

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Šimon Pražák

Transport purinergního P2X receptoru v eukaryotní buňce
Trafficking of purinergetic P2X receptor in eukaryotic cell

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vendula Stillerová, Ph.D.

Praha, 2017

Poděkování:

Touto cestou bych chtěl poděkovat své školitelce Mgr. Vendule Stillerové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc při orientaci v problematice, připomínky a čas, který mi věnovala v průběhu vypracovávání této bakalářské práce.

Prohlášení:

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

V Praze, 01. 05. 2017

Šimon Pražák

Abstrakt

P2X receptory jsou membránové iontové kanály, aktivované extracelulárním ATP. U obratlovců bylo identifikováno sedm genů pro podjednotky P2X receptorů. Tyto podjednotky jsou označovány jako P2X₁ – 7. Každá podjednotka P2X receptoru se skládá ze dvou transmembránových domén, extracelulární domény a intracelulárního N- a C- konce. P2X receptory se ve tkáních vyskytují jako homo- nebo heterotrimery. V organismu mají širokou distribuci, funkční receptory byly nalezeny v nervové tkáni, ve svalových buňkách i v neexcitabilních tkáních, jako jsou epitel, endotel a hemopoietické tkáně. Purinergní signalizace má významnou úlohu v endokrinních regulacích, v přenosu bolesti, při poranění CNS a v imunitních procesech. P2X receptory jsou syntetizovány na hrubém endoplazmatickém retikulu a po postranlačních modifikacích v Golgiho aparátu jsou transportovány do plazmatické membrány. Distribuce a transport P2X receptorů se liší podle jednotlivých podjednotek a buněčného typu, ve kterém jsou exprimovány. P2X receptory můžeme podle způsobu jejich pohybu v buňce rozdělit do tří skupin, které se liší rychlostí transportu, rychlostí akumulace v plazmatické membráně a mírou jejich internalizace.

Klíčová slova:

extracelulární ATP, purinergní signalizace, P2X receptory, lipidové rafty, internalizace, endocytóza, transport

Abstract

Purinergic receptors are membrane ion channels activated by extracellular ATP. In vertebrates, seven genes encoding P2X subunits was found. These subunits are designated as P2X₁₋₇. Every P2X receptor subunit consists of two transmembrane domains, extracellular domain and intracellular N- and C- termini. P2X receptors fold to homo- or heterotrimers. P2X receptors have a wide distribution in the organism, functional receptors are found in neurons, glial cells, muscle cells and also in non excitable tissues as epithelial, endothelial, and in hemopoietic tissue. Purinergic signalling plays an important role in pain transmission, CNS injury and immune processes. P2X receptors are synthesized on the rough endoplasmic reticulum and are transported to the plasma membrane after post-translational modifications in the Golgi apparatus. The distribution and transport of P2X receptors is subunit specific and dependent on the cell type in which they are expressed. P2X receptors can be divided into three groups according to the way they are moved in the cell, which differ in transport speed, plasma membrane accumulation rate and rate of internalization.

Key words:

extracellular ATP, purinergic signalling, P2X receptors, lipid rafts, internalization, endocytosis, trafficking

Seznam použitých zkratek:

2-meSATP	2-methylthio-ATP
A740003	[1-[[[(kyanoamino)(5-chinolinylamino)metylen]amino]-2,2-dimetylpropyl]-3,4-dimetoxybenzeneacetamid; antagonist P2X receptoru
A804598	kyano-N"-[(1S)-1-fenyletyl]-N'-5-chinolin-guanidin; antagonist P2X receptoru
ADA	adenosin deamináza
ACP	kyselá fosfatáza
ADP	adenosin-5'-difosfát
AF-353	diaminopyrimidin, antagonist P2X receptoru
ALP	alkalická fosfatáza
AMP	adenosin-5'-monofosfát
ATP	adenosin-5' trifosfát
ATP γ S	adenosin-5'-O-(3-thio)trifosfát
AZ11645373	3-[1-[[[(3'-nitro[1,1'-bifenyl]-4-yl)oxy]metyl]-3-(4-pyridinyl)propyl]-2,4-thiazolidinedion; antagonist P2X receptoru
AZ10606120	[2-[[2-[(2-hydroxyetyl)amino]etyl]amino]-5-chinolinyl]-2-tricyklo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-1-ylacetamid dihydrochlorid; antagonist P2X receptoru
$\alpha\beta$ -meATP	$\alpha\beta$ -methylen ATP
BBG	briliant blue G, antagonist P2X receptoru
BFA	brefeldin A
BzATP	2'(3')-O-4-benzoylbenzoyl)-ATP
β,γ -meATP	β,γ -methylen ATP
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní proteinkináza II
cAMP	cyklický adenosin-5'-monofosfát
CNS	centrální nervový systém
CGRP	calcitonin gene-related peptid
CTP	cytidin-5'-trifosfát
dATP	deoxyadenosin-5' trifosfát
(E-)NPPáza	(ekto-)nukleotid pyrofosfatázy/fosfodiesteráza

(E-)NTPDáza	ekto-nukleosid trifosfátdifosfohydroláza
FRAP	obnovení fluorescence po fotovybělení
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
HSP90	heat shock protein 90
IP ₅ I	diinosin pentafosfát
LPB	lipopolysacharid vazebný protein
NF023	kyselina 8,8'-[karbonylbis(imino-3,1-fenylenkarbonylimino)]bis-1,3,5-naftalen trisulfonová; antagonist P2X receptoru
NF279	kyselina 8,8'-[karbonylbis(imino-4,1-fenylenkarbonylimino-4,1-fenylenkarbonylimino)]bis-1,3,5-naftalen trisulfonová; antagonist PX receptoru
NF449	kyselina 4,4',4'',4'''-[karbonylbis(imino-5,1,3-benzentriyl-bis(karbonylimino))]tetrakis-1,3-benzen disulfonová; antagonist P2X receptoru
NF770	7,7'-(karbonylbis(imino-3,1-fenylenkarbonylimino-3,1-(4-metylfenyl)karbonylimino))bis(1-metoxy-naftalen-3,6-disulfonová kyselina) tetrasodný; antagonist P2X receptoru
NF776	6,6'-(karbonylbis(imino-3,1-(4-metylfenyl)karbonylimino))bis(1-metoxynaftalen-3,5-disulfonová kyselina) tetrasodný; antagonist P2X receptoru
NF778	6,6'-(karbonylbis(imino-3,1-fenylenkarbonylimino-3,1-(4-metylfenyl)karbonylimino))bis(1-metoxy-naftalen-3,5-disulfonová kyselina) tetrasodný; antagonist P2X receptoru
NMDG	N-metyl-D-glukamin
PKA	proteinkináza A
PLC	fosfolipáza C
PNP	purin nukleosid fosforyláza
PPADS	kyselina pyridoxal 5-fosfát 6-azofenyl-2',4'-disulfanová
PPNDS	pyridoxal-5'-fosfát-6,2'-naftalenhylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonát
PSB-10211	1-amino-4-[3-4,6-dichloro[1,3,(5)triazin-2-ylamino]fenylamino]-9,10-dioxo-9,10-dihydroantracen-2-sulfonát; antagonist P2X receptoru
PSB-1011	1-amino-4-[3-(4,6-dichloro[1,3,5]triazine-2-ylamino)-4-sulfofenylamino]-9,10-dioxo-9,10-dihydroantracen-2-sulfonát; antagonist P2X receptoru

RO-4	5-[5-jodo-4-metoxy-2-(1-metyletyl)fenoxy]-2,4-pyrimidin diamin Hydrochlorid; antagonist P2X receptoru
RO-51	5-(5-etylnyl-2-isopropyl-4-metoxy-fenoxy)-pyrimidin-2,4-diamin; antagonista P2X receptoru
TM 1 a 2	transmembránové domény 1 a 2
TNP-ATP	29,39- <i>O</i> -(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP
UTP	uridin-5'-trifosfát
VILIP1	visinin-like protein 1
YO-PRO-1	fluorescenční sonda

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Uvolňování ATP	2
2.1	Metabolismus ATP.....	3
3	Purinergní receptory.....	5
3.1	P1 receptory.....	5
3.2	P2 receptory.....	6
3.2.1	P2Y receptory	6
3.2.2	P2X receptory	6
3.2.2.1	Transport P2X receptoru buňkou.....	11
3.2.2.1.1	Podtypy a specifika jejich transportu.....	13
3.2.2.1.1.1	P2X1 receptor	13
3.2.2.1.1.2	P2X2 receptor	15
3.2.2.1.1.3	P2X3 receptor	16
3.2.2.1.1.4	P2X4 receptor	17
3.2.2.1.1.5	P2X5 receptor	19
3.2.2.1.1.6	P2X6 receptor	20
3.2.2.1.1.7	P2X7 receptor	20
4	Závěr	21
5	Seznam použité literatury.....	23

1 Úvod

Adenosin-5'-trifosfát (ATP) je nukleotid sloužící ve všech buňkách jako hlavní zásobní zdroj chemické energie. Byl objeven roku 1929 Karlem Lohmannem, ale až v roce 1941 navrhl Fritz Albert Lipmann ATP jako molekulu uchovávající a přenášející energii (Langen and Hucho 2008, Nobelprize.org 2014). Hydrolýza na adenosin-5'-difosfát (ADP) nebo adenosin-5'-monofosfát (AMP) je vysoce exergonní děj, jehož energii využívají endergonní procesy. ATP patří do skupiny 5'-ribonukleotidů, skládá se z ribózy, na kterou je na 1'-uhlíku N-glykosidickou vazbou napojen adenin, a fosfátových skupin navázaných na 5'-uhlíku vazbou fosfodiesterovou. Právě přenos fosfátových skupin je spojen s uvolněním velkého množství energie (Arabi and Matta 2009). Za standardních podmínek je hydrolýza ATP na ADP a anorganický fosfát provázena změnou Gibbsovy energie $\Delta G^{\circ} = -30,5$ kJ/mol. V buňkách slouží ATP jako zdroj fosfátu při proteinkinázových reakcích, dále jako zdroj energie při vnitrobuněčném transportu a stejně tak pro iontové pumpy vytvářející a udržující membránový potenciál (Gottesman and Maurizi 1992). Důležitá je i jeho role při syntéze nukleových kyselin, po přeměně na deoxyadenosin-5'-trifosfát (dATP) představuje jeden ze základních stavebních kamenů DNA. Dnes již není ATP považován za čistě intracelulární, je známá i jeho role jako extracelulární signalizační molekuly (Abbracchio and Burnstock 1998).

Signalizační funkce ATP byla popsána již v roce jeho objevení, nejprve v srdci a cévách (Drury and Szent-Györgyi 1929). Přesto se hypotéza o mimobuněčném působení ATP prosazovala velmi pomalu. V padesátých letech byla objasněna jeho role při uvolňování ze sensorických nervových zakončení, kde způsobuje vasodilataci (Holton and Holton 1954). V roce 1972 byla Geoffrey Burnstockem vytvořena hypotéza označující ATP jako neurotransmitter, a spolu s ní byla předpovězena existence purinergních receptorů (Burnstock 1972). Přesto nebyla představa o ATP jako mimobuněčném přenašeči informace příliš podporována. Až v roce 1994 přinesl Alan North spolu s naklonováním purinergního P2X₄ receptoru důkaz o mimobuněčném působení ATP (Valera, Hussy et al. 1994).

2 Uvolňování ATP

Během evoluce se signalizace ATP vyvíjela nejspíše paralelně se signalizací cyklickým adenosin-5'-monofosfátem (cAMP), který funguje jako vnitrobuněčný druhý posel. ATP se uplatňuje při autokrinní a parakrinní signalizaci. Malý dosah signalizace je dán aktivitou membránových a extracelulárních enzymů, které ATP štěpí na ADP, AMP a adenosin (He, Gonzalez-Iglesias et al. 2005, Verkhratsky and Burnstock 2014). Koncentrace ATP v intracelulárním prostoru se pohybuje okolo 5 mM, v prostoru mimobuněčném pak několiknásobně méně, dosahuje maximálně 200 μ M (Corriden and Insel 2010).

