J Neurochem*. 105, 1264-1275.

- Fu, J., Yu, Q., Guo, W., He, C., Burnstock, G. and Xiang, Z., 2009. P2X receptors are expressed on neurons containing luteinizing hormone-releasing hormone in the mouse hypothalamus. *Neurosci Lett.* 458, 32-36.
- Ganong, W. F., 2001. Review of Medical Physiology, 20th edition. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Garcia-Guzman, M., Soto, F., Laube, B. and Stuhmer, W., 1996. Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett.* 388, 123-127.
- Garcia-Guzman, M., Stuhmer, W. and Soto, F., 1997. Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor. *Brain Res Mol Brain Res.* 47, 59-66.
- Gendron, F. P., Chalimoniuk, M., Strosznajder, J., Shen, S., Gonzalez, F. A., Weisman, G. A. and Sun, G. Y., 2003. P2X7 nucleotide receptor activation enhances IFN gamma-induced type II nitric oxide synthase activity in BV-2 microglial cells. *J Neurochem.* 87, 344-352.
- Gever, J. R., Cockayne, D. A., Dillon, M. P., Burnstock, G. and Ford, A. P., 2006. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 452, 513-537.
- Gomes, D. A., Song, Z., Stevens, W. and Sladek, C. D., 2009. Sustained stimulation of vasopressin and oxytocin release by ATP and phenylephrine requires recruitment of desensitization-resistant P2X purinergic receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297, R940-949.
- Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T., 2001. Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem.* 77, 84-93.
- Gordon, G. R., Baimoukhametova, D. V., Hewitt, S. A., Rajapaksha, W. R., Fisher, T. E. and Bains, J. S., 2005. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci.* 8, 1078-1086.
- Gordon, G. R., Iremonger, K. J., Kantevari, S., Ellis-Davies, G. C., MacVicar, B. A. and Bains, J. S., 2009. Astrocyte-mediated distributed plasticity at hypothalamic glutamate synapses. *Neuron.* 64, 391-403.
- Gu, J. G. and MacDermott, A. B., 1997. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature.* 389, 749-753.
- Guo, C., Masin, M., Qureshi, O. S. and Murrell-Lagnado, R. D., 2007. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.* 72, 1447-1456.
- Guo, L. H., Trautmann, K. and Schluesener, H. J., 2004. Expression of P2X4 receptor in rat C6 glioma by tumor-associated macrophages and activated microglia. *J Neuroimmunol.* 152, 67-72.
- Guo, W., Sun, J., Xu, X., Burnstock, G., He, C. and Xiang, Z., 2009. P2X receptors are differentially expressed on vasopressin- and oxytocin-containing neurons in the supraoptic and paraventricular nuclei of rat hypothalamus. *Histochem Cell Biol.* 131, 29-41.
- Gurin, V. N., Gurin, A. V., Melenchuk, E. V. and Spyer, K. M., 2003. The effects of activation and blockade of central P2X receptors on body temperature. *Neurosci Behav Physiol.* 33, 845-851.
- Haines, W. R., Voigt, M. M., Migita, K., Torres, G. E. and Egan, T. M., 2001. On the contribution of the first transmembrane domain to whole-cell current through an ATP-gated ionotropic P2X receptor. *J Neurosci.* 21, 5885-5892.
- He, M. L., Gonzalez-Iglesias, A. E. and Stojilkovic, S. S., 2003. Role of nucleotide P2 receptors in calcium signaling and prolactin release in pituitary lactotrophs. *J Biol Chem.* 278, 46270-46277.

- Hiruma, H. and Bourque, C. W., 1995. P2 purinoceptor-mediated depolarization of rat supraoptic neurosecretory cells in vitro. *J Physiol.* 489 (Pt 3), 805-811.
- Hugel, S. and Schlichter, R., 2000. Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons. *J Neurosci.* 20, 2121-2130.
- Hughes, J. P., Hatcher, J. P. and Chessell, I. P., 2007. The role of P2X(7) in pain and inflammation. *Purinergic Signal.* 3, 163-169.
- Cham, J. L., Owens, N. C., Barden, J. A., Lawrence, A. J. and Badoer, E., 2006. P2X purinoceptor subtypes on paraventricular nucleus neurones projecting to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Exp Physiol.* 91, 403-411.
