

Fyziologický ústav AV ČR
Oddělení proteinových struktur

2.lékařská fakulta UK

Studie o účinku ivermektinu na purinergní P2X₄ receptor

Irena Jelínková

Dizertační práce

Školitel: Ing. Jan Teisinger, CSc.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v této práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Praze, dne 26.10.2007

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Haně Zemkové, CSc. za její odborné rady a pomoc, které zásadně přispěly k dokončení této práce. Ráda bych také poděkovala svému školiteli Ing. Janu Teisingerovi, CSc. za jeho odborné rady a podporu, kterou mi během mého postgraduálního studia poskytl. Velmi si cením přístupu obou školitelů, díky němuž jsem se mohla zapojit do projektu purinergních receptorů.

Souhrn

P2X₄ receptor je iontový kanál, jehož ligandem je ATP. Je to jediný savčí purinergní receptor, který může být modulován působením extracelulárně aplikovaného ivermektinu (IVM). IVM je alosterický modulátor, který zvyšuje citlivost P2X₄ receptoru k agonistům, potencuje maximální proudové odpovědi a prodlužuje dobu deaktivace kanálu po odmytí agonisty. V této studii jsme se pokusili lokalizovat vazebné místo pro IVM a pomocí jeho pozitivního alosterického účinku získat nové informace o vztahu struktury a funkce P2X₄ receptoru.

Nejdříve jsme se zaměřili na identifikaci oblastí P2X₄ receptoru a jednotlivých aminokyselinových zbytků, které se podílejí na účincích IVM na otevírání kanálu. K tomuto účelu jsme využili různé chimérické receptory P2X₂ a P2X₄ receptorů a dále také řadu bodových mutantních receptorů. Experimenty s chimérickými receptory ukázaly, že extracelulární sekvence V49-V61, ale ne sekvence V64-Y315, je důležitá pro účinek IVM na deaktivaci kanálu. Receptor-specifické mutace v oblasti transmembránových domén G29-V61 a N338-L358 ukázaly, že také zbytky W50, V61 a V357 hrají roli v účinku IVM na deaktivaci kanálu. Následně jsme také testovali význam všech zbytků v oblasti transmembránových domén. Výsledky cysteinové skenovací mutagenese podpořily naši domněnku o významu zbytku W50 a dále také odhalily důležitost zbytků G29, R33, Q36, L40, V43, V47, N338, G342, L346, A349 a I356 pro vazbu IVM na P2X₄ receptor.

V této studii jsme využili IVM také jako farmakologický nástroj k určení pořadí důležitosti vybraných reziduí v extracelulární doméně pro vazbu ATP a funkci iontového kanálu. Vytvořili jsme alaninové či záchranné mutace zbytků K67, F185, K190, F230, R278, D280, F294, R295 a K313, které jsou považovány za klíčové pro vazbu ATP. Většina těchto mutantních receptorů odpovídala jen velmi málo nebo vůbec na stimulaci ATP, avšak modulační účinek IVM byl u těchto receptorů zachován. U jednotlivých mutací jsme pozorovali v přítomnosti IVM odlišnosti, které naznačily rozdílnou úlohu mutovaných aminokyselinových zbytků ve funkci receptoru. Naše výsledky ukazují, že zbytky K67, R295 a K313 jsou kritické pro vazbu ATP nebo pro otevírání kanálu.

Summary

The P2X₄ receptor is ATP-gated cation channel. It is the only mammalian purinergic receptor which is modulated by extracellularly applied ivermectin (IVM). IVM is an allosteric modulator that has several effects on receptor function: it increases sensitivity to agonists, potentiates maximum current amplitude and prolongs the deactivation kinetics of the channel after agonist washout. The aim of this study was to localize IVM binding site and using its positive allosteric effect to get new information about the structure and function of P2X₄ receptor.

Initially we focused on identification of regions and residues responsible for IVM effect on channel function. We used several chimeras of P2X₂ and P2X₄ receptors and P2X₄ receptors with single point mutation. Experiments with chimeric receptors revealed that extracellular sequence V49-V61 but not the sequence V64-Y315 is important for the effects of IVM on channel deactivation. Receptor-specific alanine mutations placed in transmembrane domains G29-V61 and N338-L358 showed the importance of residues W50, V61 and V357 for IVM effect on channel deactivation. We tested further the importance of all residues in transmembrane domains. Cysteine scanning mutagenesis supported the relevance of previously identified W50 residue and showed the importance of residues G29, R33, Q36, L40, V43, V47, N338, G342, L346, A349 and I356 for the binding of IVM molecule to the P2X₄ receptor.

We used IVM also as a pharmacological tool to evaluate the importance of several ectodomain residues presumably involved in the ATP binding and/or channel gating mechanism. We created alanine and rescue mutations of K67, F185, K190, F230, R278, D280, F294, R295 and K313 residues. The majority of these mutant receptors were low-responsive or non-responsive to ATP, however, the modulatory effect of IVM was preserved. We observed differences in channel characteristics in the presence of IVM which suggested their different role in channel function. The results of our experiments indicate that residues K67, R295 and K313 are critical for ATP binding or channel gating at P2X₄ receptor.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	1
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1	Iontové kanály.....	2
2.2	Purinergní receptory.....	3
2.2.1	P2X receptory	3
2.2.1.1	Struktura.....	3
2.2.1.2	Iontová selektivita.....	6
2.2.1.3	Pór kanálu	9
2.2.1.4	ATP vazebné místo.....	11
2.2.1.5	Kinetika aktivace a deaktivace.....	13
2.2.1.6	Desenzitizace	15
2.2.1.7	Farmakologie	19
2.2.1.8	Regulace.....	20
2.3	P2X ₄ receptor	22
2.3.1	Výskyt a fyziologická úloha	22
2.3.2	Struktura a funkce P2X ₄ receptoru	22
2.3.3	Farmakologická modulace P2X ₄ receptoru	24
2.3.3.1	Ivermektin.....	25
3.	CÍLE PRÁCE	30
4.	MATERIÁL A METODY.....	31
4.1	Molekulárně biologické metody	31
4.1.1	Použité geny a chiméry	31
4.1.2	Roztoky pro transformaci bakterií	32
4.1.3	Agarosová elektroforéza	32
4.1.4	Transformace bakterií	33
4.1.5	Izolace plasmidu a měření koncentrace DNA	33
4.1.6	Polohově řízená mutageneze.....	34
4.2	Tkáňové kultury	36
4.2.1	Roztoky a média pro kultivaci buněk	36
4.2.2	Pasážování buněk.....	36
4.2.3	Transfekce.....	37
4.3	Elektrofyzologie.....	37
4.3.1	Extracelulární a intracelulární roztoky.....	37
4.3.2	Snímání proudových odpovědí	38
4.3.3	Vyhodnocení dat	40
4.4	Konfokální mikroskopie	41
4.4.1	Roztoky pro fixaci preparátů	41
4.4.2	Příprava preparátů a snímání konfokálních obrazů	41
4.5	Počítačové modely	41
5.	VÝSLEDKY	42
5.1	Identifikace oblastí a P2X ₄ receptor-specifických aminokyselinových zbytků přispívajících k účinku ivermektinu na deaktivaci kanálu.....	42
5.1.1	Charakterizace účinku ivermektinu	42
5.1.2	Úloha extracelulární domény	45
5.1.3	Závislost účinku ivermektinu na P2X ₄ receptor-specifických ektodoménových a transmembránových aminokyselinových zbytcích.....	48
5.2	Identifikace zbytků transmembránových domén P2X ₄ receptoru podílejících se na účincích ivermektinu.....	51

5.2.1	Cysteinová skenovací mutageneze TM1	51
5.2.2	Cysteinová skenovací mutageneze TM2	54
5.2.3	Modely helikální struktury TM1 a TM2 a vazebné místo pro ivermektin	58
5.3	Využití modulačního účinku ivermektinu pro zkoumání úlohy aromatických a nabitých aminokyselinových zbytků v ektodoméně P2X ₄ receptoru	60
5.3.1	Charakterizace náhodných mutantních P2X ₄ receptorů	60
5.3.2	Charakterizace lysinových a argininových ektodoménových mutantních receptorů	61
5.3.3	Charakterizace fenylalaninových a aspartátových ektodoménových mutantních receptorů	64
5.3.4	Deaktivační vlastnosti mutantních P2X ₄ receptorů	66
6.	DISKUZE	69
7.	ZÁVĚR	77
8.	LITERATURA	79
9.	PUBLIKACE	86

Seznam zkratek

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolová kyselina
ATP	adenosin-5'-trifosfát
ATP- γ -S	adenosin-5'-O-(3-thiotrifosfát)
BzATP	3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
EC ₅₀	koncentrace účinné látky, při níž je dosaženo poloviny maximálního (potenciačního) účinku
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	glykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GFP	zelený fluorescenční protein
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethansulfonová kyselina)
I _{max}	hodnota maximální proudové odpovědi
IVM	ivermektin
K _d	rovnovážná disociační konstanta
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMDG ⁺	N-methyl-D-glukamin
PBS	fosfáty pufovaný solný roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPADS	pyridoxal-5'-fosfát-6-azo-fenyl-2,4-disulfonát
p _x	koeficient permeability iontu
P2YR	metabotropní purinergní receptory
P2XR	ionotropní purinergní receptory
schP2X	P2X receptor naklonovaný ze <i>Schistosoma mansoni</i>
TM	transmembránová (doména)
TNP-ATP	2', 3'-O-(2,4,6-trinitrofenyl)adenosin-5'-trifosfát

Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
YO-PRO-1 ²⁺	4-[(3-methyl-2(3H)-benzoxazolyliden)methyl]-1-[3-(triethylamonium) propyl] diiodid
α,β -meATP	α,β -methylen-adenosin-5'-trifosfát
β,γ -meATP	β,γ -methylen-adenosin-5'-trifosfát
τ	časová konstanta
2-meSATP	2-methylthio-adenosin-5'-trifosfát

Tab.1 Aminokyseliny

1- písmenný kód	Název aminokyseliny
A	alanin
C	cystein
D	aspartát
E	glutamát
F	fenylalanin
G	glycin
H	histidin
I	isoleucin
K	lysin
L	leucin
M	methionin
N	asparagin
P	prolin
Q	glutamin
R	arginin
S	serin
T	threonin
V	valin
W	tryptofan
Y	tyrosin

1. ÚVOD

Molekula ATP (adenosin-5'-trifosfát) je známa především jako univerzální zdroj energie v různých biologických systémech. Avšak ATP může působit také extracelulárně prostřednictvím tzv. purinergních receptorů, jejichž existence byla s konečnou platností prokázána teprve nedávno, v polovině 90. let 20. století. Podle způsobu funkce rozlišujeme dva typy purinergních receptorů – metabotropní P2Y receptory spřažené s G-proteiny a ionotropní P2X receptory, které tvoří iontový kanál. Purinergní receptory se vyskytují na povrchu buněk různého původu a typu, u organismů na různém stupni vývoje. U obratlovců hrají purinergní receptory roli v nervovém, kardiovaskulárním, respiračním, imunitním, urogenitálním, nervosvalovém a gastrointestinálním systému, ve funkci specializovaných smyslů, a mají význam ve vývoji, ve stáří i v nemocech.

U savců bylo doposud naklonováno 7 různých typů P2X receptorů, označovaných jako P2X₁₋₇. Navzdory skutečnosti, že P2X₄ receptor byl prvním naklonovaným P2X receptorem, je toho o jeho funkci a mechanismu působení známo jen poměrně málo. Je to dáno tím, že po jeho aktivaci následuje poměrně rychlá desenzitizace a jen velmi pomalá resenzitizace, což znesnadňuje analýzu funkčních vlastností tohoto iontového kanálu. P2X₄ receptor je zajímavý také tím, že jako jediný P2X receptor je citlivý k působení alosterického modulátoru ivermektinu (IVM). IVM se používá k léčbě parazitárních onemocnění ve veterinární i humánní medicíně. Bylo zjištěno, že působí jako agonista či alosterický modulátor i na řadu jiných iontových kanálů např. glutamátový receptor, receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou či nikotinový acetylcholinový receptor, avšak u žádného z těchto receptorů nebylo doposud určeno vazebné místo pro IVM.

V této dizertační práci jsem se zaměřila na identifikaci aminokyselinových zbytků, které se podílejí na specifických účincích IVM. Dále jsem využila modulačního účinku IVM ke studiu vazebného místa pro ATP a funkčních vlastností P2X₄ receptora.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Iontové kanály

Iontové kanály jsou buněčné membránové proteiny, které umožňují průchod kladně nebo záporně nabitých iontů ve směru gradientu z jedné strany membrány na druhou. Kanály mají schopnost otevírat se a zavírat, a tak průchod iontů regulovat. Iontové kanály se podílejí na regulaci řady fyziologických funkcí, např. vedení nervového vzruchu, sekreci neurotransmiterů a hormonů, kontrakci svalstva, imunitní odpovědi apod. Kanály se charakterizují na základě svých permeačních vlastností, způsobu regulace otevírání a podle molekulární struktury.

Každý iontový kanál obsahuje ve své struktuře vodný pór, kterým při jeho otevření proudí vybrané ionty. Permeabilita kanálu závisí nejen na velikosti tohoto póru, ale zejména na jeho selektivním filtru. Selektivní filtr se nachází v zúžené oblasti póru a je zpravidla tvořen postranními řetězci polárních či nabitých reziduí, která interagují s vybranými ionty. Aby mohly ionty projít úzkou oblastí póru, musí se zbavit svého hydratačního obalu. To je samozřejmě značně energeticky náročné, takže pouze ty ionty, u nichž následné elektrostatické interakce s postranními řetězci aminokyselinových zbytků kanálu tuto energetickou ztrátu vykompenzují, mohou projít kanálem.

Otevírání kanálů je konformační změna, která je zprostředkována různými podněty. Podle typu podnětu rozdělujeme kanály do dvou velkých skupin – napětím řízené kanály a ligandem otevírané kanály. U napětově řízených kanálů je otevírání vyvoláno změnou v napětí přes membránu, ligandem otevírané kanály se otevírají po navázání příslušného ligandu. K otevření obou typů kanálů může dojít také fosforylací makromolekuly proteinu nebo mechanickým působením.

Ligandem otevírané kanály se dělí do několika skupin podle charakteru ligandu a molekulární struktury. Celkem rozlišujeme tři velké skupiny. První skupina obsahuje nikotinový acetylcholinový receptor (nAChR), receptor typu A pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA_AR) a glycinový receptor. Tyto kanály jsou tvořeny z 5 podjednotek, každá má čtyři transmembránové domény. Druhou skupinu tvoří ionotropní glutamátové receptory: N-methyl-D-aspartátový (NMDA), alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolový (AMPA) a kainátový receptor, které jsou tvořeny ze čtyř podjednotek, každá z nich obsahuje čtyři transmembránové struktury. Poslední skupinu pak tvoří purinergní P2X receptory.

2.2 Purinergní receptory

Purinergní signalizace je mezibuněčný přenos informace molekulami extracelulárního ATP a jiných nukleotidů nebo nukleosidů. Je uskutečňována prostřednictvím dvou zcela odlišných typů receptorů - P1 receptorů (aktivovaných adenosinem) a P2 receptorů (aktivovaných ATP a jeho analogy). P2 receptory se dále dělí na základě své molekulární struktury a mechanismu převodu signálu do dvou skupin – na metabotropní P2Y receptory a ionotropní P2X receptory (Abbracchio and Burnstock 1994).

2.2.1 P2X receptory

2.2.1.1 Struktura

Doposud bylo naklonováno 7 různých podjednotek P2X receptorů označovaných jako P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ a P2X₇ o délce 379-595 aminokyselin (obr. 2.1). Všechny P2X receptory mají podobnou strukturu. Skládají se ze dvou hydrofobních transmembránových úseků (TM1 a TM2) spojených rozsáhlou extracelulární doménou a intracelulárními N- a C- konců (Brake, Wagenbach et al. 1994; Valera, Hussy et al. 1994; Newbolt, Stoop et al. 1998; Torres, Egan et al. 1998). Vzájemná identita jednotlivých podjednotek je 25-48 %.

Všechny P2X receptory jsou, podobně jako většina membránových receptorů, glykosylované. Bylo zjištěno, že glykosylace podjednotek je nezbytná pro tvorbu funkčních receptorů a pro jejich povrchovou expresi (Newbolt, Stoop et al. 1998; Torres, Egan et al. 1998; Rettinger, Aschrafi et al. 2000). V sekvencích P2X receptorů byl identifikován konzervativní motiv pro N-glykosylaci N-X-S/T. Počet těchto míst se u jednotlivých podjednotek liší (P2X₁ – 4, P2X₂ – 3, P2X₃ – 4, P2X₄ – 6, P2X₅ – 2, P2X₆ – 3, P2X₇ – 3 (North 2002)). Bylo prokázáno, že pro vznik funkčního receptoru je postačující glykosylace pouze jednoho konzervativního místa a pro zabudování receptoru do plasmatické membrány glykosylace dvou libovolných míst (Newbolt, Stoop et al. 1998; Rettinger, Aschrafi et al. 2000).

P2X1 MARRLQDELSA-FFFEYDTPRMVLRNKKVGVIFRLIQLVVLVYVIGWVVFVEKGYQTSS 59
P2X2 MVRRLARGCWS-AFWDYETPKVIVVRNRRLGFVHRMVQLLLILLYFVWVYFIVQKSYQDSE 59
P2X3 -----MNCIS-DFFTYETTKSVVVKSWTIGIINRAVQLLLIISYFVGWVFLHEKAYQVRD 53
P2X4 MAGCCSVLG-S-FLFEYDTPRIVLIRSARKVGLMNRVQLLLILAYVIGWVVFWEKGYQETD 58
P2X5 MGQAAWKGFV-LSLFDYKTAKFVVAKSKKVGLLYRVLQLIILLYLLIIVFLIKKSYQDID 59
P2X6 MASAVAAALVSWGFPLDYKTEKYVMTRNCWVGISQRLQLGVLVYVIGWVVFVWVFLAKKGYQEW 60
P2X7 MPACCSWN----DVFQYETNKVTRIQSVNYGTIKWILHMTVFSYVS-FALMSDKLYQRKE 55

P2X1 D-LISSVSVKLKLAVT--QLQGLG-PQ---VWDVADYVFPAGHDSFVVMTNFIVTPQ 111
P2X2 TGPESSIIITKVKGITMS-----EDK-----VWDVEEYVFPPEGGSVVSIITRIEVTPS 107
P2X3 TAIESSVVTKVKGFGRY----ANR-----VMDVSDYVTPPQGTSVFVIITKMIVTEN 101
P2X4 S-VVSSVTTKAKGVAVT--NTSQLG-FR----IWDVADYVIPAQEENSLFIMTNMIVTVN 110
P2X5 TSLQSAVVTKVKGVAYTNTTMLGER-----LWDVADFVIPSQGENVFFVVTNLIIVTPN 112
P2X6 MDPQISVITKLGKGSVTVQVKELEKR-----LWDVADFVIPSQGENVFFLVTNFLVTPA 113
P2X7 -PLISSVHTKVKGVAEVTENVTEGGVTKLVHGI FDTADYTLPLQG-NSFFVMTNLYKSE 113

P2X1 QTQGHCAENPE-GG-ICQDSDGCTPGKAERKAQGIRTGNCPV-FNGTVK-TCEIFGWCPV 167
P2X2 QTLGTCPESEMRVHSSSTCHSDDDCIAGQLDMQNGIRTGHCVYHYHGDSK-TCEVSAWCPV 166
P2X3 QMQGFCPENEEKYR--CVSDSQ--GPERFPGGILTGRCVN-YSSVLR-TCEIQGWCP 155
P2X4 QTQSTCPEIPDKTS-ICNSDADCTPGSVDTHSSGVATGRCVP-FNESVK-TCEVAWCPV 167
P2X5 QRQGI CAEREGIPDGECSDDDC HAGESV VAGHGLKTGRCLR-VGNSTRGTCEIFAWCPV 171
P2X6 QVQGRCPHEPSVPLANWADEDCEPEGEMGYSHGIKTGQCVV-FNGTHR-TCEIWSWCPV 171
P2X7 QEQLKLCPEYPSRGK-QCHSDQGCIKGWMDPQSKGIQTGRCLP-YDQKRK-TCEIFAWCPA 170

P2X1 EVDDKI PSALLREANFTLFIKNSISFPRFKVNRRLNVEEVNGTYMKKCLYHKIQHPLC 227
P2X2 EDG-TSDNHFLGKMAPNFTLIIKNSIHYPKFKFSKGNIASQKSD-YLKHCTFDQSDPYC 224
P2X3 EVD-TVEMPIM-MEAEENFTLFIKNSIRFPLFNFEKGNLLPNLTDKDIKRCRFHPEKAPFC 209
P2X4 ENDVGVPTPAFLKAAENFTLLVKNNIWYPKFNFSKRNI LPNITTSYLKSCIYNAQTDPFC 227
P2X5 ETK-SMPTDLLKDAESFTI SIKNFIRFPKFNFSKANVLETDNKHFLKTCFSSSTN-LYC 229
P2X6 ESS-AVPRKPLLAQAKNFTLFIKNTVTFNKFNFSRTNALDWTWNTYFKYCLYDLSLSSPYC 230
P2X7 BEGKEAPRALRRAENFTVLIKNIIDFPGHNYTTRNILPGMNIS----CTFHKTWNPQC 226

P2X1 PVFNLYGVVRESGQDFRSLAEKGGVVGITIDWKCDLDWHVRHCKPIYQFHGL--YGEKN 284
P2X2 PIFRLGFIVEKAGENFTELAHKGVGIVGIINWNCDDLSESECNPKYSFRRLD--PKYDP 282
P2X3 PILRVGDVVKFAGQDFAKLARTGGVLGKIGWVCDLDKAWDQCIPKYSFTRLDGVSEKSS 269
P2X4 PIFRLGTIVEDAGHSFQEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASLCLPRYSFRRLDTRDLEHN 287
P2X5 PIFRLGSIWRWAGADFQDI ALKGGVIGIYIEWDCDLKAASKCNPHYFNRLDN-KHTHS 288
P2X6 PVFRIGDLVAMTGGDFEDLALLGGAVGINIHWCNLDTKGSDCSPQYSF-QLQE----- 283
P2X7 PIFRLGDI FQEI GENFTEVAVQGGIMGIEIYWDCNLDWSHRCQPKYSFRRLDDKYTNES 286

P2X1 LSPGFNFRFARHFVQ-NGTNRRLHFKVFGIHFIDLVDGKAGKFDIIPMTTITIGSGIGIFG 343
P2X2 ASSGYNFRFAKYKINGTTTTRTLKAYGIRIDVI VHGQAGKFSLIPTIINLATALTSIG 342
P2X3 VSPGYNFRFAKYKIMENGSEYRLLKAFGIRFDVLYGNAGKFNIIPTI ISSVAAFTSVG 329
P2X4 VSPGYNFRFAKYRDLAGKEQRTLT KAYGIRFDIIVFGKAGKFDIIP TMINVGSGLALLG 347
P2X5 ISSGYNFRFARYYRDPNGVEFRDLMKAYGIRFDIIVNGKAGKFSIIP TVINIGSGLALMG 348
P2X6 --RGYNFRTANYWAAASGVESRSLKLYGIRFDILVTGQAGKFA LIPTAITVGTGAALG 341
P2X7 LFPGYNFRYAKYKYE-NGMEKRTLIKAFGVRFDILVFGTGGKFDI IQLVVYIGSTLSYFG 345

P2X1 VATVLCDLLLH-----ILPKRHYYKQKFKYAEDMGPGEHEHPV 384
P2X2 VGSFLCDWILLT-----FMNKNKLYSHKFKDKVRTPKHPSRRWPVTL 384
P2X3 VGTVLCDIILLN-----FLKGADHYKARKFEEVTETTLKGTASTNPV 371
P2X4 VATVLCDVIVLY-----CMKKKYYRDKKYKYVEDYEQGLSGEMNQ 388
P2X5 AGAFFCDLVLIY-----LIRKSEFYRDKKFEKVRGQKEDANVEVEAN 389
P2X6 MVTFLCDL LLLY-----VDREAGFYWRTKYEEARAPKATNSA 379
P2X7 ALTVCIDLINTYASTCCRSRVYPSCKCCEPCAVNEYYYRKKCEPIVEPKPTLKYVSFVD 405

P2X1 ATSSTLGLQENMRTS 399
P2X2 ALVLGQIPPPSHYSQDQPPSPSGEGPTLGEAELPLAVQSFRPCISALTEQVVDTLG 444
P2X3 FASDQ ATVEKQSTDSGAYSIGH 393
P2X5 EMEQERPEDEPLERVRQDEQSQELAQSGRQNSNCQVLEPARFGLRENAIVNVKQSQIL 431
P2X7 EPHIWMVDQQLLKGSLQDVKGQEVPRPQTDFLELSRLSLSLHHSPPIPGQPEEMQLLQIE 466

P2X2 QHMGQRPPVPEPSQDSTSTDPKGLAQL 472
P2X5 HPVKT 455
P2X7 AVPRSRDSPDWCQCGNCLPSQLPENRRALEELCCRKPGQCITTSSELFSKIIVLSREALQL 525

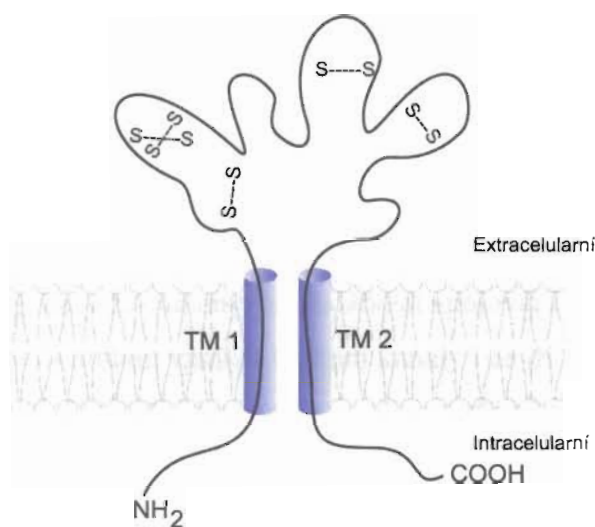
P2X7 LLLYQEPLLALEGEAINSKLRHCAYRSYATWRVFSQDMADFAILPSCCRWKIRKEFPKTQ 585

P2X7 GQYSGFKYPY 595

Obř. 2.1 Porovnání sekvencí podjednotek potkanich P2X receptorů. (převzato z (North 2002))

V extracelulární doméně podjednotek P2X receptorů bylo identifikováno celkem 10 konzervovaných zbytků cysteinů. Jak bylo později prokázáno, tyto cysteiny tvoří intramolekulární disulfidové vazby (Clyne, Wang et al. 2002; Ennion and Evans 2002). Experimentálně byli určeni partneři těchto vazebných interakcí (pro lidský P2X₁ receptor: C117-C165, C126-C149, C132-C159, C217-C227 a C261-C270). Tyto disulfidové můstky se podílejí na tvorbě terciární struktury receptoru.

Funkční receptory se vyskytují ve formě homo- či heterotrimerů (Nicke, Baumert et al. 1998; Stoop, Thomas et al. 1999; Aschrafi, Sadtler et al. 2004; Mio, Kubo et al. 2005). Struktura funkčního kanálu připomíná převrácenou trojbokou pyramidu (Mio, Kubo et al. 2005).



Obr. 2.2 Schématické zobrazení struktury podjednotky P2X receptoru

Torres a kol. ukázali, že pro spojování jednotlivých podjednotek v trimery je kritická druhá transmembránová doména (Torres, Egan et al. 1999). P2X receptory trimerizují kotranslačně v endoplasmatickém retikulu a zůstávají v intracelulárních kompartmentech či plasmatické membráně ve formě trvale vytvořených trimerů. Předpokládá se, že TM2 přispívá k seskupování podjednotek spíše tím, že funguje jako jakási hydrofobní kotva v plasmatické membráně, než tím, že by byla rozpoznávána sousedními podjednotkami. Důležitou úlohu v trimerizaci by mohl hrát zbytek D355 z TM2 (hP2X₅), konzervovaný u všech receptorů, který by mohl iniciovat oligomerizaci transmembránových helixů pomocí vodíkových vazeb (Duckwitz, Hausmann et al. 2006).