Do mezibuněčného prostoru se ATP uvolňuje z poškozených i nepoškozených buněk. Vylití ATP z poškozených buněk má zásadní roli v imunitních reakcích. U dráždivých tkání je ATP vylučován řízenou exocytózou. V neuronech je skladován v synaptických váčcích, kde jeho koncentrace může dosahovat až 1000 μ M (Burnstock 2006a). Ve váčcích může být obsažen samostatně, nebo jako kotransmitter s dalšími neurotransmitery (Kennedy 2015). Příkladem kotransmise je uvolňování ze sympatických nervů spolu s noradrenalinem a z parasympatických a motorických nervů spolu s acetylcholinem (Silinsky and Redman 1996). V centrálním nervovém systému (CNS) se ATP vyskytuje jako kotransmitter s glutamátem, dopaminem, serotoninem, noradrenalinem a kyselinou γ -aminomáselnou (Holton 1959, Jo and Role 2002, Burnstock 2009). ATP vyvolává v tkáních inervovaných sympatickými a parasympatickými nervy rychlou část odpovědi působením na purinergní P2X receptory. Pomalou složku odpovědi zprostředkovávají metabotropní P2Y a adenosinové receptory (Burnstock 2006a).

ATP je uvolňován i z gliových buněk (Cotrina, Lin et al. 2000). Gliové buňky jsou zároveň k extracelulárnímu ATP citlivé. Například astrocyty na svém povrchu exprimují purinergní receptory, přes které extracelulární ATP stimuluje jejich proliferaci a diferenciaci (Bolego, Ceruti et al. 1997). Funkcí ATP uvolňovaného z astrocytů je například inhibice uvolňování glutamátu z neuronů hipokampu (Koizumi, Fujishita et al. 2003).

Do extracelulárního prostoru je ATP uvolňován i z mnoha buněčných typů mimo nervový systém. Jedná se například o erytrocyty a trombocyty, kde se účastní procesů vedoucích ke srážení krve (Bergfeld and Forrester 1992). Dále jde například o epitelální buňky, buňky imunitního systému, buňky hladké svaloviny, Sertoliho buňky, a mnoho dalších (Pearson and Gordon 1979, Ferguson, Kennedy et al. 1997, Lalevee, Rogier et al. 1999).

Podnětem pro uvolnění ATP do mezibuněčného prostoru může být například mechanický stres, osmotický stres, hypoxie, ischemie, zánět, nebo acidóza. (Bodin and

Burnstock 2001). U nedráždivých buněk se ATP uvolňuje konnexinovými a pannexinovými kanály, napětím ovládanými aniontovými kanály a dilatovaným pórem purinergního receptoru P2X7 (Yegutkin 2008). Signalizace ATP má často dopad na intracelulární Ca^{2+} ionty, které dále aktivují celou řadu kináz (Corriden and Insel 2010).

2.1 Metabolismus ATP

V mezibuněčném prostoru je ATP degradován čtyřmi rodinami ektonukleotidáz. Ektonukleotidázy hydrolyzují ATP na ADP, AMP a adenosin (Obr. 1). Ektonukleotidázy jsou membránové hydrolytické působící enzymy, mohou se ale z membrány odštěpit za vzniku exonukleotidáz (He, Gonzalez-Iglesias et al. 2005).

První a největší rodinou jsou ektonukleotid trifosfát difosfhydrolázy (E-NTPDázy). Rodina E-NTPDáz obsahuje osm členů. Čtyři z nich, E-NTPDáza 1, 2, 3 a 8 jsou lokalizované na povrchu buněk, kde účinně degradují nukleotid trifosfáty a nukleotid difosfáty (Robson, Sévigny et al. 2006). E-NTDPázy 4 a 7 se na hydrolýze extracelulárního ATP nepodílejí, jsou lokalizovány uvnitř buněčných organel (Yegutkin 2014). E-NTDPáza 5 a 6 se mohou vyskytovat v obou formách: ve formě membránových enzymů nebo volně v podobě exoenzymů (Zimmermann 2001).

Druhou rodinou jsou ektonukleotid pyrofosfátázy (E-NPPázy). Rodina E-NPPáz obsahuje sedm členů (NPP1 – 7). Degradace extracelulárních nukleotidů se účastní NPP1, NPP2 a NPP3. Jejich široká specifita jim umožňuje kromě hydrolýzy nukleotid trifosfátů a nukleotid difosfátů na monofosfáty také rozkládat nikotinamidadenin nukleotid (NAD), nebo cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát (cAMP) na adenosin (Zimmermann 2000).

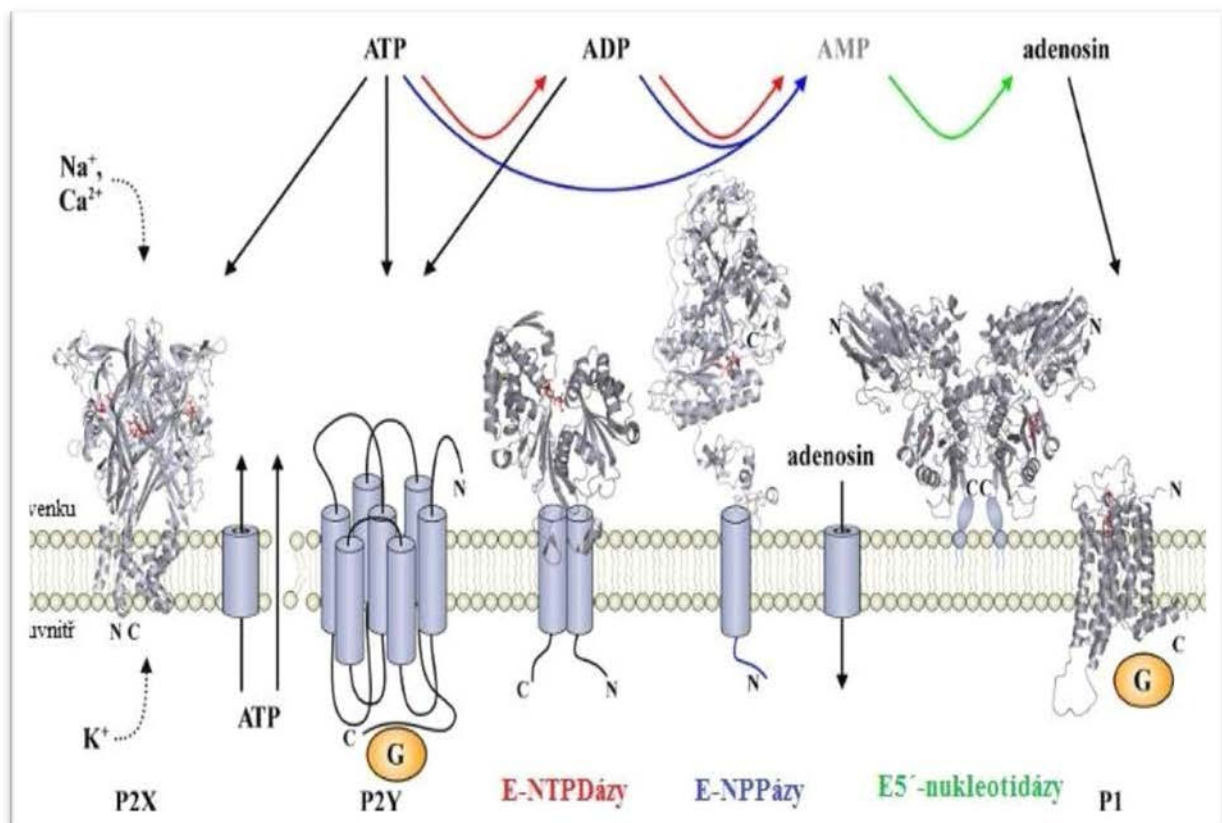
Třetí rodinou jsou alkalické fosfatázy (ALPázy), které mají schopnost vyštěpovat anorganický fosfát z různých substrátů. Pro jejich katalytickou aktivitu je optimální pH 8 – 11 a přítomnost Zn^{2+} a Mg^{2+} iontů.

Čtvrtou rodinou jsou kyselé fosfatázy (ACPázy). Zástupce PAP je schopný hydrolyzovat AMP a cAMP na adenosin, zástupce TRAP je díky své široké specifitě schopný hydrolyzovat ATP, ADP a v menší míře AMP (Mitić, Valizadeh et al. 2005, Zimmermann 2009).

Poslední rodinou v rámci ektonukleotidáz jsou ekto-5'-nukleotidázy. Ty vyštěpují z nukleotid-5'-monofosfátů nukleosidy, čímž vzniká například adenosin, který aktivuje P1 receptory. Správná funkce všech ektonukleotidázových enzymů je podmíněna přítomností dvoumocného kationtu Mg a Ca (He, Gonzalez-Iglesias et al. 2005).

Odbourávání extracelulárního ATP se kromě ektonukleotidáz účastní ještě další enzymy. Mezi ně patří například adenosin deamináza (ADA), účastníci se deaminace adenosinu na inosin. Dále purin nukleosid fosforyláza (PNP), která fosforyluje inosin na hypoxantin, který se dále metabolizuje na kyselinu močovou (Yegutkin 2008).

Některé buňky jsou schopny naopak produkovat enzymy prodlužující působení signalizace ATP. Mezi tyto enzymy patří například adenylát kináza, katalyzující vznik ATP ze dvou molekul ADP a jedné molekuly AMP (Yegutkin 2008).



Obrázek 1: Zjednodušené schéma purinerní signalizace.

Ektonukleotid trifosfát difosfohydrolázy (E-NTPDázy) hydrolyzují ATP na ADP a následně na AMP. Ektonukleotid pyrofosfatázy (E-NPPázy) hydrolyzují ADP na AMP. AMP je v posledním kroku hydrolyzován ekto-5'-nukleotidázami (E5'-nukleotidázy) hydrolyzován na adenosin. P1, P2Y, P2X – purinerní receptory; G – G-protein. Převzato a upraveno podle (Yegutkin 2014).

3 Purinergní receptory

Purinergní membránové receptory jsou citlivé k extracelulárním purinům (ATP, ADP a adenosinu) a v některých případech i k pyrimidinům (uridin-5'-trifosfát, uridin-5'-difosfát) (Abbracchio and Burnstock 1998). Jejich existence byla předpovězena v první polovině sedmdesátých let, v druhé polovině došlo k jejich rozčlenění na P1 a P2 skupinu (Burnstock 1977). V P2 skupině rozlišujeme metabotropní P2Y receptory a ionotropní P2X receptory.

Purinergní receptory byly objeveny u nižších živočichů, bezobratlých a obratlovců (Fountain and Burnstock 2009). Později byly popsány i u rostlin (Hou and Cao 2016). U člověka jsou popsány ve většině tkání, kde mají různé funkce od vasodilatace, kontrakce hladkého a srdečního svalu, přes imunitní odpověď až po účast v chronické a zánětlivé bolesti (Schwab, Guo et al. 2005, Lamont, Vial et al. 2006, Donnelly-Roberts, McGaraughty et al. 2008).

Purinergní receptory jsou rozděleny do dvou skupin podle povahy jejich aktivace. Skupina P1 receptorů je aktivována adenosinem, skupina P2 je pak aktivována extracelulárními puriny, případně pyrimidiny.

3.1 P1 receptory

P1 jsou adenosinem aktivované metabotropní receptory spřažené s G-proteiny, zvané také adenosinové receptory. Podobně jako ostatní G-proteinové receptory je tvoří sedm transmembránových (TM) domén, extracelulární N-konec a intracelulární C-konec. (Bodin and Burnstock 2001). Výsledkem jejich aktivace je ovlivnění hladiny vnitrobuněčného cAMP. Dnes rozeznáváme čtyři podtypy P1 receptorů: A₁, A_{2A}, A_{2B} a A₃. Každý podtyp má specifické agonisty a antagonisty. Projevy jejich aktivace jsou rozdílné, aktivace A₁ receptorů způsobuje inhibici adenylát cyklázy, A_{2A} a A_{2B} adenylát cyklázu naopak aktivují. Aktivovaný A₃ receptor působí na adenylát cyklázu inhibičně, navíc stimuluje aktivitu fosfolipázy C (PLC) (Ralevic and Burnstock 1998). P1 receptory se uplatňují například v nervovém systému, kde ovlivňují hladinu neurotransmiteru či v kardiovaskulárním systému při regulaci krevního tlaku (Abbracchio, Burnstock et al. 2009).

3.2 P2 receptory

3.2.1 P2Y receptory

P2Y jsou receptory citlivé k ATP, ADP a v několika případech k uridin-5'-trifosfátu (UTP). Podobně jako P1 receptory, jsou P2Y receptory spřažené s G-proteiny. Tvoří je sedm TM domén, N-konec orientovaný vně buňky a C-konec orientovaný intracelulárně. V současné době jsou P2Y receptory rozčleněny na osm podtypů, které řadíme do dvou skupin podle typu spřaženého G-proteinu. Do první skupiny patří podtypy P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ spřažené s G_q-proteinem. Do druhé patří skupiny podtypy P2Y₁₂, P2Y₁₃ a P2Y₁₄ spřažené s G_i-proteinem (Waldo and Harden 2004, Abbracchio, Burnstock et al. 2009). Chybějící čísla označují podtypy, které nebyly nalezeny u savců, nebo u nich nedochází k funkční odpovědi na nukleotidy (Webb, Henderson et al. 1996).