- Chaumont, S., Jiang, L. H., Penna, A., North, R. A. and Rassendren, F., 2004. Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem.* 279, 29628-29638.
- Cho, J. H., Choi, I. S. and Jang, I. S., 2010. P2X7 receptors enhance glutamate release in hippocampal hilar neurons. *Neuroreport.* 21, 865-870.
- Iglesias, R., Locovei, S., Roque, A., Alberto, A. P., Dahl, G., Spray, D. C. and Scemes, E., 2008. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295, C752-760.
- Ikedo, H., Tsuda, M., Inoue, K. and Murase, K., 2007. Long-term potentiation of neuronal excitation by neuron-glia interactions in the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci.* 25, 1297-1306.
- Inoue, K., Koizumi, S. and Tsuda, M., 2007. The role of nucleotides in the neuron-glia communication responsible for the brain functions. *J Neurochem.* 102, 1447-1458.
- Ireland, M. F., Noakes, P. G. and Bellingham, M. C., 2004. P2X7-like receptor subunits enhance excitatory synaptic transmission at central synapses by presynaptic mechanisms. *Neuroscience.* 128, 269-280.
- Iremonger, K. J., Benediktsson, A. M. and Bains, J. S., 2010. Glutamatergic synaptic transmission in neuroendocrine cells: Basic principles and mechanisms of plasticity. *Front Neuroendocrinol.* 31, 296-306.
- Jameson, H. S., Pinol, R. A. and Mendelowitz, D., 2008. Purinergic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic and glycinergic neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. *Brain Res.* 1224, 53-62.
- Jarvis, M. F. and Khakh, B. S., 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology.* 56, 208-215.
- Jelinkova, I., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Zemkova, H. W., Zemkova, H. and Stojilkovic, S. S., 2008. Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Arch.* 456, 939-950.
- Jiang, L. H., Mackenzie, A. B., North, R. A. and Surprenant, A., 2000a. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol.* 58, 82-88.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Spelta, V., Surprenant, A. and North, R. A., 2001. Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor. *J Biol Chem.* 276, 14902-14908.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Surprenant, A. and North, R. A., 2000b. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem.* 275, 34190-34196.
- Jin, Y. H., Bailey, T. W., Li, B. Y., Schild, J. H. and Andresen, M. C., 2004. Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius. *J Neurosci.* 24, 4709-4717.

- Jindrichova, M., Vavra, V., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H., 2009. Functional relevance of aromatic residues in the first transmembrane domain of P2X receptors. *J Neurochem.* 109, 923-934.
- Jindřichová, M., 2009. Úloha transmembránových domén ve struktuře a funkci P2X receptorů. Dizertační práce na 1 lékařské fakultě UK, Praha.
- Jo, Y. H., Donier, E., Martinez, A., Garret, M., Toulme, E. and Boue-Grabot, E., 2011. Crosstalk between P2X4 and GABA-A receptors determines synaptic efficacy at central synapses. *J Biol Chem.*
- Jo, Y. H. and Role, L. W., 2002. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci.* 22, 4794-4804.
- Jo, Y. H. and Schlichter, R., 1999. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci.* 2, 241-245.
- Jones, C. A., Chessell, I. P., Simon, J., Barnard, E. A., Miller, K. J., Michel, A. D. and Humphrey, P. P., 2000. Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues. *Br J Pharmacol.* 129, 388-394.
- Jones, C. A., Vial, C., Sellers, L. A., Humphrey, P. P., Evans, R. J. and Chessell, I. P., 2004. Functional regulation of P2X6 receptors by N-linked glycosylation: identification of a novel alpha beta-methylene ATP-sensitive phenotype. *Mol Pharmacol.* 65, 979-985.
- Kanjhan, R., Housley, G. D., Burton, L. D., Christie, D. L., Kippenberger, A., Thorne, P. R., Luo, L. and Ryan, A. F., 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.
- Kapoor, J. R. and Sladek, C. D., 2000. Purinergic and adrenergic agonists synergize in stimulating vasopressin and oxytocin release. *J Neurosci.* 20, 8868-8875.