Kromě P2X₇ receptoru všechny podjednotky P2X receptorů mohou tvořit homo- i heteromery. V případě P2X₆ podjednotky se dlouho předpokládalo, že se nevyskytuje ve formě homomerů, neboť ve většině studií se nepodařilo získat funkční kanály a v ostatních

vznikaly kanály jen velmi neefektivně. To by mohlo být důsledkem nedostatečného formování receptoru v endoplasmatickém retikulu (Ormond, Barrera et al. 2006) nebo nepřítomností některé nezbytné podjednotky/proteinu pro správné spojování a přesun.

Doposud byly charakterizovány funkčně a biochemicky tyto kombinace heteromerů: P2X₁/P2X₂ (Brown, Townsend-Nicholson et al. 2002), P2X₁/P2X₄ (Nicke, Kerschensteiner et al. 2005), P2X₁/P2X₅ (Torres, Haines et al. 1998; Le, Boue-Grabot et al. 1999; Surprenant, Schneider et al. 2000), P2X₂/P2X₃ (Lewis, Neidhart et al. 1995; Radford, Virginio et al. 1997; Wilkinson, Jiang et al. 2006), P2X₂/P2X₆ (King, Townsend-Nicholson et al. 2000), P2X₄/P2X₆ (Le, Babinski et al. 1998). Tyto studie, s výjimkou jediné, ale nenaznačují, v jakém poměru se jednotlivé podjednotky spojují. Jiang a kol. zjistili, že heteromery P2X₂/P2X₃ se vyskytují ve složení P2X₂(P2X₃)₂ (Jiang, Kim et al. 2003), což bylo později potvrzeno také Wilkinsonem a kol. (Wilkinson, Jiang et al. 2006). Pomocí koimunoprecipitační techniky byla dále naznačena možnost vzniku těchto heteromerů: P2X₁/P2X₃, P2X₁/P2X₆, P2X₂/P2X₅, P2X₃/P2X₅, P2X₄/P2X₅ a P2X₅/P2X₆ (Torres, Egan et al. 1999), ale doposud nebyly farmakologicky charakterizovány. Při studiu heteromultimerizace byly vždy zkoumány jen možnosti spojování dvou různých podjednotek a tak zůstává otázkou, zda-li mohou vznikat funkční kanály i ze tří různých podjednotek.

Bylo zjištěno, že řada buněk exprimuje současně různé typy P2X podjednotek. Jak vyplývá z funkčních studií, mají tyto heteromery jiné farmakologické vlastnosti než homomerní receptory. Tvorba heteromerů je tak zřejmě jedním z možných způsobů, který buňce umožňuje přesnější regulaci funkce receptorů.

2.2.1.2 Iontová selektivita

P2X receptory jsou často označovány jako neselektivní kationtové kanály. To je ale poněkud nepřesné, neboť jak vyplývá z experimentálních studií, jsou některé typy P2X receptorů propustné do značné míry i pro anionty (zejména Cl⁻) a také do určité míry rozlišují mezi jednotlivými kationty.

Selektivita kanálu se určuje buď měřením relativní propustnosti nebo relativní vodivosti pro určité spektrum iontů. Relativní propustnost lze vypočítat z reverzních potenciálů proudů naměřených v roztocích o definovaném iontovém složení pomocí Goldman-Hodgkin-Katzovy rovnice:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{p_K [K^+]_o + p_{Na} [Na^+]_o + p_{Cl} [Cl^-]_i}{p_K [K^+]_i + p_{Na} [Na^+]_i + p_{Cl} [Cl^-]_o} \right),$$

kde V_m je membránový potenciál, R je univerzální plynová konstanta, T je absolutní teplota, F je Faradayova konstanta a p_K , p_{Na} , p_{Cl} značí koeficienty permeability příslušných iontů.

Pro kanály s vazebným místem pro iont v permeační cestě platí, že nejpevněji se vázící iont má nejvyšší propustnost. Relativní vodivost kanálu vyjadřuje, jak ochotně ion prochází pórem, a je určena měřením amplitud proudů jednotlivých kanálů získaných pro srovnatelné hodnoty koncentrací propustných iontů. Může se stát, že pořadí iontů podle relativní vodivosti a relativní propustnosti je odlišné. To může nastat v případě, že afinita vazebného místa pro iont je tak vysoká, že způsobí zpomalení průchodu iontu kanálem. Je tedy vhodné popisovat kanál pomocí obou parametrů (Egan, Samways et al. 2006). Jednotková vodivost P2X₄ receptoru se pohybovala v rozmezí 9-12 pS (Negulyaev and Markwardt 2000; Silberberg, Chang et al. 2005).

Propustnost pro monovalentní kationty (alkalických kovů)

Permeační selektivita P2X receptorů pro kationty alkalických kovů (podle jejich relativní vodivosti i relativní propustnosti) je v tomto pořadí: $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$ ($p_{K/Na} = 1,40$; $p_{Rb/Na} = 1,35$; $p_{Cs/Na} = 1,28$; $p_{Na/Na} = 1,00$; $p_{Li/Na} = 0,83$; hodnoty jsou určeny z proudů jednotlivých kanálů P2X₂ receptorů a vypočteny podle Goldman-Hodgkin-Katzovy rovnice). Toto pořadí je jen lehce odlišné od pořadí relativních pohyblivostí těchto iontů ve vodě, což naznačuje existenci vazebného místa pro ionty o slabé elektrické síle (Ding and Sachs 1999).

Propustnost pro divalentní ionty

P2X receptory jsou propustné také pro Ca^{2+} ionty. Při aktivaci P2X receptorů tak dochází k nárůstu koncentrace volných Ca^{2+} iontů v buňce. Kromě toho se hladina volných Ca^{2+} iontů zvyšuje i prostřednictvím napětově řízených Ca^{2+} kanálů, které se aktivují v důsledku depolarizace membrány vyvolané prouděním iontů skrze P2X receptory. U elektricky neexcitabilních tkání ale postačuje k vyvolání biologické odpovědi zvýšení koncentrace Ca^{2+} zprostředkované pouze P2X receptory (Egan, Samways et al. 2006). Relativní propustnost Ca^{2+} byla stanovena na základě měření celkového proudu za současného určení velikosti proudu zprostředkovaného Ca^{2+} ionty (pomocí fluorescenčního

měření). Bylo zjištěno, že podíl Ca^{2+} proudu na celkovém proudu se pohybuje v rozmezí od 2,7 % (P2X_3) až po 12,4 % (P2X_1) (Egan and Khakh 2004).

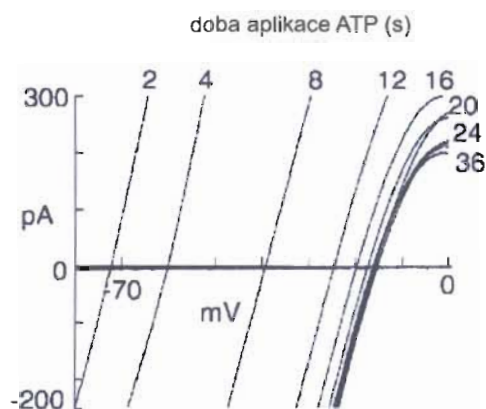
Propustnost pro anionty

Některé typy P2X receptorů, zejména P2X_5 receptor, jsou propustné i pro anionty. Poprvé byla tato skutečnost pozorována Humem a kol. při zkoumání ATP evokovaných bifazických odpovědí na kultivovaných kuřecích embryonálních prsních svalech (Thomas and Hume 1990). Později bylo zjištěno, že i lidský P2X_5 receptor je značně propustný pro Cl^- ionty ($p_{\text{Cl}/\text{Na}} = 0,5$) (Bo, Jiang et al. 2003).

Propustnost pro větší kationty a anionty

Některé P2X receptory (P2X_2 , P2X_4 , P2X_5 , P2X_7) jsou propustné nejen pro monovalentní a divalentní kationty, ale také pro větší organické ionty jako např. NMDG^+ , ethidium⁺ nebo YO-PRO-1^{2+} (obr. 2.3.). Vykazují tak několik vodivostních stavů definovaných pomocí různých relativních propustností pro tyto veliké ionty. Kanál ve stavu označovaném jako O_1 , má průměr póru okolo 8 Å (P2X_7) až 11 Å (P2X_2) a $p_{\text{NMDG}/\text{pNa}} 0,03$ (Evans, Lewis et al. 1996; Virginio, MacKenzie et al. 1999; Eickhorst, Berson et al. 2002). Druhý vodivostní stav je označován jako O_2 a průměr póru kanálu je větší minimálně o 3 Å (měřeno pro P2X_2) (Eickhorst, Berson et al. 2002). V případě receptoru P2X_7 může dosáhnout průměru dokonce až 40 Å. Hodnota $p_{\text{NMDG}/\text{pNa}}$ tohoto stavu je 0,34 (P2X_2) až 0,48 (P2X_7).

Zajímavé je, že v případě P2X_2 , P2X_4 a P2X_7 receptoru je nárůst v permeabilitě pro větší ionty vyvolán opakovanými aplikacemi ATP (Khakh, Bao et al. 1999; Virginio, MacKenzie et al. 1999; Virginio, MacKenzie et al. 1999), zatímco P2X_5 receptor je propustný pro tyto ionty okamžitě a s prodlužující dobou působení ATP se propustnost již nemění (Bo, Jiang et al. 2003).



Obr. 2.3 Časově závislé změny propustnosti P2X₂ receptoru exprimovaného v buňkách HEK293.

V průběhu delšího působení (40s) 100 μM ATP dochází k postupné změně reverzního potenciálu v roztoku obsahujícím Na⁺/NMDG⁺, což naznačuje obrovský nárůst v propustnosti pro NMDG⁺ ionty.

Nárůst permeability u P2X₂, P2X₄ a P2X₇ receptorů je doprovázen dilatací póru, jež je závislá na koncentraci agonisty, takže vyšší koncentrace agonisty vyvolá vyšší rychlost dilatace (Virginio, MacKenzie et al. 1999; Virginio, MacKenzie et al. 1999).

Relativní propustnost pro větší ionty je do značné míry závislá na subtypu P2X receptoru, což vede k otázce, zda jednotlivé typy receptorů nepřechází ze stavu O₁ do O₂ odlišnými způsoby. Tento přechod by mohl být uskutečňován následujícími způsoby: 1) dilatací existujícího póru, 2) shlukováním a následnou oligomerizací existujících monomerních kanálů (klastrováním) za vzniku nového póru a 3) aktivací jiné odlišné vodivé dráhy. Druhá možnost se zdá být velmi nepravděpodobná, neboť ke změně stechiometrie kanálu pravděpodobně nedochází. Navíc bylo prokázáno, že P2X₂ receptor, který vykazuje propustnost pro větší ionty, neklastruje. Otázka, zda je zvýšená propustnost zprostředkována dilatací existujícího póru nebo zapojením jiné vodivé dráhy, musí být ještě řádně prozkoumána, neboť existují experimentální data potvrzující obě hypotézy (Eickhorst, Berson et al. 2002; Fisher, Girdler et al. 2004; Jiang, Rassendren et al. 2005; Egan, Samways et al. 2006).

2.2.1.3 Pór kanálu

Vodivost a permeabilita iontových kanálů závisí nejen na velikosti jejich vodivého póru, ale také na selektivním filtru. Všeobecně se předpokládá, že pór P2X kanálů je tvořen hydrofobními transmembránovými úseky proteinu. Bylo uskutečněno několik experimentů

na P2X₂ a P2X₄ receptorech s cílem zjistit, jaké je uspořádání transmembránových domén a jaká je úloha jednotlivých aminokyselinových zbytků (Rassendren, Buell et al. 1997; Egan, Haines et al. 1998; Haines, Migita et al. 2001; Haines, Voigt et al. 2001; Jiang, Rassendren et al. 2001; Li, Migita et al. 2004; Khakh and Egan 2005; Silberberg, Chang et al. 2005). Výsledky ukazují, že pór kanálu je pravděpodobně tvořen oběma transmembránovými doménami, u trimerního receptoru tedy celkem z šesti transmembránových úseků, což by bylo v souladu s obecnou hypotézou, že na tvorbě póru selektivního pro kationty se podílí více jak 3 transmembránové domény. Skutečné uspořádání domén není známé, nicméně existuje domněnka, že TM2 směřuje více dovnitř póru, naopak TM1 směřuje vně. TM1 a TM2 sousedních podjednotek musí být u vnější strany membrány v těsném kontaktu, neboť byla prokázána možnost tvorby disulfidové vazby mezi V48C a I328C (P2X₂ receptor) (Jiang, Rassendren et al. 2001; Khakh and Egan 2005). U většiny iontových kanálů mají úseky protínající cytoplasmatickou membránu a podílející se na tvorbě póru strukturu α -helixu. Výsledky experimentů naznačují, že i TM1 P2X receptorů by mohla mít helikální uspořádání. U TM2 však helikální uspořádání dosud prokázáno nebylo, snad jen s výjimkou horní části této domény (Rassendren, Buell et al. 1997; Egan, Haines et al. 1998; Li, Migita et al. 2004; Silberberg, Chang et al. 2005).

Je zatím nejasné, které aminokyselinové zbytky se přímo podílejí na tvorbě póru. Bylo provedeno sice několik studií, ale jejich výsledky se mnohdy dosti odlišují. Výsledky alaninové skenovací mutagenese P2X₂ receptoru naznačují, že TM1 zbytky F31, R33 a Q37 by mohly hrát roli v dilataci póru (Khakh and Egan 2005). Horní část TM1, zejména zbytky Y43 a F44, významně ovlivňovala citlivost P2X₂ receptoru k ATP (Haines, Migita et al. 2001; Li, Migita et al. 2004). S ohledem na svoji pozici a konzervovanost u všech typů P2X receptorů by TM2 zbytek G342 (P2X₂ číslování) mohl fungovat jako jakýsi pant, který leží uprostřed na rozhraní vnitřní a vnější části póru, a umožňuje otevírání a zavírání kanálu (Egan, Haines et al. 1998; Li, Migita et al. 2004; Khakh and Egan 2005).

Důležitou součástí póru je selektivní filtr, který je v podstatě vazebné místo pro ionty. Migita a kol. zjistili pomocí polohově řízené mutagenese, že záměna zbytků T339 a S340 (P2X₂ receptor) způsobuje změnu sekvence propustností pro alkalické ionty na pořadí odpovídající relativní pohyblivosti iontů ve vodě. Navíc nahrazením zbytků T336, T339 a S340 různými jinými aminokyselinami se podařilo specificky změnit propustnost kanálu pro Ca²⁺ ionty. Lze se tedy domnívat, že tyto, a pravděpodobně ještě některé další, polární zbytky aminokyselin se podílejí na tvorbě vazebného místa (selektivního filtru), které dočasně váže ionty při jejich průchodu pórem kanálu. Vazba iontu na toto místo by mohla působit jako

jakýsi zdroj náboje, který umožňuje procházejícím iontům zbavit se hydratačního obalu, který jim jinak brání v průchodu pórem (Migita, Haines et al. 2001). Podle jiné hypotézy by zvýšená propustnost P2X₁ a P2X₄ receptorů pro Ca²⁺ ionty mohla souviset s konzervovanými nabitými zbytky glutamátu, který se nachází u konce první, a aspartátu, který se nachází u začátku druhé transmembránové domény. Avšak i receptory P2X₃ a P2X₇, které mají relativně nízkou Ca²⁺ propustnost, mají v podobných pozicích kyselý zbytek (Egan, Samways et al. 2006), takže otázka mechanismu vzniku Ca²⁺ propustnosti zůstává otevřena.

Úloha jednotlivých zbytků bude jistě v budoucnosti ještě zkoumána, ale již nyní je zřejmé, že oba TM úseky hrají důležitou úlohu ve funkci kanálu, a že mutace v této oblasti výrazným způsobem ovlivňují vlastnosti receptoru včetně jeho citlivosti k ATP.

2.2.1.4 ATP vazebné místo

Všeobecně se předpokládá, že se ATP váže v extracelulární doméně P2X receptoru. Receptory se však v citlivosti k ATP liší (Gever, Cockayne et al. 2006) a zůstává otázkou, zdali jsou jejich ATP vazebná místa stejná. Struktura tohoto vazebného místa nebyla ale zatím určena u žádného z P2X receptorů. Řada proteinů, které mají schopnost vázat ATP, tak činí prostřednictvím tzv. Walker motivu. Ten však u P2X receptorů chybí. U některých proteinů, které také nemají Walker motiv, je ATP koordinováno často prostřednictvím lysinových (pozn. lysinový zbytek je také obsažen ve Walker motivu), fenylalaninových či argininových zbytků. Proto byly tyto aminokyseliny testovány pro svůj možný podíl na vazbě ATP také v případě P2X receptorů. Bylo vytvořeno několik experimentálních a teoretických modelů ATP vazebného místa. Evans a kol. vytvořili model na základě dat z polohově řízené mutagenese lidského P2X₁ receptoru a krystalové struktury potkaního synapsinu II, u kterého byl popsán podobný způsob uspořádání residuí koordinujících vazbu ATP. V tomto modelu je adeninový kruh molekuly ATP koordinován motivy F185-T186 a N290-F291-R292, konzervovanými u všech savčích P2X receptorů. Kladně nabitě zbytky K68 a K309 koordinují vazbu záporně nabitých β- a γ-fosfátových skupin. R292 pak interaguje s α-fosfátem (Ennion, Hagan et al. 2000; Roberts and Evans 2004; Vial, Roberts et al. 2004; Roberts and Evans 2006; Roberts, Vial et al. 2006).

Další, tentokrát teoretické modely, navrhlí Freist a kol. (Freist, Verhey et al. 1998) a Mager a kol. (Mager, Weber et al. 2004). Freist se svými spolupracovníky vytvořil model na základě podobnosti sekvence a sekundární struktury mezi extracelulární doménou P2X

podjednotek a katalytickým centrem aminoacyl-tRNA syntetáz třídy II. Této podobnosti využili také Stojilkovic a kol. (Yan, Liang et al. 2005). S využitím krystalových struktur tRNA syntetáz jako templátu, vytvořili nový 3D model ATP vazebného místa P2X₄ receptoru, který následně experimentálně ověřili. Tento model se do značné míry shoduje s modelem Freista, ale v několika ohledech se liší. D280 koordinuje vazbu Mg²⁺, F230 vazbu adeninového kruhu a K190 vazbu α-fosfátu, podobně jako je tomu u Freistova modelu, ale β-fosfát a γ-fosfát je koordinován pomocí H286 a R278 (v tomto pořadí). R318, který byl navržen Freistem pro interakci s γ-fosfátem, má význam pro převod signálu z vazebného místa směrem k druhé transmembránové doméně (Yan, Liang et al. 2005). K313 P2X₄ receptoru hraje podle Yanova modelu významnou roli ve funkci receptoru, ale nepodílí se přímo na vazbě fosfátového řetězce ATP (Yan, Liang et al. 2006), jak je to navrženo v Evansově modelu.

V některých bodech se práce kolektivů Evanse a Stojilkovice shodují. Např. mutace K190 u lidského P2X₁ měla za následek snížení citlivosti receptoru k ATP. Podobně tomu bylo i v případě mutace korespondujícího zbytku (K188) u potkaního P2X₂ receptoru (Jiang, Rassendren et al. 2001). Na druhou stranu mutace F230 a R314 (ekvivalent R318 P2X₄) u lidského P2X₁ receptoru neměla žádný vliv na účinnost ATP (Ennion, Hagan et al. 2000; Roberts and Evans 2004).

Řada proteinů, které interagují s ATP, jej váže ve formě komplexů s Mg²⁺ ionty. Vazba Mg²⁺ je zahrnuta ve Freistově a Yanově modelu, ale nikoli v Evansově. Evans a kol. dospěli na základě experimentálních dat k závěru, že komplex ATP s Mg²⁺ ionty není pro vazbu na P2X₁ receptor důležitý (Ennion, Ritson et al. 2001). Je zajímavé, že výsledky experimentálních dat získaných pro P2X₂ receptor jsou z části v souladu s výsledky získanými pro P2X₄ receptor a z části pro P2X₁ receptor. Mutace F227 (ekvivalent F230 P2X₄) vedla u P2X₂ receptoru ke změně citlivosti (Nakazawa, Ojima et al. 2004). Na druhé straně ale mutace K69, K71, R290 a K308 (K68, K70, R291 a K309 P2X₁ receptoru) měly podobný vliv na účinek ATP jako tomu bylo v případě P2X₁ receptoru (Jiang, Rassendren et al. 2000). Je tedy patrné, že jednotlivé modely se sice v některých ohledech shodují, ale v mnoha se liší. Tato skutečnost by mohla být vysvětlena tím, že tyto modely byly vytvořeny pro různé typy P2X receptorů a ty se liší svým ATP vazebným místem. V současné době se také zdá, že jedna podjednotka nestačí ke zmapování celé oblasti vazby ATP (viz dále). Yanův model je navíc modelem pouze druhé poloviny extracelulární domény (úsek K180-K326) a neobjasňuje význam první poloviny extracelulární domény, která je součástí

Evansova modelu. Přesnou strukturu vazebného místa pro ATP budeme tedy znát až po objasnění krystalové struktury P2X receptoru.

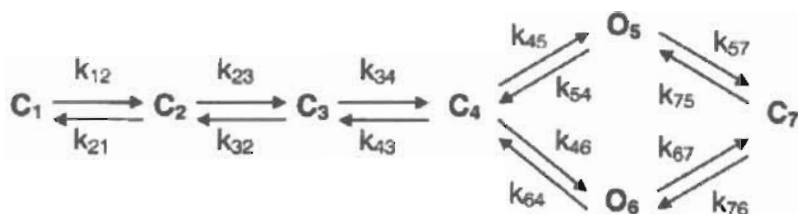
Jak bylo zmíněno výše (kapitola.2.2.1), funkční kanály jsou trimerní. Každý kanál tedy obsahuje celkem 3 ATP vazebná místa, pro funkčnost kanálu je však postačující obsazení pouze dvou vazebných míst ligandem (Wilkinson, Jiang et al. 2006; Marquez-Klaka, Rettinger et al. 2007). Dlouhou dobu se diskutovalo, zda jsou tato vazebná místa lokalizována v rámci jedné podjednotky, nebo zda se nachází na rozhraní sousedících podjednotek jako je tomu u některých iontových kanálů (např. nACh receptor). Výsledky posledních studií naznačují, že vazebná místa pro ATP se nachází pravděpodobně mezi podjednotkami. V tomto případě by se na tvorbě vazebné kapsy mohla podílet residua K69 a K308 (P2X₂ číslování). Součástí této kapsy by mohl být i zbytek F291 (P2X₂ číslování) (Marquez-Klaka, Rettinger et al. 2007).

2.2.1.5 Kinetika aktivace a deaktivace

Iontové kanály se mohou vyskytovat v otevřeném, zavřeném nebo desenzitizovaném stavu. Přechod mezi jednotlivými stavy popisujeme pomocí několika pojmů jako je aktivace, deaktivace, desenzitizace, resenzitizace.

Aktivace ligandem otevíraných kanálů zahrnuje vazbu agonisty a konformační změny, které vedou k otevření kanálu. Koncentračně závislý účinek agonisty je charakterizován Hillovou rovnicí a koncentrace, při které bylo dosaženo poloviny maximální odpovědi (EC₅₀) se pro různé receptory liší. Deaktivace je proces opačný. Při deaktivaci dochází k uzavření kanálu a disociaci agonisty z vazebného místa. Deaktivace nedesenzitizujících P2X receptorů může probíhat dvěma způsoby, kterými jsou: 1) pomalý přechod kanálu (závislý na typu kanálu) z otevřeného stavu do uzavřeného následovaný rychlou disociací agonisty z receptoru nebo 2) rychlé uzavření kanálu následované pomalou disociací agonisty z receptoru. Otázkou zůstává, který z kroků je rychlost limitující (Rettinger and Schmalzing 2004). Měřítkem deaktivace je rychlost poklesu proudů po odmytí agonisty charakterizovaná časovou konstantou deaktivace τ_{off} . U P2X receptorů byla pozorována inverzní korelace mezi hodnotami τ_{off} a hodnotami EC₅₀ agonistů (Rettinger and Schmalzing 2004; Zemkova, He et al. 2004). Zdá se tedy, že na deaktivaci P2X receptorů se podílí především odvazování agonisty.

Bylo vytvořeno již několik kinetických modelů popisujících přechod z uzavřeného stavu do otevřeného stavu P2X₂ kanálů. Dosud nejlepší model navrhli Ding a Sachs na základě měření charakteristik jednotlivých P2X₂ kanálů v membránách (outside out patches) HEK293 buněk a oocytů *Xenopus laevis*. Tento model zahrnuje 5 uzavřených a 2 otevřené stavy a je schématicky znázorněn na obr. 2.4 (Ding and Sachs 1999).



Obr. 2.4 Kinetický model P2X₂ receptoru.

C označuje uzavřený stav, O označuje otevřený stav. (Ding and Sachs 1999)

Podle tohoto modelu předchází otevření kanálu postupné navázání 3 molekul ATP (uzavřené stavy C₂, C₃, a C₄), přičemž vazebná místa pro ATP nejsou nezávislá, ale pozitivně kooperativní. Kanál se otevírá pouze tehdy, má-li všechna vazebná místa obsazena. Z modelu je dále zřejmé, že se kanál může vyskytovat ve 2 různých otevřených stavech (O₅ a O₆), na který navazuje jeden stav uzavřený (C₇), který je necitlivý k ATP. Z modelu také vyplývá, že aktivace a deaktivace kanálu probíhá stejnou cestou. Model je však nedokonalý, jednak v něm není zahrnuta desenzitizace (viz kapitola 2.2.1.6.) a je v rozporu s nedávnými výsledky, podle kterých může k otevření kanálu docházet i tehdy, pokud nejsou všechna ATP vazebná místa obsazena (Wilkinson, Jiang et al. 2006).

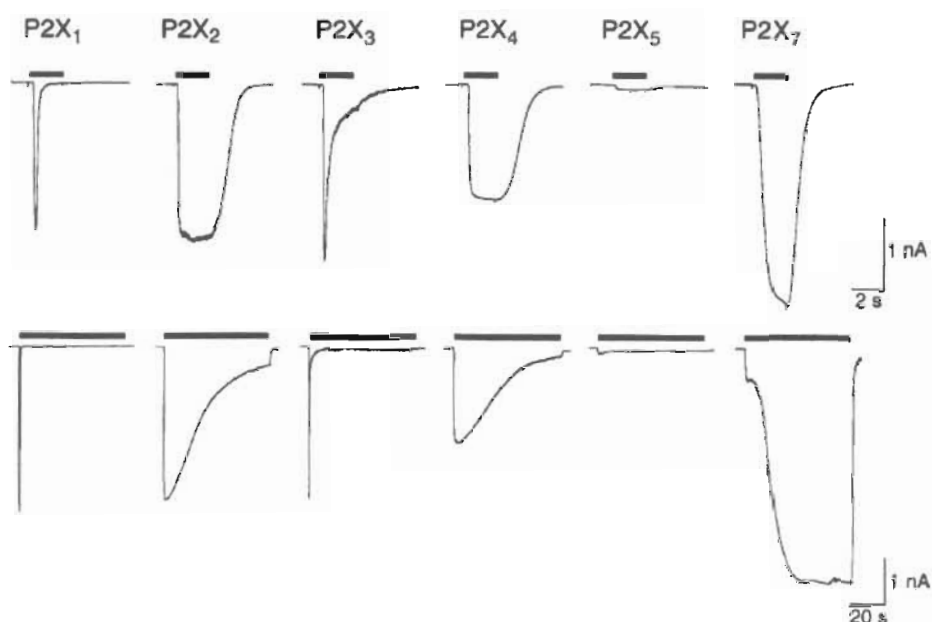
Výsledky experimentů dále ukázaly, že v závislosti na membránovém potenciálu se měnila střední doba otevření a zavření kanálu, z čehož plyne, že rychlostní konstanty otevření a zavření jsou napětově závislé, nicméně tato závislost je malá. Platí, že pravděpodobnost výskytu kanálu v otevřeném stavu klesá s depolarizací. Bylo také potvrzeno, že s rostoucí koncentrací agonisty se zvyšuje pravděpodobnost, že se kanál nachází v otevřeném stavu, přičemž maximální hodnota P_o je 0,61 a u P2X₂ kanálů je jí dosaženo již při koncentraci 30 μM ATP. Skutečnost, že hodnota P_o je takto nízká, naznačuje, že rychlost zavírání je větší než rychlost otevírání. Jak bylo prokázáno, nárůst hodnoty pravděpodobnosti P_o s rostoucí koncentrací agonisty je důsledkem snížení průměrné doby zavření kanálů a ne prodloužením průměrné doby otevření. To by naznačovalo, že ATP kontroluje rychlost otevírání kanálu, ale ne jeho zavírání. Hodnoty Hillova koeficientu a EC₅₀ určené z koncentrační závislosti

pravděpodobnosti otevírání byly srovnatelné s hodnotami velikosti odpovědi naměřenými při snímání z celých buněk (Ding and Sachs 1999).