Nejsilnějším agonistou P2Y₂ a P2Y₁₁ je ATP, u P2Y₄ a P2Y₆ je nejsilnějším agonistou UTP (Koizumi, Shigemoto-Mogami et al. 2007), u ostatních podjednotek buď ATP nebo ADP (O'Connor, Dainty et al. 1991). Signalizace přes P2Y receptory může vést k aktivaci adenylát cyklázy a PLC, která přes sekundární posly ovlivňuje hladinu intracelulárních Ca²⁺ iontů. P2Y receptory se uplatňují například při vasodilataci, relaxaci hladké svaloviny, regulaci tvorby kostních buněk a srážení krve (Léon, Hechler et al. 1999, Abbracchio, Burnstock et al. 2009).

3.2.2 P2X receptory

Purinergní P2X receptory patří mezi ligandem aktivované iontové kanály. Iontové kanály jsou struktury procházející dvojvrstvou fosfolipidů, které se účastní transportu iontů přes membránu. Na rozdíl od napětově ovládaných iontových kanálů, které mění svoji aktivitu v závislosti na změně napětí na membráně, ligandem ovládané kanály vyžadují navázání signální molekuly – ligandu. Po vazbě ligandu dochází ke změně konformace, která vede ke změně jejich propustnosti. Dnes rozeznáváme tři hlavní skupiny ligandem aktivovaných kanálů, a to glutamátové kanály, Cys-loop kanály a kanály aktivované ATP (Le Novère and Changeux 2001).

P2X receptory jsou iontové kanály aktivované extracelulárním ATP. Jsou propustné především pro jednomocné kationty Na a K, dvoumocné Ca kationty a malé organické kationty (Liu and Adams 2001). V současné době je popsáno sedm podjednotek P2X receptorů, a to P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ a P2X₇ (North 2002). Jednotlivé

podjednotky se od sebe liší afinitou k agonistům, propustností pro Ca^{2+} ionty, délkou aminokyselinového řetězce, nebo umístěním v buňce (Khakh and North 2006).

Dnes již víme, že P2X receptory tvoří trimerní struktury. Právě tvorba trimerních struktur je jedním z charakteristických znaků P2X receptorů, kterým se odlišují od glutamátových tetramerních a acetylcholinových pentamerních ligandem aktivovaných iontových kanálů. (Kellenberger and Grutter 2015). Funkční P2X receptory tvoří kromě homotrimerů i heterotrimerní struktury (Tab. 1). Ne všechny podtypy jsou vzájemně funkčně kombinovatelné. P2X₁, P2X₂, P2X₃ a P2X₅ jsou vzájemně kombinovatelné. P2X₄ se může kombinovat s P2X₁, P2X₅ a P2X₆. Podtyp P2X₆ kombinuje s P2X₁, P2X₂, P2X₄ a P2X₅. Podtyp P2X₇ tvoří heterotrimery s P2X₄.

Tabulka 1: Možné uspořádání podjednotek do heterotrimerů. Převzato z (North 2002) a aktualizováno podle (Saul, Hausmann et al. 2013).

	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇
P2X ₁	+	+	+	+	+	+	–
P2X ₂		+	+	–	+	+	–
P2X ₃			+	–	+	–	–
P2X ₄				+	+	+	+
P2X ₅					+	+	–
P2X ₆						–	–
P2X ₇							+

Strukturálně se P2X receptory skládají z velké extracelulární domény, dvou TM domén (TM1 a TM2) a intracelulárního N-konce a C-konce. Extracelulární doménu P2X receptoru tvoří převážně β -skládané listy a několik α -helixů (Obr. 2). Obsahuje také tři vazebná místa pro ATP, která se nacházejí na rozmezí dvou podjednotek trimeru a deset konzervovaných cysteinů, které se spojují do pěti disulfidických můstků a podílejí se na tvorbě trimerní struktury receptoru (Clyne, Wang et al. 2002, Hu and Hoylaerts 2010). Po navázání ATP dojde ve struktuře receptoru ke konformačním změnám, které se přenesou k TM, kde dochází k formování vlastního iontového kanálu (Hu and Hoylaerts 2010).

Důležitou vlastností extracelulární domény je její glykosylace, která je klíčová pro správné skládání podjednotek do funkčního stavu receptoru. Počet konzervovaných sekvencí pro glykosylaci se u jednotlivých podjednotek liší (Newbolt, Stoop et al. 1998). Plně funkční receptory vyžadují glykosylaci alespoň dvou sekvencí. Receptory s jednou glykosylovanou

sekvencí prokazují slabou odpověď na ATP, protože glykosylace má důležitou roli i při transportu receptoru do plazmatické membrány (Nicke, Bäumer et al. 1998, North 2002).

TM domény P2X receptorů mají α -helikální strukturu. Každá podjednotka trimeru obsahuje dva α -helixy, iontový kanál je tedy tvořen celkem šesti helixy (Khakh and Egan 2005).

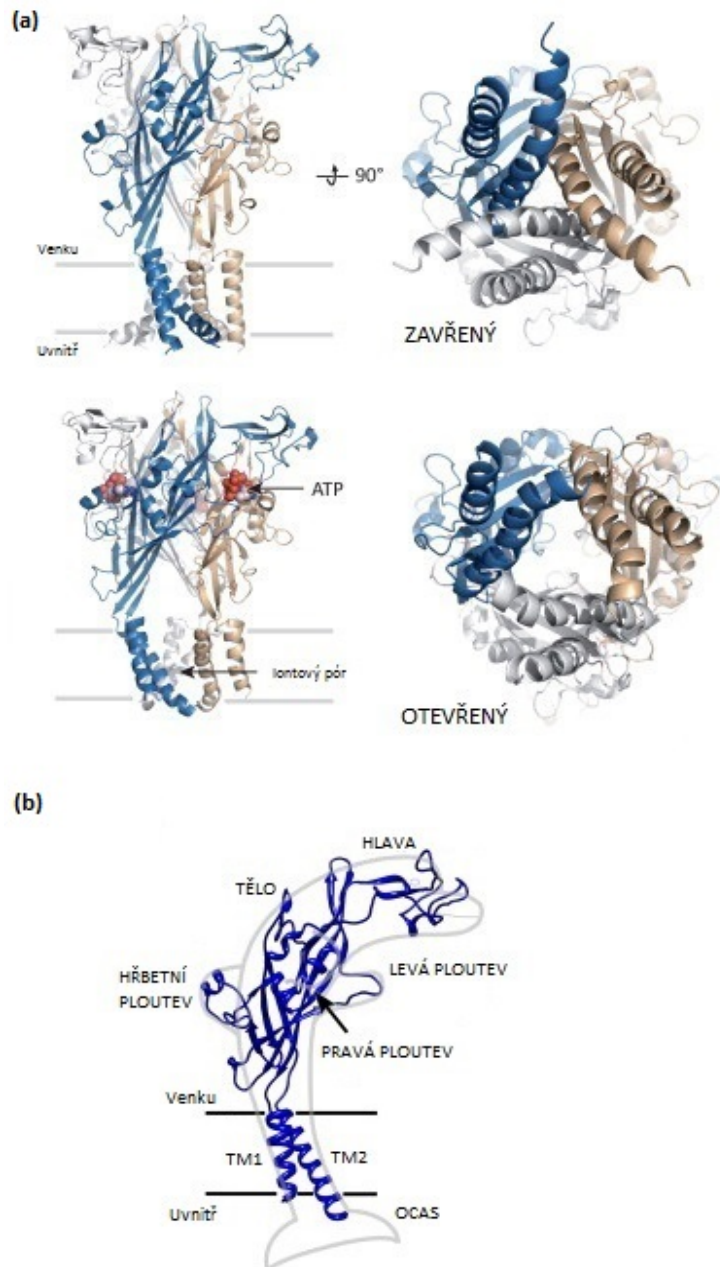
Intracelulární N-konec receptoru obsahuje konzervovanou fosforylační sekvenci, která má vliv na desenzitizaci receptoru (Boue-Grabot, Archambault et al. 2000). Intracelulární C-konec, jehož délka je rozdílná u jednotlivých podtypů P2X receptorů má funkci při zabudování receptoru do membrány a jeho následné stabilizaci (Chaumont, Jiang et al. 2004, Kaczmarek-Hájek, Lörinczi et al. 2012).

Jednotlivé podjednotky P2X receptorů jsou s různou citlivostí aktivovány i dalšími (syntetickými) agonisty (Tab. 2), zároveň také s různou citlivostí reagují na antagonisty, čehož se ve studiích využívá k jejich rozlišení (Coddou, Yan et al. 2011).

Tabulka 2: Agonisté a antagonisté P2X receptorů.

Převzato z (von Kugelgen 2006) a upraveno podle (Coddou, Yan et al. 2011, Tvrdonova, Rokic et al. 2014).

Podtyp	Agonista (EC50/IC50)
P2X1	ATP (0,1-0,7 μM) > $\alpha\beta$ -meATP (0,1-1 μM) = 2-meSATP (0,1-1 μM) > BzATP (0,7-24 μM) > ATP γ S (1 μM)
P2X2	2-meSATP (1 μM) > ATP (2-8 μM) > BzATP (6-30 μM) > ATP γ S (10 μM) > $\alpha\beta$ -meATP (>100 μM)
P2X3	2-meSATP (0,3 μM) > ATP (1 μM) > $\alpha\beta$ -meATP (1-2 μM) > ATP γ S (10 μM) > $\beta\gamma$ -meATP (>300 μM)
P2X4	ATP (3 μM) > 2-meSATP (10 μM) = ATP γ S (10 μM) > BzATP (13 μM) > $\alpha\beta$ -meATP (80 μM) > CTP (200 μM)
P2X5	ATP (0,5-4 μM) = 2-meSATP (0,5 μM) = ATP γ S (0,5 μM) > BzATP (1-6 μM) > $\alpha\beta$ -meATP (1-12 μM)
P2X6	-
P2X7	BzATP (10 μM) > 2-meSATP (200 μM) > $\beta\gamma$ -meATP (>300 μM) = $\alpha\beta$ -meATP (>300 μM) > ATP (2-4 mM)
Podtyp	Antagonista (EC50/IC50)
P2X1	NF449 (0,5 nM) > IP5I (3 nM) > TNP-ATP (6 nM) > PPNDS (15 nM) > NF279 (20 nM)
P2X2	NF770 (19 nM) > PSB-1011 (79 nM) > PSB-10211 (86 nM) > NF776 (97 nM) > NF778 (140 nM)
P2X3	TNP-ATP (1 nM) > RO-51 (10 nM) = AF-353 (10 nM) > RO-4 (13 nM) > RO-85 (30 nM)
P2X4	Paroxetin (2 μM) > BBG (3-100 μM) > TNP-ATP (15 μM) > NF023 (>100 μM) > Suramin (>300 μM) = PPADS (300 μM)
P2X5	PPADS (200-600 nM) > TNT-ATP (600-700 nM) > BBG (0,5) > Suramin (2-3)
P2X6	-
P2X7	AZ11645373 (5-10 nM) > A804598 (10 nM) > AZ10606120 (10-200 nM) > BBG (15-250 nM) > A740003 (20-700 nM)



Obrázek 2: Struktura krystalu Δ zfP2X2 receptoru.