- Kato, F. and Shigetomi, E., 2001. Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Physiol.* 530, 469-486.
- Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T. and Gouaux, E., 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature.* 460, 592-598.
- Khakh, B. S., 2001. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci.* 2, 165-174.
- Khakh, B. S., Bao, X. R., Labarca, C. and Lester, H. A., 1999a. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci.* 2, 322-330.
- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Seguela, P., Voigt, M. and Humphrey, P. P., 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, B. S. and Egan, T. M., 2005. Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics. *J Biol Chem.* 280, 6118-6129.
- Khakh, B. S., Gittermann, D., Cockayne, D. A. and Jones, A., 2003. ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci.* 23, 7426-7437.
- Khakh, B. S. and Henderson, G., 1998. ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol Pharmacol.* 54, 372-378.
- Khakh, B. S. and North, R. A., 2006. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature.* 442, 527-532.
- Khakh, B. S., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V., Labarca, C. and Lester, H. A., 1999b. Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J Neurosci.* 19, 7289-7299.

- King, B. F., Townsend-Nicholson, A., Wildman, S. S., Thomas, T., Spyer, K. M. and Burnstock, G., 2000. Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci.* 20, 4871-4877.
- King, B. F., Wildman, S. S., Ziganshina, L. E., Pintor, J. and Burnstock, G., 1997. Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor. *Br J Pharmacol.* 121, 1445-1453.
- King, B. F., Ziganshina, L. E., Pintor, J. and Burnstock, G., 1996. Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH. *Br J Pharmacol.* 117, 1371-1373.
- Knott, T. K., Marrero, H. G., Custer, E. E. and Lemos, J. R., 2008. Endogenous ATP potentiates only vasopressin secretion from neurohypophysial terminals. *J Cell Physiol.* 217, 155-161.
- Knott, T. K., Marrero, H. G., Fenton, R. A., Custer, E. E., Dobson, J. G., Jr. and Lemos, J. R., 2007. Endogenous adenosine inhibits CNS terminal Ca(2+) currents and exocytosis. *J Cell Physiol.* 210, 309-314.
- Knott, T. K., Velazquez-Marrero, C. and Lemos, J. R., 2005. ATP elicits inward currents in isolated vasopressinergic neurohypophysial terminals via P2X2 and P2X3 receptors. *Pflugers Arch.* 450, 381-389.
- Kodama, N., Funahashi, M., Mitoh, Y., Minagi, S. and Matsuo, R., 2007. Purinergic modulation of area postrema neuronal excitability in rat brain slices. *Brain Res.* 1165, 50-59.
- Koshimizu, T., Tomic, M., Koshimizu, M. and Stojilkovic, S. S., 1998a. Identification of amino acid residues contributing to desensitization of the P2X2 receptor channel. *J Biol Chem.* 273, 12853-12857.
- Koshimizu, T., Tomic, M., Van Goor, F. and Stojilkovic, S. S., 1998b. Functional role of alternative splicing in pituitary P2X2 receptor-channel activation and desensitization. *Mol Endocrinol.* 12, 901-913.
- Koshimizu, T. A., Kretschmannova, K., He, M. L., Ueno, S., Tanoue, A., Yanagihara, N., Stojilkovic, S. S. and Tsujimoto, G., 2006. Carboxyl-terminal splicing enhances physical interactions between the cytoplasmic tails of purinergic P2X receptors. *Mol Pharmacol.* 69, 1588-1598.
- Kracun, S., Chaptal, V., Abramson, J. and Khakh, B. S., 2010. Gated access to the pore of a P2X receptor: structural implications for closed-open transitions. *J Biol Chem.* 285, 10110-10121.
- Krause, R. M., Buisson, B., Bertrand, S., Corringer, P. J., Galzi, J. L., Changeux, J. P. and Bertrand, D., 1998. Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* 53, 283-294.
- Krusek, J. and Zemkova, H., 1994. Effect of ivermectin on gamma-aminobutyric acid-induced chloride currents in mouse hippocampal embryonic neurones. *Eur J Pharmacol.* 259, 121-128.