Vazba agonisty a následné otevírání a zavírání kanálu je spojené s řadou konformačních změn, které se ale zatím nepodařilo popsat. Haines a kol. vytvořili na základě výsledků s chimerními receptory, u nichž byla zaměněna TM1, hypotézu, podle níž by TM1 sloužila jako převodní cesta mezi navázáním agonisty a otevřením kanálu. Při navázání agonisty do vazebného místa dochází ke změnám ve struktuře ektodomény, které jsou pak dále převedeny na TM1, která poté interaguje s TM2, což má za následek posun TM2 a tedy otevření kanálu (Haines, Migita et al. 2001). Na otevírání kanálu se podílejí obě transmembránové domény. Vzájemnou interakci TM domén při otevírání kanálu dokládá pozorování, že mezi V48C a I328C (P2X₂ číslování) se může vytvářet disulfidová vazba, která má za následek vznik konstitutivně otevřeného kanálu (Jiang, Rassendren et al. 2001; Khakh and Egan 2005). Během otevírání dochází k největším změnám v oblasti vnějších částí transmembránových úseků Y42-V47 a T335-L346 (P2X₄ číslování) (Silberberg, Chang et al. 2005).

2.2.1.6 Desenzitizace

V dlouhodobé přítomnosti agonisty se stávají P2X receptory odolné vůči stimulaci a dochází k poklesu buněčné odpovědi. Tento proces, zvaný desenzitizace, je důsledkem toho, že ligandem obsazené kanály přechází do stabilní konformace, v níž je propustnost pro ionty zablokována nebo změněna. Jednotlivé podtypy P2X receptorů se liší rychlostí desenzitizace: P2X₁ a P2X₃ receptory desenzitizují rychle (t.j. v řádu milisekund), P2X₄ a P2X₆ receptory desenzitizují středně rychle (v řádu několik sekund) a P2X₂, P2X₅ a P2X₇ receptory desenzitizují pomalu nebo nedesenzitizují vůbec (He, Koshimizu et al. 2002) (obr. 2.5). Heteromerní receptory se liší desenzitizací od homomerních receptorů svých podjednotek.



Obr. 2.5 Desenzitizace P2X receptorů pozorovaná při krátkodobé (nahore) a dlouhodobé (dole) stimulaci ATP. Rychlá desenzitizace byla pozorována při 2 s stimulaci suprarnaximální koncentrací ATP (30 μ M ATP) u P2X₁ a P2X₃ receptoru. Pomalá desenzitizace byla pozorována u P2X₂ a P2X₄ receptoru při stimulaci po dobu 60 s. V případě P2X₇ receptoru nedochází k desenzitizaci ani v přítomnosti 1 mM ATP. U P2X₅ receptoru se rychlost desenzitizace nepodařilo zjistit (North 2002).

Molekulární mechanismus desenzitizace P2X receptorů a návratu z desenzitizovaného stavu (resenzitizace) nebyl zatím úplně popsán (Lewis, Neidhart et al. 1995; Koshimizu, Koshimizu et al. 1999). Experimentální data ukazují, že se jedná o složitý proces, na němž se mohou podílet různé části receptoru, a že resenzitizace neprobíhá mechanismem obrácené desenzitizace (Zemkova, He et. al. 2004). Na základě dosavadních výsledků byly navrženy 2 hypotézy desenzitizace. První vychází ze struktury kanálu a druhá pak z činnosti intracelulárních přenašečů.

Různé laboratoře se ve svých pokusech zaměřily na zjištění významu jednotlivých částí receptoru pro jeho desenzitizaci. Werner a spol. dospěli na základě experimentů s chimérami P2X₂ a P2X₁ nebo P2X₃ receptoru k závěru, že pro zrychlenou desenzitizaci je nezbytná interakce mezi transmembránovými úseky (Werner, Seward et al. 1996). Tato hypotéza by byla v souladu s pozorováním, že heteromery desenzitizují jiným způsobem než homomerní receptory jejich podjednotek. Velká pozornost byla také věnována významu C-konce. Bylo objeveno, že různé sestříhové varianty P2X₂ receptoru, lišící se délkou C-konce, desenzitizují různou rychlostí. Sestříhová varianta označovaná jako P2X_{2b} receptor, které chybí úsek 69 aminokyselin v oblasti C-konce (V370-Q438), vykazovala ve srovnání

s nezkrácenou variantou receptoru P2X₂, též označovanou jako P2X_{2a}, výrazně zrychlenou desenzitizaci (Brandle, Spielmanns et al. 1997; Koshimizu, Tomic et al. 1998). Využitím polohově řízené mutagenese se pak podařilo identifikovat několik zbytků v oblasti C-konce, které by mohly být zodpovědné za průběh desenzitizace P2X₂ receptoru. (Koshimizu 1998, Zhou 1998, Smith 1999). Koshimizu a kol. ukázali, že segment R371-P376 na C-konci je kritický pro rozvoj pomalého způsobu desenzitizace P2X_{2a} receptoru (Koshimizu, Tomic et al. 1998). Smith a spolupracovníci dospěli k podobným závěrům, když prokázali, že přítomnost úseku 9 aminokyselin od V370 je dostatečná k průběhu desenzitizace, jaká je pozorována u P2X_{2a} receptoru (Smith, Humphrey et al. 1999). Změny ve struktuře C-konce mohou ovlivňovat desenzitizaci také u P2X₁, P2X₃ a P2X₄ receptorů. V případě P2X₁ a P2X₃ receptoru se na průběhu desenzitizace podílí i jiné části receptoru (Koshimizu, Koshimizu et al. 1999).

Podobně jako u řady jiných ligandem otevíraných kanálů, také extracelulární doména hraje roli v rychlosti desenzitizace P2X receptorů. Stabilita desenzitizovaného stavu je ovlivňována N-polovinou ektodomény, zatímco na stabilizaci otevřeného konformačního stavu se podílí C-polovina ektodomény (Zemkova, He et al. 2004). Tuto hypotézu také podporují experimenty s chimérami variant P2X₂ receptorů s ektodoménou P2X₃, P2X₄ a P2X₇ receptoru, které ukazují na vzájemné propojení mezi ektodoménou a C-koncem při desenzitizaci. Průběh desenzitizace závislé na C-konci totiž závisí na vazebné afinitě ligandu a na jeho aktivační účinnosti. Agonisté s vysokou potencí vyvolají C-koncem kontrolovanou desenzitizaci, ale agonisté s nízkou potencí toto nedokáží. Zdá se tedy, že konformační změny vyvolané vazbou agonisty nejsou někdy postačující ke spuštění C-koncem kontrolované desenzitizace. P2X receptory desenzitizují koncentračně závislým způsobem, takže s rostoucí koncentrací agonisty vzrůstá rychlost desenzitizace (He, Koshimizu et al. 2002; He, Zemkova et al. 2003). Koncentrační závislost desenzitizace a vliv ektodomény na průběh desenzitizace byly pozorovány i u jiných typů kanálů jako např. AMPA receptoru, glutamátového receptoru (typu 6). Je zřejmé, že ektodoména může ovlivňovat desenzitizaci také nezávisle na C-konci, ale mechanismus působení není znám (He, Zemkova et al. 2003). Lze se domnívat, že by zde mohla být určitá souvislost s ATP vazebným místem. Mutace aminokyselinových zbytků K68, K70 a K309 (P2X₁ číslování), o nichž se předpokládá, že přispívají k tvorbě ATP vazebného místa na P2X₁ a P2X₂ receptoru, se totiž projevila změnou rychlosti desenzitizace (Ennion, Hagan et al. 2000; Jiang, Rassendren et al. 2000).

Také vápník a jiné divalentní kationty ovlivňují rychlost desenzitizace a resenzitizace v nativních i rekombinantních receptorech (Cook, Rodland et al. 1998; Ding and Sachs 2000).

Druhá hypotéza předpokládá, že desenzitizace může být regulována také procesy buněčné signalizace. Některé studie ukázaly na možnou regulaci desenzitizace P2X receptorů aktivitou proteinkinázy C, a to buď prostřednictvím fosforylace na N-konci (v místě vysoce konzervovaného místa pro proteinkinázu C) nebo prostřednictvím fosforylace asociovaného proteinu (Fountain and North 2006). Všechny P2X receptory mají v oblasti N-konce konzervativní místo TXK/R (T18) pro proteinkinázu C. Fosforylace threoninu proteinkinázou C zpomaluje desenzitizaci P2X₁ a P2X₂ receptoru (Boue-Grabot, Archambault et al. 2000; Paukert, Osteroth et al. 2001; Ennion and Evans 2002). Kromě konzervovaného místa pro proteinkinázu C se nachází v sekvenci P2X₂ receptoru v oblasti C-konce ještě místo pro proteinkinázu A. Výsledky experimentů naznačují, že účinek proteinkinázy A a proteinkinázy C na průběh desenzitizace P2X₂ receptoru je opačný, neboť fosforylace receptoru proteinkinázou A desenzitizaci urychluje (Chow and Wang 1998; Boue-Grabot, Archambault et al. 2000).

Na základě experimentů s P2X₁ receptorem navrhli Rettinger a kol. model popisující průběh desenzitizace, podle kterého receptor přechází do desenzitizovaného stavu výhradně z otevřeného stavu (Rettinger and Schmalzing 2004). Průběh návratu receptoru z desenzitizovaného stavu byl doposud prozkoumán jen z malé části. Návrat z desenzitizovaného stavu je zřejmě strukturně závislý na jiných částech receptoru, než jsou úseky zodpovědné za desenzitizaci (Fabbretti, Sokolova et al. 2004; Zemkova, He et al. 2004). Resenzitizace probíhá bez otevření kanálu přímo z desenzitizovaného do uzavřeného stavu (Rettinger and Schmalzing 2004) a předpokládá se, že je dvoustupňová. V prvním kroku se pomalu odvazuje agonista, přičemž tento krok limituje rychlost resenzitizace. V druhém kroku pak dochází k rychlé konformační změně, která je na agonistovi nezávislá. Vazebné místo pro ligand je vysokoafinitní a je v desenzitizovaném stavu exponované. Navázáním drží agonista receptor v desenzitizovaném stavu. Rychlost odvazování agonisty určuje rychlost návratu z desenzitizace. Jestliže má agonista nižší afinitu pro vazebné místo, probíhá resenzitizace receptoru rychleji. Navíc je potřeba vyšších koncentrací k tomu, aby agonista udržel receptor v desenzitizovaném stavu (Pratt, Brink et al. 2005). Návrat z desenzitizovaného stavu může být urychlen také přítomností extracelulárních Ca²⁺ iontů. Tato vlastnost, unikátní pro P2X₃ receptor, je zprostředkována několika záporně nabitými nekonzervovanými aminokyselinovými zbytky v extracelulární části receptoru (Fabbretti, Sokolova et al. 2004).

2.2.1.7 Farmakologie

Receptory lze podle citlivosti k různým ATP agonistům rozdělit do 3 skupin. První skupinu tvoří P2X₁ a P2X₃ receptory. Je pro ně charakteristická vysoká citlivost k $\alpha\beta$ -meATP ve srovnání s ostatními P2X receptory (Evans, Lewis et al. 1995; Garcia-Guzman, Stuhmer et al. 1997; Bianchi, Lynch et al. 1999). Vůbec nejúčinnějším agonistou je u těchto receptorů 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP (BzATP) (Bianchi, Lynch et al. 1999). Mezi další agonisty patří také 2-methylthioATP (2-meSATP), adenosin-5'-O-(3-thio)trifosfát (ATP- γ -S), β,γ -methylenATP (β,γ -meATP) (Evans, Lewis et al. 1995; Garcia-Guzman, Stuhmer et al. 1997), v případě P2X₁ receptoru sem lze zařadit i adenosin-5'-hexafosfát, a jako parciální agonisty i adenosin-5'-pentafofát a adenosin-5'-tetrafofát (Wildman, Brown et al. 1999). P2X₁ a P2X₃ receptory lze vzájemně odlišit pomocí β,γ -meATP. Citlivost P2X₁ receptoru k β,γ -meATP je srovnatelná s citlivostí k α,β -meATP, avšak citlivost P2X₃ receptoru k β,γ -meATP je jen 30-50% (Evans, Lewis et al. 1995; Garcia-Guzman, Stuhmer et al. 1997). P2X₁ a P2X₃ receptory jsou oba citlivé k působení klasických P2X inhibitorů – suraminu a pyridoxal-5'-fosfát-6-azo-fenyl-2,4-disulfonátu (PPADS) (Evans, Lewis et al. 1995; Garcia-Guzman, Stuhmer et al. 1997). V nedávné době byly připraveny účinnější deriváty těchto látek (např. NF279, MRS2220), které vykazují větší selektivitu pro P2X₁ receptor (Rettinger, Schmalzing et al. 2000; Gever, Cockayne et al. 2006). Kromě těchto látek, inhibičně působí také 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenyl)adenosin-5'-trifosfát (TNP-ATP) a jiné deriváty TNP-nukleosidtrifosfátů, přičemž jejich selektivita pro P2X₁ receptoru a P2X₃ receptor je výrazně vyšší než pro ostatní P2X receptory (Virginio, Robertson et al. 1998).

Do druhé skupiny lze na základě vzájemné podobnosti zařadit P2X₂, P2X₄ a P2X₅ receptory. Nejúčinnějším agonistou této skupiny je ATP (Soto, Garcia-Guzman et al. 1996; Lynch, Touma et al. 1999; Gever, Cockayne et al. 2006). Receptory mohou být dále stimulovány pomocí 2-meSATP (Lynch, Touma et al. 1999; Jones, Chessell et al. 2000; Bo, Jiang et al. 2003). V případě P2X₂ receptoru je agonistou také ATP- γ -S, adenosin-5'-tetrafofát a částečně i BzATP (Lynch, Touma et al. 1999). P2X₄ receptor může být stimulován prostřednictvím CTP a také adenosin-5'-tetrafofátu (Jones, Chessell et al. 2000). P2X₅ receptor je také citlivý k BzATP (Bo, Jiang et al. 2003). K methylenovým derivátům ATP jsou receptory této skupiny obecně necitlivé s výjimkou P2X₄ receptoru, na který působí α,β -meATP jako parciální agonista (Buell, Lewis et al. 1996; Soto, Garcia-Guzman et al. 1996; Garcia-Guzman, Soto et al. 1997). Dosud není znám žádný dostatečně účinný ani selektivní inhibitor P2X₂ receptoru. PPADS, TNP-ATP či reaktivní modř sice inhibují P2X₂

receptor, ale v mnohem menší míře než je tomu u P2X₁ a P2X₃ receptorů (Bianchi, Lynch et al. 1999). Také suramin působí podle některých studií inhibičně. P2X₄ receptor je relativně necitlivý ke klasickým P2X antagonistům PPADS a suraminu (Buell, Lewis et al. 1996; Soto, Garcia-Guzman et al. 1996; Garcia-Guzman, Soto et al. 1997). Kromě těchto sloučenin působí inhibičně i obě formy reaktivní modři – cibakronová modř a basilejská modř (Garcia-Guzman, Soto et al. 1997). PPADS a suramin účinně blokují také proudy P2X₅ receptoru (Garcia-Guzman, Soto et al. 1996), zatímco TNP-ATP působí jen částečně (Surprenant, Schneider et al. 2000).

Do třetí skupiny patří P2X₇ receptor. Obecně lze říci, že je nejméně citlivý k působení nukleotidů. Lze jej dobře stimulovat jen pomocí BzATP, zatímco 2-meSATP, ATP- γ -S, α,β -meATP a β,γ -meATP jsou jen velmi málo účinné nebo zcela neúčinné (Chessell, Simon et al. 1998; Hibell, Kidd et al. 2000). Z inhibitorů vykazuje dobrou účinnost PPADS (Chessell, Michel et al. 1998; Chessell, Simon et al. 1998). Naopak suramin je jen velmi málo účinný nebo zcela neúčinný (Bianchi, Lynch et al. 1999). PPADS, stejně jako oxidované ATP, blokuje navíc i vstup YO-PRO-1 do buňky, ke kterému dochází při stimulaci BzATP (Chessell, Michel et al. 1998; Chessell, Simon et al. 1998). Jako antagonistu P2X₇ receptoru působí i briliantová modř G. Mezi antagonisty P2X₇ receptoru patří i velké kationické inhibitory Ca²⁺/kalmomodulin-dependentní proteinkinázy typu II (např. kalmidazolium, KN-62) (Gever, Cockayne et al. 2006).

2.2.1.8 Regulace

Aktivita P2X receptorů může být fyziologicky regulována nejrůznějšími mechanismy jako je přímá fosforylace receptoru, interakce s regulačními proteiny nebo s jinými ligandem otevíranými kanály a receptory spřaženými s G-proteiny. Kromě fosforylace místa pro proteinkinázu C v oblasti N-konce, které hraje roli při desenzitizaci, může být aktivita P2X receptorů modulována i prostřednictvím jiných fosforylačních míst. Např. proteinkináza A fosforyluje S431 P2X₂ receptoru, což má za následek inhibici P2X₂ odpovědi (Chow and Wang 1998). Aktivita Ca²⁺/kalmomodulin-dependentní kinázy II naopak potencuje ATP odpovědi receptoru tím, že zvyšuje jeho transport na povrch buňky (Xu and Huang 2004). Výsledky nedávné studie naznačují, že fosforylaci nepodléhají jen intracelulární části receptoru, ale také extracelulární, a sice prostřednictvím ekto-proteinkinázy C (Wirkner, Stanchev et al. 2005). Na regulaci P2X kanálů se mohou podílet i receptory, které s ním

v membráně sousedí. Byla popsána interakce mezi P2X₂ receptory a jinými ligandem otvíranými kanály (např. α₃β₄ nikotinickým receptorem, 5-hydroxytryptaminovým receptorem typu 3, GABA_A receptory, P2Y receptory). P2X receptory mohou interagovat také s regulačními proteiny (např. basický myelinový protein, Fe65 – protein vážící se na beta-amylloid prekursorový protein-adaptorový proteinový komplex 2) (Roberts, Vial et al. 2006).

Také samotná povrchová exprese je, jak se zdá, regulovaný proces. Jak již bylo zmíněno výše, je pro transport receptorů do membrány nezbytná určitá míra glykosylace. To však není jediný faktor, který míru povrchové exprese ovlivňuje. Různé podjednotky P2X receptorů vykazují různou stabilitu na povrchu buňky. Receptory P2X₂ jsou v membráně poměrně stabilní na rozdíl od P2X₄ receptorů, které jsou internalizovány a poté opětovně zabudovány do membrány. Také P2X₁ receptor je v důsledku aplikace agonisty internalizován a opětovně začleňován do plasmatické membrány.

Změnou relativní rychlosti odstranění a opětovné inserce do membrány může buňka citlivě regulovat počet receptorů na svém povrchu a tak ovlivňovat velikost odpovědi vyvolané navázáním agonisty. Aplikace ATP zvyšuje rychlost internalizace. V heteromerech obsahujících P2X₄ podjednotku se tato podjednotka chová jako dominantní a rozhoduje o umístění heteromeru v buňce (Bobanovic, Royle et al. 2002). Internalizace probíhá klathrinem zprostředkovanou cestou. Na C-konci P2X₄ receptoru byl identifikován nekanonický na tyrosinu založený endocytický motiv YXXGΦ („Φ“ značí aminokyselinu s rozvětveným hydrofobním řetězcem), konkrétně jde o motiv YEQGL, tvořený aminokyselinami Y378, G381 a L382, který je zodpovědný za konstitutivní a agonistou vyvolanou internalizaci (Royle, Bobanovic et al. 2002). Tento motiv je rozpoznáván μ2 podjednotkou adaptor proteinu 2 (AP2) klathrin adaptorového proteinového komplexu. Poté dochází ke shromažďování jednotlivých receptorů do klastrů a následnému začlenění do klathrinem potažených váčků (Royle, Qureshi et al. 2005). P2X receptory obsahují na C-konci také konzervovaný motiv YXXXX, který je zodpovědný za správnou povrchovou expresi P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ a P2X₆ receptoru. Tento motiv neovlivňuje transport receptorů z endoplasmatického retikula do membrány, ale stabilizuje tyto receptory na povrchu buňky. Mutace tohoto motivu má za následek redukcii počtu receptorů v membráně v důsledku jejich zrychlené internalizace (Chaumont, Jiang et al. 2004). Kromě těchto dvou motivů obsahuje P2X₄ receptor ještě další kanonický motiv - YXXΦ (Y372, YXXV) v blízkosti YXXGL (Y378). Tento kanonický motiv ale není využíván, neboť není přístupný AP2 komplexu. Nicméně je to oblast receptoru, která významně ovlivňuje funkci

receptoru, neboť mutace Y372A měla za následek výrazné konformační změny vedoucí k nefunkčnosti kanálu (Royle, Qureshi et al. 2005).

2.3 P2X₄ receptor

2.3.1 Výskyt a fyziologická úloha

P2X₄ receptor byl naklonován nezávisle 5 skupinami, byl získán z mozku, horního cervikálního ganglionu a pankreatu (Bo, Zhang et al. 1995; Buell, Lewis et al. 1996; Seguela, Haghghi et al. 1996; Soto, Garcia-Guzman et al. 1996; Wang, Namba et al. 1996). Patří mezi nejrozšířenější P2X kanály. Jeho mRNA a proteinové lokalizační studie naznačují, že P2X₄ podjednotka je exprimována v různých oblastech mozku (zejm. cerebrálních Purkyněho buňkách) a páteřní míchy, autonomních a sensorických gangliích, arteriálních hladkých svalech, osteoklastech, ledvinách, plicích, srdci, játrech, pankreatu a lidských B-lymfocytech (Soto, Garcia-Guzman et al. 1996; Bo, Kim et al. 2003; Gever, Cockayne et al. 2006). Funkční úloha P2X₄ receptoru ve většině těchto tkáních je stále nejasná. Několik posledních studií ukázalo, že exprese P2X₄ receptoru je zvýšená na aktivovaných páteřních mikroglíích po poškození páteřních nervů. P2X₄ receptor se pravděpodobně podílí na rozvoji taktilní alodynies a neuropatické bolesti obecně a dále také na chronické zánětlivé odpovědi (Inoue, Tsuda et al. 2004; Gever, Cockayne et al. 2006). P2X₄ receptor hraje zřejmě také úlohu v parasymptetické aktivaci slinných žláz, která vede k produkci a exkreci slin (Brown, Bruce et al. 2004).

2.3.2 Struktura a funkce P2X₄ receptoru

P2X₄ receptor byl také naklonován z různých živočišných druhů. Podrobněji byly studovány lidské, potkaní a myší receptory a bylo zjištěno, že se v některých ohledech mohou i značně lišit. U lidí se jeho gen nachází na konci dlouhého ramene chromozomu 12, v těsné blízkosti genu pro P2X₇ receptor. Dokazuje to, že jde pravděpodobně o následek genové duplikace. Pro heterologní expresi receptorů byly nejčastěji využity HEK293 buňky a oocyty. P2X₄ receptor má délku 388 aminokyselin. Celková struktura kanálu je obdobná s ostatními P2X receptory: je složen ze dvou hydrofobních transmembránových úseků (TM) spojených rozsáhlou extracelulární doménou a intracelulárními N- a C- konci. Předpokládá se, že TM1 sahá od G29 – V49 a TM2 je vymezena zbytky N338 – L358 (North 2002). Podle Egana a

kol. je TM2 delší o 6 aminokyselinových zbytků a je vymezena úseky I332-L358 (Egan, Haines et al. 1998).

Biochemicky a funkčně byla prokázána tvorba heteromerů P2X₁/P2X₄ (Nicke, Kerschensteiner et al. 2005) a P2X₄/P2X₆ v oocytech *Xenopus* (Le, Babinski et al. 1998). Heteromerizace má za následek odlišné vlastnosti receptorů, které ale v některých ohledech připomínají chování homomerních receptorů. Například P2X₁/P2X₄ receptory se svojí kinetikou podobají P2X₄ homomerům a farmakologickým profilem naopak P2X₁ homomerům (Nicke, Kerschensteiner et al. 2005).

P2X₄ receptor je propustný jak pro monovalentní ($p_{K/Na} = 1,0$; $p_{Cs/Na} = 0,8$) tak i pro divalentní kationty ($p_{Ca/Na} = 4,2$) (Buell, Lewis et al. 1996). Podobně jako P2X₂, P2X₅ a P2X₇ receptory může být P2X₄ receptor propustný také pro větší ionty. Propustnost pro větší ionty získává P2X₄ receptor buď při delším působení ATP (až 5 min) nebo při opakovaných krátkých stimulacích ATP (1 s aplikace každých 10 s, celkem po dobu 1 min). U oocytů se propustnost p_{NMDG}/p_{Na} během prodloužené doby působení ATP zvýšila z 0,097 (O₁ stav) na 0,20 (O₂ stav). Mechanismus stojící za vznikem těchto dvou odlišných vodivostních stavů není znám. Zajímavé bylo pozorování, že mutace TM2 zbytku G347 ovlivnila výrazně v tomto směru chování receptoru a v závislosti na chemickém charakteru nově vneseného zbytku vykazovaly mutantní receptory změny jak v O₁ tak v O₂. Vnesení nabitých aminokyselin lysinu a argininu mělo za následek vymizení O₁ stavu, stav O₂ byl zachován. V případě tyrosinu pak byla situace opačná (Khakh, Bao et al. 1999). Na vzniku O₂ stavu se podílí kromě transmembránových úseků zřejmě i cytoplasmatický C-konec. Mutace rezidua Y378 na alanin způsobila výraznou redukci O₂ stavu (Toulme, Soto et al. 2006).

Lidský a myší receptor jsou si svým chováním více podobné a odlišují se od potkaní formy. Nejúčinnějším agonistou P2X₄ receptoru je ATP. Hodnota EC₅₀ pro potkaní receptor se lišila v závislosti na použitém typu buněk, ve kterých byl receptor exprimován. Pro potkaní receptor exprimovaný v myších immortalizovaných neuronálních buňkách sekretující hormon uvolňující gonadotropin (GT1 neurony) byla naměřena hodnota $3,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (Yan, Liang et al. 2005), v buňkách HEK293 $5,5 \pm 2,9 \mu\text{M}$ (Jones, Chessell et al. 2000) a v oocytech žáby *Xenopus* $6,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (Soto, Garcia-Guzman et al. 1996). Pro lidský receptor exprimovaný v buňkách HEK293 byla naměřena hodnota $1,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ (Jones, Chessell et al. 2000) a v oocytech žáby *Xenopus* $7,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (Garcia-Guzman, Soto et al. 1997). P2X₄ receptory mohou být dále stimulovány 2-methylthioATP, cytidin-5'-trifosfátem (CTP) nebo adenosin-5'-tetrafosfátem (AP₄), který je účinný zejména na lidské a myší formě (Jones, Chessell et al.