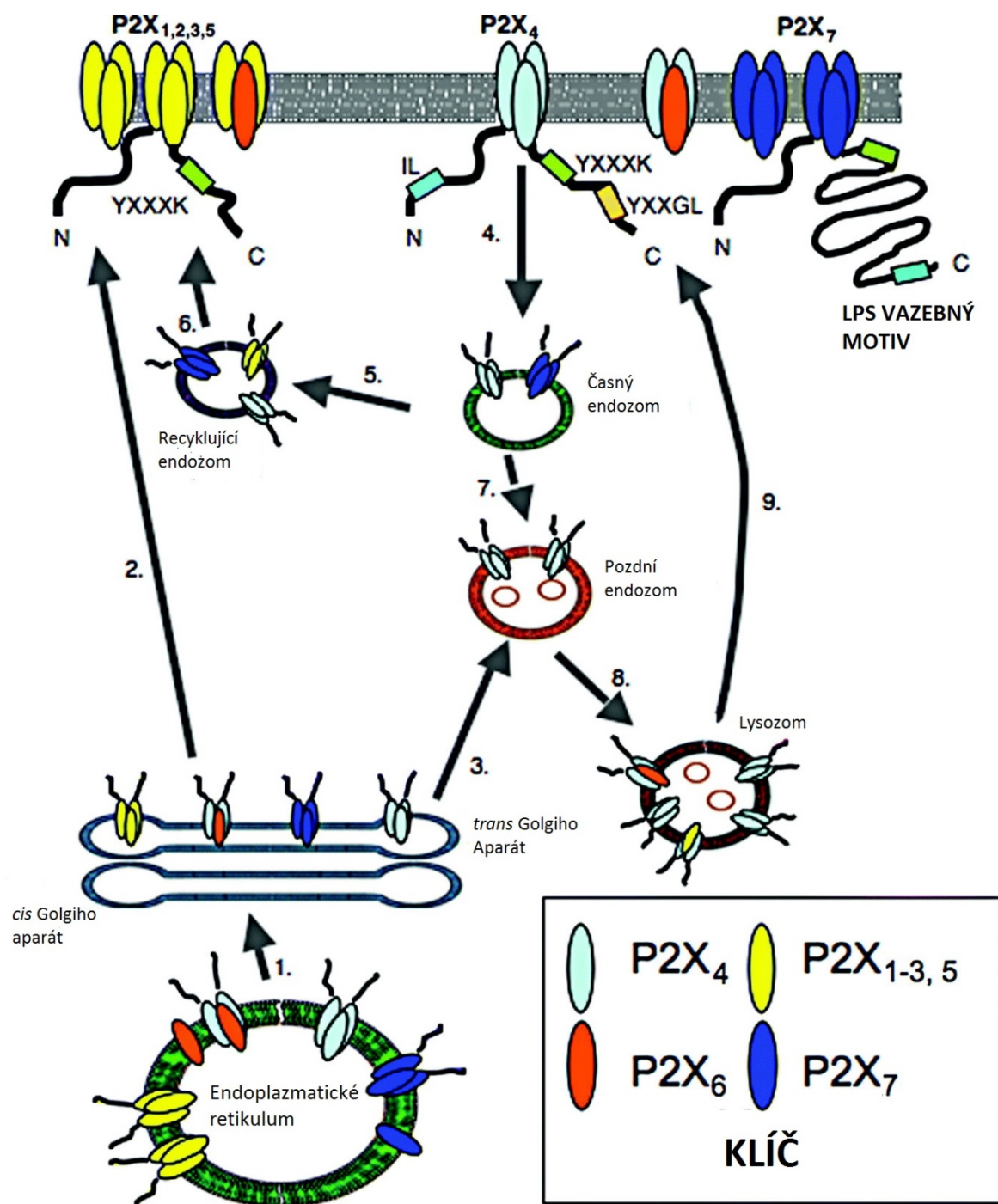
Horní část obrázku (a) zobrazuje boční (vlevo) a spodní (vpravo) pohled na receptor v uzavřeném stavu. Spodní část obrázku (a) zobrazuje boční (vlevo) a spodní (vpravo) pohled na receptor v otevřeném stavu s navázaným ATP. Každá podjednotka trimeru je zakreslena odlišnou barvou (modrá, hnědá, šedivá). Část obrázku (b) zobrazuje samostatnou podjednotku receptoru. Jednotlivé části ektodomény jsou podle podobnosti s delfínem označovány jako hlava, tělo, levá ploutev, pravá ploutev a hřbetní ploutev. Část ocasu tvoří transmembránové domény TM1 a TM2. Převzato a upraveno z (Kawate, Michel et al. 2009, Browne, Jiang et al. 2010, Jiang, Taly et al. 2013)

3.2.2.1 Transport P2X receptoru buňkou

Skládání jednotlivých P2X podjednotek do trimerních struktur probíhá v endoplazmatickém retikulu (ER). Odtud jsou P2X receptory transportovány přes *trans* Golgiho aparát do plazmatické membrány (Obr. 3). V plazmatické membráně jsou stabilizovány pomocí konzervovaného YXXXXK motivu, který je umístěn na C-konci všech P2X receptorů (Kaczmarek-Hájek, Lörinczi et al. 2012).

Distribuce a transport homotrimerních P2X receptorů se liší podle jednotlivých podjednotek a buněčného typu, ve kterém jsou exprimovány (Bobanovic, Royle et al. 2002). P2X receptory můžeme podle způsobu jejich transportu rozdělit do tří skupin. První skupinu tvoří P2X₅ a P2X₆ podtypy. Obě podjednotky se dominantně vyskytují na ER. U P2X₅ podtypu je známá sekvence způsobující jeho setrvání v ER, P2X₆ podtyp netvoří funkční homotrimery (Saul, Hausmann et al. 2013). Druhá skupina obsahuje P2X₂ a P2X₇ podtypy. Pro podtypy této skupiny je charakteristická prodloužená doba transportu buňkou a pomalá akumulace na plazmatické membráně. P2X₂ a P2X₇ podtypy vykazují minimální míru internalizace (Murrell-Lagnado and Robinson 2013). Poslední skupinu tvoří P2X₁, P2X₃ a P2X₄ podtypy. Pro podtypy této skupiny je charakteristické primární směřování do endozomů a vysoká míra konstitutivní internalizace (Bobanovic, Royle et al. 2002). U heterotrimerních receptorů se předpokládá podobný mechanismus transportu jako u podjednotek, ze kterých se heterotrimerní receptor skládá (Bobanovic, Royle et al. 2002).

V plazmatické membráně jsou P2X receptory často lokalizovány v lipidových raftech. Míra asociace P2X receptorů a lipidových raftů se liší podle buněčného typu (Allsopp, Lalo et al. 2010). Způsob, jakým jsou P2X receptory do lipidových raftů směřovány je prozatím nejasný. P2X₁ receptory byly lokalizovány v oblastech bohatých na cholesterol společně s flotillinem 1 a 2, což jsou proteiny specifické pro lipidové rafty (Vial and Evans 2005). P2X₇ podtyp je schopný interakce s caveolinem-1, který je součástí kaveolárního typu lipidických raftů (Patel and Insel 2009). Blokací caveolinu-1 došlo k snížení exprese P2X₇ v membráně (Weinhold, Krause-Buchholz et al. 2010). Při použití detergentu Triton-X došlo k přesunu P2X receptorů mimo oblasti lipidových raftů. P2X₃ a P2X₄ receptory reagují na nižší koncentrace detergentu než P2X₁ a P2X₂, čímž se prokázalo, že asociace v raftech se u jednotlivých podtypů P2X různí (Allsopp, Lalo et al. 2010).



Obrázek 3: Transport P2X receptorů buňkou

P2X_{1-3,5} receptory jsou z ER transportovány přes *trans* Golgiho aparát (1) do plazmatické membrány (2). P2X₁ receptor může být z endozomů recyklován (6). P2X₆ receptor setrvává na ER. V rámci heterotrimeru může být P2X₆ podjednotka transportována do plazmatické membrány. P2X₄ receptor je směřován do pozdních endozomů (3) a lysozomů (8), odkud může být recyklován. Z plazmatické membrány je stahován do časných endosomů (4). P2X₇ receptor je přes *trans* Golgiho aparát transportován do membrány, odkud může být internalizován. Převzato a upraveno z (Murrell-Lagnado and Qureshi 2008).

3.2.2.1.1 Podtypy a specifika jejich transportu

3.2.2.1.1.1 P2X₁ receptor

P2X₁ receptor byl poprvé izolován ze svaloviny chámovodu potkana, u člověka z buněk močového měchýře (Valera, Hussy et al. 1994, Valera, Talabot et al. 1995). Exprese P2X₁ receptoru byla dále popsána v buňkách srdeční svaloviny, hladké svaloviny cév, míšních neuronů, hippokampu, mozečku, trombocytech a neutrofilních granulocytech (MacKenzie, Mahaut-Smith et al. 1996, Vulchanova, Arvidsson et al. 1996, Lecut, Frederix et al. 2009).

Podjednotka P2X₁ receptoru je tvořena 399 aminokyselinami. Charakteristickou vlastností receptoru je jeho rychlá aktivace a desenzitizace po navázání agonisty. Naopak obnovení z desenzitizovaného stavu je pomalý proces, který souvisí s transportem receptoru zpět do intracelulárního prostředí (Buell, Michel et al. 1996). Agonisté P2X₁ receptoru seřazeni podle účinnosti jsou: α,β -methylen ATP ($\alpha\beta$ -meATP), ATP, 2-methylthio-ATP (2-meSATP), 2'(3')-O-4-benzoylbenzoyl-ATP (BzATP) a adenosine-5'-O-(3-thiotrifosfát) (ATP γ S) (Coddou, Yan et al. 2011). Výčet nejsilnějších antagonistů P2X₁ receptoru je uveden v tabulce 2. Propustnost P2X₁ receptoru pro Ca²⁺ ionty je relativně vysoká. Inhibice receptoru extracelulárním vápníkem je zanedbatelná (Khakh 2001).

Účast P2X₁ receptoru byla popsána například u fyziologických procesů kontrakce hladké svaloviny a shlukování krevních destiček. P2X₁ receptory jsou vysoce exprimovány v hladké svalovině artérií, močového měchýře a chámovodu. Zde jsou aktivovány ATP, který je vylučován jako kotransmitter s noradrenalinem na nervosvalových ploténkách sympatiku. Aktivace receptoru má za následek vtok iontů Ca²⁺, které dále vyvolají aktivaci vnitrobuněčných drah vedoucích ke svalové kontrakci (Vial and Evans 2002, Lamont, Vial et al. 2006).

P2X₁ receptory exprimované na povrchu krevních destiček mohou být aktivovány ATP, který je vylučován z poškozených endotelových buněk nebo erytrocytů. Aktivace receptoru způsobí vtok Ca²⁺ iontů, který spustí signální kaskády, jejichž následkem dojde ke změně tvaru krevních destiček a jejich agregaci (Toth-Zsomboki, Oury et al. 2003, Hu and Hoylaerts 2010).

Kompletní P2X₁ receptory jsou z ER přes *trans* Golgiho aparát transportovány primárně do plazmatické membrány (Murrell-Lagnado and Robinson 2013). Sekvence zodpovědná za transport receptoru do plazmatické membrány nebyla dosud identifikována. Transport a exprese P2X₁ receptoru na plazmatické membráně je ovlivněna interakcí

s dalšími proteiny. Popsána byla interakce s heat shock proteinem 90 (HSP90), chaperonem který kromě jiného ovlivňuje expresi ostatních proteinů v buňce. Inhibice HSP90 vyvolaná geldanamycinem způsobila snížení exprese P2X₁ receptoru na povrchu buňky (Suttitanamongkol, Gear et al. 2000). Kromě cílení receptoru k plazmatické membráně má HSP90 vliv také na dobu jeho desenzitizace, která se při inhibici HSP90 zkracuje až o 25% (Lalo, Jones et al. 2012).

P2X₁ receptory jsou vysoce mobilní a na rozdíl od stabilních P2X₂ receptorů podstupují častou internalizaci a následnou recyklaci vyvolanou aplikací agonisty (Murrell-Lagnado and Robinson 2013). Pomocí FRAP metody bylo pozorováno, že poměr mobilních a nepohyblivých P2X₁-eGFP označených receptorů v membráně je 75% mobilních a 25% nepohyblivých (Lalo, Allsopp et al. 2010). Pomocí FRAP (obnovení fluorescence po fotovybělení) metody byl také zkoumán podíl nových a recyklovaných receptorů v přírůstku do mobilní části. Použití inhibitoru proteosyntézy cykloheximidu prokázalo malou roli nově syntetizovaných receptorů na obnovení fluorescence po vybělení. K obnovení došlo díky účasti recyklovaných receptorů z endozomů.

Použitím brefelidinu A (BFA), který způsobuje kolaps Golgiho aparátu a vezikulárního transportu, čímž se znemožní možnost recyklace, došlo k omezení návratu vysvícených receptorů do membrány (Vacca, Giustizieri et al. 2009, Lalo, Allsopp et al. 2010). Internalizace P2X₁ receptorů do endosomů tedy probíhá BFA senzitivní cestou. Na rozdíl od P2X₃ a P2X₄ receptorů, které jsou také internalizovány, nebyla u P2X₁ receptorů doposud popsána sekvence, na jejímž základě jsou směřovány k recyklaci. Aktivace P2X₁ receptorů vede k vyšší míře jejich internalizace a recyklace (Ennion and Evans 2001).