- Kucher, B. M. and Neary, J. T., 2005. Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes. *J Neurochem.* 92, 525-535.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Wichert, S. P., Rossner, M. J., North, R. A., Kirchhoff, F. and Verkhratsky, A., 2008. P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci.* 28, 5473-5480.
- Lalo, U., Verkhratsky, A. and Pankratov, Y., 2011. Ionotropic ATP receptors in neuronal-glia communication. *Semin Cell Dev Biol.*
- Le, K. T., Babinski, K. and Seguela, P., 1998. Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci.* 18, 7152-7159.

- Le, K. T., Boue-Grabot, E., Archambault, V. and Seguela, P., 1999. Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *J Biol Chem.* 274, 15415-15419.
- Leng, G., Brown, C. H. and Russell, J. A., 1999. Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Prog Neurobiol.* 57, 625-655.
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G. and 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, T. H., Silberberg, S. D. and Swartz, K. J., 2008. Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci.* 11, 883-887.
- Li, P., Calejesan, A. A. and Zhuo, M., 1998. ATP P2x receptors and sensory synaptic transmission between primary afferent fibers and spinal dorsal horn neurons in rats. *J Neurophysiol.* 80, 3356-3360.
- Li, Z., Migita, K., Samways, D. S., Voigt, M. M. and Egan, T. M., 2004. Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor. *J Neurosci.* 24, 7378-7386.
- Liu, G. J., Brockhausen, J. and Bennett, M. R., 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.
- Loesch, A. and Burnstock, G., 2001. Immunoreactivity to P2X(6) receptors in the rat hypothalamo-neurohypophysial system: an ultrastructural study with extravidin and colloidal gold-silver labelling. *Neuroscience.* 106, 621-631.
- Loesch, A., Miah, S. and Burnstock, G., 1999. Ultrastructural localisation of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophysial system. *J Neurocytol.* 28, 495-504.
- Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Kage, K. L., Burgard, E. C., van Biesen, T., Kowaluk, E. A. and Jarvis, M. F., 1999. Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol Pharmacol.* 56, 1171-1181.
- Marquez-Klaka, B., Rettinger, J., Bhargava, Y., Eisele, T. and 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.
- Matsumoto, N., Sorimachi, M. and Akaike, N., 2004. Excitatory effects of ATP on rat dorsomedial hypothalamic neurons. *Brain Res.* 1009, 234-237.
- Matute, C., Torre, I., Perez-Cerda, F., Perez-Samartin, A., Alberdi, E., Etxebarria, E., Arranz, A. M., Ravid, R., Rodriguez-Antiguedad, A., Sanchez-Gomez, M. and Domercq, M., 2007. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci.* 27, 9525-9533.
- Meeker, R. B., Swanson, D. J., Greenwood, R. S. and Hayward, J. N., 1993. Quantitative mapping of glutamate presynaptic terminals in the supraoptic nucleus and surrounding hypothalamus. *Brain Res.* 600, 112-122.
- Migita, K., Haines, W. R., Voigt, M. M. and Egan, T. M., 2001. Polar residues of the second transmembrane domain influence cation permeability of the ATP-gated P2X(2) receptor. *J Biol Chem.* 276, 30934-30941.
- Miller, K. J., Michel, A. D., Chessell, I. P. and Humphrey, P. P., 1998. Cibacron blue allosterically modulates the rat P2X4 receptor. *Neuropharmacology.* 37, 1579-1586.
- Mori, M., Heuss, C., Gahwiler, B. H. and Gerber, U., 2001. Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol.* 535, 115-123.

- Nagaya, N., Tittle, R. K., Saar, N., Dellal, S. S. and Hume, R. I., 2005. An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *J Biol Chem.* 280, 25982-25993.
- Nakatsuka, T. and Gu, J. G., 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, J. X., Sonobe, H. and Gu, J. G., 2003. Distinct roles of P2X receptors in modulating glutamate release at different primary sensory synapses in rat spinal cord. *J Neurophysiol.* 89, 3243-3252.
- Narcisse, L., Scemes, E., Zhao, Y., Lee, S. C. and Brosnan, C. F., 2005. The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia.* 49, 245-258.