2000). Málo účinnými agonisty jsou také $\alpha\beta$ -meATP a deoxyadenosin-5'-trifosfát (dATP). Receptory jsou naopak necitlivé k působení adenosin-5'-difosfátu (ADP), adenosin-5'-monofosfátu (AMP), $\beta\gamma$ -methylenATP, guanosin-5'-trifosfátu (GTP) a adenosinu i při vysokých koncentracích 100 až 300 μM (Buell, Lewis et al. 1996; Soto, Garcia-Guzman et al. 1996; Garcia-Guzman, Soto et al. 1997).

2.3.3 Farmakologická modulace P2X₄ receptoru

P2X₄ receptor je obecně poměrně málo k citlivý ke klasickým antagonistům P2X receptorů jako jsou PPADS a suramin, přičemž PPADS je účinnější než suramin (Buell, Lewis et al. 1996; Soto, Garcia-Guzman et al. 1996; Garcia-Guzman, Soto et al. 1997). Obecně lze říci, že lidská a myší forma receptoru je citlivější k působení antagonistů než potkaní (Jones, Chessell et al. 2000). Kromě těchto antagonistů působí inhibičně také obě formy reaktivní modři – cibakronová modř a basilejská modř. Výsledky studií zabývajících se účinky antagonistů se ale mnohdy dost liší. V některých studiích je PPADS, suraminu či reaktivní modři přisuzován naopak potenciační účinek (Miller, Michel et al. 1998; Townsend-Nicholson, King et al. 1999). Bylo také popsáno, že cibakronová modř je alosterickým modulátorem P2X₄ receptoru (Miller, Michel et al. 1998).

P2X₄ receptorové proudy mohou být modulovány také změnou pH extracelulárního roztoku. Snížení pH (6,3-6,5) má za následek redukci proudových odpovědí a posun křivky koncentrační závislosti doprava k vyšším hodnotám EC₅₀. Další snižování pH (pH 5,5) vede ještě výraznějšimu poklesu citlivosti receptoru. Zvýšení pH (8,0-8,3) nemá vliv, popř. může jen slabě zvýšit citlivost k agonistům (Stoop, Surprenant et al. 1997; Wildman, King et al. 1999).

Účinek agonistů může být modulován také působením divalentních kationtů kovů. Jako první byla objevena potenciace zinkem (Seguela, Haghghi et al. 1996; Garcia-Guzman, Soto et al. 1997). Bylo zjištěno, že potenciace je závislá na použité koncentraci Zn²⁺. S rostoucí koncentrací vzrůstá potenciace, maximálního zvýšení proudu je dosaženo cca při 10 μM Zn²⁺. Dále již pak potenciace klesá a při vysokých koncentracích Zn²⁺ byla pozorována inhibice (Garcia-Guzman, Soto et al. 1997; Xiong, Peoples et al. 1999; Acuna-Castillo, Morales et al. 2000). Působením 10 μM Zn²⁺ iontů dochází k posunu koncentrační závislosti doleva a k nižším hodnotám EC₅₀, přičemž hodnota maximálního proudu (I_{max}) zůstává zachována (Acuna-Castillo, Morales et al. 2000). Kromě zinku může potenciačně působit i kadmium (Acuna-Castillo, Morales et al. 2000; Coddou, Lorca et al. 2005), přičemž

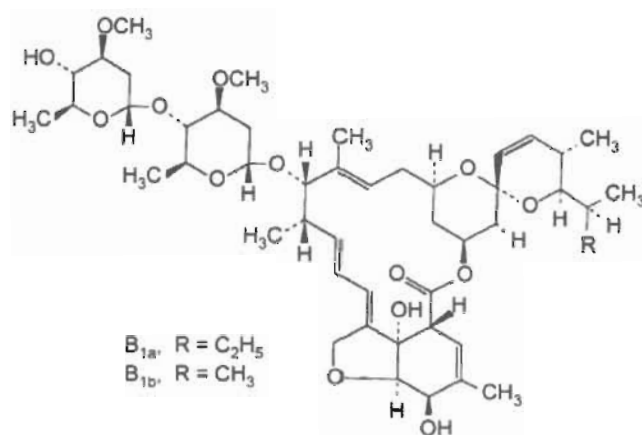
jejich účinek je aditivní. Naopak Cu^{2+} a Hg^{2+} blokují kanál. Působením Cu^{2+} dochází ke snížení I_{max} , ale EC_{50} se nemění. Účinek Cu^{2+} a Hg^{2+} je také aditivní (Acuna-Castillo, Morales et al. 2000). Předpokládá se, že ionty kovů působí prostřednictvím specifických vazebných míst (Xiong, Peoples et al. 1999; Acuna-Castillo, Morales et al. 2000; Coddou, Morales et al. 2003). Existují minimálně 2 vazebná místa pro dvojmocné kovy. Jedno, které zprostředkovává potenciační působení Zn^{2+} , a druhé, které zprostředkovává působení Cu^{2+} . Mutagenézí bylo zjištěno, že na vazbě Cu^{2+} by se mohl podílet zbytek H140. Součástí vazebného místa by pak mohly být také zbytky T123, S124, S141 a T146, které jsou podle počítačově vytvořeného 3D modelu v blízkosti H140 (Coddou, Morales et al. 2003). Nejnovější výsledky naznačují existenci ještě dalšího vazebného místa pro Cu^{2+} a Hg^{2+} . Ionty Pb^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Ga^{3+} neměnily významně proudy stimulované ATP (Coddou, Lorca et al. 2005). Byla také naznačena možnost blokace ATP stimulovaných proudů prostřednictvím Mg^{2+} , což by mohlo být důsledek komplexace ATP Mg^{2+} ionty (Negulyaev and Markwardt 2000).

Jako alosterický modulátor P2X_4 receptoru může také působit etanol, a to již ve fyziologických koncentracích. Pro jeho modulační působení se ukázal být významným zbytek v extracelulární doméně H241 (Xiong, Hu et al. 2005).

Všechny výše uvedené způsoby modulace jsou více či méně sdílené i ostatními P2X receptory. Jediným dosud popsáním specifickým modulátorem P2X_4 proudů je ivermektin.

2.3.3.1 Ivermektin

Ivermektin (IVM) je název pro 22,23-dihydroavermektin. Vzniká selektivní hydrogenací avermektinu B1, což je látka syntetizovaná půdní bakterií *Streptomyces avermitilis*. IVM je směsí dvou izomerů 22,23-dihydroavermektin B1_a (>80%) a 22,23-dihydroavermektin B1_b (<20%) (Chabala, Mrozek et al. 1980). Je to látka o vysoké molekulové hmotnosti, vysoce lipofilní, s velmi malou rozpustností ve vodě. IVM se stal rozšířeným léčivem ve veterinární medicíně, kde se používá proti červům a hmyzu, ale také v humánní medicíně, kde se používá pro prevenci a léčbu filariálních infekcí, zejména onchocerkózy a lymfatické filariózy (Edwards 2003).



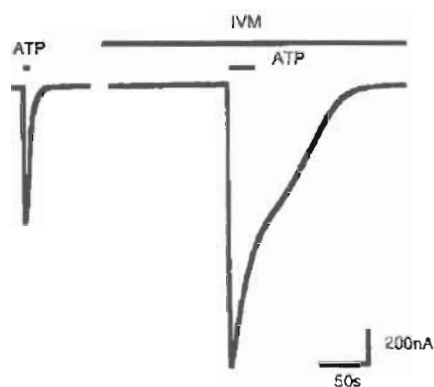
Obr. 2.6 Struktura IVM

Z experimentů s *Caenorhabditis elegans* vyplývá, že IVM působí na glutamátém otevírané chloridové kanály v neuronech a svalových buňkách hltauu červů. IVM indukuje pomalé otevírání kanálů, které je téměř ireverzibilní. To má za následek změny v propustnosti membrán a tedy i blokování další funkce buněk. Tímto je narušen trávicí proces parazita a dochází k jeho vyhladovění (Dent, Davis et al. 1997; Dent, Smith et al. 2000). Bylo prokázáno, že IVM působí při vyšších koncentracích (10 μ M) jako agonista glutamátém otevíraných chloridových kanálů (Dent, Davis et al. 1997), při nižších (10 nM) jako modulátor glutamátových odpovědí (Cully, Paress et al. 1996). Jiní autoři naopak uvádějí, na základě experimentů s glutamátém otevíranými chloridovými kanály *Haemonchus contortus*, že je to účinek IVM, který je potencován glutamátém (Forrester, Prichard et al. 2003). Předpokládá se proto, že se IVM váže v jiné části receptoru než glutamát.

Kromě glutamátém otevíraných chloridových kanálů je k IVM citlivá i řada jiných kanálů – GABA_A receptory myších neuronů (Krusek and Zemkova 1994; Adelsberger, Lepier et al. 2000), $\alpha 7$ nikotinické receptory (Krause, Buisson et al. 1998), lidský glycinový receptor (Shan, Haddrill et al. 2001), histaminový receptor *Drosophila melanogaster* (Zheng, Hirschberg et al. 2002). Na těchto kanálech působí IVM jako agonista (histaminový receptor, glycinový receptor) či jako pozitivní alosterický modulátor (nikotinický receptor, P2X₄ receptor) nebo obojí (GABA receptor).

Skutečnost, že IVM může modulovat chování P2X₄ receptoru, jako jediného z rodiny savčích purinergních P2X receptorů, byla poprvé popsána Khakem (Khakh, Proctor et al. 1999). O několik let později pak bylo objeveno, že IVM moduluje také proudy P2X receptoru naklonovaného z bezobratlého organismu *Schistosoma mansoni* (schP2X) (Agboh, Webb et al. 2004). IVM nemá schopnost aktivovat P2X₄ receptor, působí pouze jako modulátor. Preinkubace s IVM se projevuje několika účinky na P2X₄ receptor.

IVM má schopnost potencovat proudy stimulované ATP (Khakh, Proctor et al. 1999; Priel and Silberberg 2004). Potenciační účinek IVM je značný. V přítomnosti 3 μM IVM byly odpovědi stimulované saturujícími koncentracemi ATP navýšeny až 2-násobně (Priel and Silberberg 2004). Účinek IVM na amplitudu se rozvíjí postupně a je zcela reverzibilní (Khakh, Proctor et al. 1999; Priel and Silberberg 2004). Časová konstanta nástupu účinku IVM na amplitudu byla pro lidský receptor exprimovaný v HEK293 buňkách stanovena na $\tau_{\text{on}} = 1,9$ min a časová konstanta pro odeznění účinku po odmytí $\tau_{\text{off}} = 11,5$ min (Priel and Silberberg 2004).



Obr. 2.7 Reprezentativní záznam P2X_4 receptoru exprimovaného v oocytech při stimulaci 100 μM ATP v přítomnosti (vpravo) a v nepřítomnosti (vlevo) IVM. IVM potencuje amplitudu proudu a prodlužuje dobu deaktivace kanálu. (Khakh, Proctor et al. 1999)

IVM má také výrazný účinek na deaktivaci kanálu, který se projevuje zpomalením poklesu proudové odpovědi po odmytí ATP a celkovým prodloužením ATP odpovědi. Preinkubace s 3 μM IVM způsobuje až 30-násobné prodloužení doby deaktivace kanálu (Khakh, Proctor et al. 1999; Priel and Silberberg 2004). Také tento účinek není okamžitý, ale rozvíjí se s dobou působení IVM. Časová konstanta nástupu účinku IVM na deaktivaci byla pro lidský receptor exprimovaný v HEK293 buňkách stanovena na $\tau_{\text{on}} = 4,6$ min a časová konstanta pro odeznění účinku po odmytí $\tau_{\text{off}} = 2,2$ min (Priel and Silberberg 2004).

Třetím pozorovaným účinkem IVM na P2X_4 receptory je zvyšování citlivosti receptoru k agonistům. Působením 1 μM IVM se snížila hodnota EC_{50} pro ATP z 3,8 μM na 0,5 μM . Tento účinek IVM byl pozorován nejen při stimulaci ATP, ale také při stimulaci částečným agonistou $\alpha\beta\text{-meATP}$, z něhož se stává úplný agonista P2X_4 receptoru (Khakh, Proctor et al. 1999).

Účinek IVM je závislý nejenom na době jeho působení, ale také na jeho koncentraci. S rostoucí koncentrací potenciační i deaktivační účinek IVM stoupá, přičemž maxima je dosaženo přibližně při 10 μM a dále již klesá (Khakh, Proctor et al. 1999; Priel and Silberberg 2004). Při nižších koncentracích IVM (0,2 μM) je ovlivněna zejména I_{max} , při vyšších koncentracích (1 μM) je ovlivněna i deaktivace (Priel and Silberberg 2004). To je v souladu s výsledky Khakha, podle kterých je hodnota EC_{50} pro potenciační účinek 257 nM (Khakh, Proctor et al. 1999). Rozdíly v působení IVM v závislosti na použité koncentraci byly pozorovány i na úrovni jednotlivých kanálů. Nižší koncentrace IVM zvýšily celkovou dobu otevření kanálu, aniž by došlo k navýšení průměrné doby otevření nebo k ovlivnění jednotkové vodivosti. Vyšší koncentrace IVM částečně prodloužily průměrnou dobu otevření kanálu a dále zvýšily pravděpodobnost otevření (Priel and Silberberg 2004). Znamená to, že IVM stabilizuje kanál v otevřeném stavu.

IVM působí jako alosterický modulátor. Lokalizace jeho působení a vazebné místo nejsou dosud známy. Bylo zjištěno, že účinek IVM je nezávislý na předchozí stimulaci receptoru ATP, což naznačuje, že není potřeba permeace otevřeným kanálem (Khakh, Proctor et al. 1999) a že působí pouze z extracelulární strany buňky (Priel and Silberberg 2004). Účinek IVM také není závislý napětově, takže lze předpokládat, že vazebné místo leží mimo pór (Khakh, Proctor et al. 1999). Jestli jsou účinky IVM zprostředkovány jedním společným místem, nebo zda má IVM více vazebných míst, není zatím zřejmé. Priel a kol. vytvořili hypotézu, podle které existují na receptoru 2 vazebná místa pro IVM - nízkoafinitní a vysokoafinitní, z nichž každé je zodpovědné za jeden z účinků. Vysokoafinitní místo primárně působí na I_{max} a nízkoafinitní je zodpovědné za snížení rychlosti deaktivace po odmytí agonisty (Priel and Silberberg 2004). Jak již bylo uvedeno, IVM je směs dvou izomerů. Nabízí se tedy možnost, že jeden z izomerů by mohl zprostředkovávat potenciační účinek a druhý by byl zodpovědný za prodlouženou deaktivaci. Tato hypotéza ale byla vyloučena (Priel and Silberberg 2004). A jak prokázaly výsledky dalších experimentů, potenciační účinek IVM není ani důsledek zvýšené propustnosti kanálu (Khakh, Proctor et al. 1999). Byla vyslovena domněnka, že vlivem působení IVM dochází ke zvýšení počtu P2X₄ receptorů na povrchu buněk (mechanismem zahrnujícím konstitutivní AP2/klathrin dependentní internalizaci), což by se mohlo projevit zvětšením proudů (Toulme, Soto et al. 2006). To je ale v rozporu s pozorováními Khakha a kol., kteří nezaznamenali změny v membránové kapacitanci, což znamená, že vlivem IVM nedocházelo k inzerci vesikulů s novými P2X₄ receptory a že potenciace tedy byla důsledkem modulace existující populace

P2X₄ (Khakh, Proctor et al. 1999). Zvýšený počet receptorů v membráně také nemůže vysvětlit změnu v citlivosti receptoru pro ATP.

Je tedy zřejmé, že informace o místě a mechanismu působení IVM jsou velmi nejasné, mnohdy i rozporuplné, a k jejich objasnění bude potřeba provést ještě řadu dalších experimentů.

3. CÍLE PRÁCE

Cílem této dizertační práce bylo přispět k objasnění vztahu mezi strukturou a funkcí potkaního purinergního P2X₄ receptoru s využitím specifických účinků alosterického modulátoru ivermektinu (IVM) a dále analyzovat mechanismus působení a vazebné místo této látky na P2X₄ receptor. Konkrétně v této práci byly řešeny tyto úkoly:

1. Identifikovat oblasti receptoru a receptor-specifické aminokyselinové zbytky, které se podílejí na selektivním účinku IVM na P2X₄ receptor.
2. Postupnou záměnou všech aminokyselin v první a druhé transmembránové doméně P2X₄ receptoru za cystein určit zbytky, které jsou důležité pro působení IVM na tento receptor.
3. Analýzou pozitivního modulačního účinku IVM na ATP odpovědi receptorů s mutací ektodoménových konzervovaných nabitých a aromatických zbytků zjistit význam těchto aminokyselin pro vazbu extracelulárního ATP a funkci receptoru.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Molekulárně biologické metody

4.1.1 Použité geny a chiméry

V práci jsem pracovala s geny pro divoký typ potkaních purinergních receptorů P2X₄, P2X_{2a} a P2X_{2b}, které byly získány reverzní transkripcí a překlony do vektoru pIRES2-EGFP (Clontech, Mountain View, CA, USA). Tento vektor je navržen takovým způsobem, že umožňuje translaci cílového genu (P2X) a genu pro EGFP z jedné bicistronické mRNA. Dále jsem pracovala s geny pro pět chimér těchto receptorů, které byly připraveny v laboratoři Dr. S.S. Stojilkovice, NICHD, NIH, Bethesda, USA. Seznam použitých genů divokých receptorů a chimér je uveden v tab. 4.1.

Chiméry P2X_{2a}/V64-Y315P2X₄ a P2X_{2b}/V64-Y315P2X₄ obsahovaly ektodoménovou sekvenci V64-Y315 receptoru P2X₄ místo původní sekvence I66-Y310 receptoru P2X_{2a} a P2X_{2b} (He, Zemkova et al. 2003). Chimerní receptor P2X_{2a}/V49-V61 P2X₄, u kterého byl fragment 14 aminokyselin I50-E63 receptoru P2X_{2a} nahrazen V49-V61 fragmentem receptoru P2X₄. Chimerní receptor P2X₄/I50-E63 P2X_{2a} obsahoval 14 aminokyselin I50-E63 receptoru P2X_{2a} místo sekvence V49-V61 receptoru P2X₄ (Jelinkova, Yan et al. 2006).

Tab. 4.1 Geny a chiméry použité v experimentech

Gen	Původ , citace
P2X ₄ podjednotka	GenBank accesion no. NM 031594 (Koshimizu, Koshimizu et al. 1999)
P2X _{2a} podjednotka	GenBank accesion no. NM 053656 (Koshimizu, Koshimizu et al. 1999)
P2X _{2b} podjednotka	GenBank accesion no. Y09910 (Koshimizu, Koshimizu et al. 1999)
P2X ₄ podjednotka značená EGFP	(Yan, Liang et al. 2005)
chiméra P2X _{2a} /V64-Y315 P2X ₄	(He, Zemkova et al. 2003)
chiméra P2X _{2b} /V64-Y315 P2X ₄	(He, Zemkova et al. 2003)
chiméra P2X ₄ /I66-Y310 P2X ₂	(He, Zemkova et al. 2003)
chiméra P2X _{2a} /V49-V61 P2X ₄	(Jelinkova, Yan et al. 2006)
chiméra P2X ₄ /I50-E63P2X _{2a}	(Jelinkova, Yan et al. 2006)

4.1.2 Roztoky pro transformaci bakterií

Roztoky pro kultivaci bakterií a agarosovou elektroforézu byly připraveny rozpuštěním chemikálií (zakoupených od firmy Sigma a Serva) v deionizované vodě. Konkrétně byly použity tyto roztoky a média:

LB (Luria-Bertani) médium

1% tryptonu, 0,5% kvasničného extraktu, 1 % NaCl

sterilizace 20 min při 121°C

LB agar s kanamycinem

1% tryptonu, 0,5% kvasničného extraktu, 1% NaCl, 1,5-2,0% agaru

sterilizace 20 min při 121°C, po ochlazení na 50°C přidat kanamycin (30 µg/ml), rozlít agarový roztok na Petriho misky

TBE pufr (10x koncentrovaný)

0,89 M Tris, 0,89 M kyseliny borité, 0,02 M EDTA (pH = 8,3)

DNA vzorkovací pufr

50% glycerolu, 1% bromfenolové modře, 1x TBE pufr

4.1.3 Agarosová elektroforéza

Agarosový gel (1%) byl připraven smícháním 0,8 g agarosy v 80 ml TBE pufru (1x) a jejím následným rozvařením v mikrovlnné troubě. Po částečném schlazení na cca 60°C byl roztok agarosy nalit do plastové nalévací vaničky a byly do něj ponořeny hřebeny. Po ztuhnutí gelu (cca 20 min), byly hřebeny vytaženy. Gel byl přenesen do elektroforetické vany a zalit TBE pufrem. Do jednotlivých jamek v gelu byly poté nanášeny jednotlivé vzorky, které byly připraveny naředěním 5 µl DNA v 5 µl deionizované vody a přidáním 5 µl DNA vzorkového pufru. Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji stejnosměrného proudu o napětí 72 V (4 V na 1 cm, vzdálenost elektrod 18 cm). Elektroforetické dělení probíhalo 1 hodinu. Poté byl gel přenesen do roztoku ethidium bromidu. Po 10 min byl gel prohlížen na UV transluminátoru (model UVT-14M, Herolab, Wiesloch, Německo).

4.1.4 Transformace bakterií

Transformace bakterií byla prováděna metodou teplotního šoku. Pro transformaci byly použity kompetentní buňky *E.coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA). 30-45 μl buněk bylo smícháno se 150-250 ng plasmidové DNA a poté byly ponechány 20-30 min na ledu. Po skončení inkubace byly buňky vystaveny teplotnímu šoku ve vodní lázni po dobu 45 s při 42°C. Buňky pak byly umístěny na 2 min zpět do ledu. Následně k nim bylo přidáno 150-180 μl tekutého LB média a směs byla kultivována za stálého třepání po dobu 1 hod při 37°C. Poté byla buněčná suspenze nanášena na Petriho misky s LB agarem (30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycinu) a rozetřena rovnoměrně po celé ploše misky ochlazenou sterilní skleněnou hokejkou. Miska byla inkubována v termostatu při 37°C přes noc.

4.1.5 Izolace plasmidu a měření koncentrace DNA

Bakterie nesoucí příslušný plasmid byly zaočkovány do tekutého LB média s kanamycinem (30 $\mu\text{g/ml}$) a aerobně kultivovány při 37°C, 200 rpm, 16-20 hod. Izolace plasmidu byla provedena podle firemního návodu pomocí kitu JETquick Plasmid Miniprep (Genomed, Löhne, Německo). Nejprve byly postupně odstředěny v mikrozkušavce 3-5 ml této kultury (1 min, 12 000 rpm). Vzniklá peleta byla resuspendována 250 μl G1 roztoku až do vzniku homogenní suspenze. Poté bylo k suspenzi přidáno 250 μl G2 roztoku a vše bylo důkladně, ale jemně promícháno otáčením zkumavky. Po 5 min inkubace bylo k směsi dále přidáno 350 μl G3 roztoku, čímž vznikla sraženina, která byla odstraněna centrifugací (10 min, 12 000 rpm). Vzniklý supernatant byl přenesen na JETquick spin kolonku a odstředěn (1 min, 12 000 rpm). Následně bylo na kolonu přidáno 500 μl GX roztoku. Po jejím odstředění (1 min, 12 000 rpm) byl proces zopakován ještě s 500 μl G4 roztoku. Po promytí roztokem G4 byla provedena ještě jedna centrifugace (1 min, 12 000 rpm), aby byly odstraněny zbylé stopy G4 roztoku. Poté byl eluován plasmid. K eluci bylo použito 50-70 μl TE pufru vytemperovaného na 65°C. Po 1 min inkubace při laboratorní teplotě byla kolonka centrifugována (2 min, 12 000 rpm). Koncentrace získané plasmidové DNA byla stanovena měřením na spektrofotometru BioPhotometr 6131 (Eppendorf, Hamburg, Německo) programem dsDNA.

4.1.6 Polohově řízená mutagenese

V této práci jsme vytvořili 46 nových mutací genu pro P2X₄ receptor, ve kterých jsme zaměnili všechny aminokyseliny, jednu po druhé, v obou transmembránových doménách za cystein (popř. alanin). Konkrétně jsme připravili tyto mutantní TM1 a TM2 receptory: P2X₄G29C, P2X₄L30C, P2X₄M31C, P2X₄N32C, P2X₄R33C, P2X₄A34C, P2X₄V35C, P2X₄Q36C, P2X₄L37C, P2X₄L38C, P2X₄I39C, P2X₄L40C, P2X₄A41C, P2X₄Y42C, P2X₄V43C, P2X₄I44C, P2X₄G45C, P2X₄W46C, P2X₄V47C, P2X₄F48C, P2X₄V49C, P2X₄N338C, P2X₄V339C, P2X₄G340C, P2X₄S341C, P2X₄G342C, P2X₄L343C, P2X₄A344C, P2X₄L345C, P2X₄L346C, P2X₄G347C, P2X₄V348C, P2X₄A349C, P2X₄T350C, P2X₄V351C, P2X₄L352C, P2X₄C353A, P2X₄D354C, P2X₄V355C, P2X₄I356C, P2X₄V357C, P2X₄L358C. V případě P2X₄ receptor-specifických aminokyselinových zbytků TM1 a TM2 jsme provedli také jejich substituci alaninem (v případě A41 leucinem) a připravili tyto mutantní receptory: P2X₄M31A, P2X₄A41L, P2X₄V355A a P2X₄V357A. V oblasti ektodomény sousedící s TM1 jsme nahrazením receptor-specifických aminokyselinových zbytků vytvořili 7 mutantních receptorů: P2X₄W50A, P2X₄W50C, P2X₄E56A, P2X₄T57A, P2X₄S59A, P2X₄V60A a P2X₄V61A. Dále jsme připravili 4 receptory s bodovou mutací v ektodoméně, u kterých byla aromatická nebo nabitá aminokyselina nahrazena za alanin: P2X₄K67A, P2X₄F185A, P2X₄F294A a P2X₄R295A. V laboratoři NICHD/NIH byly připraveny tyto receptory s bodovou mutací v ektodoméně: P2X₄K67R, P2X₄F185W, P2X₄K190A, P2X₄K190R, P2X₄K197A, P2X₄F230A, P2X₄F230W, P2X₄K258A, P2X₄R278A, P2X₄R278K, P2X₄D280A, P2X₄D280E, P2X₄N287A, P2X₄F294W, P2X₄R295K, P2X₄K313A, P2X₄K313R. U těchto receptorů byla aromatická nebo nabitá aminokyselina nahrazena za aminokyselinu s podobnými chemickými vlastnostmi nebo za alanin.

Oligonukleotidové primery pro polohově řízenou mutagenesi byly zakoupeny od firmy VBC-genomics (Vienna, Rakousko). Primery byly o délce 33-36 bází, mutované místo bylo zhruba uprostřed a na 3'- a 5'-koncích byly G nebo C báze. *PfuUltra* polymeráza byla zakoupena od firmy Stratagene (La Jolla, CA, USA). Reakční směs byla připravena na ledu podle tab. 4.2.

Tab. 4.2 Reakční směs pro polohově řízenou mutagenezi

Složka	Objem
Deionizovaná voda	x μ l
10x <i>PfuUltra</i> pufr	5 μ l
Směs dNTP (25 mM)	2,5 μ l
Primery (100 pmol/ μ l)	1 μ l každý
<i>PfuUltra</i> DNA polymeráza	1 μ l
DNA templát (500 ng/ μ l)	0,5 μ l
Celkový reakční objem	50 μl

Hotová reakční směs byla vložena do cyklieru (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Německo) a poté byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR) podle následujícího schématu:

1. 2 min, 95°C,
2. 1 min, 95°C,
3. 1 min, 51°C,
4. 10 min, 72°C,
5. kroky 2-4 opakovat 20-krát,
6. 12 min, 72°C
7. dále udržovat při 4°C.