Inhibicí dynaminu inhibitorem dynasorem došlo k snížení recyklace FRAP vysvícených receptorů, což naznačuje závislost transportu a recyklace P2X₁ receptorů na dynaminu a klathrinu (Preta, Cronin et al. 2015). Inhibice transportu pomocí BFA a dynasoru prodloužila dobu odpovědi receptoru na agonistu i dobu desenzitizace, dá se tedy předpokládat, že internalizace a recyklace receptoru hraje roli při jeho obnově z desenzitizovaného stavu (Maxfield and McGraw 2004, Lalo, Allsopp et al. 2010).

Důležitou roli při prvotním transportu P2X₁ receptorů do membrány hraje His³⁵⁵ lokalizovaný na C-konci, H355A mutant se projevil sníženou expresí (Vial, Rigby et al. 2006).

3.2.2.1.1.2 P2X₂ receptor

P2X₂ receptor byl poprvé izolován z PC12 buněk (Brake, Wagenbach et al. 1994). Exprese P2X₂ receptoru byla popsána v periferním a centrálním nervovém systému, konkrétně v buňkách mozečku, hippocampu, hypotalamu, kůry mozkové a zadních rožích míšních (Housley, Kanjhan et al. 1999, Burnstock 2004). P2X₂ receptory se dále vyskytují v buňkách endotelu, hypofýzy, dřeni nadledvin, hladké a srdeční svaloviny (Vulchanova, Arvidsson et al. 1996, Vial, Rigby et al. 2006, Morton-Jones, Vlajkovic et al. 2015).

Podjednotka P2X₂ receptoru je tvořena 472 aminokyselinami, oproti P2X₁ receptoru obsahuje prodloužení na C-konci. Aktivovaný P2X₂ receptor je propustný pro jedno a dvoumocné kationty. Pokud je vystaven dlouhodobé přítomnosti agonisty, stává se propustným i pro velké organické molekuly a kationty, jako je například NMDG⁺ (Virginio, MacKenzie et al. 1999, Mittal, Grati et al. 2016). Charakteristickou vlastností P2X₂ receptoru je jeho pomalá desenzitizace a poměrně rychlé obnovení z inaktivovaného stavu (Evans, Lewis et al. 1995, Coddou, Yan et al. 2015). Agonisté P2X₂ receptoru seřazeni podle účinnosti jsou: 2-meSATP, ATP, BzATP, ATP γ S a $\alpha\beta$ -meATP (Coddou, Yan et al. 2011). Výčet nejsilnějších antagonistů P2X₂ receptoru je uveden v tabulce 2. Fyziologické funkce P2X₂ se liší podle typu buněk, ve kterých jsou exprimovány. Často se vyskytují jako P2X_{2/3} a P2X_{2/6} heteromery.

Kompletně složené homotrimerní P2X₂ receptory jsou primárně lokalizovány na ER. Jejich transport do plazmatické membrány je relativně pomalý. Sekvence adresující receptor na membránu nebyla prozatím popsána (Murrell-Lagnado and Qureshi 2008). Prodloužená doba transportu P2X₂ receptorů může být ovlivněna interakcemi s dalšími proteiny. Tyto interakce mají vliv také na funkčnost receptorů (Bobanovic, Royle et al. 2002).

Popsána byla interakce s adaptorovým proteinem Fe65, který se váže na C-koncovou doménu receptoru, čímž ovlivňuje jeho iontovou propustnost a expresi (Masin, Kerschensteiner et al. 2006). P2X₂ receptory interagují také s receptory kyseliny γ -aminomáselné typu A (GABA_A) (Murrell-Lagnado and Robinson 2013). Výskyt interagujících P2X₂ a GABA_A receptorů byl vizualizací Försterova rezonančního přenosu energie (FRET) potvrzen v cytosolu a plazmatické membráně. Použitím defektních mutantů GABA_A receptoru došlo ke snížení exprese obou typů receptorů na buněčném povrchu. Interakce s GABA_A receptory tedy ovlivňuje transport P2X₂ receptorů buňkou (Shrivastava, Triller et al. 2011).

Dalším proteinem, který interaguje s P2X₂ receptory a ovlivňuje jejich expresi je VILIP1. FRAP metodou bylo pozorováno, že interakce s visinin-like proteinem 1 (VILIP1) navyšuje počet P2X₂ receptorů exprimovaných na plazmatické membráně a zvyšuje jejich citlivost k ATP (Chaumont, Compan et al. 2008). Popsána byla i interakce P2X₂ receptoru s βIII tubulinem. Ten hraje důležitou roli v mnoha buněčných procesech včetně transportu váčků. Je tedy možné, že tato interakce ovlivňuje transport P2X₂ receptorů (Gendreau, Schirmer et al. 2003).

Povrchová exprese P2X₂ receptoru se výrazně snížila mutacemi konzervovaných aminokyselin Y362A a K366A v YXXXXK motivu. Mutace okolních aminokyselin v rozmezí od Lys³⁶⁰ do Lys³⁶⁹ v TM2 neměly žádný vliv na expresi receptoru (Chaumont, Jiang et al. 2004, Vial, Rigby et al. 2006). P2X₂ receptory jsou v plazmatické membráně relativně stabilní a prokazují jen minimální internalizaci (Murrell-Lagnado and Robinson 2013).

3.2.2.1.1.3 P2X₃ receptor

P2X₃ receptor byl poprvé izolován ze senzoričských neuronů dorzálních kořenových ganglií (Burnstock 2006b). Výskyt P2X₃ receptorů byl popsán především na Aγ-vláknech neuronů, na nemyelinizovaných C-vláknech, vláknech dorzálních kořenových ganglií, nodózních a trigeminálních ganglií (Vulchanova, Arvidsson et al. 1996, Burnstock 2004).

Podjednotka P2X₃ receptoru se skládá z 393 aminokyselin (Souslova, Ravenall et al. 1997). Charakteristickými vlastnostmi P2X₃ receptoru jsou velmi rychlá aktivace a desenzitizace (Lewis, Neidhart et al. 1995). Návrat receptoru z desenzitizovaného stavu je naopak velmi pomalý. Zvýšením extracelulární koncentrace Ca²⁺ může být návrat urychlen. Zvýšená extracelulární koncentrace Mg²⁺, nebo snížená koncentrace Ca²⁺, naopak působí snížení rychlosti návratu (Giniatullin, Sokolova et al. 2003). Agonisté P2X₃ receptoru seřazeni podle účinnosti jsou: 2-meSATP, ATP, αβ-meATP, ATPγS a β,γ-methylen ATP (βγ-meATP) (Coddou, Yan et al. 2011). Výčet nejsilnějších antagonistů P2X₃ receptoru je uveden v tabulce 2.

P2X₃ receptor se uplatňuje při akutní bolesti, neuropatické bolesti a mechanotransdukci (Zagorodnyuk, Brookes et al. 2009).

P2X₃ receptory podstupují podobně jako P2X₁ receptory konstitutivní internalizaci z plazmatické membrány. Kompletně složené P2X₃ receptory jsou ale z ER přes *trans* Golgiho aparát směřovány primárně do pozdních endozomů a lysozomů (Murrell-Lagnado and Qureshi 2008). Inhibicí endocytózy dochází k akumulaci P2X₃ receptorů na plazmatické membráně. Za rovnovážného stavu endocytóza P2X₃ receptorů převažuje nad transportem do

plazmatické membrány. V plazmatické membráně se tak vyskytuje minimální počet receptorů. (Vacca, Giustizieri et al. 2009). Receptory mohou být po endocytóze recyklovány zpět na membránu, nebo směřovány do lysozomů k degradaci. Větší část receptorů je směřována do lysozomů. P2X₃ receptory určené k degradaci v lysozomu jsou označovány ubikvitinací. Na C-konci receptoru se nachází několik konzervovaných lyzinových reziduí, která jsou potencionálním cílem ubikvitinace. Navíc se zde nachází konsenzus sekvence DSGΨXS, která je využívána u dalších proteinů během ubikvitin-dependentní degradace (Shirane, Hatakeyama et al. 1999). Na C-konci P2X₃ receptoru se dále nachází dva konzervované leuciny v motivu DXXLL, což je konsenzus vazebná sekvence pro proteiny transportované z *trans* Golgiho aparátu do endozomů (Bonifacino and Traub 2003). Podobně jako u P2X₁ receptorů, po vystavení P2X₃ receptoru agonistovi se zvýší míra jeho internalizace. Exprese P2X₃ receptorů na plazmatické membráně může být stimulována přítomností calcitonin příbuznému peptidu (CGRP; calcitonin gene-related peptid) (Fabbretti, D'Arco et al. 2006). Popsán byl také vztah mezi P2X₃ receptorem a Ca²⁺/kalmodulin dependentní proteinkinázou II (CaMKII). Aktivovaná CaMKII může zvýšit odpověď P2X₃ receptorů na ATP stimulací jejich exprese na plazmatickou membránu (Xu and Huang 2004).

3.2.2.1.1.4 P2X4 receptor

P2X₄ receptor byl poprvé izolován z mozku potkana (Bo, Zhang et al. 1995). Kromě CNS je P2X₄ receptor hojně distribuován v buňkách autonomních ganglií, plic, cévního endotelu, močového měchýře, slinivky, brzlíku, střev, imunitního systému a srdeční svaloviny (Seguela, Haghghi et al. 1996, Soto, Garcia-Guzman et al. 1996, Bo, Kim et al. 2003).

Podjednotku P2X₄ receptoru tvoří 388 aminokyselin (Dhulipala, Wang et al. 1998). Desenzitizace P2X₄ receptoru je pomalejší než u podtypů P2X₁ a P2X₃, ale rychlejší než u podtypů P2X₂, P2X₅ a P2X₇. P2X₄ receptor je v rámci P2X receptorů vysoce propustný pro Ca²⁺ ionty. Vysoce propustný je i pro Na⁺, K⁺ a Cs⁺ ionty (Soto, Garcia-Guzman et al. 1996). Podobně jako u P2X₂ receptoru, při dlouhodobé aplikaci agonisty se P2X₄ receptor stává propustný pro velké organické kationty jako NMDG⁺ a YO-PRO-1 (Khakh, Proctor et al. 1999, Virginio, MacKenzie et al. 1999). Agonisté P2X₄ receptoru seřazení podle účinnosti jsou: ATP, 2-meSATP, ATP_γS, BzATP a αβ-meATP (Tvrdonova, Rokic et al. 2014). Velmi slabou odpověď prokazuje na β,γ-methylen ATP (βγ-meATP) a cytidin-5'-trifosfát (CTP) (Coddou, Yan et al. 2011). Jejich účinek může být zesílen přidáním modulátoru ivermektinu (Priel and Silberberg 2004). Výčet nejsilnějších antagonistů P2X₄ receptoru je uveden v tabulce 2.

P2X₄ receptory se uplatňují v neuronech na rychlých nervových spojeních. Na presynaptické membráně je jeho aktivací stimulováno vylučování váčků s mediátorem. Na postsynaptické membráně moduluje postsynaptický signál (Franklin, Asatryan et al. 2014). P2X₄ receptory jsou exprimovány aktivovanými mikroglie, které reagují na poškození nervových buněk. Předpokládá se tedy, že P2X₄ se uplatňují při chronické neuropatické bolesti (Schwab, Guo et al. 2005).

P2X₄ receptory podstupují konstitutivní internalizaci z plazmatické membrány, podobně jako P2X₁ a P2X₃. Kompletní homotrimerní P2X₄ receptory jsou z ER přes *trans* Golgiho aparát dominantně transportovány do pozdních endozomů a lysozomů (Murrell-Lagnado and Robinson 2013). V současné době není jasné, jestli P2X₃ a P2X₄ receptory musí projít plazmatickou membránou, nebo jsou transportovány z *trans* Golgiho aparátu přímo do pozdních endozomů a lysozomů. Doposud nebyl vysvětlen ani důvod jejich směřování do pozdních endozomů a lysozomů. Lysozomy byly popsány jako důležité zásobárny Ca²⁺ iontů (Churchill, Okada et al. 2002, Kilpatrick, Magalhaes et al. 2016). Možným vysvětlením pro směřování Ca²⁺ vysoce propustných P2X₄ receptorů do lysozomů je jejich zapojení do regulace toku Ca²⁺ iontů mezi cytosolem a lumen lysozomů.