- Neelands, T. R., Burgard, E. C., Uchic, M. E., McDonald, H. A., Niforatos, W., Faltynek, C. R., Lynch, K. J. and Jarvis, M. F., 2003. 2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP and A-317491 are competitive antagonists at a slowly desensitizing chimeric human P2X3 receptor. *Br J Pharmacol.* 140, 202-210.
- Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. and Schmalzing, G., 1998. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J.* 17, 3016-3028.
- North, R. A., 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82, 1013-1067.
- O'Connor, S. E., Dainty, I. A. and Leff, P., 1991. Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol Sci.* 12, 137-141.
- Oliveira, J. F., Riedel, T., Leichsenring, A., Heine, C., Franke, H., Krugel, U., Norenberg, W. and Illes, P., 2011. Rodent Cortical Astroglia Express In Situ Functional P2X7 Receptors Sensing Pathologically High ATP Concentrations. *Cereb Cortex.* 21, 806-820.
- Palygin, O., Lalo, U., Verkhatsky, A. and Pankratov, Y., 2010. Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium.* 48, 225-231.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O. A. and Verkhatsky, A., 2009. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience.* 158, 137-148.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhatsky, A. and North, R. A., 2006. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 452, 589-597.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhatsky, A. and North, R. A., 2007. Quantal release of ATP in mouse cortex. *J Gen Physiol.* 129, 257-265.
- Pannicke, T., Fischer, W., Biedermann, B., Schadlich, H., Grosche, J., Faude, F., Wiedemann, P., Allgaier, C., Illes, P., Burnstock, G. and Reichenbach, A., 2000. P2X7 receptors in Muller glial cells from the human retina. *J Neurosci.* 20, 5965-5972.
- Papp, L., Balazsa, T., Kofalvi, A., Erdelyi, F., Szabo, G., Vizi, E. S. and Sperlagh, B., 2004. P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 310, 973-980.
- Parvathenani, L. K., Tertyshnikova, S., Greco, C. R., Roberts, S. B., Robertson, B. and Posmantur, R., 2003. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 278, 13309-13317.
- Patti, L., Raiteri, L., Grilli, M., Parodi, M., Raiteri, M. and Marchi, M., 2006. P2X(7) receptors exert a permissive role on the activation of release-enhancing presynaptic alpha7 nicotinic receptors co-existing on rat neocortex glutamatergic terminals. *Neuropharmacology.* 50, 705-713.
- Pocock, J. M. and Kettenmann, H., 2007. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 30, 527-535.

- Ponzio, T. A. and Hatton, G. I., 2005. Adenosine postsynaptically modulates supraoptic neuronal excitability. *J Neurophysiol.* 93, 535-547.
- Ponzio, T. A., Wang, Y. F. and Hatton, G. I., 2006. Activation of adenosine A2A receptors alters postsynaptic currents and depolarizes neurons of the supraoptic nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291, R359-366.
- Priel, A. and Silberberg, S. D., 2004. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol.* 123, 281-293.
- Rassendren, F., Buell, G., Newbolt, A., North, R. A. and Surprenant, A., 1997. Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *Embo J.* 16, 3446-3454.
- Rhee, J. S., Wang, Z. M., Nabekura, J., Inoue, K. and Akaike, N., 2000. ATP facilitates spontaneous glycinergic IPSC frequency at dissociated rat dorsal horn interneuron synapses. *J Physiol.* 524 Pt 2, 471-483.
- Roberts, J. A. and Evans, R. J., 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, J. A. and Evans, R. J., 2006. Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP. *J Neurochem.* 96, 843-852.
- Robertson, S. J., Ennion, S. J., Evans, R. J. and Edwards, F. A., 2001. Synaptic P2X receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 11, 378-386.
- Robertson, S. J., Rae, M. G., Rowan, E. G. and Kennedy, C., 1996. Characterization of a P2X-purinoreceptor in cultured neurones of the rat dorsal root ganglia. *Br J Pharmacol.* 118, 951-956.
- Rodrigues, R. J., Almeida, T., Richardson, P. J., Oliveira, C. R. and Cunha, R. A., 2005. Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 25, 6286-6295.
- Rokic, M. B., Tvrdonova, V., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Stojilkovic, S. S. and Zemkova, H., 2010. Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating. *Physiol Res.* 59, 927-935.