Po skončení PCR bylo k reakční směsi přidáno 1,5 μ l enzymu DpnI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), aby byla rozštěpena templátová DNA, a směs byla inkubována 1,5-2 hod při 37°C. Poté byla směs analyzována pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. Reakční směs byla následně použita pro transformaci kompetentních buněk (2,5-5 μ l reakční směsi + 45 μ l kompetentních buněk). Transformace byla provedena teplotním šokem (viz. odstavec 4.1.4). Následující den bylo vybráno několik kolonií z Petriho misky pro zaočkování tekutého LB média s kanamycinem. Narostlé bakteriální kultury pak byly použity pro izolaci plasmidové DNA. Správnost sekvence DNA a úspěšnost vnesení bodové mutace byla poté u jednotlivých klonů ověřena sekvenováním. Sekvence byly provedeny na přístroji ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) v Laboratoři DNA sekvenace, Mikrobiologický ústav, AV ČR, vvi.

4.2 Tkáňové kultury

Pro elektrofyziologické experimenty byla použita buněčná linie lidských ledvinných buněk - HEK293 (CRL-1573, American Type Culture Collection). Buňky byly kultivovány v tekutém médiu při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% CO₂, 95% vzduchu.

4.2.1 Roztoky a média pro kultivaci buněk

Roztoky pro kultivaci buněk byly připraveny rozpuštěním chemikálií nebo naředěním zakoupených koncentrovaných roztoků. Produkty pro tkáňové kultury a Lipofectamine 2000 pro transfekci buněk byly zakoupeny od Invitrogenu (Carlsbad, CA, USA). Byly použity tyto roztoky a média:

0,025% trypsin

0,25% Trypsin-EDTA4Na, ředěno komerčně dostupným Versenovým roztokem na požadovanou koncentraci

Kultivační médium HEK293

90% Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (DMEM) , 10% fetální hovězí sérum (FBS) (tepelně inaktivované), 100 (50) µg/ml streptomycinu, 100 (50) units/ml penicilinu

0,025% trypsin byl skladován při -20°C po dobu několika měsíců. Kultivační média byla uchovávána při 4°C po dobu 4-6 týdnů.

4.2.2 Pasážování buněk

Buňky byly kultivovány na plastické T-75 láhvi až do 80-95% konfluence a poté byly pasážovány (cca 2-3 dny). Nejprve bylo z láhve odsáto kultivační médium. Pak byly buňky opláchnuty Versenovým roztokem (popř. PBS) a následně inkubovány 2-5 min s roztokem 0,025% trypsinu při 37°C až do té doby, než došlo k jejich uvolnění z povrchu láhve. K uvolněným buňkám bylo přidáno kultivační médium a směs byla jemně, ale důkladně promíchána pipetou. Buněčná suspenze byla centrifugována 5 min při 100 g. Po slítí supernatantu bylo k buňkám přidáno kultivační médium a byla provedena jejich resuspendace. Část resuspendovaných buněk byla použita pro zachování linie ($1,5 \cdot 10^6$ –

$2 \cdot 10^6$ buněk na T75 láhev) a část byla nasazena na poly-L-lysinovaná sklička v 35 mm polystyrenové misce (cca $1,5 \cdot 10^5$ buněk na 1 misku), která pak byla využita následující den pro transfekci.

4.2.3 Transfekce

Den před transfekcí byly buňky nasazeny na poly-L-lysinovaná sklička v 35 mm polystyrenové misce (cca $1,5 \cdot 10^5$ buněk na 1 misku). Před vlastní transfekcí bylo buňkám nahrazeno jejich normální kultivační médium za médium vhodné pro transfekce - OptiMEM. S novým médiem byly buňky inkubovány po dobu aspoň 20 min. Mezitím byla připravena transfekční směs DNA s Lipofectaminem2000. Nejprve byla rozpuštěna v OptiMEMu v jedné zkumavce DNA (1 μ g) a ve druhé zkumavce Lipofectamin2000 (7 μ l) a to tak, aby výsledný objem směsi byl 250 μ l. Po krátké inkubaci (5 min) byly obsahy zkumavek smíchány a vzniklá směs byla ponechána po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Poté byla směs přidána k buňkám v OptiMEMu a buňky byly inkubovány v termostatu 4-6 hod. Následně bylo médium s transfekční směsí vyměněno za normální kultivační médium a buňky byly dále inkubovány v termostatu 24-48 hod, kdy byly použity pro měření.

4.3 Elektrofyziologie

4.3.1 Extracelulární a intracelulární roztoky

Roztoky byly připraveny rozpuštěním navážených nebo odměřených chemikálií v deionizované vodě.

Extracelulární roztok pro elektrofyziologická měření

142 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM D-glukóza, 10 mM HEPES, pH=7,3 (upraveno pomocí NaOH)

Intracelulární roztok (na bázi K^+)

70 mM KCl, 70 mM K-aspartát, 5 mM EGTA, 0,5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, pH=7,2 (upraveno přidávkem KOH)

Intracelulární roztok (na bázi Cs⁺)

154 mM CsCl, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH=7,2 (upraveno přidavkem CsOH)

Osmolalita roztoků byla stanovena na osmometru Vapro 5520 (Wescor, Logan, UT, USA). Osmolalita extracelulárního roztoku se pohybovala v rozmezí 290-300 mOsm/l, osmolalita intracelulárního roztoku byla v rozmezí 280-290 mOsm/l. Extracelulární roztok byl uchováván při -20°C po dobu ~1 měsíce, intracelulární roztoky při -80°C po dobu ~6 měsíců.

ATP bylo připraveno rozpuštěním v deionizované vodě na finální koncentraci 0,01 M a uloženo při -80°C. IVM byl rozpuštěn v DMSO na konečnou koncentraci 0,01 M a skladován při 4°C po dobu 1 týdne.

Na začátku každého experimentu byly připraveny aplikační roztoky naředěním ATP či IVM v extracelulárním roztoku. Koncentrace DMSO v aplikačním roztoku IVM nepřesáhla 1 % a v této koncentraci nemá vliv na odpovědi receptoru stimulované ATP (Khakh, Proctor et al. 1999).

4.3.2 Snímání proudových odpovědí

Měření bylo prováděno 24-48 hod po transfekci z buněk podobné velikosti, tvaru a míry exprese receptoru. Před vlastním měřením byly buňky na poly-L-lysinovaném skličku přeneseny do Petriho misky naplněné extracelulárním roztokem. Miska byla upevněna na stolek fluorescenčního invertovaného mikroskopu (model IX71, Olympus, Melville, NY, USA), s objektivy o zvětšení 10x a 40x. Transfekované buňky byly identifikovány podle fluorescenčního signálu EGFP pomocí UV lampy a filtru U-MWIB2 pro excitační vlnové délky 460-490 nm a emisi při 505 nm.

ATP-stimulované proudové odpovědi z celých buněk byly snímány technikou patch clamp za pomoci zesilovače Axopatch-200B (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Metoda patch clamp (Hamill, Marty et al. 1981) byla původně vyvinuta pro studium jednotlivých iontových kanálů v malém kousku membrány izolovaném ve špičce skleněné mikroelektrody a udržovaném na konstantním napětí. Později ale bylo zjištěno, že lze provádět i snímání z celé buňky, a pokud je membránový potenciál udržován na konstantní hodnotě, je velikost membránového proudu dána součtem proudů zprostředkovaných ionty procházejícími všemi aktivovanými kanály na buněčné membráně. Základem měřícího obvodu jsou dvě elektrody, snímací (skleněná mikropipeta) a referenční, a zesilovač.

Přiložením skleněné mikropipety naplněné vodivým intracelulárním roztokem na membránu buňky, nasátím membrány v místě kontaktu do vnitřku pipety a následným protržením tohoto kousku membrány dojde k propojení vnitřku elektrody s vnitřkem buňky. Roztok v pipetě je pak propojen pomocí Ag/AgCl drátku (Ag drátek pokrytý vrstvou AgCl) se zesilovačem. K němu je připojena i referentní elektroda, taktéž z Ag/AgCl drátku, která je ponořena do extracelulárního roztoku obklopujícího buňku, a která tedy zajišťuje propojení zesilovače s vnějším prostředím buňky. Proud, který prochází membránou, jsou vedeny snímací pipetou do sondy zesilovače. Sonda zesilovače obsahuje proudovo – napěťový převodník. Přicházející proudy jsou zde převedeny na napěťový signál, který je pak v zesilovači dále zesilován a filtrován. Konstantní membránový potenciál je během měření udržován prostřednictvím snímací elektrody. Snímací elektroda je tedy použita nejen pro snímání membránových proudů, ale také pro kontrolu membránového potenciálu. V našich pokusech byl elektrický signál filtrován vestavěným 8-pólovým Besselovým filtrem na 1 kHz, digitalizován (Digidata 1200, Axon Instruments, Union City, USA) a zaznamenáván do počítače vzorkovací frekvencí 2 kHz. Do závěrečného hodnocení byly pro snímání z celé buňky přijaty pouze buňky jejichž vstupní odpor se po dobu měření nezměnil a nepřesáhl 20 MΩ. Sériový odpor byl kompenzován na 40%.

Mikropipety byly vyrobeny z trubiček z borosilikátového skla (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) o vnějším průměru 1,65 mm, tloušťce stěny 0,2 mm a s vloženým vláknem, pomocí horizontálního tahače (model P-97, Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Špička elektrody byla otavena pomocí mikrokovárny (model MF-830, Narishige, Tokyo, Japonsko), čímž došlo k uhlazení hrotu a k odstranění prachových nečistot. Po otavení se průměr špičky elektrody pohyboval v rozmezí 1-2 μm. Odpor elektrod po naplnění intracelulárním roztokem byl v rozmezí 3-5 MΩ. Motorizovaný mikromanipulátor (model MP-285, Sutter Instrument, Novato, CA, USA) umožňoval pohyb mikropipety pod mikroskopem.

Testované látky byly aplikovány pomocí mikroperfúze. Mikroperfúzní systém se skládal z deseti křemenných (Composite Metal Services, Shipley, Velká Británie) paralelně spojených trubiček se společným vyústěním do jediné trubičky o vnitřním průměru 320 μm. Každá trubička byla spojena teflonovou hadičkou s 10 ml nádržkou obsahující aplikační roztok. Průtok aplikačních roztoků jednotlivými trubičkami byl řízen solenoidovými ventily (Parker Hannifin Corporation, General Valve division, Fairfield, NJ, USA) ovládanými mikroprocesorem (Ing. I. Dittert a RNDr. V. Vlachová, FGÚ AVČR, vvi). Společné vyústění

trubiček bylo nastavováno ~ 500 μm od snímací mikropipety těsně nad povrch buněčné kultury v úhlu ~ 45°. Kompletní výměna roztoku v okolí buňky trvala méně než 300 ms. Snímání byla prováděna při pokojové teplotě 22-24°C.

4.3.3 Vyhodnocení dat

Vyhodnocování dat bylo prováděno pomocí počítačového programu Clampfit verze 8, který je součástí programového nástroje pClamp verze 8 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) a dále pomocí programu Sigmaplot 2000 verze 6.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Hodnoty EC_{50} byly stanoveny měřením amplitud odpovědí na opakované aplikace ATP o různých koncentracích (většinou 0,3-100 μM) v intervalech 20-120 s. Všechny odpovědi byly vztaženy buď k 3 μM nebo k maximální odpovědi (indukované 100 μM ATP, v některých případech až 5000 μM ATP) a předpokládalo se, že pokles, k němuž dochází při opakovaných aplikacích ATP, je lineární. Tento přepočít byl prováděn s cílem odstranit vliv internalizace a pomalého návratu receptoru $P2X_4$ z desenzitizovaného stavu, který byl způsobený aplikacemi vysokých koncentrací ATP. Křivky prokládající data v grafech koncentračních závislostí byly získány pomocí 3-parametrové logistické rovnice: $I = 1/(1+(EC_{50}/[ATP])^{n_H})$, kde $[ATP]$ je testovaná koncentrace ATP, n_H je Hillův koeficient, I je amplituda proudu vyvolaná aplikací ATP o dané koncentraci, EC_{50} je koncentrace ATP vyvolávající polovinu maximální proudové odpovědi. V některých případech byla hodnota EC_{50} určena extrapolací pomocí zadaného průměrného Hillova koeficientu = 1,3. Kinetika poklesu proudu při odmyvání agonisty byla pomocí programu Clampfit v.8 proložena 1-exponenciální funkcí: $y = A \exp(-t/\tau) + C$, nebo 2-exponenciální funkcí: $y = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + C$, kde $C = 0$, A_1 a A_2 jsou relativní amplitudy první a druhé exponenciály, τ_1 a τ_2 jsou časové konstanty. Odvozená konstanta doby deaktivace byla označena τ_{off} . Časové konstanty pro nástup a pokles účinku IVM na velikost amplitudy a τ_{off} byly odvozeny pomocí monoexponenciálních funkcí. Rovnovážná disociační konstanta K_d pro IVM na WT $P2X_4$ receptoru byla vypočtena podle rovnice $K_d = k_u/k_b$, kde k_b je rychlostní konstanta pro vazbu IVM a k_u je konstanta pro odvazování IVM. Hodnoty k_b a k_u byly vypočteny podle rovnic $k_u = 1/\tau_{off}$ a $k_b = ((1/\tau_{on}) - k_u)/[IVM]$, kde τ_{on} je časová konstanta vyjadřující nástup účinku IVM a τ_{off} je časová konstanta popisující pokles účinku IVM. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM a statistická významnost rozdílů byla ověřována pomocí Studentova t-testu s hladinami významnosti (P) 0,05 a 0,01.

4.4 Konfokální mikroskopie

4.4.1 Roztoky pro fixaci preparátů

PBS pufr (10x koncentrovaný)

1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH_2PO_4 , 80 mM Na_2HPO_4

roztok paraformaldehydu

2% paraformaldehydu, 1x PBS pufr, pH = 7,4 (upraveno NaOH)

4.4.2 Příprava preparátů a snímání konfokálních obrazů

Transfekované buňky na poly-L-lysinovaných sklíčkách byly nejprve opláchnuty 2x roztokem PBS a poté zafixovány roztokem 2% paraformaldehydu. Inkubace probíhala 15 min na ledu. Poté byl roztok odstraněn a po dvojitým opláchnutím roztokem PBS byly buňky ponechány dalších 5 min na ledu. Následně byly buňky ošetřeny roztoky s rostoucí koncentrací ethanolu (70%, 80% a 95% ethanol) vždy po dobu 1 min. Po oschnutí bylo sklíčko s buňkami přiloženo na skleněnou podložku s médiem Vectashield. Lokalizace EGFP značených receptorů v buňce byla sledována pomocí laserové skenovací konfokální mikroskopie (vlnová délka použitá pro snímání – 488 nm). Obrázky byly získány s využitím inverzního mikroskopu Leica SP2 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo) s objektivem 63x a s dodatečným 2-násobným zvětšením.

4.5 Počítačové modely

Helikální kruhová projekce TM domén byla vytvořena pomocí internetové aplikace (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>). Pro vytvoření modelu molekuly IVM byla použita sada softwarových nástrojů pro molekulární modelování Ghemical (Hassinen and Perakyla 2001) a program Desktop Molecular Modeller v4.2 (Polyhedron software, Witney, UK). Model α -helixu sekvence G29-W50 P2X₄ receptoru byl vytvořen pomocí programu DeepView/Swiss-PdbViewer v3.7 (Guex and Peitsch 1997).

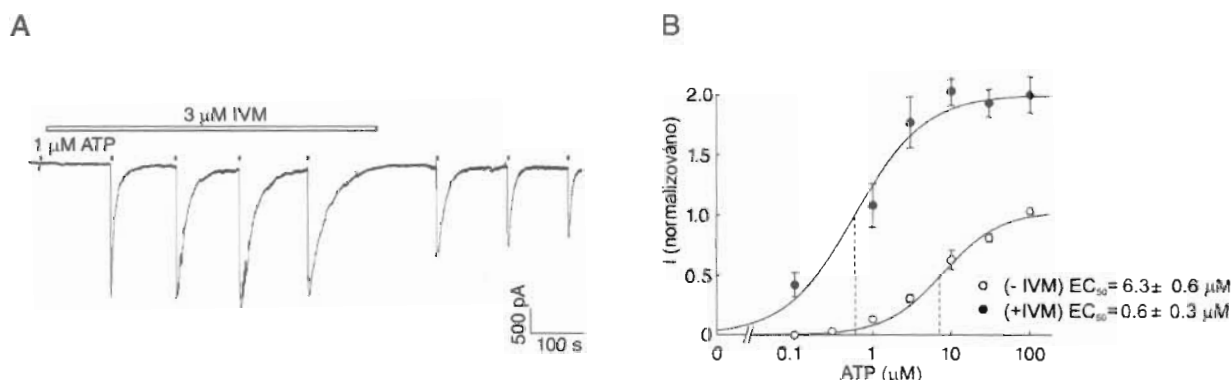
5. VÝSLEDKY

5.1 Identifikace oblastí a P2X₄ receptor-specifických aminokyselinových zbytků přispívajících k účinku ivermektinu na deaktivaci kanálu

5.1.1 Charakterizace účinku ivermektinu

Ivermektin působí jako selektivní pozitivní alosterický modulátor P2X₄ receptoru (Khakh, Proctor et al. 1999; Priel and Silberberg 2004). Potkaní P2X₄ receptor byl podrobněji zkoumán pouze v oocytech, proto jsme se v první fázi pokusů soustředili nejprve na podrobné prozkoumání účinku IVM na tento receptor v našich experimentálních podmínkách.

Aplikace ATP vyvolala u HEK293 buněk exprimujících divoký typ P2X₄ receptoru (WT P2X₄) proudy směřující do buňky. V přítomnosti 3 μM IVM bylo pozorováno výrazné navýšení amplitud proudových odpovědí a prodloužení doby deaktivace kanálu (obr. 5.1A). Měřením závislosti proudové odpovědi na použité koncentraci ATP bylo zjištěno, že v přítomnosti IVM docházelo také ke zvýšení citlivosti P2X₄ receptoru pro ATP (obr. 5.1). Hodnota EC₅₀ pro ATP byla v tomto případě snížena z $6,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$ na $0,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$.

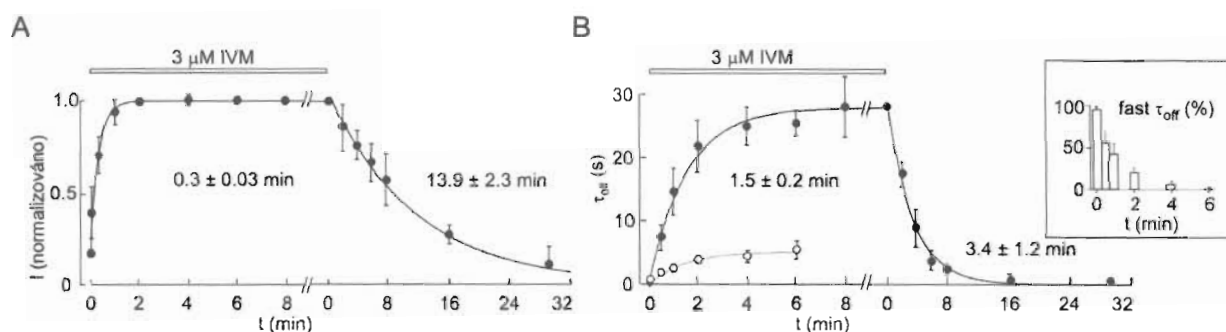


Obr. 5.1 Účinky ivermektinu (IVM) na ATP-stimulované proudy v HEK293 buňkách exprimujících potkaní WT P2X₄ receptor.

A Typický záznam dokumentující účinek IVM na amplitudu a dobu deaktivace proudů při opakované stimulaci 1 μM ATP (2-s pulsy aplikované každé 2 min, délka aplikace je naznačena černým obdélníkem nad stopou).

B Graf znázorňující závislost amplitudy proudových odpovědí WT P2X₄ receptoru na použité koncentraci ATP v nepřítomnosti (\circ symbol) a v přítomnosti (\bullet symbol) 3 μM IVM. Vertikální čáry reprezentují průměrné hodnoty EC₅₀. Jednotlivé body představují aritmetický průměr \pm SEM z 5 – 17 buněk.

Navýšení amplitudy proudové odpovědi v přítomnosti IVM (tzv. potenciační účinek IVM) bylo závislé na použité koncentraci ATP. Pro nízké mikromolární či submikromolární koncentrace bylo dosaženo až 20-násobku (obr. 5.1), pro supramaximální (100 μM) ATP koncentrace bylo navýšení proudové amplitudy (I_{max}) přibližně 2-násobné (tab. 5.1). Potenciační účinek nebyl okamžitý, ale rozvíjel se postupně s prodlužující se dobou inkubace v IVM. Podrobná analýza ukázala, že nástup potenciačního účinku byl poměrně rychlý, charakterizovaný časovou konstantou $0,3 \pm 0,03$ min (obr. 5.2A). Tato konstanta vyjadřuje přibližně dobu, za kterou došlo k navýšení amplitudy v proudu v přítomnosti 3 μM IVM na polovinu maximální odpovědi. Po odmytí IVM byl pozorován postupný pokles amplitud proudových odpovědí až k hodnotám, které byly naměřeny před působením IVM. Tento pokles byl charakterizován časovou konstantou $13,9 \pm 2,3$ min. Z těchto dvou časových konstant nástupu a poklesu účinku IVM na amplitudu ATP odpovědi byla vypočtena rovnovážná disociační konstanta $K_d = 0,07$ μM .



Obr. 5.2 Časová závislost účinku IVM na amplitudu proudových odpovědí a dobu deaktivace kanálu WT P2X₄ receptoru .

A Průběh navyšování amplitudy ATP-stimulovaných proudových odpovědí během aplikace IVM a pokles amplitudy po odmytí IVM. Čísla představují aritmetický průměr \pm SEM hodnot časových konstant při nástupu potenciačního účinku vyvolaného IVM a při návratu do původního stavu po odmytí IVM (N=4).

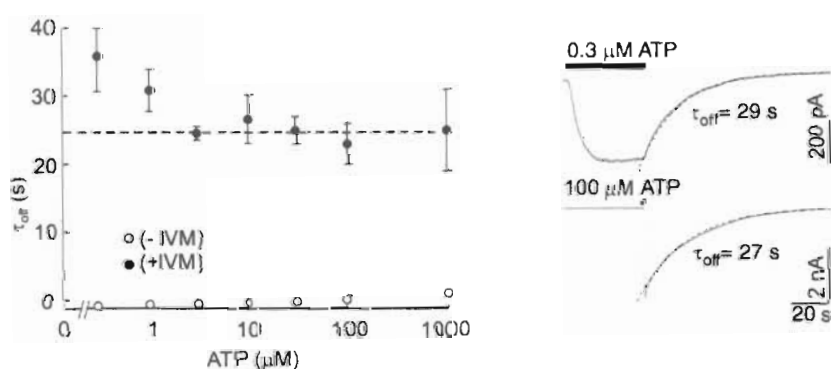
B Časový průběh poklesu proudu po odmytí ATP v přítomnosti IVM. Na počátku byla deaktivace charakterizována pomocí dvouexponenciální funkce (\circ - rychlá komponenta , \bullet - pomalá komponenta). Čísla vyjadřují aritmetický průměr \pm SEM hodnot časových konstant (N = 4) nástupu deaktivčního účinku IVM (pomalá komponenta) a návratu k výchozímu stavu po odmytí IVM.

B vložka, graf dokumentující rychlý pokles podílu rychlé komponenty na deaktivaci receptoru během opakovaných stimulací ATP v přítomnosti IVM.

V nepřítomnosti IVM byla deaktivace receptoru stimulovaného 1- 3 μM ATP nejlépe popsána pomocí 1-exponenciální funkce s průměrnou časovou konstantou $\tau_{\text{off}} = 0,4 \pm 0,1$ s.

V přítomnosti 3 μM IVM pak byla deaktivace charakterizována zpočátku 2-exponenciální funkcí a byly určeny dvě deaktivací konstanty - rychlá a pomalá. Nástup účinku IVM na deaktivaci receptoru nebyl, podobně jako tomu bylo u potenciačního účinku, okamžitý. Časová konstanta charakterizující nástup pro obě komponenty byla rovna $1,5 \pm 0,2$ min (obr. 5.2B). Na začátku inkubace v IVM převládala (z 96%) v celkovém průběhu deaktivace podíl rychlé komponenty ($\tau_{\text{off}} = 5,5 \pm 1,2$ s), ten ale postupně klesal. Po 2 min inkubace činil již méně než 20% a po 6 min zcela vymizel. Během delší inkubace s IVM bylo tedy možno popisovat deaktivaci receptoru pouze pomocí pomalé komponenty τ_{off} , která byla rovna $29 \pm 3,5$ s (tab. 5.1). Po odmytí IVM byl pozorován postupný pokles doby deaktivace kanálu charakterizovaný časovou konstantou $3,4 \pm 1,2$ min (obr. 5.2B). Z časových konstant nástupu a poklesu účinku IVM na deaktivaci byla vypočtena rovnovážná disociační konstanta $K_d = 1,43 \mu\text{M}$. Dvě rozdílné disociační konstanty pro účinek IVM na amplitudu a deaktivaci naznačují, že IVM se váže k molekule receptoru nejméně ve 2 vazebných místech, což je v souladu s předpoklady publikovanými v jiných laboratořích (Khakh, Proctor et al. 1999; Priel and Silberberg 2004).

Na rozdíl od potenciačního účinku nebyl účinek IVM na deaktivaci závislý na použité koncentraci ATP (obr. 5.3). Vzhledem k tomu, že po odmytí IVM klesly hodnoty amplitudy proudu i časové konstanty pro deaktivaci na původní hodnoty před inkubací s IVM, je zřejmé, že účinek IVM na P2X₄ receptor byl reverzibilní, což je také v souladu s publikovanými daty (Khakh, Proctor et al. 1999; Priel and Silberberg 2004).



Obr. 5.3 Koncentrační nezávislost doby deaktivace kanálu WT P2X₄ receptoru po odmytí ATP.

Vlevo Graf dokumentující koncentračně nezávislý vliv ATP na časovou konstantu deaktivace v přítomnosti i v nepřítomnosti IVM. **Vpravo** jsou uvedeny příklady záznamů deaktivace proudů indukovaných odmyváním 0,3 μM a 100 μM ATP v přítomnosti IVM. Černé čáry představují monoexponenciální křivky, jimiž byly odpovědi proloženy.

Část experimentů uváděných v této práci byla prováděna také na buňkách transfekovaných WT P2X₄ receptorem značeným na C-konci zeleným fluorescenčním proteinem EGFP a s mutanty tohoto receptoru. Důvodem byla skutečnost, že fluorescenční značení nám umožnilo určit lokalizaci receptoru v buňce, což bylo důležité zejména v případech, kdy funkce receptoru byla výrazně narušena. Naše výsledky ukázaly, že připojení EGFP nemělo vliv na amplitudu a deaktivaci WT P2X₄ receptoru, v nepřítomnosti i přítomnosti IVM (tab. 5.4), což je v souladu s publikovanými daty (Yan, Liang et al. 2005).

5.1.2 Úloha extracelulární domény

Výsledky práce z jiné laboratoře ukazují, že IVM působí pouze extracelulárně. IVM přidáný do intracelulárního roztoku nezpůsoboval žádné změny v chování P2X₄ receptoru (Priel and Silberberg 2004). To by naznačovalo, že v působení IVM na P2X₄ receptoru hraje důležitou úlohu extracelulární doména receptoru.