Konstitutivní endocytóza P2X₄ receptorů je proces závislý na dynaminu a klathrinu. Použitím mutantního dynaminu-1(K44A) došlo k navýšení počtu P2X₄ receptorů na plazmatické membráně, což byl důsledek inhibice na dynaminu dependentní endocytózy (Bobanovic, Royle et al. 2002). Stejný vliv na navýšení povrchově exprimovaných P2X₄ receptorů mělo použití inhibitoru endocytózy dynasoru (Boumechache, Masin et al. 2009).

Na C-konci P2X₄ receptoru byl popsán kanonický YXXV motiv a nekanonický YXXGL motiv. Mutace Y372 obsaženého v YXXV motivu nezměnila míru endocytózy receptoru. Naopak mutace Y387 obsaženého v YXXGL motivu míru endocytózy značně zmenšila. Mutace Y367A a K371A v okolí YXXGL motivu způsobily nefunkčnost receptoru. Nekanonický YXXGL motiv se ukázal být klíčovým pro transport P2X₄ receptoru do lysozomů (Royle, Qureshi et al. 2005).

Na endocytóze P2X₄ receptoru se podílejí adaptorové proteiny, konkrétně AP-2. AP-2 se pomocí μ 2 podjednotky váže na YXXGL motiv P2X₄ receptoru. AP-2 dále zprostředkovává vazbu na klathrin (Owen, Collins et al. 2004). Internalizace P2X₄ receptoru může být také regulována vysokou aktivitou protein kinázy A (PKA). Předpokládá se, že zvýšená hladina cAMP snižuje míru endocytózy fosforylací AP-2 (Brown and Yule 2010).

Na N-konci P2X₄ receptoru byl popsán motiv L²² I²³, který je podobný dileucinovým motivům zodpovědným za přímý transport batterin proteinu z *trans* Golgiho aparátu do

lysozomu (Kyttala, Ihrke et al. 2004). Mutacemi v motivu L²² I²³ se zvýšila hladina P2X₄ receptorů na plazmatické membráně. Tím byla potvrzena jeho důležitá role v transportu P2X₄ receptorů do lysozomů (Qureshi, Paramasivam et al. 2007).

Hladina P2X₄ receptorů v plazmatické membráně může být navýšena i lysozomální exocytózou. K ní dochází například při zvýšené hladině Ca²⁺ iontů v cytosolu. Vzhledem k vysoké permeabilitě P2X₄ receptoru pro Ca²⁺ ionty můžeme předpokládat, že existuje pozitivní zpětná vazba vyvolaná aktivací receptoru (Qureshi, Paramasivam et al. 2007).

Na rozdíl od P2X₃ receptorů, P2X₄ receptory jsou stabilní a nejsou v lysozomech degradovány. Proti degradaci jsou chráněny N-glykosylací v oblasti mezi TM doménami receptoru (Murrell-Lagnado and Robinson 2013).

3.2.2.1.1.5 P2X5 receptor

P2X₅ receptor byl poprvé izolován ze sympatických ganglií potkana (Collo, North et al. 1996). Jeho výskyt byl popsán v buňkách CNS, brzlíku, močového měchýře, močovodu, střeva, nadledvin, kosterní svaloviny a srdeční svaloviny (Meyer, Groschel-Stewart et al. 1999, Lee, Bardini et al. 2000, Ryten, Dunn et al. 2002, Gayle and Burnstock 2005). Jejich výskyt byl zaznamenán také v proliferujících kožních buňkách a diferencujících svalových buňkách (Greig, Linge et al. 2003, Calvert, Shabbir et al. 2004).

Podjednotka P2X₅ receptoru je tvořena 455 aminokyselinami. Charakteristické znaky P2X₅ receptoru jsou jeho rychlá aktivace a velmi pomalá napěťově závislá desenzitizace (Collo, North et al. 1996). Zvláštní vlastností P2X₅ receptoru je jeho relativně vysoká propustnost pro Cl⁻ ionty (Bo, Kim et al. 2003). Agonisté P2X₅ receptoru seřazeni podle účinnosti jsou: ATP, 2-meSATP, ATPγS, BzATP a αβ-meATP (Coddou, Yan et al. 2011). Výčet nejsilnějších antagonistů P2X₅ receptoru je uveden v tabulce 2

Fyziologické funkce P2X₅ receptoru nebyly dosud dobře popsány, soudí se, že mohou hrát roli při regulaci buněčné proliferace a diferenciaci kosterního svalstva a kůže (Ryten, Dunn et al. 2002, Calvert, Shabbir et al. 2004).

V 85% lidské populace je syntetizována zkrácená verze P2X₅ receptoru, která postrádá část korespondující s exonem 10 (Bo, Jiang et al. 2003). Zkrácená verze receptoru postrádá část C-konce a část TM2 domény, což má za následek neschopnost správného skládání do homotrimerů (Duckwitz, Hausmann et al. 2006, Murrell-Lagnado and Qureshi 2008). P2X₅ receptor se často vyskytuje v heteromerním P2X_{1/5} stavu.

Přestože správně složené P2X₅ receptory mohou být transportované na plasmatickou membránu, místem jejich primárního výskytu je ER. U potkana byla na C-konci receptoru

popsána sekvence Arg⁴⁰⁴-Val-Arg, podobná sekvence Arg⁴⁰⁴-Val-His byla popsána u myši. Tento RXR motiv zodpovědný za setrvávání P2X₅ receptorů v ER byl nalezen i u dalších iontových kanálů (Ma and Jan 2002, Bo, Kim et al. 2003). Mutace v RXR motivu však způsobila jen minimální přírůstek P2X₅ receptorů na plazmatické membráně. P2X₅ receptory neprochází konstitutivní endocytózou.

3.2.2.1.1.6 P2X6 receptor

P2X₆ receptor byl poprvé izolován z mozku potkana (Soto, Garcia-Guzman et al. 1996). Výskyt P2X₆ receptorů byl popsán v mozečku, hippokampu, Purkyňových buňkách, slinných žlázách, a v buňkách kosterního a srdečního svalstva (Collo, North et al. 1996, Worthington, Dutton et al. 1999, Bobanovic, Royle et al. 2002).

Podjednotka P2X₆ receptoru je tvořena 379 aminokyselinami (Kaczmarek-Hájek, Lőrinczi et al. 2012). Jako jediné ze skupiny P2X receptorů, P2X₆ podjednotky nejsou schopny vytvořit funkční homotrimery. Podjednotky P2X₆ zůstávají nefunkční v ER. P2X₆ podjednotky se v plazmatické membráně vyskytují ve formě P2X_{2/6} a P2X_{4/6} heteromerů, které se podobají svými vlastnostmi P2X₂, respektive P2X₄, podjednotkám (Bobanovic, Royle et al. 2002). Nefunkční P2X₆ receptor se podařilo exprimovat na plazmatickou membránu díky rozsáhlé N-glykosylaci (Jones, Vial et al. 2004). Na N-konci P2X₆ receptoru byl popsán region obsahující 14 aminokyselin, který neobsahuje žádná další P2X podjednotka. Tento region může být zodpovědný za znemožnění skládání do trimerního stavu a omezení transportu do plazmatické membrány. Jeho odstraněním je umožněna glykosylace podjednotek a jejich transport na buněčný povrch (Ormond, Barrera et al. 2006).

3.2.2.1.1.7 P2X7 receptor

P2X₇ receptor byl poprvé izolován z mozku potkana (Surprenant, Rassendren et al. 1996). P2X₇ receptor se vyskytuje v především v buňkách imunitního systému, konkrétně v makrofázích, lymfocytech, mikroglíích a žírných buňkách (Collo, Neidhart et al. 1997).

Podjednotka P2X₇ receptoru se skládá z 595 aminokyselin. Obsahuje prodloužení o stovku aminokyselin na C-konci a je tak nejdelší z celé P2X rodiny. Charakteristická pro P2X₇ receptor je jeho nízká senzitivita k nukleotidům. Desenzitizace receptoru je pomalá, může být ovlivněna extracelulárními kationty (Surprenant, Rassendren et al. 1996). Agonisté P2X₇ receptoru seřazeni podle účinnosti jsou: BzATP, 2-meSATP, βγ-meATP, αβ-meATP a ATP (Coddou, Yan et al. 2011). Výčet nejsilnějších antagonistů P2X₁ receptoru je uveden

v tabulce 2. Při dlouhodobém působení agonisty se P2X₇ receptor stává propustným pro velké organické kationty.

P2X₇ receptor ovlivňuje mnoho fyziologických procesů. Aktivací kaspázy-1 zprostředkovává uvolňování cytokinů, například interleukinu-1 β (IL-1 β) (Verhoef, Estacion et al. 2003). P2X₇ receptor je někdy označován jako receptor smrti, jeho dlouhodobou stimulací se je spuštěna apoptotická kaskáda (North 2002). Skrze stimulaci IL-1 β P2X₇ receptor výrazně ovlivňuje neurodegradaci (Allan and Rothwell 2001).

Kompletně složené P2X₇ receptory jsou primárně lokalizovány na ER. Podobně jako u P2X₂ receptorů je jejich transport a akumulace v plazmatické membráně relativně pomalý proces (Murrell-Lagnado and Robinson 2013). Transport P2X₇ receptorů buňkou se liší podle buněčného typu. V monocytech a lymfocytech se vyskytují především v intracelulárním prostředí, naopak v makrofázích se vyskytují dominantně v plazmatické membráně (Kim, Spelta et al. 2001). Během transportu intracelulárním prostorem P2X₇ receptor interaguje s řadou dalších proteinů, například s HSP90, které ovlivňují funkční vlastnosti receptoru (Adinolfi, Kim et al. 2003). Na C-konci P2X₇ receptoru byla popsána konzervovaná sekvence umístěná mezi aminokyselinami 573–590, která je velmi podobná vazebné sekvenci nalezené u lipopolysacharid vázícího proteinu (lipopolysaccharide binding protein; LPB). Tato sekvence ovlivňuje lokalizaci receptoru v membráně interakcí s fosfolipidy (Denlinger, Fisette et al. 2001). Mutacemi C572, N574, a F581 byla prokázána důležitost této sekvence, mutantní receptory nebyly schopny transportu do membrány. Funkčnost a transport P2X₇ receptoru ovlivňuje také polymorfismus na pozici 1729T→A cDNA. Ten se projevuje změnou izoleucinu na asparagin na pozici 568 v oblasti C-konce P2X₇ receptoru (Wiley, Dao-Ung et al. 2003). Receptory s touto mutací nejsou schopné transportu do membrány (Denlinger, Sommer et al. 2003). P2X₇ receptory jsou v plazmatické membráně relativně stabilní a prokazují jen velmi malou míru internalizace.

4 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo popsat transport purinergních P2X receptorů buňkou. Transportní mechanismy se u jednotlivých podjednotek P2X receptorů různí. P2X₁ receptory jsou vysoce mobilní, podstupují konstitutivní endocytózu a mohou být recyklovány zpět na membránu. P2X₂ receptory konstitutivní endocytózu nepodstupují, jsou primárně lokalizovány na ER a jejich transport na plazmatickou membránu je velmi pomalý. P2X₃ receptory jsou z plazmatické membrány internalizovány do pozdních endozomů a lysozomů,

kde dochází k jejich degradaci. P2X₄ receptory jsou primárně směřovány do lysozomů, odkud mohou být recyklovány na membránu. V lysozomech jsou chráněny před degradací N-glykosylací. P2X₅ podjednotka se u člověka vyskytuje ve zkrácené verzi, která není za fyziologických podmínek schopná transportu do plazmatické membrány. P2X₆ podjednotka jako jediná není schopna správného složení do trimerního stavu a na plazmatické membráně se objevuje pouze v podobě heteromerů. P2X₇ receptory jsou primárně lokalizovány na ER, jejich charakteristickou vlastností je pomalý transport buňkou a pomalá akumulace v endoplazmatické membráně.

Jedinou doposud objevenou všem P2X receptorům společnou sekvencí ovlivňující transport je YXXXXK motiv umístěný na C-konci, který stabilizuje receptory v membráně. U většiny podjednotek byly popsány další, nekanonické, aminokyselinové sekvence ovlivňující jejich transport.

Během transportu buňkou interagují P2X receptory s mnoha dalšími proteiny, které kromě transportu samotného ovlivňují míru jejich exprese, aktivitu a rychlost desenzitizace. V plazmatické membráně se P2X receptory často nachází v lipidových raftech, míra asociace s lipidovými rafty se u jednotlivých podjednotek různí.