- Roman, R. M., Wang, Y., Lidofsky, S. D., Feranchak, A. P., Lomri, N., Scharschmidt, B. F. and Fitz, J. G., 1997. Hepatocellular ATP-binding cassette protein expression enhances ATP release and autocrine regulation of cell volume. *J Biol Chem.* 272, 21970-21976.
- Royle, S. J., Bobanovic, L. K. and Murrell-Lagnado, R. D., 2002. Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J Biol Chem.* 277, 35378-35385.
- Ruppelt, A., Ma, W., Borchardt, K., Silberberg, S. D. and Soto, F., 2001. Genomic structure, developmental distribution and functional properties of the chicken P2X(5) receptor. *J Neurochem.* 77, 1256-1265.
- Samways, D. S., Migita, K., Li, Z. and Egan, T. M., 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.
- Sanz, J. M. and Di Virgilio, F., 2000. Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol.* 164, 4893-4898.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A. and Moriyama, Y., 2008. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 5683-5686.
- Scemes, E., Suadicani, S. O., Dahl, G. and Spray, D. C., 2007. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol.* 3, 199-208.

- Seguela, P., Haghghi, A., Soghomonian, J. J. and Cooper, E., 1996. A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J Neurosci.* 16, 448-455.
- Shan, Q., Haddrill, J. L. and Lynch, J. W., 2001. Ivermectin, an unconventional agonist of the glycine receptor chloride channel. *J Biol Chem.* 276, 12556-12564.
- Shibuya, I., Tanaka, K., Hattori, Y., Uezono, Y., Harayama, N., Noguchi, J., Ueta, Y., Izumi, F. and Yamashita, H., 1999. Evidence that multiple P2X purinoceptors are functionally expressed in rat supraoptic neurones. *J Physiol.* 514 (Pt 2), 351-367.
- Shigetomi, E. and Kato, F., 2004. Action potential-independent release of glutamate by Ca²⁺ entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci.* 24, 3125-3135.
- Shrivastava, A. N., Triller, A., Sieghart, W. and Sarto-Jackson, I., 2011. Regulation of {gamma}-aminobutyric acid (GABA) receptor dynamics by interaction with purinergic P2X2 receptors. *J Biol Chem.*
- Schipke, C. G., Boucsein, C., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F. and Kettenmann, H., 2002. Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *Faseb J.* 16, 255-257.
- Schwab, J. M., Guo, L. and Schluesener, H. J., 2005. Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X4 receptor expression. *J Neuroimmunol.* 163, 185-189.
- Sigel, E. and Baur, R., 1987. Effect of avermectin B1a on chick neuronal gamma-aminobutyrate receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol.* 32, 749-752.
- Silberberg, S. D., Chang, T. H. and Swartz, K. J., 2005. Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol.* 125, 347-359.
- Silberberg, S. D. and Swartz, K. J., 2009. Structural biology: Trimeric ion-channel design. *Nature.* 460, 580-581.
- Smart, M. L., Gu, B., Panchal, R. G., Wiley, J., Cromer, B., Williams, D. A. and 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.
- Song, Z., Gomes, D. A. and Stevens, W., 2009. Role of purinergic P2Y1 receptors in regulation of vasopressin and oxytocin secretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297, R478-484.
- Song, Z., Vijayaraghavan, S. and Sladek, C. D., 2007. ATP increases intracellular calcium in supraoptic neurons by activation of both P2X and P2Y purinergic receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292, R423-431.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., Gomez-Hernandez, J. M., Hollmann, M., Karschin, C. and Stuhmer, W., 1996. P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 3684-3688.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M. and Stuhmer, W., 1997. Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J Membr Biol.* 160, 91-100.
- Sperlagh, B., Heinrich, A. and Csolle, C., 2007. P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic Signal.* 3, 269-284.
- Sperlagh, B., Kofalvi, A., Deuchars, J., Atkinson, L., Milligan, C. J., Buckley, N. J. and Vizi, E. S., 2002. Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J Neurochem.* 81, 1196-1211.