Význam extracelulární smyčky pro účinek IVM jsme zkoumali pomocí již dříve zkonstruovaných chimérických receptorů P2X_{2a}/V64-Y315P2X₄ a P2X_{2b}/V64-Y315P2X₄ (He, Zemkova et al. 2003). Chiméry obsahovaly extracelulární doménu P2X₄ receptoru, zbytek byl z P2X₂ receptoru, a jsou schématicky znázorněny na obr. 5.4A. Oba chimérické receptory byly funkční a proudové odpovědi těchto receptorů se v mnoha ohledech podobaly. Byla zkoumána závislost velikosti amplitudy proudové odpovědi na použité koncentraci ATP (obr. 5.4D). Hodnota EC₅₀ vypočtená z této závislosti pro oba receptory společně byla $2,3 \pm 0,8 \mu\text{M}$, což je hodnota blízká EC₅₀ WT P2X₄ receptoru ($6,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$; tab. 5.1 a $3,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$; tab. 5.4). To potvrzuje skutečnost, že přenesením extracelulární sekvence P2X₄ receptoru na P2X₂ receptor získal chimérický receptor citlivost P2X₄ receptoru vůči agonistům (He, Zemkova et al. 2003).

Vlastnímu testování působení IVM na chimérické receptory předcházelo ověření skutečnosti, že rodičovské P2X_{2a} a P2X_{2b} receptory nejsou citlivé k IVM (data nejsou zobrazena), což je v souladu s literaturou (Khakh, Proctor et al. 1999). Také u chimérických receptorů P2X_{2a}/V64-Y315P2X₄ a P2X_{2b}/V64-Y315P2X₄ nebyl v přítomnosti 3 μM IVM pozorován žádný účinek na amplitudu ani na deaktivaci (obr. 5.4B a 5.4C). Časová konstanta deaktivace τ_{off} byla stejná v přítomnosti i nepřítomnosti IVM a rovnala se $1,6 \pm 0,2 \text{ s}$. IVM také nezvyšoval citlivost chimérických receptorů vůči agonistům (obr. 5.4D). Tyto výsledky

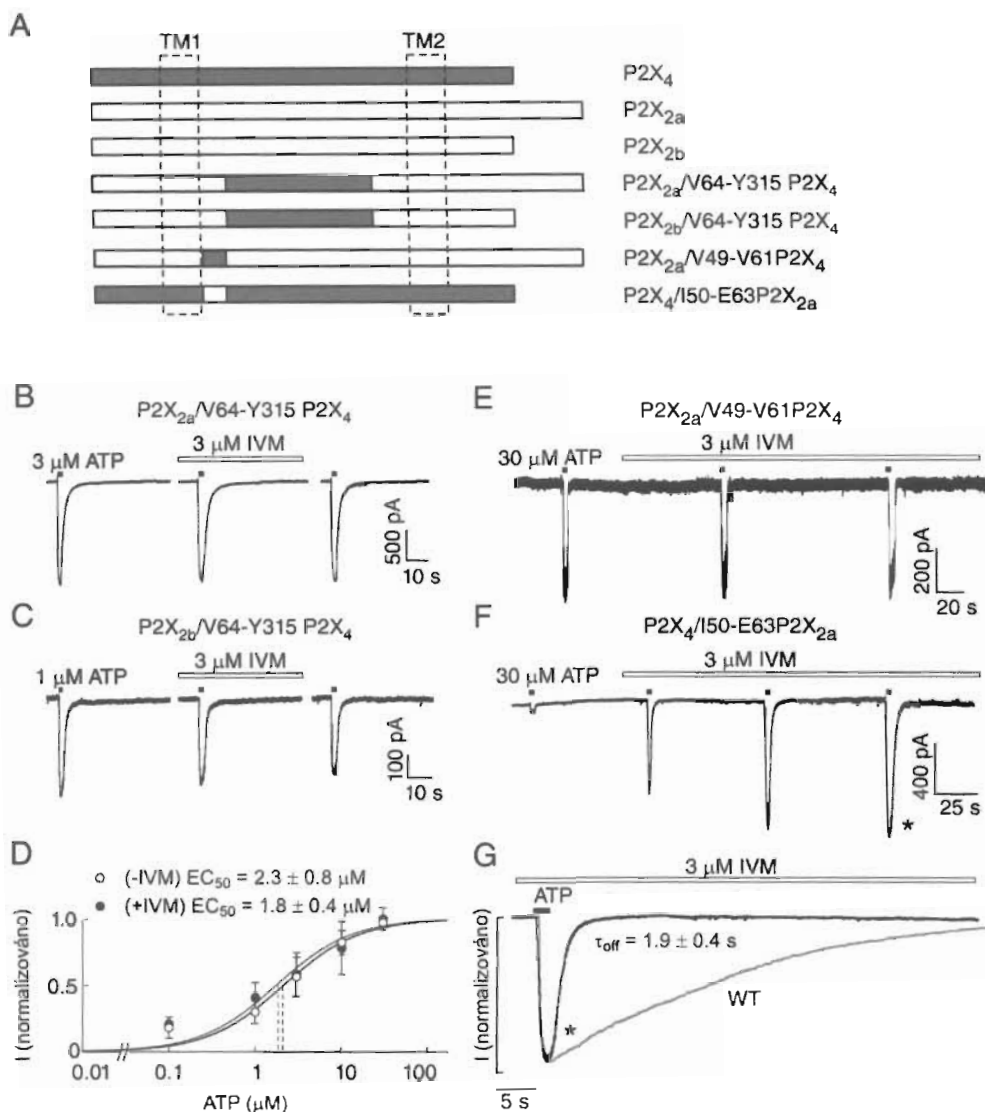
tedy ukázaly, že chimérní receptory P2X_{2a}/V64-Y315P2X₄ a P2X_{2b}/V64-Y315P2X₄ jsou k IVM necitlivé.

Chtěli jsme také testovat IVM účinek na obráceném chimérním receptoru P2X₄/I66-Y310P2X₂. Tento receptor byl však nefunkční (He, Zemkova et al. 2003) a ani v přítomnosti IVM neodpovídal na ATP stimulaci (data nejsou zobrazena).

Celá extracelulární doména P2X₄ receptoru je tvořena úsekem W50-I337. V uvedených chimérních receptorech tedy nebyly zaměněny extracelulární domény kompletně. Nebyly v nich nahrazeny krátké úseky V49-S63 nad první transmembránovou doménou a G316-I337 nad druhou transmembránovou doménou. Existovala zde tedy možnost, že IVM by mohl působit právě v těchto oblastech. Vzhledem k tomu, že v úseku G316-I337 se nenachází žádný P2X₄ receptor-specifický aminokyselinový zbytek, zaměřili jsme se v další fázi experimentů na zjištění významu úseku V49-S63. K tomuto účelu jsme zkonstruovali dva nové chimérní receptory P2X_{2a}/V49-V61P2X₄ a P2X₄/I50-E63P2X_{2a}.

Oba chimérní receptory byly funkční, v porovnání s WT P2X₄ receptorem byly ale méně citlivé k ATP. Stimulace chimérního receptoru P2X_{2a}/V49-V61P2X₄ 30 μ M ATP vyvolala nízké amplitudy proudových odpovědí (220 ± 46 pA), které nebyly v přítomnosti 3 μ M IVM zvýšeny. Přítomnost IVM neměla také žádný vliv na deaktivaci kanálu (obr. 5.4E). Amplituda proudových odpovědí P2X₄/I50-E63P2X_{2a} receptoru stimulovaného 100 μ M ATP byla dokonce ještě nižší (70 ± 10 pA), avšak s prodlužující se dobou inkubace v 3 μ M IVM došlo k jejímu postupnému navýšení až na 660 ± 130 pA. Vliv IVM na dobu deaktivace chimérního receptoru byl ale jen minimální (obr. 5.4F). Hodnota τ_{off} v přítomnosti 3 μ M IVM byla pro P2X₄/I50-E63P2X_{2a} jen $1,9 \pm 0,4$ s, zatímco pro WT P2X₄ receptor dosahovala hodnoty $29,0 \pm 3,5$ s. Lze tedy říci, že chimérní receptor P2X_{2a}/V49-V61P2X₄ byl k IVM necitlivý. P2X₄/I50-E63P2X_{2a} receptor byl sice k IVM citlivý, avšak plně byl zachován pouze potenciační účinek IVM a deaktivací účinek byl výrazně snížen.

Pokusy s chimérními receptory nám ukázaly, že IVM nepůsobí přes ektodoménu P2X₄ receptoru a jeho receptorové místo se tak nepřekrývá s vazebným místem pro ATP.



Obr. 5.4 Charakterizace účinků IVM na ATP-indukované proudy v chimérických P2X₂/P2X₄ receptorech.

A Schématické znázornění WT receptorů a chimérických konstruktů použitých v této studii. P2X_{2a} a P2X_{2b} jsou dvě různé sestříhové varianty P2X₂ receptoru. Čárkované obdélníky označují transmembránové úseky TM1 a TM2.

B,C Ukázky odpovědí P2X_{2a}/V64-Y315P2X₄ a P2X_{2b}/V64-Y315P2X₄ chimérických receptorů na krátké (1-2 s) aplikace ATP před působením IVM, 4 min po začátku aplikace IVM a 20 min po odmytí IVM (směrem zleva doprava).

D Závislost velikosti amplitudy proudových odpovědí obou chimérických receptorů na použité koncentraci ATP v nepřítomnosti (○ symbol) a v přítomnosti (● symbol) 3 μM IVM. Vertikální přerušovaná čára reprezentuje průměrné hodnoty EC₅₀. Body představují aritmetický průměr ± SEM ze 3 – 5 buněk pro každou koncentraci ATP a pro každou chiméru.

E,F Záznamy dokumentující částečnou závislost deaktivčního účinku IVM na ektodoménové sekvenci V49-V61 receptoru P2X₄. Chimérický receptor P2X_{2a}/V49-V61P2X₄ byl necitlivý k působení IVM (**E**) na rozdíl od chimérického receptoru P2X₄/I50-E63P2X_{2a}, u něhož byl pozorován snížený účinek IVM na deaktivaci proudu a plně zachovaný potenciační účinek.

G Reprezentativní proudové záznamy WT P2X₄ a chimérního P2X₄/I50-E63P2X_{2a} receptoru indukované 3 μM ATP v přítomnosti 3 μM IVM. Symbol * označuje stopu, která je zobrazena v menším časovém měřítku také na obr. F. Superponované záznamy ukazují výrazný rozdíl v deaktivaci rodičovského a chimerního receptoru.

5.1.3 Závislost účinku ivermektinu na P2X₄ receptor-specifických ektodoménových a transmembránových aminokyselinových zbytcích

Experimenty s chimérními receptory nám pomohly vymezit oblasti receptoru, které by mohly být zodpovědné za účinek IVM na P2X₄ receptor. V těchto oblastech byl pak s využitím techniky polohově řízené mutagenese sledován význam jednotlivých P2X₄ receptor-specifických aminokyselinových zbytků pro působení IVM na P2X₄ receptor. Byl zkoumán úsek V49-V61, neboť experimenty s chimérními receptory P2X_{2a}/V49-V61P2X₄ a P2X₄/I50-E63P2X_{2a} ukázaly důležitost této sekvence pro IVM účinek na deaktivaci kanálu. V tomto úseku se nachází celkem pět P2X₄ receptor-specifických residuí – W50, T57, S59, V60 a V61 (obr. 5.5A). Pro mutagenезní experimenty byl vybrán také zbytek E56, který se nachází v této oblasti. Tento zbytek se nám jevil zajímavým z toho důvodu, že je společný pouze pro P2X₄ receptor, nefunkční P2X₆ receptor a pro P2X receptor ze *Schistosoma mansoni* (schP2X), který je podobně jako P2X₄ receptor citlivý k IVM (Agboh, Webb et al. 2004). Současně byly studovány P2X₄ specifické zbytky z TM1 a TM2. Důvodem byla skutečnost, že IVM je látka lipofilního charakteru. Považovali jsme tedy za možné, že díky této své vlastnosti se může částečně zanořit do membrány buňky a interagovat i se zbytky v transmembránových úsecích. V transmembránových doménách se nachází celkem 4 P2X₄ receptor-specifické zbytky: M31, A41, V355 a V357 (obr. 5.5A). Všechny tyto vybrané aminokyselinové zbytky byly zaměněny za alanin, s výjimkou A41, který byl zaměněn za leucin.

Všechny vzniklé mutantní receptory byly funkční. Vnesení mutace nemělo vliv na citlivost receptoru k ATP (tab. 5.1). Avšak u receptorů P2X₄V60A a P2X₄V355A byla pozorována snížená velikost maximální proudové odpovědi. Maximální amplituda proudu poklesla u P2X₄V60A receptoru na 54% a u P2X₄V355A receptoru na 33% ve srovnání s WT P2X₄ receptorem. Aplikace 3 μM IVM vedla u všech receptorů k navýšení maximální amplitudy proudu. Potenciace byla 1,7-2,5-násobná. Přítomnost 3 μM IVM měla za následek také prodloužení doby deaktivace kanálu podobně jako tomu bylo u WT P2X₄ receptoru s výjimkou 3 receptorů - P2X₄W50A, P2X₄V60A a P2X₄V357A. V případě receptorů

P2X₄W50A a P2X₄V357A byl účinek IVM na deaktivaci kanálu statisticky významně snížen (τ_{off} P2X₄W50A = 5,9 ± 1,8 s a τ_{off} P2X₄V357A = 10,1 ± 2,3 s), naopak v případě P2X₄V60A výrazně navýšen (τ_{off} P2X₄V60A = 46,6 ± 5,4 s) ve srovnání s WT P2X₄ receptorem (τ_{off} P2X₄ = 28, 9 ± 3,5 s) (tab. 5.1, obr. 5.4). Tyto pokusy naznačily, že zbytky W50, V60 a V357 by mohly hrát důležitou roli v účinku IVM na P2X₄ receptor.

Tab. 5.1 Účinky IVM na WT a mutantní P2X₄ receptory se záměnou receptor-specifických zbytků.

Receptor	EC ₅₀ (μM)	-IVM I _{max} (nA)	-IVM τ _{off} (s)	+IVM I _{max} (nA)	+IVM τ _{off} (s)	I _{max} (násobek navýšení)
WT P2X ₄	6.3 ± 0.6	1.6 ± 0.2	0.4 ± 0.05	3.1 ± 0.4	29 ± 3.5	1.9 ± 0.2
V61A	5.4 ± 1.3	2.3 ± 0.2	0.6 ± 0.06	4.3 ± 0.2	30 ± 5.3	1.9 ± 0.2
V60A	6.9 ± 1.6	0.9 ± 0.1*	0.5 ± 0.47	1.5 ± 0.3	47 ± 5.4*	1.7 ± 0.4
S59A	3.2 ± 1.3	1.3 ± 0.2	0.5 ± 0.09	2.4 ± 0.4	24 ± 5.4	1.8 ± 0.3
T57A	7.6 ± 1.1	1.1 ± 0.6	0.7 ± 0.09	1.9 ± 0.2	25 ± 4.8	1.7 ± 0.2
E56A	4.0 ± 1.8	1.9 ± 0.4	0.3 ± 0.04	3.4 ± 0.5	31 ± 9.4	1.8 ± 0.3
W50A	4.6 ± 0.5	1.2 ± 0.4	0.3 ± 0.01	2.5 ± 0.5	5.9 ± 1.8**	2.1 ± 0.4
A41L	7.0 ± 1.6	1.8 ± 0.5	0.5 ± 0.05	3.4 ± 0.5	29 ± 6.8	1.9 ± 0.3
M31A	7.2 ± 2.2	1.4 ± 0.2	0.3 ± 0.09	3.3 ± 0.5	21 ± 3.9	2.5 ± 0.3
V355A	7.6 ± 2.0	0.5 ± 0.1**	0.3 ± 0.04	1.2 ± 0.3	36 ± 4.1	2.3 ± 0.5
V357A	5.6 ± 1.2	2.4 ± 0.5	0.2 ± 0.02	4.6 ± 0.3	10 ± 2.3**	1.9 ± 0.1

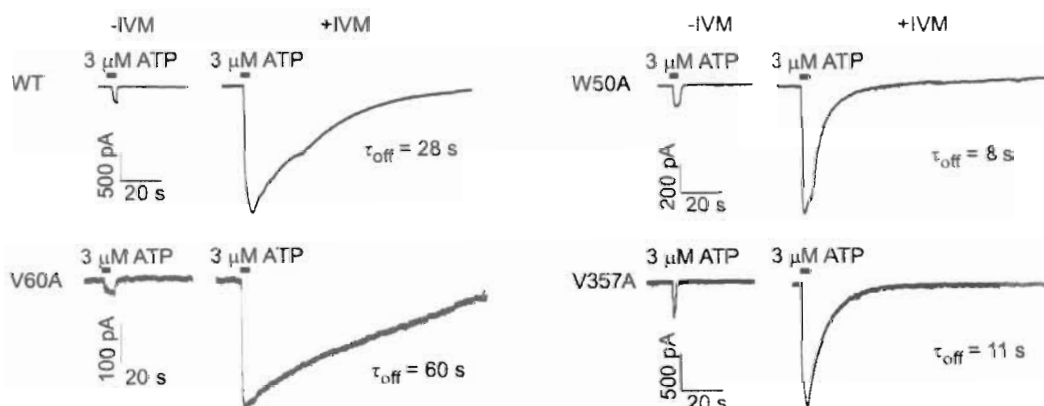
EC₅₀ – koncentrace ATP vyvolávající odpověď dosahující 50% maximální proudové odpovědi, I_{max} – maximální proudová odpověď indukovaná 30 – 100 μM ATP, τ_{off} – časová konstanta deaktivace proudu po odstranění ATP. Každý receptor byl zkoumán v 6 - 19 buňkách v přítomnosti (+IVM) a v nepřítomnosti (-IVM) 3 μM IVM. Statistické rozdíly *P>0,05 a **P >0,01 byly vypočteny pro EC₅₀ a τ_{off} mezi WT a mutantními receptory. Rozdíly v potenciačním účinku IVM byly posuzovány porovnáním násobku navýšení I_{max}, který byl vypočten jako podíl hodnot I_{max} (+IVM) a I_{max} (-IVM).

A

		TM1			
P2X ₁	30	GVIFRLIQLVVLVYVIGWVVFV	YEKGYQT - SSDLISSV		65
P2X ₂	30	GFVHRMVQLLILLYFVWYVFI	VQKSYQDSETGPESSEI		66
P2X ₃	24	GIINRAVQLLIISYFVGWVFL	HEKAYQVRDTAIESSV		60
P2X ₅	30	GLLYRVLQLIILLYLLIWFVLI	KKSYQDIDTSLQSAV		66
P2X ₆	31	GISQRLQLGVVYVIGWALL	AKKGYQEWDMDPQISV		67
P2X ₇	27	GTIKWILHMTVFSYVS - FALM	SDKLYQR - KEPLISSV		61
P2X ₄	29	GLINRAVQLLILYVIGWVVFV	YEKGYQEDSY - YSSV		64
schP2X	25	GVTQRLLQLVLILYVVCWVMI	YEKGYQENDIA - KSAV		60

		TM2			
P2X ₁	312	GIHFDILVDGKAGKFDIIPMTI	TIGSGIGIFGVATVLCDLLL		354
P2X ₂	311	GIRIDIVIHGQAGKFSLIPTI	INLATALTSIGVGSFLCDWILL		353
P2X ₃	298	GIRFDLVYGNAGKFNIPITII	SSVAAPTSGVGTVLCDIILL		340
P2X ₅	317	GIRFDVIVNGKAGKFSIIPTVI	NIGSGLALMGAGAFFCDLVLI		359
P2X ₆	310	GIRFDILVTGQAGKFAIPTAI	IVGTGAAWLGMVTFLCDLLL		352
P2X ₇	314	GVRFDILVFGTGGKFDIQLVV	YIGSTLSYFGLATVCIDLIN		356
P2X ₄	316	GIRFDIIVFGKAGKFDIIPMTI	NVGSGLALLGVATVLCDIIVL		358
schP2X	317	GIRFVIHVSGEAGKFHLLPLTM	NIGSGLALLGLAPTVCIDIIAL		359

B



Obr. 5.5 Charakterizace mutantních P2X₄ receptorů, u kterých byly zaměněny receptor-specifické zbytky.

A Porovnání sekvencí potkaních P2X receptorů a schP2X receptoru v oblasti transmembránových domén a přilehlých úseků ektodomén, které nebyly nahrazeny v chimerálních receptorech P2X_{2a}/V64-Y315P2X₄ a P2X_{2b}/V64-Y315P2X₄. Mutované P2X₄ receptor-specifické aminokyseliny jsou označeny modrou barvou. Předpokládané úseky TM1 a TM2 jsou označeny velkými obdélníky.

B Reprezentativní záznamy HEK293 buněk exprimujících WT P2X₄ receptor a vybrané receptor-specifické mutantní receptory stimulovaných 3 μM ATP v přítomnosti (+IVM) a v nepřítomnosti (-IVM) 3 μM IVM. Čísla pod záznamy jsou konkrétní deaktivací konstanty (τ_{off}) v přítomnosti IVM.

5.2 Identifikace zbytků transmembránových domén P2X₄ receptoru podílejících se na účincích ivermektinu

Výsledky pokusů s chimérními receptory a P2X₄ receptor-specifickými mutantními receptory ukázaly, že účinek IVM nelze odstranit záměnou jednotlivých receptor-specifických aminokyselin a že důležitou úlohu pro účinek (nebo vazbu) IVM by mohla mít nejen oblast zahrnující 14 aminokyselin extracelulární domény těsně nad TM1, ale také oblast transmembránových domén. Rozhodli jsme se proto provést skenovací mutagenезi všech aminokyselinových zbytků první i druhé transmembránové domény P2X₄ receptoru a na mutantních receptorech studovat tři účinky IVM: zvýšení maximální proudové odpovědi, prodloužení časové konstanty deaktivace a zvýšení citlivosti k ATP (t.j. snížení ATP EC₅₀).

5.2.1 Cysteinová skenovací mutagenезe TM1

V následujících experimentech jsem zkoumalí vliv cysteinové mutagenезe na účinek IVM u první transmembránové domény (TM1), která je vymezena zbytky G29 až V49 (North 2002) (obr. 5.5A). Na základě výsledků předchozích experimentů jsme současně studovali také receptor-specifický zbytek W50, jehož alaninová mutace měla významný vliv na účinek IVM na deaktivaci kanálu. Po vzoru podobných pokusů s první transmembránovou doménou, které byly provedeny na receptoru P2X₂ (Jiang, Rassendren et al. 2001), jsme nahradili jednotlivé aminokyselinové zbytky za cystein a sledovali vliv mutagenезe na chování receptoru nejprve v nepřítomnosti a poté i v přítomnosti 3 μM IVM.

Všechny mutantní receptory TM1 byly funkční. U buněk exprimujících receptory P2X₄G29C, P2X₄R33C, P2X₄Y42C, P2X₄W46C a P2X₄V49C jsme zaznamenali statisticky významně snížené hodnoty amplitud proudových odpovědí ve srovnání s WT P2X₄ receptorem (tab. 5.2). Z důvodu nízkých odpovědí se nám nepodařilo u receptorů P2X₄G29C a P2X₄V49C stanovit hodnoty EC₅₀. P2X₄M31C a P2X₄R33C receptory měly sníženou citlivost k ATP, naopak P2X₄Y42C a P2X₄G45C receptory vykazovaly zvýšenou citlivost ve srovnání s WT P2X₄ receptorem. P2X₄Y42C receptor se kromě zvýšené citlivosti a snížené maximální odpovědi lišil od ostatních mutantních receptorů také výrazným poklesem velikosti proudových amplitud během opakovaných aplikací ATP. Lze očekávat, že receptory, u nichž mutagenезe způsobila současně změny v EC₅₀ i I_{max}, mohou hrát důležitou úlohu ve funkci receptoru. U zbývajících mutantních receptorů (P2X₄L30C, P2X₄N32C, P2X₄A34C, P2X₄V35C, P2X₄Q36C, P2X₄L37C, P2X₄L38C, P2X₄I39C, P2X₄L40C,

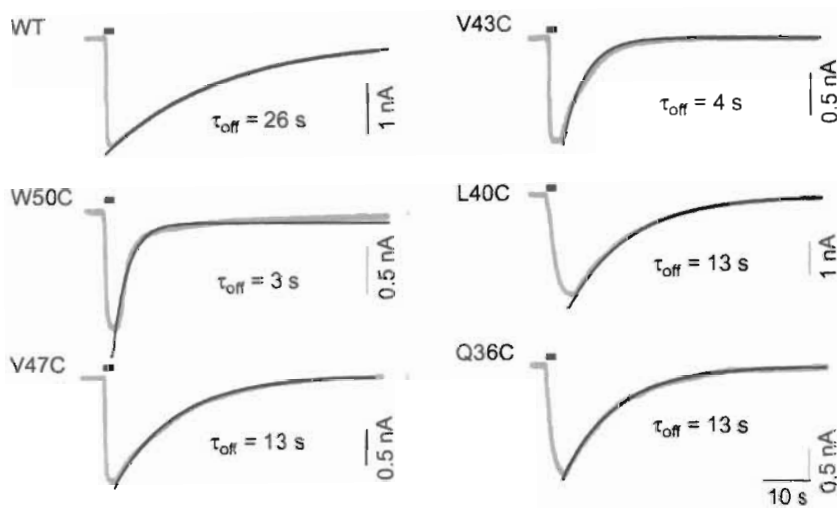
P2X₄A41C, P2X₄V43C, P2X₄I44C, P2X₄V47C, P2X₄F48C a P2X₄W50C) jsme nepozorovali významné změny v hodnotách EC₅₀ a I_{max} oproti hodnotám WT P2X₄ receptoru a lze tedy říci, že tyto receptory byly k substituci cysteinem necitlivé.

Tab. 5.2 Účinky IVM na WT a TM1 mutantní P2X₄ receptory

P2X ₄ receptor	-IVM EC ₅₀ (μM)	+IVM EC ₅₀ (μM)	-IVM I _{max} (nA)	+IVM I _{max} (nA)	-IVM τ _{off} (s)	+IVM τ _{off} (s)
WT	4.6±0.3	0.5±0.1	1.6±0.2	2.8±0.2	0.4±0.04	26±1.6
W50C	7.3±1.9	2.2±0.1*	1.6±0.4	2.5±0.3	0.5±0.20	4±0.4*
V49C [#]	n.d.	1.8±0.3*	0.3±0.1*	0.9±0.3*	0.4±0.05	15±1.9*
F48C	3.8±1.3	0.5±0.2	1.2±0.3	1.9±0.3	0.4±0.1	31±2.8
V47C	3.6±1.2	1±0.1	1.3±0.2	2±0.1*	0.3±0.01	16±1.6*
W46C	6.2±0.2	0.4±0.1	1±0.2*	1.4±0.3*	0.5±0.16	26±2.7
G45C	1.6±0.3*	0.2±0.03	1.8±0.3	2.9±0.5	0.4±0.04	76±9.3*
I44C	4.1±0.4	0.4±0.03	2.1±0.5	2.6±0.3	0.3±0.03	31±4.6
V43C	4.5±0.5	2.2±0.4*	1.4±0.4	2.2±0.5	0.3±0.15	2.7±0.5*
Y42C	0.6±0.1*	0.5±0.1	0.5±0.2*	0.4±0.2*	21±1.8*	32±4.2
A41C	5.1±0.8	0.7±0.4	1.6±0.3	2.4±0.2	0.3±0.05	26±2.9
L40C	7.2±1.2	1.7±0.5*	1.2±0.1	2.7±0.2	0.2±0.09	13±1.3*
I39C	4.6±1.3	0.5±0.1	1.3±0.3	2.1±0.4	0.2±0.18	30±3.6
L38C	7.4±2.5	0.9±0.1	1.8±0.2	2.4±0.4	0.2±0.03	19±2.1
L37C	6.3±0.7	0.9±0.2	1.8±0.9	2.3±0.2	0.3±0.05	22±2.5
Q36C	7.4±2.5	1.9±0.2*	1.4±0.2	2.5±0.4	0.2±0.03	13±2.0*
V35C	4.1±1.0	0.6±0.3	1.5±0.2	2±0.5	0.3±0.04	37±3.2
A34C	3.9±1.1	0.5±0.5	2.0±0.4	2.5±0.4	0.3±0.05	24±2.1
R33C	9.9±1.8*	2.9±1.4*	0.6±0.1*	0.8±0.2*	0.7±0.2	22±2.8
N32C	6±0.9	0.8±0.1	2±0.3	2.8±0.4	0.4±0.07	20±4.7
M31C [#]	15±2*	1±0.2	1.1±0.2	2.6±0.3	0.3±0.15	17±2.5*
L30C	5.7±0.7	0.9±0.2	1.3±0.3	2.6±0.4	0.3±0.02	21±3.0
G29C [#]	n.d.	4.9±0.7*	0.1±0.05*	0.5±0.1*	0.3±0.02	16±1.3*

EC₅₀ – koncentrace ATP vyvolávající odpověď dosahující 50% maximální proudové odpovědi, I_{max} – maximální proudová odpověď indukovaná 30 – 100 μM ATP (u receptorů z označením [#] až 1 mM ATP), τ_{off} – časová konstanta deaktivace proudu po odstranění ATP, (*) značí statistické rozdíly mezi WT a mutantními receptory (P<0,01). Čísla představují aritmetický průměr ± SEM.