Mechanismy transportu P2X receptorů buňkou jsou v současné době popsány jen na velmi základní úrovni a v budoucnosti bude nutné jejich další zkoumání. P2X receptory figurují například ve vnímání bolesti, v neurodegenerativních procesech, arterioskleróze nebo při imunitních zánětlivých reakcích. Dalším studiem jejich transportních mechanismů můžeme prohloubit současné znalosti a přispět k objevu nových poznatků, které mohou pomoci při zdokonalování léčby lidských onemocnění.

5 Seznam použité literatury

Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1998). "Purinergic signalling: pathophysiological roles." Jpn J Pharmacol **78**(2): 113-145.

Abbracchio, M. P., et al. (2009). "Purinergic signalling in the nervous system: an overview." Trends in Neurosciences **32**(1): 19-29.

Adinolfi, E. and M. Kim, et al. (2003). "Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X7 receptor complex negatively regulates P2X7 receptors." J Biol Chem **278**(39): 37344-37351.

Allan, S. M. and N. J. Rothwell (2001). "Cytokines and acute neurodegeneration." Nat Rev Neurosci **2**(10): 734-744.

Allsopp, R. C. and U. Lalo, et al. (2010). "Lipid raft association and cholesterol sensitivity of P2X1-4 receptors for ATP: chimeras and point mutants identify intracellular amino-terminal residues involved in lipid regulation of P2X1 receptors." J Biol Chem **285**(43): 32770-32777.

Arabi, A. A. and C. F. Matta (2009). "Where is Electronic Energy Stored in Adenosine Triphosphate?" Journal of Physical Chemistry A **113**(14): 3360-3368.

Bergfeld, G. R. and T. Forrester (1992). "RELEASE OF ATP FROM HUMAN ERYTHROCYTES IN RESPONSE TO A BRIEF PERIOD OF HYPOXIA AND HYPERCAPNIA." Cardiovascular Research **26**(1): 40-47.

Bo, X. and L. H. Jiang, et al. (2003). "Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor." Mol Pharmacol **63**(6): 1407-1416.

Bo, X. and M. Kim, et al. (2003). "Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody." Cell Tissue Res **313**(2): 159-165.

Bo, X. and Y. Zhang, et al. (1995). "A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile." FEBS Letters **375**(1): 129-133.

Bobanovic, L. K. and S. J. Royle, et al. (2002). "P2X Receptor Trafficking in Neurons Is Subunit Specific." The Journal of Neuroscience **22**(12): 4814-4824.

Bodin, P. and G. Burnstock (2001). "Purinergic signalling: ATP release." Neurochem Res **26**(8-9): 959-969.

Bolego, C., Ceruti, S., et al. (1997). "Characterization of the signalling pathways involved in ATP and basic fibroblast growth factor-induced astrogliosis." British Journal of Pharmacology **121**(8): 1692-1699.

Bonifacino, J. S. and L. M. Traub (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." Annu Rev Biochem **72**: 395-447.

- Boue-Grabot, E., et al. (2000). "A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels." J Biol Chem **275**(14): 10190-10195.
- Boumechache, M. and M. Masin, et al. (2009). "Analysis of Assembly and Trafficking of Native P2X4 and P2X7 Receptor Complexes in Rodent Immune Cells." J Biol Chem **284**(20): 13446-13454.
- Brake, A. J. and M. J. Wagenbach, et al. (1994). "New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor." Nature **371**(6497): 519-523.
- Brown, D. A. and D. I. Yule (2010). "Protein Kinase A Regulation of P2X(4) Receptors: Requirement for a Specific Motif in the C-terminus." Biochimica et biophysica acta **1803**(2): 275-287.
- Browne, L. E. and L. H. Jiang, et al. (2010). "New structure enlivens interest in P2X receptors." Trends in Pharmacological Sciences **31**(5): 229-237.
- Buell, G. and A. D. Michel, et al. (1996). "P2X1 receptor activation in HL60 cells." Blood **87**(7): 2659-2664.
- Burnstock, G. (1972). "Purinergetic nerves." Pharmacol Rev **24**(3): 509-581.
- Burnstock, G. (1977). "The purinergetic nerve hypothesis." Ciba Found Symp(48): 295-314.
- Burnstock, G. (2004). "Cotransmission." Curr Opin Pharmacol **4**(1): 47-52.
- Burnstock, G. (2006a). "Historical review: ATP as a neurotransmitter." Trends Pharmacol Sci **27**(3): 166-176.
- Burnstock, G. (2006b). "Pathophysiology and therapeutic potential of purinergetic signaling." Pharmacol Rev **58**(1): 58-86.
- Burnstock, G. (2009). "Purinergetic cotransmission." F1000 Biology Reports **1**: 46.
- Calvert, R. C. and M. Shabbir, et al. (2004). "Immunocytochemical and pharmacological characterisation of P2-purinoceptor-mediated cell growth and death in PC-3 hormone refractory prostate cancer cells." Anticancer Res **24**(5a): 2853-2859.
- Clyne, J. D. and L. F. Wang, et al. (2002). "Mutational Analysis of the Conserved Cysteines of the Rat P2X₂ Purinoceptor." The Journal of Neuroscience **22**(10): 3873-3880.
- Coddou, C. and Z. Yan, et al. (2011). "Activation and Regulation of Purinergetic P2X Receptor Channels." Pharmacological Reviews **63**(3): 641-683.
- Coddou, C., et al. (2015). "Role of domain calcium in purinergetic P2X2 receptor channel desensitization." American Journal of Physiology - Cell Physiology **308**(9): C729-C736.
- Collo, G. and S. Neidhart, et al. (1997). "Tissue distribution of the P2X7 receptor." Neuropharmacology **36**(9): 1277-1283.

Collo, G. and R. A. North, et al. (1996). "Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels." J Neurosci **16**(8): 2495-2507.

Corriden, R. and P. A. Insel (2010). "Basal Release of ATP: An Autocrine-Paracrine Mechanism for Cell Regulation." Science Signaling **3**(104): re1-re1.

Cotrina, M. L. and J. H. Lin, et al. (2000). "ATP-mediated glia signaling." Journal of Neuroscience **20**(8): 2835-2844.

Denlinger, L. C. and P. L. Fiset, et al. (2001). "Cutting Edge: The Nucleotide Receptor P2X₇ Contains Multiple Protein- and Lipid-Interaction Motifs Including a Potential Binding Site for Bacterial Lipopolysaccharide." The Journal of Immunology **167**(4): 1871-1876.

Denlinger, L. C. and J. A. Sommer, et al. (2003). "Mutation of a Dibasic Amino Acid Motif Within the C Terminus of the P2X₇ Nucleotide Receptor Results in Trafficking Defects and Impaired Function." The Journal of Immunology **171**(3): 1304-1311.

Dhulipala, P. D. K. and Y. X. Wang, et al. (1998). "The human P2X4 receptor gene is alternatively spliced." Gene **207**(2): 259-266.

Donnelly-Roberts, D. and S. McGaraughty, et al. (2008). "Painful purinergic receptors." J Pharmacol Exp Ther **324**(2): 409-415.

Drury, A. N. and A. Szent-Györgyi (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." The Journal of Physiology **68**(3): 213-237.

Duckwitz, W. and R. Hausmann, et al. (2006). "P2X5 subunit assembly requires scaffolding by the second transmembrane domain and a conserved aspartate." J Biol Chem **281**(51): 39561-39572.

Ennion, S. J. and R. J. Evans (2001). "Agonist-stimulated internalisation of the ligand-gated ion channel P2X1 in rat vas deferens." FEBS Letters **489**(2-3): 154-158.

Evans, R. J. and C. Lewis, et al. (1995). "Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors)." Mol Pharmacol **48**(2): 178-183.

Fabbretti, E., et al. (2006). "Delayed Upregulation of ATP P2X₃ Receptors of Trigeminal Sensory Neurons by Calcitonin Gene-Related Peptide." The Journal of Neuroscience **26**(23): 6163-6171.

Ferguson, D. R., Kennedy, I., et al. (1997). "ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes - a possible sensory mechanism?" Journal of Physiology-London **505**(2): 503-511.

Fountain, S. J. and G. Burnstock (2009). "An evolutionary history of P2X receptors." Purinergic Signalling **5**(3): 269-272.

Franklin, K. M. and L. Asatryan, et al. (2014). "P2X4 receptors (P2X4Rs) represent a novel target for the development of drugs to prevent and/or treat alcohol use disorders." Frontiers in Neuroscience **8**: 176.

Gayle, S. and G. Burnstock (2005). "Immunolocalisation of P2X and P2Y nucleotide receptors in the rat nasal mucosa." Cell Tissue Res **319**(1): 27-36.

Gendreau, S. and J. Schirmer, et al. (2003). "Identification of a tubulin binding motif on the P2X2 receptor." Journal of Chromatography B **786**(1-2): 311-318.

Giniatullin, R. and E. Sokolova, et al. (2003). "Modulation of P2X3 receptors by Mg²⁺ on rat DRG neurons in culture." Neuropharmacology **44**(1): 132-140.

Gottesman, S. and M. R. Maurizi (1992). "REGULATION BY PROTEOLYSIS - ENERGY-DEPENDENT PROTEASES AND THEIR TARGETS." Microbiological Reviews **56**(4): 592-621.

Greig, A. V. and C. Linge, et al. (2003). "Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells." J Invest Dermatol **121**(2): 315-327.

He, M. L. and A. Gonzalez-Iglesias, et al. (2005). "Release and extracellular metabolism of ATP by ecto-nucleotidase eNTPDase 1-2 in hypothalamic and pituitary cells." Purinergic Signalling **1**(2): 135-144.

Holton, F. A. and P. Holton (1954). "The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings." The Journal of Physiology **126**(1): 124-140.

Holton, P. (1959). "The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves." The Journal of Physiology **145**(3): 494-504.

Hou, Z. and J. Cao (2016). "Comparative study of the P2X gene family in animals and plants." Purinergic Signal **12**(2): 269-281.

Housley, G. D. and R. Kanjhan, et al. (1999). "Expression of the P2X₂ Receptor Subunit of the ATP-Gated Ion Channel in the Cochlea: Implications for Sound Transduction and Auditory Neurotransmission." The Journal of Neuroscience **19**(19): 8377-8388.

Hu, H. and M. F. Hoylaerts (2010). "The P2X1 ion channel in platelet function." Platelets **21**(3): 153-166.

Chaumont, S. and V. Compan, et al. (2008). "Regulation of P2X2 Receptors by the Neuronal Calcium Sensor VILIP1." Science signaling **1**(41): ra8-ra8.

Chaumont, S. and L. H. Jiang, et al. (2004). "Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors." J Biol Chem **279**(28): 29628-29638.

Churchill, G. C. and Y. Okada, et al. (2002). "NAADP mobilizes Ca²⁺ from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs." Cell **111**(5): 703-708.

Jiang, R. and A. Taly, et al. (2013). "Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors." Trends Biochem Sci **38**(1): 20-29.

Jo, Y. H. and L. W. Role (2002). "Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons." Journal of Neuroscience **22**(12): 4794-4804.

Jones, C. A. and C. Vial, et al. (2004). "Functional Regulation of P2X₆ Receptors by *N*-Linked Glycosylation: Identification of a Novel $\alpha\beta$ -Methylene ATP-Sensitive Phenotype." Mol Pharmacol **65**(4): 979-985.

Kaczmarek-Hájek, K. and E. Lörinczi, et al. (2012). "Molecular and functional properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges." Purinergic Signalling **8**(3): 375-417.

Kawate, T. and J. C. Michel, et al. (2009). "Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state." Nature **460**(7255): 592-598.

Kellenberger, S. and T. Grutter (2015). "Architectural and Functional Similarities between Trimeric ATP-Gated P2X Receptors and Acid-Sensing Ion Channels." Journal of Molecular Biology **427**(1): 54-66.

Kennedy, C. (2015). "ATP as a cotransmitter in the autonomic nervous system." Autonomic Neuroscience **191**: 2-15.

Khakh, B. S. (2001). "Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses." Nat Rev Neurosci **2**(3): 165-174.

Khakh, B. S. and T. M. Egan (2005). "Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X₂ channel permeability dynamics." J Biol Chem **280**(7): 6118-6129.

Khakh, B. S. and R. A. North (2006). "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease." Nature **442**(7102): 527-532.

Khakh, B. S. and W. R. Proctor, et al. (1999). "Allosteric control of gating and kinetics at P2X₄ receptor channels." J Neurosci **19**(17): 7289-7299.

Kilpatrick, B. S. and J. Magalhaes, et al. (2016). "Endoplasmic reticulum and lysosomal Ca²⁺ stores are remodelled in GBA1-linked Parkinson disease patient fibroblasts." Cell Calcium **59**(1): 12-20.