- Sperlagh, B., Mergl, Z., Juranyi, Z., Vizi, E. S. and Makara, G. B., 1999. Local regulation of vasopressin and oxytocin secretion by extracellular ATP in the isolated posterior lobe of the rat hypophysis. *J Endocrinol.* 160, 343-350.
- Sreedharan, S., Shaik, J. H., Olszewski, P. K., Levine, A. S., Schioth, H. B. and Fredriksson, R., 2010. Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the

- SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression. *BMC Genomics*. 11, 17.
- Stojilkovic, S. S., 2009. Purinergic regulation of hypothalamopituitary functions. *Trends Endocrinol Metab*. 20, 460-468.
- Stojilkovic, S. S. and Koshimizu, T., 2001. Signaling by extracellular nucleotides in anterior pituitary cells. *Trends Endocrinol Metab*. 12, 218-225.
- Suadicani, S. O., Brosnan, C. F. and Scemes, E., 2006. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci*. 26, 1378-1385.
- Surprenant, A. and North, R. A., 2009. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol*. 71, 333-359.
- Terasawa, E., Keen, K. L., Grendell, R. L. and Golos, T. G., 2005. Possible role of 5'-adenosine triphosphate in synchronization of Ca²⁺ oscillations in primate luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol*. 19, 2736-2747.
- Thirion, S., Troadec, J. D. and Nicaise, G., 1996. Cytochemical localization of ecto-ATPases in rat neurohypophysis. *J Histochem Cytochem*. 44, 103-111.
- Thompson, R. J., Zhou, N. and MacVicar, B. A., 2006. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*. 312, 924-927.
- Torres, G. E., Egan, T. M. and Voigt, M. M., 1999. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem*. 274, 6653-6659.
- Trang, T., Beggs, S. and Salter, M. W., 2006. Purinoceptors in microglia and neuropathic pain. *Pflugers Arch*. 452, 645-652.
- Troadec, J. D., Thirion, S., Nicaise, G., Lemos, J. R. and Dayanithi, G., 1998. ATP-evoked increases in [Ca²⁺]_i and peptide release from rat isolated neurohypophysial terminals via a P2X2 purinoceptor. *J Physiol*. 511 (Pt 1), 89-103.
- Troadec, J. D., Thirion, S., Petturiti, D., Bohn, M. T. and Poujeol, P., 1999. ATP acting on P2Y receptors triggers calcium mobilization in primary cultures of rat neurohypophysial astrocytes (pituicytes). *Pflugers Arch*. 437, 745-753.
- Tsuda, M., Kuboyama, K., Inoue, T., Nagata, K., Tozaki-Saitoh, H. and Inoue, K., 2009. Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Mol Pain*. 5, 28.
- Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A. and Buell, G., 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*. 371, 516-519.
- Vavra, V., Bhattacharya, A. and Zemkova, H., 2011. Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices. *Neuroscience*. 188, 1-12.
- Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F. A., North, R. A. and Surprenant, A., 1999. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci*. 2, 315-321.
- Virginio, C., Robertson, G., Surprenant, A. and North, R. A., 1998. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Mol Pharmacol*. 53, 969-973.
- Volonte, C., Amadio, S., D'Ambrosi, N., Colpi, M. and Burnstock, G., 2006. P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther*. 112, 264-280.
- Vorobjev, V. S., Sharonova, I. N., Haas, H. L. and Sergeeva, O. A., 2003. Expression and function of P2X purinoceptors in rat histaminergic neurons. *Br J Pharmacol*. 138, 1013-1019.

- Wakamori, M. and Sorimachi, M., 2004. Properties of native P2X receptors in large multipolar neurons dissociated from rat hypothalamic arcuate nucleus. *Brain Res.* 1005, 51-59.
- Wang, C. M., Chang, Y. Y., Kuo, J. S. and Sun, S. H., 2002. Activation of P2X(7) receptors induced [(3)H]GABA release from the RBA-2 type-2 astrocyte cell line through a Cl(-)/HCO(3)(-)-dependent mechanism. *Glia.* 37, 8-18.
- Wang, Z. M., Katsurabayashi, S., Rhee, J. S., Brodwick, M. and Akaike, N., 2001. Substance P abolishes the facilitatory effect of ATP on spontaneous glycine release in neurons of the trigeminal nucleus pars caudalis. *J Neurosci.* 21, 2983-2991.