Většina receptorů tolerantních k mutagenезi vykazovala v přítomnosti IVM navýšení I_{max} , prodloužení doby deaktivace a zvýšení EC_{50} srovnatelné s WT P2X₄ receptorem. Výjimkou byly receptory P2X₄Q36C, P2X₄L40C, P2X₄V43C, P2X₄V47C, P2X₄W50C, které vykazovaly v přítomnosti IVM rychlejší deaktivaci než WT P2X₄ receptor (obr. 5.6). Současně u většiny těchto receptorů došlo ke snížení účinku IVM na citlivost k ATP. Jelikož se jedná o receptory necitlivé k mutagenезi (nedošlo u nich ke změně EC_{50} a I_{max} v nepřítomnosti IVM), ukazují tyto změny na význam příslušných zbytků pro rozpoznávání IVM molekuly v lipidové dvojvrstvě.



Obr. 5.6 Charakterizace deaktivace vybraných P2X₄ TM1 mutantních receptorů.

Reprezentativní proudové záznamy HEK293 buněk exprimujících WT, W50 a TM1 mutantní P2X₄ receptory stimulované 1-3 μ M ATP v přítomnosti 3 μ M IVM. Šedou barvou jsou značeny záznam, černá křivka byla získána proložení stopy monoexponenciální funkcí. Čísla pod záznamy jsou deaktivací konstanty (τ_{off}).

Odlíšnosti v působení IVM jsme zaznamenali také v případě receptorů citlivých k mutagenезi. V jejich případě je posouzení, zda změny v účincích IVM odráží pouze narušení receptorové funkce nebo i změny ve vazbě IVM, komplikovanější. Sledovali jsme, zda změna citlivosti v přítomnosti IVM je provázána odpovídající změnou v rychlosti deaktivace receptoru, neboť bylo zjištěno, že tyto dva parametry spolu souvisí (Rettinger and Schmalzing 2004; Zemkova, He et al. 2004). Při zvýšené citlivosti receptoru k agonistovi probíhá deaktivace pomaleji a naopak. Dále jsme sledovali, zda násobek navýšení EC_{50} a I_{max} , ke kterému dochází v přítomnosti IVM, je srovnatelný s hodnotami pro WT P2X₄ receptor (násobek EC_{50} = 65, násobek I_{max} = 1,75).

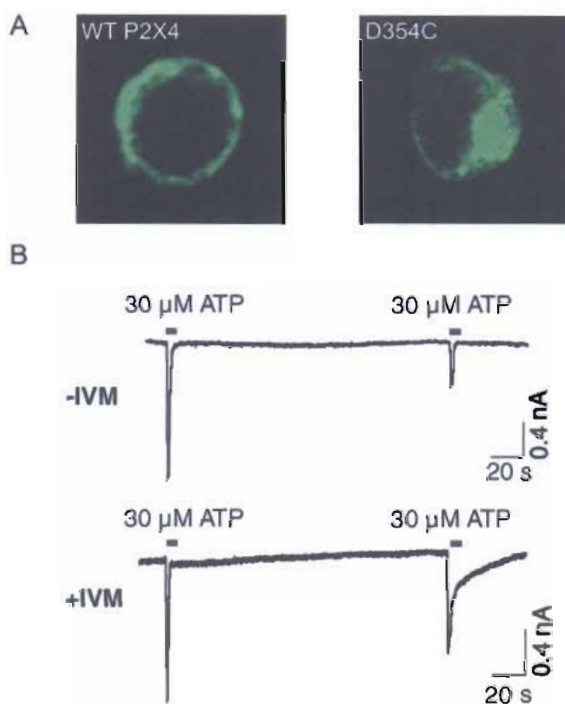
V přítomnosti IVM byla částečně obnovena funkce P2X₄G29C a P2X₄V49C receptorů, které byly v nepřítomnosti IVM téměř nefunkční. Nicméně i přes výrazné zvýšení zůstala citlivost obou receptorů nižší než citlivost WT P2X₄ receptoru, což ale bylo doprovázeno zrychlenou deaktivací. Působením IVM došlo k 3- a 5-násobnému navýšení I_{max} . Změny v rychlosti deaktivace pozorované u P2X₄M31C a P2X₄G45C receptorů byly rovněž paralelní se změnami citlivosti k ATP, na rozdíl od P2X₄R33C receptoru, kde snížená citlivost nebyla doprovázena zrychlenou deaktivací. Z toho lze usuzovat, že v případě P2X₄R33C receptoru byly změny v účinku IVM způsobeny nejen narušenou funkcí receptoru, ale také narušením vazby IVM. Výjimečné bylo také chování P2X₄Y42C receptoru v přítomnosti IVM. IVM totiž neovlivňoval ani maximální amplitudu ani citlivost receptoru k ATP. Pokles proudu po odmytí agonisty byl velmi zpomalen a to jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti IVM. Podobný pokles byl ale pozorován i při dlouhých stimulacích ATP (časová konstanta desenzitizace $\tau_{des} = 41,2 \pm 5,2$ s), což ukazuje, že tento pokles odráží ve velké míře i desenzitizaci receptoru. Dále jsme pozorovali v přítomnosti IVM sníženou hodnotu I_{max} u receptoru P2X₄W46C při současně zachované citlivosti k ATP a rychlosti deaktivace. Tento receptor měl sníženou hodnotu I_{max} již v nepřítomnosti IVM a násobek zvýšení I_{max} byl srovnatelný s hodnotou pro WT P2X₄ receptor. Z toho lze usuzovat, že nižší I_{max} je zřejmě důsledek nižší exprese receptoru v membráně.

5.2.2 Cysteinová skenovací mutagenese TM2

Druhá transmembránová doména (TM2) P2X₄ receptoru je vymezena aminokyselinovými zbytky N338 až L358 (North 2002) (obr. 5.5A). Pomocí polohově řízené mutagenese jsme, podobně jako u TM1, zaměnili jednotlivé zbytky TM2 za cystein a v případě C353 za alanin.

Všechny získané mutantní receptory byly funkční s výjimkou P2X₄D354C receptoru, který neodpovídal na stimulaci ATP (až do 1 mM) ani v přítomnosti IVM. Nicméně výsledky z konfokální mikroskopie potvrdily lokalizaci tohoto receptoru v plasmatické membráně (obr. 5.7A). To ukazuje, že nefunkčnost receptoru nebyla důsledkem špatného dopravení receptoru do plasmatické membrány buněk, ale změn ve vazbě ATP či otevírání kanálu. Receptory P2X₄S341C, P2X₄G347C, P2X₄T350C, a P2X₄V357C vykazovaly statisticky významně snížené hodnoty maximální proudové amplitudy ve srovnání s WT P2X₄ receptorem (tab. 5.3), jejich citlivost k ATP ale nebyla ovlivněna. U receptorů P2X₄G340C a

P2X₄C353A jsme vedle snížení I_{\max} zaznamenali i změny v EC_{50} . Citlivost k ATP byla, při současném zachování I_{\max} , velmi výrazně snížena také v případě receptoru P2X₄L343C. U receptoru P2X₄A344C jsme pozorovali při opakovaných aplikacích ATP rychlý pokles proudu (obr. 5.7B). Zbývající TM2 mutantní receptory byly k cysteinové mutagenезi tolerantní.



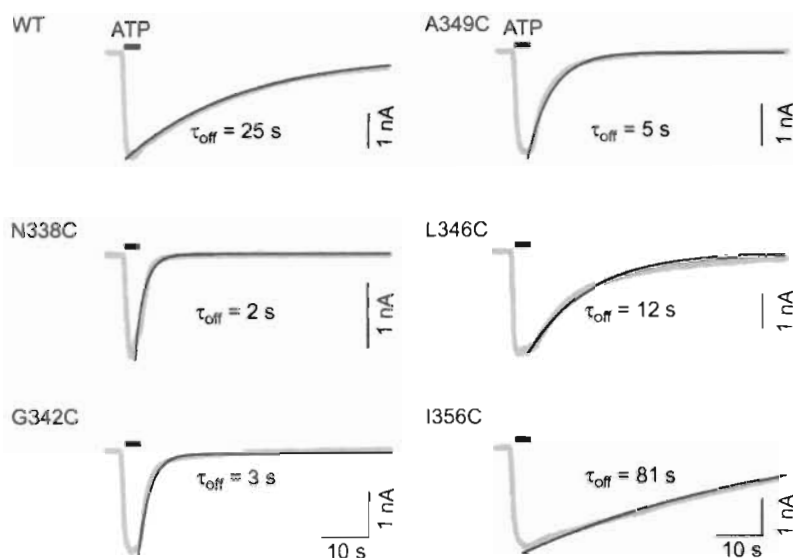
Obr. 5.7 Charakterizace P2X₄A344C a P2X₄D354C receptorů.

A Obrazy z konfokální mikroskopie potvrzující lokalizaci EGFP značeného WT P2X₄ receptoru a mutantního P2X₄D354C receptoru v plasmatické membráně HEK293 buněk.

B Reprezentativní záznamy ze stimulace HEK293 buněk exprimujících P2X₄A344C receptor v přítomnosti (+IVM) a nepřítomnosti IVM (-IVM). Ze záznamu je patrný výrazný pokles proudu při opakovaných aplikacích ATP. U tohoto receptoru jsme navíc zaznamenali dvouexponenciální průběh deaktivace i po delší inkubaci s IVM.

V přítomnosti IVM jsme u několika TM2 mutantních receptorů, citlivých i necitlivých k mutagenезi, pozorovali změny oproti chování WT P2X₄ receptoru. U receptoru P2X₄A344C nedocházelo v přítomnosti IVM k úplnému návratu proudu k původním hodnotám, a tudíž jsme nebyli schopni analyzovat vliv IVM na hodnoty EC_{50} a I_{\max} , třebaže potenciační i deaktivační efekt IVM byl zachován (obr. 5.7B). P2X₄N338C, P2X₄G342C, P2X₄L346C a P2X₄A349C receptory deaktivovaly rychleji než WT P2X₄ receptor, přičemž byla současně snížena jejich citlivost k ATP. P2X₄I356C receptor deaktivoval pomaleji než

WT P2X₄ receptor (obr. 5.8). Všechny tyto receptory byly tolerantní k substituci cysteinem, což ukazuje, že změny byly způsobeny zřejmě narušením vazby molekuly IVM v lipidové dvojvrstvě.



Obr. 5.8 Charakterizace TM2 mutantních P2X₄ receptorů necitlivých k mutagenезi.

Reprezentativní proudové záznamy HEK293 buněk exprimujících WT a TM2 mutantní P2X₄ receptory stimulovaných 1-3 μM ATP v přítomnosti 3 μM IVM. Šedou barvou jsou značeny záznamy, černá křivka byla získána proložení stopy monoexponenciální funkcí. Čísla pod záznamy jsou deaktivací konstanty (τ_{off}).

Při posuzování významu změn v účincích IVM u receptorů, jejichž chování se v důsledku mutagenезe lišilo od WT P2X₄ receptoru, jsme sledovali stejné parametry jako v případě TM1 domény. P2X₄S341C, P2X₄G347C, P2X₄T350C a P2X₄V357C receptory, u nichž se mutagenезe projevila redukcí maximální proudové amplitudy, měly sníženou hodnotu I_{max} i v přítomnosti IVM. Jejich citlivost k ATP i rychlost deaktivace byla podobná WT P2X₄ receptoru s výjimkou P2X₄S341C, u kterého ale korespondovala snížená citlivost k ATP se zvýšenou rychlostí deaktivace. Násobek navýšení I_{max} , ke kterému došlo působením IVM, byl v případě P2X₄T350C srovnatelný s WT P2X₄ receptorem, což ukazuje, že tento zbytek není kritický pro vazbu IVM. Nízká hodnota I_{max} byla patrně zapříčiněna sníženou expresí receptoru v membráně. Na druhou stranu, pro receptory P2X₄S341C, P2X₄G347C a P2X₄V357C jsme získali násobek navýšení I_{max} vyšší než u WT P2X₄ receptoru (v rozmezí 2,5-4,8). To ukazuje, že receptory P2X₄S341C, P2X₄G347C a P2X₄V357C s vysokou pravděpodobností nemají sníženou vazbu IVM. Zvýšený nárůst I_{max} ve srovnání s WT P2X₄ receptorem svědčí pro skutečnost, že receptory mají posunutou rovnováhu ve prospěch

uzavřeného stavu. Svým chováním se od ostatních receptorů výrazně odlišoval receptor P2X₄G340C. U něj, podobně jako u P2X₄Y42C z TM1, jsme nezaznamenali v přítomnosti IVM nárůst citlivosti k ATP ani potenciaci maximální proudové odpovědi. Deaktivace byla působením IVM prodloužena, ale méně než tomu bylo v případě WT P2X₄ receptoru byla významně prodloužena i v nepřítomnosti IVM.

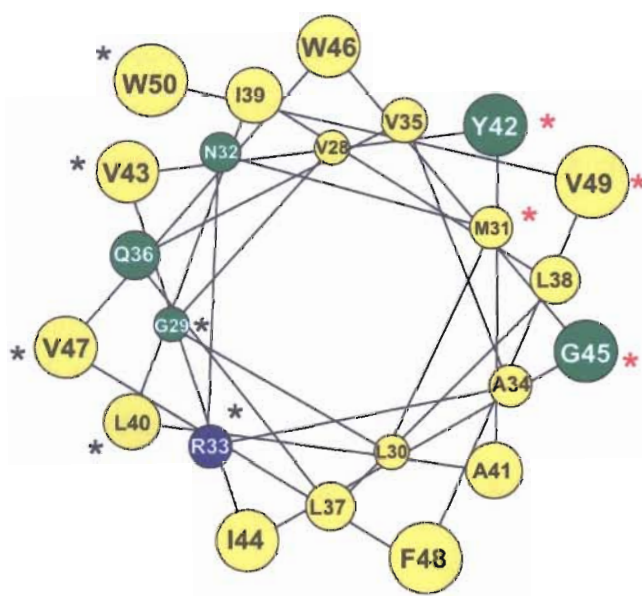
Tab. 5.3 Účinky IVM na WT a mutantní TM2 P2X₄ receptory

P2X ₄ receptor	-IVM EC ₅₀ (μM)	+IVM EC ₅₀ (μM)	-IVM I _{max} (nA)	+IVM I _{max} (nA)	-IVM τ _{off} (s)	+IVM τ _{off} (s)
WT	4.6±0.3	0.5±0.1	1.6±0.2	2.8±0.2	0.4±0.1	26±1.6
N338C	4.6±0.8	2.5±1.1*	1±0.3	2.4±0.3	0.5±0.1	1.9±0.1*
V339C	3.8±0.2	0.7±0.1	2.3±0.4	3.4±0.5	0.6±0.1	27±0.4
G340C	0.7±0.1*	0.6±0.2	0.8±0.2*	0.9±0.2*	3.8±0.3*	15±1.5*
S341C [#]	6±1.1	1.8±0.5*	0.5±0.1*	1.3±0.2*	0.6±0.1	12±1.4*
G342C	3.1±0.5	2.2±0.5*	1.4±0.2	2.8±0.3	1.7±0.2*	3.8±0.5*
L343C [#]	>100	15±2.6*	1.6±0.3	2.7±0.3	0.7±0.1	4.2±0.5*
A344C	3.4±0.5	n.d.	1.3±0.3	n.d.	0.7±0.1	26±3.7
L345C	6.5±1.7	1±0.4	1.8±0.5	2.8±0.4	0.9±0.3	19±2.1
L346C	3.3±0.7	2.1±0.5*	1.5±0.3	2.7±0.4	0.8±0.2	4.3±1.2*
G347C	7.5±0.4	0.8±0.2	0.5±0.1*	2.4±0.4	0.6±0.1	20±2.9
V348C	3.2±0.6	0.7±0.2	1.7±0.5	3±0.3	0.7±0.1	22±1.8
A349C	4.5±0.5	1.4±0.4*	1.1±0.3	2.3±0.4	0.4±0.1	10±1.5*
T350C	4.8±1	0.7±0.5	0.9±0.2*	1.8±0.3*	0.7±0.1	34±3.3
V351C	5.1±0.7	1.3±0.2*	1.4±0.3	2.7±0.4	0.5±0.04	19±1.9
L352C	5.5±1.2	0.7±0.1	1.1±0.2	2.3±0.2	0.4±0.1	20±3.1
C353A	10±3.2*	2.3±1.1*	0.7±0.1*	1.3±0.4*	0.2±0.05	24±2.5
D354C	-	-	-	-	-	-
V355C	4.7±1.5	0.7±0.2	1.2±0.5	1.8±0.2*	0.4±0.04	21±2.2
I356C	4.4±1.2	0.8±0.1	1.2±0.5	2.2±0.4	0.3±0.03	51±7.1*
V357C	3.2±1.3	0.5±0.3	0.6±0.1*	1.5±0.2*	0.4±0.07	34±1.4
L358C	2.5±1.6	0.6±0.2	1.2±0.1	1.7±0.2*	0.3±0.07	30±2.2

EC₅₀ – koncentrace ATP vyvolávající odpověď dosahující 50% maximální proudové odpovědi, I_{max} – maximální proudová odpověď indukovaná 30 – 100 μM ATP (u receptorů z označením [#] až 1 mM ATP), τ_{off} - časová konstanta deaktivace proudu po odstranění ATP, n.d. – nebylo stanoveno z důvodu velkého poklesu proudu při opakovaných stimulacích ATP, (+IVM) v přítomnosti a (-IVM) v nepřítomnosti 3 μM IVM, (*) značí statistické rozdíly mezi WT a mutantními receptory (P<0,01). Čísla představují aritmetický průměr ± SEM.

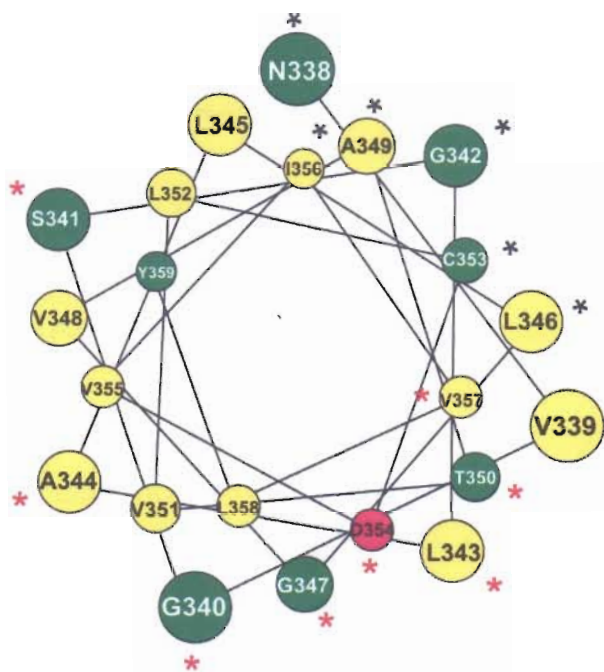
5.2.3 Modely helikální struktury TM1 a TM2 a vazebné místo pro ivermektin

Periodicita změn IVM-indukovaných účinků u receptorů tolerantních k mutagenезi (zasazení každého 3-4 zbytku) je v souladu s helikálním uspořádáním TM domén. Pomocí počítačového programu jsme vytvořili kruhovou helikální projekci pro úseky TM1 (V28–V49) společně s W50 (obr. 5.9) a TM2 (N338–L358) (obr. 5.10). Ze vzájemného uspořádání aminokyselinových zbytků je patrné, že zbytky Q36, L40, V43, V47 a W50, jež byly tolerantní k cysteinové mutagenезi a u nichž jsme zároveň pozorovali snížení účinku IVM na deaktivaci a citlivost receptoru k ATP, jsou všechny lokalizovány na stejné straně vytvořeného TM1 α -helikálního modelu. Podobně zbytky N338, G342, L346, A349 a I356 z TM2, které byly tolerantní k mutagenезi a které vykazovaly změněný účinek IVM, jsou všechny orientovány na stejnou stranu TM2 helixu. Na opačné straně k těmto reziduím leží u obou modelů zbytky citlivé k mutagenезi (s výjimkou S341), u nichž změny v účinku IVM byly důsledkem změněné funkce receptoru a ne ovlivnění vazby IVM.



Obr. 5.9 Kruhová helikální projekce TM1 domény

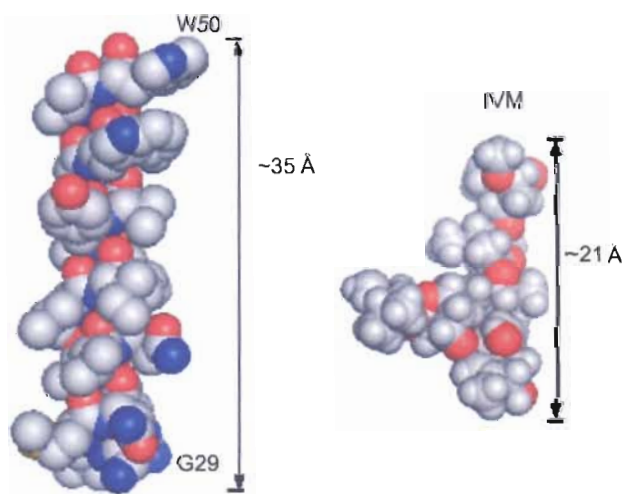
(*) označuje zbytky tolerantní k mutagenезi, u nichž byl zároveň pozorován změněný účinek IVM na deaktivaci receptoru, včetně G29 a R33, které se také pravděpodobně podílí na vazbě IVM. (*) značí zbytky, které byly citlivé k mutagenезi, avšak substituce cysteinem neovlivnila vazbu IVM.



Obr. 5.10 Kruhová helikální projekce TM2 domény.

(*) označuje zbytky tolerantní k mutagenézi, u nichž byl zároveň pozorován změněný účinek IVM na deaktivaci receptoru, včetně C353, který se také pravděpodobně podílí na vazbě IVM. (*) značí zbytky, které byly citlivé k mutagenézi, avšak substituce cysteinem neovlivnila vazbu IVM.

Na obr. 5.11 je schématické porovnání velikosti IVM molekuly a TM1 domény v podobě α -helixu (~36-40Å). Z tohoto obrázku je zřejmé, že rozměry IVM molekuly jsou takové (~21Å), že existuje reálná možnost, že při jejím zanoření do membrány může docházet ke vzájemné interakci mezi IVM a zbytky v TM1 a TM2.



Obr. 5.11 Model IVM molekuly s TM1 doménou v podobě α -helixu.

5.3 Využití modulačního účinku ivermektinu pro zkoumání úlohy aromatických a nabitých aminokyselinových zbytků v ektodoméně P2X₄ receptoru

V posledních letech probíhá intenzivní výzkum P2X receptorů v souvislosti s cílem objasnit strukturu jejich ATP vazebného místa, podle kterého by pak mohla být navržena nová farmaka, především analgetika. Pomocí polohově řízené mutagenese je zkoumán hlavně význam konzervovaných aromatických nebo nabitých aminokyselinových zbytků pro vazbu ATP nebo pro otevírání kanálu. V řadě případů má substituce těchto aminokyselinových zbytků dramatický vliv na aktivitu kanálů, které jsou buď zcela nefunkční nebo jen velmi málo odpovídají na stimulaci agonisty. V naší studii jsme se rozhodli využít pozitivního alosterického efektu IVM na P2X₄ receptor ke zkoumání, zda snížená nebo chybějící funkce těchto mutantních receptorů neodráží pouze jejich sníženou citlivost k ATP. Pokud by tomu tak bylo, zvýšení citlivosti receptorů v přítomnosti IVM, jehož vazebné místo neinterferuje s vazebným místem pro ATP a leží mimo ektodoménu receptoru (viz kap. 5.2), by potom umožnilo podrobnější poznání jejich významu pro funkci receptoru.

Zaměřili jsme se na aminokyselinové zbytky K190, F230, R278 a D280 (Yan, Liang et al. 2005), K67, R295 a K313 (Ennion, Hagan et al. 2000) a F185 a F294 (Roberts and Evans 2004) (vše P2X₄ číslování), o nichž se předpokládá, že by se mohly podílet na vazbě ATP u P2X₁, P2X₂ nebo P2X₄ receptorů. Provedli jsme záměnu za alanin nebo za aminokyselinu, která má obdobné vlastnosti jako původní zbytek. Konkrétně byly zkoumány tyto mutantní P2X₄ receptory – P2X₄K67A, P2X₄K67R, P2X₄F185A, P2X₄F185W, P2X₄K190A, P2X₄K190R, P2X₄F230A, P2X₄F230W, P2X₄R278A, P2X₄R278K, P2X₄D280A, P2X₄D280E, P2X₄F294A, P2X₄F294W, P2X₄R295A, P2X₄R295K, P2X₄K313A a P2X₄K313R. Kromě těchto zajímavých zbytků byly náhodně zvoleny ještě 3 aminokyselinové zbytky z extracelulární domény a vyrobeny P2X₄ receptory, v nichž byly tyto zbytky nahrazeny alaninem – P2X₄K197A, P2X₄K258A a P2X₄N287A.

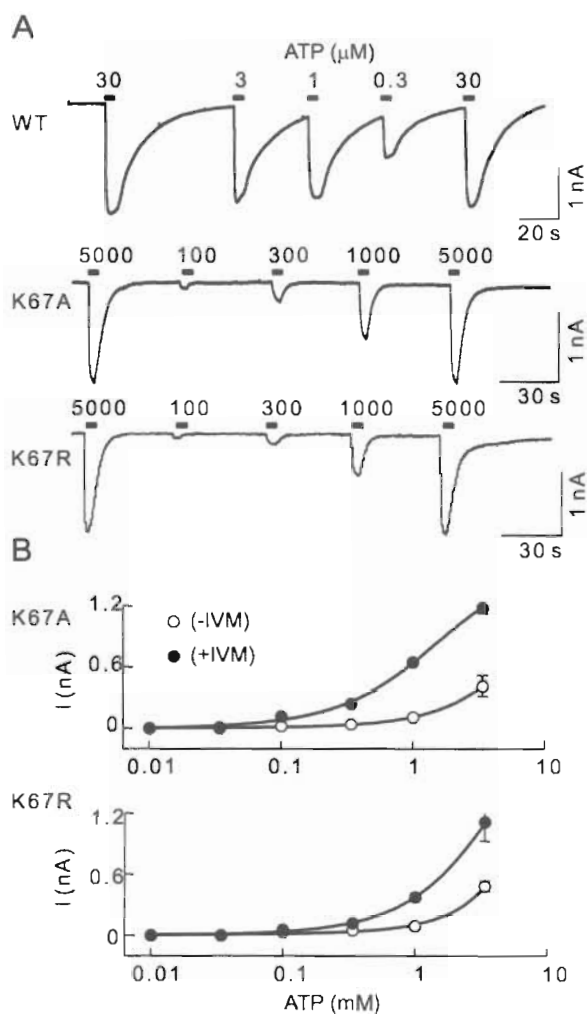
5.3.1 Charakterizace náhodných mutantních P2X₄ receptorů

Receptory P2X₄K197A, P2X₄K258A a P2X₄N287A byly citlivé k ATP podobně jako WT P2X₄ v nepřítomnosti i přítomnosti IVM a jejich maximální amplituda pod vlivem IVM vzrostla 1,6-2,5-násobně (tab. 5.4). Také deaktivční kinetika byla, v nepřítomnosti i přítomnosti IVM, srovnatelná s WT P2X₄ receptorem. Amplitudy proudových odpovědí

P2X₄K197A a P2X₄N287A receptorů byly významně redukovány, ačkoli nebyl pozorován rozdíl v intenzitě fluorescence v oblasti plasmatické membrány u těchto receptorů ve srovnání s WT P2X₄ receptorem (Zemkova, Yan et al. 2007). Znamená to, že tyto zbytky by potenciálně mohly být důležité pro jinou funkci receptoru než je vazba ATP.