Kim, M. and V. Spelta, et al. (2001). "Differential assembly of rat purinergic P2X₇ receptor in immune cells of the brain and periphery." J Biol Chem **276**(26): 23262-23267.

Koizumi, S., et al. (2003). "Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(19): 11023-11028.

Koizumi, S. and Y. Shigemoto, et al. (2007). "UDP acting at P2Y₆ receptors is a mediator of microglial phagocytosis." Nature **446**(7139): 1091-1095.

- Kyttala, A. and G. Ihrke, et al. (2004). "Two motifs target Batten disease protein CLN3 to lysosomes in transfected nonneuronal and neuronal cells." Mol Biol Cell **15**(3): 1313-1323.
- Lalevee, N. and Rogier, N., et al. (1999). "Acute effects of adenosine triphosphates, cyclic 3',5'-adenosine monophosphates, and follicle-stimulating hormone on cytosolic calcium level in cultured immature rat Sertoli cells." Biology of Reproduction **61**(2): 343-352.
- Lalo, U. and R. C. Allsopp, et al. (2010). "P2X1 receptor mobility and trafficking; regulation by receptor insertion and activation." J Neurochem **113**(5): 1177-1187.
- Lalo, U. and S. Jones, et al. (2012). "Heat shock protein 90 inhibitors reduce trafficking of ATP-gated P2X1 receptors and human platelet responsiveness." J Biol Chem **287**(39): 32747-32754.
- Lamont, C. and C. Vial, et al. (2006). "P2X1 receptors mediate sympathetic postjunctional Ca²⁺ transients in mesenteric small arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(6): H3106-3113.
- Langen, P. and F. Hucho (2008). "Karl Lohmann and the discovery of ATP." Angew Chem Int Ed Engl **47**(10): 1824-1827.
- Le Novère, N. and J.-P. Changeux (2001). "LGICdb: the ligand-gated ion channel database." Nucleic Acids Research **29**(1): 294-295.
- Lecut, C. and K. Frederix, et al. (2009). "P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation." J Immunol **183**(4): 2801-2809.
- Lee, H. Y. and M. Barini, et al. (2000). "Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat." J Urol **163**(6): 2002-2007.
- Léon, C. and B. Hechler, et al. (1999). "Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice." Journal of Clinical Investigation **104**(12): 1731-1737.
- Lewis, C. and S. Neidhart, et al. (1995). "Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons." Nature **377**(6548): 432-435.
- Liu, D. M. and D. J. Adams (2001). "Ionic selectivity of native ATP-activated (P2X) receptor channels in dissociated neurones from rat parasympathetic ganglia." J Physiol **534**(Pt 2): 423-435.
- Ma, D. and L. Y. Jan (2002). "ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors." Curr Opin Neurobiol **12**(3): 287-292.
- MacKenzie, A. B. and M. P. Mahaut-Smith, et al. (1996). "Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets." J Biol Chem **271**(6): 2879-2881.

- Masin, M. and D. Kerschensteiner, et al. (2006). "Fe65 interacts with P2X2 subunits at excitatory synapses and modulates receptor function." J Biol Chem **281**(7): 4100-4108.
- Maxfield, F. R. and T. E. McGraw (2004). "Endocytic recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 121-132.
- Meyer, M. P. and U. Groschel-Stewart, et al. (1999). "Expression of two ATP-gated ion channels, P2X5 and P2X6, in developing chick skeletal muscle." Dev Dyn **216**(4-5): 442-449.
- Mitić, N. and M. Valizadeh, et al. (2005). "Human tartrate-resistant acid phosphatase becomes an effective ATPase upon proteolytic activation." Archives of Biochemistry and Biophysics **439**(2): 154-164.
- Mittal, R. and M. Grati, et al. (2016). "Characterization of ATPase Activity of P2RX2 Cation Channel." Frontiers in Physiology **7**: 186.
- Morton-Jones, R. T. and S. M. Vlajkovic, et al. (2015). "Properties of ATP-gated ion channels assembled from P2X2 subunits in mouse cochlear Reissner's membrane epithelial cells." **11**(4): 551-560.
- Murrell-Lagnado, R. and L. Robinson (2013). "The trafficking and targeting of P2X receptors." Frontiers in Cellular Neuroscience **7**(233).
- Murrell-Lagnado, R. D. and O. S. Qureshi (2008). "Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors (Review)." Mol Membr Biol **25**(4): 321-331.
- Newbolt, A. and R. Stoop, et al. (1998). "Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor)." Journal of Biological Chemistry **273**(24): 15177-15182.
- Nicke, A. and H. G. Bäumert, et al. (1998). "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." The EMBO Journal **17**(11): 3016-3028.
- Nobelprize.org (2014). "Fritz Lipmann - Biographical." from http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1953/lipmann-bio.html.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiol Rev **82**(4): 1013-1067.
- O'Connor, S. E. and I. A. Dainty, et al. (1991). "Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies." Trends Pharmacol Sci **12**(4): 137-141.
- Ormond, S. J. and N. P. Barrera, et al. (2006). "An Uncharged Region within the N Terminus of the P2X₆ Receptor Inhibits Its Assembly and Exit from the Endoplasmic Reticulum." Mol Pharmacol **69**(5): 1692-1700.
- Owen, D. J. and B. M. Collins, et al. (2004). "Adaptors for clathrin coats: structure and function." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 153-191.
- Patel, H. H. and P. A. Insel (2009). "Lipid Rafts and Caveolae and Their Role in Compartmentation of Redox Signaling." Antioxidants & Redox Signaling **11**(6): 1357-1372.

Pearson, J. D. and J. L. Gordon (1979). "VASCULAR ENDOTHELIAL AND SMOOTH-MUSCLE CELLS IN CULTURE SELECTIVELY RELEASE ADENINE-NUCLEOTIDES." Nature **281**(5730): 384-386.

Preta, G. and J. G. Cronin, et al. (2015). "Dynasore - not just a dynamin inhibitor." Cell Communication and Signaling : CCS **13**: 24.

Priel, A. and S. D. Silberberg (2004). "Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels." J Gen Physiol **123**(3): 281-293.

Qureshi, O. S. and A. Paramasivam, et al. (2007). "Regulation of P2X₄ receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis." Journal of Cell Science **120**(21): 3838-3849.

Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**(3): 413-492.

Robson, S. C. and Sévigny, J., et al. (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance." Purinergic Signalling **2**(2): 409-430.

Royle, S. J. and O. S. Qureshi, et al. (2005). "Non-canonical YXXGΦ endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors." Journal of Cell Science **118**(14): 3073-3080.

Ryten, M. and P. M. Dunn, et al. (2002). "ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X5 receptor on satellite cells." J Cell Biol **158**(2): 345-355.

Saul, A. and R. Hausmann, et al. (2013). "Heteromeric assembly of P2X subunits." Frontiers in Cellular Neuroscience **7**: 250.

Seguela, P. and A. Hageghi, et al. (1996). "A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain." J Neurosci **16**(2): 448-455.

Shirane, M. and S. Hatakeyama, et al. (1999). "Common pathway for the ubiquitination of IkappaBalpha, IkappaBbeta, and IkappaBepsilon mediated by the F-box protein FWD1." J Biol Chem **274**(40): 28169-28174.

Shrivastava, A. N. and A. Triller, et al. (2011). "Regulation of GABA(A) Receptor Dynamics by Interaction with Purinergic P2X(2) Receptors." J Biol Chem **286**(16): 14455-14468.

Schwab, J. M., L. Guo, et al. (2005). "Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X4 receptor expression." J Neuroimmunol **163**(1-2): 185-189.

Silinsky, E. M. and R. S. Redman (1996). "Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog." J Physiol **492 (Pt 3)**: 815-822.

- Soto, F. and M. Garcia-Guzman, et al. (1996). "Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain." Biochem Biophys Res Commun **223**(2): 456-460.
- Souslova, V. and S. Ravenall, et al. (1997). "Structure and chromosomal mapping of the mouse P2X3 gene." Gene **195**(1): 101-111.
- Surprenant, A. and F. Rassendren, et al. (1996). "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)." Science **272**(5262): 735-738.
- Suttitanamongkol, S. and A. R. Gear, et al. (2000). "Geldanamycin disrupts platelet-membrane structure, leading to membrane permeabilization and inhibition of platelet aggregation." Biochem J **345 Pt 2**: 307-314.
- Toth-Zsamboki, E. and C. Oury, et al. (2003). "P2X1-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation." J Biol Chem **278**(47): 46661-46667.
- Tvrdonova, V. and M. B. Rokic, et al. (2014). "Identification of Functionally Important Residues of the Rat P2X4 Receptor by Alanine Scanning Mutagenesis of the Dorsal Fin and Left Flipper Domains." PLoS ONE **9**(11): e112902.
- Vacca, F., et al. (2009). "Rapid constitutive and ligand-activated endocytic trafficking of P2X receptor." J Neurochem **109**(4): 1031-1041.
- Vacca, F. and M. Giustizieri, et al. (2009). "Rapid constitutive and ligand-activated endocytic trafficking of P2X3 receptor." J Neurochem **109**(4): 1031-1041.
- Valera, S. and N. Hussy, et al. (1994). "NEW CLASS OF LIGAND-GATED ION-CHANNEL DEFINED BY P-2X RECEPTOR FOR EXTRACELLULAR ATP." Nature **371**(6497): 516-519.
- Valera, S. and F. Talabot, et al. (1995). "Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder." Receptors Channels **3**(4): 283-289.
- Verhoef, P. A. and M. Estacion, et al. (2003). "P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release." J Immunol **170**(11): 5728-5738.
- Verkhatsky, A. and G. Burnstock (2014). "Biology of purinergic signalling: its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance." Bioessays **36**(7): 697-705.
- Vial, C. and R. J. Evans (2002). "P2X(1) receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y6-like receptor in arteries." Mol Pharmacol **62**(6): 1438-1445.
- Vial, C. and R. J. Evans (2005). "DISRUPTION OF LIPID RAFTS INHIBITS P2X(1) RECEPTOR MEDIATED CURRENTS AND ARTERIAL VASOCONSTRICTION." J Biol Chem **280**(35): 30705-30711.

- Vial, C. and R. Rigby, et al. (2006). "Contribution of P2X1 receptor intracellular basic residues to channel properties." Biochemical and Biophysical Research Communications **350**(1): 244-248.
- Virginio, C. and A. MacKenzie, et al. (1999). "Pore dilation of neuronal P2X receptor channels." Nat Neurosci **2**(4): 315-321.
- von Kugelgen, I. (2006). "Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes." Pharmacol Ther **110**(3): 415-432.
- Vulchanova, L. and U. Arvidsson, et al. (1996). "Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 8063-8067.
- Waldo, G. L. and T. K. Harden (2004). "Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor." Mol Pharmacol **65**(2): 426-436.
- Webb, T. E. and D. Henderson, et al. (1996). "A novel G protein-coupled P2 purinoceptor (P2Y3) activated preferentially by nucleoside diphosphates." Molecular Pharmacology **50**(2): 258-265.
- Weinhold, K. and U. Krause-Buchholz, et al. (2010). "Interaction and interrelation of P2X7 and P2X4 receptor complexes in mouse lung epithelial cells." Cell Mol Life Sci **67**(15): 2631-2642.
- Wiley, J. S. and L. P. (Wiley, Dao-Ung, et al. (2003). "An Ile-568 to Asn Polymorphism Prevents Normal Trafficking and Function of the Human P2X7 Receptor." Journal of Biological Chemistry **278**(19): 17108-17113.
- Worthington, R. A. and J. L. Dutton, et al. (1999). "Localisation of P2X receptors in human salivary gland epithelial cells and human embryonic kidney cells by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting and immunofluorescence." Electrophoresis **20**(10): 2065-2070.
- Xu, G.-Y. and L.-Y. M. Huang (2004). "Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II potentiates ATP responses by promoting trafficking of P2X receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(32): 11868-11873.
- Yegutkin, G. G. (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1783**(5): 673-694.
- Yegutkin, G. G. (2014). "Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **49**(6): 473-497.
- Zagorodnyuk, V. P. and S. J. Brookes, et al. (2009). "Mechanotransduction and chemosensitivity of two major classes of bladder afferents with endings in the vicinity to the urothelium." The Journal of Physiology **587**(Pt 14): 3523-3538.

Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 299-309.

Zimmermann, H. (2001). "Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature." Drug Development Research **52**(1-2): 44-56.

Zimmermann, H. (2009). "Prostatic acid phosphatase, a neglected ectonucleotidase." Purinergic Signal **5**(3): 273-275.