- Watano, T., Calvert, J. A., Vial, C., Forsythe, I. D. and Evans, R. J., 2004. P2X receptor subtype-specific modulation of excitatory and inhibitory synaptic inputs in the rat brainstem. *J Physiol.* 558, 745-757.
- Wilkinson, W. J., Jiang, L. H., Surprenant, A. and North, R. A., 2006. Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol Pharmacol.* 70, 1159-1163.
- Wirkner, K., Kofalvi, A., Fischer, W., Gunther, A., Franke, H., Groger-Arndt, H., Norenberg, W., Madarasz, E., Vizi, E. S., Schneider, D., Sperlagh, B. and Illes, P., 2005. Supersensitivity of P2X receptors in cerebrocortical cell cultures after in vitro ischemia. *J Neurochem.* 95, 1421-1437.
- Wollmann, G., Acuna-Goycolea, C. and van den Pol, A. N., 2005. Direct excitation of hypocretin/orexin cells by extracellular ATP at P2X receptors. *J Neurophysiol.* 94, 2195-2206.
- Xiang, Z., He, C. and Burnstock, G., 2006. P2X5 receptors are expressed on neurons containing arginine vasopressin and nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1099, 56-63.
- Xing, J., Lu, J. and Li, J., 2008. Purinergic P2X receptors presynaptically increase glutamatergic synaptic transmission in dorsolateral periaqueductal gray. *Brain Res.* 1208, 46-55.
- Yan, Z., Liang, Z., Obsil, T. and Stojilkovic, S. S., 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.
- Yao, S. T., Gourine, A. V., Spyer, K. M., Barden, J. A. and Lawrence, A. J., 2003. Localisation of P2X2 receptor subunit immunoreactivity on nitric oxide synthase expressing neurones in the brain stem and hypothalamus of the rat: a fluorescence immunohistochemical study. *Neuroscience.* 121, 411-419.
- Yi, C. L., Liu, Y. W., Xiong, K. M., Stewart, R. R., Peoples, R. W., Tian, X., Zhou, L., Ai, Y. X., Li, Z. W., Wang, Q. W. and Li, C. Y., 2009. Conserved extracellular cysteines differentially regulate the inhibitory effect of ethanol in rat P2X4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 381, 102-106.
- Young, M. T., 2009. P2X receptors: dawn of the post-structure era. *Trends Biochem Sci.* 35, 83-90.
- Young, M. T., Pelegrin, P. and Surprenant, A., 2007. Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol Pharmacol.* 71, 92-100.
- Zebisch, M. and Strater, N., 2007. Characterization of Rat NTPDase1, -2, and -3 ectodomains refolded from bacterial inclusion bodies. *Biochemistry.* 46, 11945-11956.
- Zemkova, H., Balik, A., Jiang, Y., Kretschmannova, K. and Stojilkovic, S. S., 2006. Roles of purinergic P2X receptors as pacemaking channels and modulators of calcium-mobilizing pathway in pituitary gonadotrophs. *Mol Endocrinol.* 20, 1423-1436.

- Zemkova, H., Kucka, M., Li, S., Gonzalez-Iglesias, A. E., Tomic, M. and Stojilkovic, S. S., 2010. Characterization of purinergic P2X4 receptor channels expressed in anterior pituitary cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298, E644-651.
- Zemkova, H., Yan, Z., Liang, Z., Jelinkova, I., Tomic, M. and Stojilkovic, S. S., 2007. Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions. *J Neurochem.* 102, 1139-1150.
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X. S. and Duan, S., 2007a. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol.* 9, 945-953.
- Zhang, Z., Zhang, Z., Artelt, M., Burnet, M. and Schluesener, H. J., 2007b. Dexamethasone attenuates early expression of three molecules associated with microglia/macrophages activation following rat traumatic brain injury. *Acta Neuropathol.* 113, 675-682.
- Zhou, L., Qi, X., Potashkin, J. A., Abdul-Karim, F. W. and Gorodeski, G. I., 2008. MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate 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.
- Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research.* 52, 44-56.