5.3.2 Charakterizace lysinových a argininových ektodoménových mutantních receptorů

Stimulace buněk exprimujících P2X₄K67A a P2X₄K67R receptory aplikací 1 mM ATP vyvolala proudové odpovědi, jejichž amplitudy dosahovaly pouze 108 ± 28 pA (P2X₄K67A) a 97 ± 27 pA (P2X₄K67R), což představovalo přibližně 6% z hodnoty amplitudy proudu naměřené z HEK293 buněk exprimujících WT P2X₄ receptor. Hodnoty EC₅₀ tedy nemohly být určeny. V přítomnosti IVM byly u obou mutantních receptorů amplitudy proudových odpovědí několikanásobně navýšeny (obr. 5.12). Nicméně i přes výraznou potenciaci nebylo dosaženo maximální odpovědi srovnatelné s I_{max} WT P2X₄ receptoru ani při použití 5 mM ATP. Vzhledem k tomu, že vyšší koncentrace ATP vyvolávají nespecifické permeabilizující účinky, byla hodnota EC₅₀ odhadnuta pomocí extrapolace a pohybovala se v řádu několika mM. To dokládá skutečnost, že tyto receptory byly funkční, ale měly výrazně sníženou citlivost k ATP ve srovnání s WT P2X₄ receptorem. Zajímavá byla také skutečnost, že pro všechny testované koncentrace byly proudové odpovědi získané s receptorem P2X₄K67A dokonce o trochu větší než odpovědi s receptorem P2X₄K67R. To ukazuje na jedinečnou úlohu lysinu v této pozici, který nemohl být nahrazen argininem.



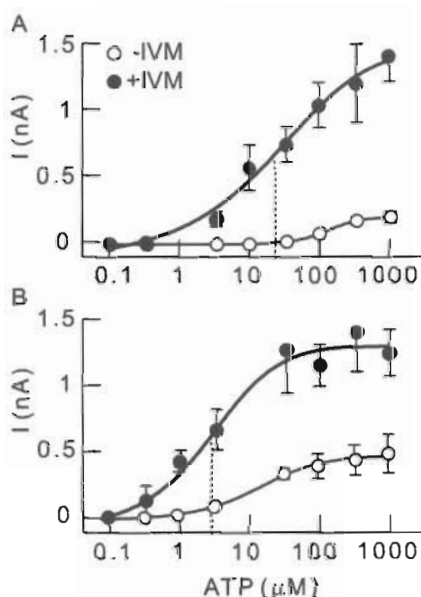
Obr. 5.12 Charakterizace P2X₄K67A a P2X₄K67R mutantních receptorů.

A Reprezentativní proudové záznamy HEK293 buněk exprimujících WT P2X₄, P2X₄K67A a P2X₄K67R receptory na krátké aplikace ATP v přítomnosti 5 μM IVM. Horizontální čáry nad stopami znázorňují dobu trvání aplikace ATP.

B Závislost velikosti amplitudy proudových odpovědí P2X₄K67A (nahore) a P2X₄K67R (dole) receptorů na použité koncentraci ATP v nepřítomnosti (○ symbol) a v přítomnosti (● symbol) IVM. Body představují aritmetický průměr \pm SEM z 5 -18 buněk.

Dále jsme studovali mutace zbytků K190 a R278. Stimulace HEK293 buněk 1 mM ATP vyvolala v případě receptoru P2X₄K190A odpovědi dosahující 13% a v případě P2X₄R278A 31% velikosti amplitudy proudové odpovědi WT P2X₄ receptoru. Hodnota EC₅₀ nemohla být určena. V přítomnosti IVM byly oba receptory P2X₄K190A a P2X₄R278A plně funkční a jejich maximální odpovědi byly srovnatelné WT P2X₄ receptorem (obr. 5.13). Hodnoty EC₅₀ těchto receptorů byly ve srovnání s WT P2X₄ receptorem zvýšeny 40- a 4-násobně (v tomto pořadí). Připravili jsme také mutantní receptory se zachovaným kladným

nábojem v této pozici - P2X₄K190R a P2X₄R278K. Jak je zřejmé z hodnot EC₅₀ pro ATP (tab. 5.4), byly tyto mutantní receptory funkční, což naznačuje důležitost kladného náboje v této pozici pro funkci receptoru.

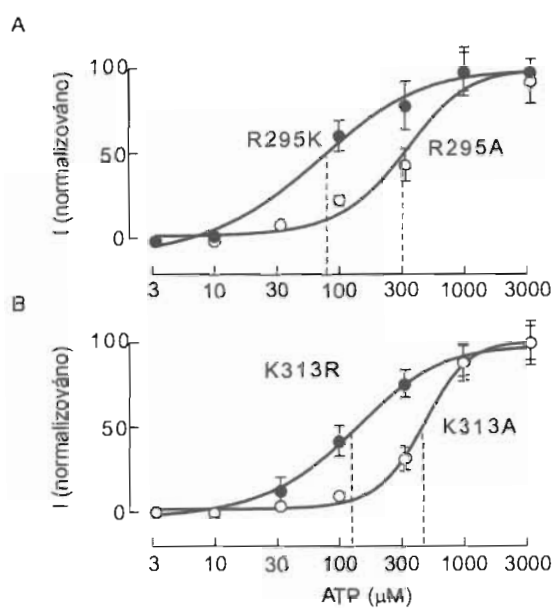


Obr. 5.13 Charakterizace P2X₄K190A a P2X₄R278A mutantních receptorů.

Závislost velikosti amplitudy proudových odpovědí P2X₄K190A (A) a P2X₄R278A (B) receptorů na koncentraci ATP v nepřítomnosti (○ symbol) a v přítomnosti (● symbol) 5 μM IVM. Body představují aritmetický průměr \pm SEM z 4-13 buněk. Vertikální tečkované čáry ilustrují odhadnuté hodnoty EC₅₀ (v přítomnosti IVM).

Také receptory P2X₄R295A, P2X₄R295K a P2X₄K313A a P2X₄K313R byly studovány s cílem zjistit, zdali existují rozdíly mezi alaninovými a záchrannými mutacemi. Hodnoty EC₅₀ pro ATP nemohly být u mutantních receptorů P2X₄R295A a P2X₄K313A v nepřítomnosti IVM stanoveny, což jasně naznačuje, že funkce receptoru byla silně narušena. Na rozdíl od výše zmíněných P2X₄K190 a P2X₄R278 mutantních receptorů, zavedení kladného náboje nevedlo k obnovení funkce receptoru. Nicméně v přítomnosti IVM, byla amplituda všech čtyř mutantních receptorů zcela obnovena a hodnoty EC₅₀ byly v rozmezí 57 μM až 420 μM (tab. 5.4). To znamená, že mutagenese způsobila snížení citlivosti receptoru pro ATP o 110- až 840-násobek ve srovnání s WT P2X₄ receptorem. Zachování kladného náboje vedlo jen k částečnému navýšení (cca 4-násobnému) citlivosti receptoru (obr. 5.14).

Výsledky konfokální mikroskopie potvrdily umístění všech lysinových a argininových mutantních P2X₄ receptorů v oblasti plasmatické membrány buněk, a to v množství srovnatelném s WT P2X₄ receptorem (Yan, Liang et al. 2005; Zemkova, Yan et al. 2007). Změna funkce těchto receptorů proto nemohla být způsobena jejich chybnou expresí.



Obr. 5.14 Vliv mutace kladně nabitého R295 a K313 na citlivost receptoru k ATP.

Závislost amplitud proudových odpovědí buněk exprimujících P2X₄R295(A) a P2X₄K313 (B) mutantní receptory na koncentraci ATP v přítomnosti 5 μM IVM. Data jsou zobrazena jako aritmetický průměr ± SEM z 5-16 buněk. Vertikální tečkované čáry ilustrují odhadnuté EC₅₀ hodnoty.

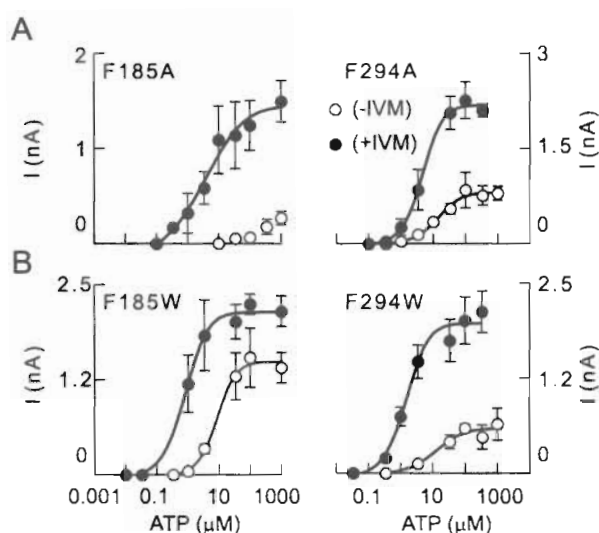
5.3.3 Charakterizace fenylalaninových a aspartátových ektodoménových mutantních receptorů

Mutantní receptor P2X₄D280A exprimovaný v HEK293 buňkách byl prakticky nefunkční, na rozdíl od receptoru se zachovaným záporným nábojem P2X₄D280E, který byl zcela funkční. To je v souladu s předchozími výsledky Yan a kol. (Yan, Liang et al. 2005). V přítomnosti IVM byla funkce P2X₄D280A obnovena (tab. 5.4).

Podobná byla i situace u mutantních receptorů P2X₄F230A a P2X₄F230W. Receptor P2X₄F230A měl sníženou funkčnost a odpovídal na submikromolární až mikromolární koncentrace ATP. Hodnota EC₅₀ tedy nemohla být pro receptor P2X₄F230A stanovena, na rozdíl od P2X₄F230W, který byl v nepřítomnosti IVM funkční a podobal se svým

chováním WT P2X₄ receptoru (tab. 5.4). To ukazuje, že pro funkci receptoru je důležitá přítomnost aromatického zbytku v této pozici. V přítomnosti IVM byl P2X₄F230A receptor funkční s hodnotou EC₅₀ přibližně 1 μM. Amplitudy proudových odpovědí vyvolané aplikací 1 mM ATP ale dosahovaly pouhých 12 - 18% velikosti amplitud pozorovaných v HEK293 buňkách exprimujících WT P2X₄ receptor, což by naznačovalo sníženou expresi tohoto mutantního receptoru v plasmatické membráně. Výsledky z konfokální mikroskopie ukázaly, že většina EGFP fluorescence pochází z cytosolu (Zemkova, Yan et al. 2007). Na základě tohoto zjištění, a také proto, že aromatické aminokyseliny obecně hrají roli v transportu, předpokládáme, že v tomto případě došlo ke snížení počtu receptorů v plasmatické membráně.

Mutantní P2X₄F185A receptor odpovídal pouze na submilimolární a milimolární koncentrace ATP a hodnota EC₅₀ nemohla být určena (obr. 5.15, tab. 5.4). V přítomnosti IVM byl mutantní receptor plně funkční a odhadnutá hodnota EC₅₀ pro ATP se pohybovala okolo 4 μM. V případě receptoru P2X₄F185W nebyla funkce ovlivněna, což naznačuje význam aromatického zbytku v této pozici (obr. 5.15). Receptor P2X₄F294A byl funkční i v nepřítomnosti IVM. Hodnota EC₅₀ pro ATP byla stanovena na 1 – 3 μM, což naznačuje, že aromatická kyselina není v této pozici kritická pro funkci receptoru.

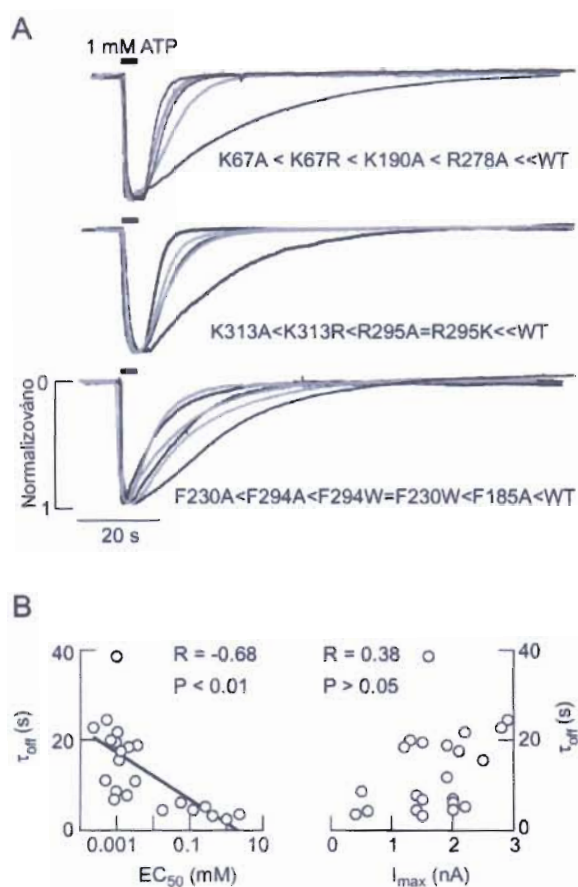


Obr.5.15 Vliv mutací aromatických aminokyselin F185 a F294 na citlivost P2X₄ receptoru.

Závislost amplitud proudových odpovědí P2X₄F185A, P2X₄F294A (A), P2X₄F185W, a P2X₄F294W (B) mutantních receptorů na ATP v nepřítomnosti (○ symbol) a v přítomnosti (● symbol) 5 μM IVM. Data jsou zobrazena jako aritmetický průměr ± SEM z ze 3-15 buněk.

5.3.4 Deaktivační vlastnosti mutantních P2X₄ receptorů

U všech mutantních receptorů s výjimkou P2X₄F185A, P2X₄F185W a P2X₄R278K probíhala v přítomnosti IVM deaktivace kanálu rychleji než u WT P2X₄ receptoru. U třech párů mutantů - P2X₄K67A/P2X₄K67R, P2X₄R295A/P2X₄R295K a P2X₄K313A/P2X₄K313R nebyl pozorován žádný vzájemný významný rozdíl v deaktivační kinetice. Tyto receptory měly také ve srovnání s WT P2X₄ receptorem nejnižší časovou konstantu deaktivace v přítomnosti IVM ze všech mutantních receptorů. Z toho lze usuzovat, že přítomnost lysinových a argininových zbytků v těchto pozicích by mohla být důležitá pro vazbu ATP nebo funkci receptoru, přičemž jejich důležitost nebyla dána jejich kladným nábojem. Naopak v případě dvojic P2X₄K190A/P2X₄K190R a P2X₄R278A/P2X₄R278K byly rozdíly v deaktivačních vlastnostech veliké (obr. 5.16A, tab. 5.4). Receptory s alaninovou substitucí deaktivovaly v přítomnosti IVM výrazně rychleji, než receptory se zachovaným kladným nábojem, což by potvrdilo domněnku o důležitosti kladného náboje v této pozici pro funkci receptoru. Deaktivační kinetika P2X₄F230A, P2X₄F230W, P2X₄F294A a P2X₄F294W receptorů byla také urychlena zatímco deaktivace P2X₄F185A i P2X₄F185W mutantních receptorů probíhala s podobnou rychlostí jako u WT a náhodných mutantů P2X₄ (obr. 5.16A). Všeobecně ale nebyl vliv mutací na deaktivační kinetiku u těchto zbytků tak dramatický, jako tomu bylo v případě lysinových či argininových zbytků. Abychom zjistili, zda existuje závislost mezi hodnotami EC₅₀ pro ATP a rychlostí deaktivace u mutantních receptorů v přítomnosti IVM, vypočetli jsme korelační koeficient R pro všechna získaná data. Tento koeficient byl roven -0,68, což ukázalo na inverzní závislost mezi hodnotou EC₅₀ pro ATP a rychlostí deaktivace receptoru v přítomnosti IVM (obr. 5.16B vlevo). Tento fakt naznačuje, že odvazování agonisty hraje hlavní roli v deaktivační kinetice receptoru. Byla také zkoumána závislost rychlosti deaktivace na amplitudě proudové odpovědi. Podle našich očekávání, nebyla žádná souvislost prokázána (obr. 5.16B vpravo). Hodnota korelačního koeficientu byla rovna 0,38.



Obr. 5.16 Deaktivační vlastnosti ektodoménových mutantních P2X₄ receptorů.

A Průběh deaktivace po odstranění 1 mM ATP. Rozdělení mutantních receptorů do skupin podle deaktivace odpovídá důležitosti ektodoménových zbytků pro vazbu ATP a funkci receptoru. Pro srovnání je v každé skupině jako poslední trasa ukázána deaktivace P2X₄ receptoru. Všechny experimenty byly uskutečněny v přítomnosti 5 μ M IVM.

B Korelace mezi hodnotami EC_{50} a rychlostí deaktivace τ_{off} (vlevo) a korelace mezi amplitudami proudů (indukovaných 1 mM ATP) a hodnotami τ_{off} (vpravo). Vše je odhadnuto v přítomnosti 5 μ M IVM. R – koeficient korelace.

Tab. 5.4 Charakterizace WT a ektodoménových mutantních P2X₄ receptorů.

Receptor	-IVM	+IVM	-IVM	+IVM	+IVM	N
	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	I _{max} (nA)	I _{max} (nA)	τ _{off} (s)	
WT P2X ₄	3.8±0.3	0.5±0.1	1.6±0.1	2.9±0.2	24.5±1.0	57
K197A	5.7±1.3	0.9±0.2	0.6±0.2*	1.5±0.3*	19.5±1.3	10
K258A	3.1±1.8	0.2±0.1	1.7±0.3	2.8±0.4	22.8±4.9	4
N287A	5.3±0.7	0.7±0.3	0.6±0.1*	1.3±0.2 *	20.1±2.3	11
K67A	n.d.	997±105 [^]	0.1±0.03*	0.5±0.1*	2.5±0.3 *	23
K67R	n.d.	2293±450 [^]	0.1±0.03*	0.4±0.1*	3.6±0.4*	20
F185A	n.d.	3.7±1.5*	0.3±0.09*	1.9±0.3	18.9±1.2	18
F185W	7±1.5	1±0.2	1.5±0.4	2.2±0.2	21.8±3.7	13
K190A	n.d.	18.9±1.2*	0.2±0.02*	1.4±0.3*	4.5±0.6*	13
K190R	10.7±2.4	2.1±0.2*	0.7±0.04	1.2±0.1*	18.5±1.3*	7
F230A	n.d.	1±0.2	0.2±0.05*	0.5±0.2*	8.7±0.9*	22
F230W	4.6±1.7	1.4±0.4	1.5±0.3	2.5±0.85	15.6±1.7*	8
R278A	n.d.	1.9±0.4*	0.5±0.15*	1.4±0.3*	7.8±0.8*	27
R278K	3±0.9	0.9±0.2	0.9±0.15*	1.6±0.2	38.6±6.3*	6
D280A	n.d.	0.9±0.3	0.5±0.03*	1.5±0.2*	6.9±1.1*	17
D280E	3.2±1.2	0.5±0.2	1.1±0.5	2.0±0.2	11.1±2.4*	13
F294A	31.4±5*	3.2±0.8*	0.8±0.11*	1.9±0.3	10.9±1.4*	23
F294W	13.6±2.2*	1.3±0.4	0.6±0.06*	2.1±0.3	17.6±1.7*	18
R295A	n.d.	267±41*	0.5±0.07*	2.2±0.3	5.3±0.5*	12
R295K	n.d.	57±12*	0.6±0.17*	2.1±0.2	6.2±0.6*	14
K313A	n.d.	420±80*	0.2±0.04*	1.3±0.2	3.3±0.3*	16
K313R	n.d.	125±56*	0.4±0.08*	1.8±0.2	4.6±0.4*	16

EC₅₀ – koncentrace ATP produkující 50% maximální proudové odpovědi, I_{max} – proudová odpověď vyvolaná 1 mM ATP, τ_{off} - časová konstanta deaktivace proudů po odmytí ATP, N - počet buněk, n.d. - nebylo stanoveno, (*) značí statisticky významný rozdíl (P<0,01) mezi WT a mutantními receptory, (^) - odhadnuto extrapolací.

6. DISKUZE

IVM je běžně používán ve veterinární i lidské medicíně, je lékem proti parazitům, používá se k prevenci a léčbě tropické nemoci onchocerciasis, známé jako „river blindness“, která postihuje odhadem 18 milionu lidí v Africe, Latinské Americe a na Středním východě (Rohrer, Meinke et al. 1992). Je známo, že IVM působí jako pozitivní alosterický modulátor na několik ligandem otevíraných kanálů, jedná se o GABA_A receptor a nikotinický ACh receptor obratlovců a glutamátem-aktivovaný chloridový kanál svalových i nervových buněk bezobratlých. Nedávno bylo nalezeno, že IVM působí jako modulátor také na savčí purinergní P2X receptory, avšak specificky způsobuje potenciaci pouze u P2X₄ receptoru (Khakh, Proctor et al. 1999; Priel and Silberberg 2004) a u jemu podobného P2X receptoru naklonovaného z bezobratlého organismu *Schistosoma mansoni* (schP2X) (Agboh, Webb et al. 2004). Vazebné místo pro IVM nebylo dosud identifikováno na žádném z uvedených receptorů. IVM je poměrně velká molekula, z toho lze usuzovat, že rozeznávací místo na příslušném proteinu může být určeno více aminokyselinami. Z biofyzikálního hlediska je proto jeho specifické působení na P2X₄ receptor udivující a znamená, že v jeho vazbě a působení by měly hrát roli specifické aminokyselinové zbytky, nebo skupiny zbytků, tohoto receptoru. Využili jsme této skutečnosti při hledání vazebného místa na potkaním P2X₄ receptoru exprimovaném v HEK293 buňkách.

IVM působí na P2X₄ receptoru pouze extracelulárně (Priel and Silberberg 2004), původně se proto předpokládalo, že pro účinek IVM by mohla být důležitá extracelulární doména. V celé extracelulární doméně je celkem 67 P2X₄ receptor-specifických aminokyselin. Postupné testování všech těchto zbytků pomocí polohově řízené mutagenese by bylo značně obtížné, a proto jsme se rozhodli v prvním kroku nejprve otestovat chimérické receptory, které mají extracelulární doménu z jiného než P2X₄ receptoru.

K tomuto účelu jsme využili již dříve zkonstruované chiméry P2X_{2a}/V64-Y315P2X₄ a P2X_{2b}/V64-Y315P2X₄, u nichž byla původní sekvence P2X₂ receptoru I66-Y310 nahrazena sekvencí V64-Y315 z P2X₄ receptoru. Již dříve bylo známo, že přenesením extracelulární sekvence V64-Y315 P2X₄ receptoru na P2X₂ receptor byla zachována funkčnost receptoru a citlivost P2X₄ receptoru k ATP (He, Zemkova et al. 2003), avšak my jsme našli, že citlivost k IVM zachována nebyla (obr. 5.4). To ukazuje na skutečnost, že P2X₄ receptor-specifická rezidua, kterých je 62 v této oblasti, a celá tato oblast, nejsou pro funkci IVM důležité. Lze namítnout, že chimerizací mohlo dojít ke změně sekundární struktury ekto-domény a

k poškození oblasti důležité pro účinek IVM, nicméně, to se zdá být nepravděpodobné, jelikož ATP vazebné místo, které se rovněž nachází v extracelulární doméně (Ennion, Hagan et al. 2000; Roberts and Evans 2004; Yan, Liang et al. 2005; Roberts and Evans 2006), narušeno nebylo. Zbývajících pět extracelulárních P2X₄ receptor-specifických aminokyselinových zbytků se nalézají v oblasti V49-V61 nad TM1.

Experimenty s chimérickými receptory P2X_{2a}/V49-V61P2X₄ a P2X₄/I50-E63P2X_{2a} u kterých byl vyměněn krátký úsek nad první transmembránovou doménou, naznačily možný význam této oblasti pro funkci IVM. Třebaže přenos tohoto úseku na P2X₂ receptor neumožnil přenos IVM citlivosti na P2X₂ receptor, jeho nepřítomnost u P2X₄ receptoru silně narušila účinek IVM na deaktivaci (obr. 5.4). Následná substituce specifických reziduí W50, T57, S59, V60 a V61 alaninem ukázala, že zbytky W50 a V60 mohou být důležité pro účinek IVM na deaktivaci, neboť u těchto mutantních receptorů byla pozorována změna v rychlosti deaktivace (obr. 5.5). Na rozdíl od zbytku W50, který byl k alaninové mutagenезi necitlivý, byla u mutantu P2X₄V60A pozorována snížená amplituda proudových odpovědí (tab. 5.1). V žádném z existujících modelů ATP vazebného místa na P2X receptorech není V60 zbytek označován jako kritický pro vazbu ATP nebo otevírání kanálu. V těsné blízkosti se však nachází lysin K67, který by se mohl podílet na tvorbě ATP vazebného místa (Ennion, Hagan et al. 2000; Roberts, Vial et al. 2006). Je tedy možné, že sousedící oblast s V60 by mohla hrát úlohu v převodu signálu z ATP vazebného místa směrem k první transmembránové doméně a při otevírání kanálu.

Mutageneze P2X₄ receptor-specifických reziduí v oblasti TM domén ukázala odlišnosti v chování dvou receptorů P2X₄V355A (snížená amplituda proudových odpovědí) a P2X₄V357A (zrychlená deaktivace v přítomnosti IVM) (tab. 5.1, obr. 5.5). Oba tyto zbytky se nachází v blízkosti C-konce TM2 domény. Experimenty s lidským P2X₅ receptorem ukázaly, že úsek F352-L356 (odpovídá V351-V355) je důležitý pro stabilní inzerci helixu v membráně (Duckwitz, Hausmann et al. 2006). Zbytky P2X₂ receptoru korespondující s V355 a V357 se zdají být důležité pro dilataci póru (Khakh and Egan 2005). Lze tedy předpokládat, že tato rezidua jsou spíše důležitá pro otevírání kanálu a funkci samotného receptoru, v případě V357 o tom přinesly důkazy i naše další pokusy s cysteinovou skenovací mutagenezí.

S ohledem na malý počet P2X₄ receptor-specifických zbytků potenciálně důležitých pro účinky IVM na tento receptor se nabízela hypotéza, že pro působení IVM mohou být významné i receptor-nespecifické zbytky. Rozhodli jsme se proto otestovat postupně jednotlivé zbytky obou TM domén P2X₄ receptoru. Většina TM zbytků byla tolerantní k cysteinové mutagenезi. Z nich receptory P2X₄Q36C, P2X₄L40C, P2X₄V43C, P2X₄V47C,

P2X₄W50C, P2X₄N338C, P2X₄G342C, P2X₄L346C a P2X₄A349C vykazovaly snížený účinek a receptor P2X₄I356C naopak zvýšený účinek IVM na deaktivaci receptoru. Jelikož se jedná o zbytky, jejichž substituce nezpůsobila v nepřítomnosti IVM žádné změny v chování receptoru, lze se domnívat, že pozměněný účinek IVM ukazuje na důležitost těchto zbytků pouze pro vazbu IVM. U většiny těchto mutantních receptorů byl navíc zaznamenán snížený účinek IVM na citlivost receptoru k ATP, což podporuje naši domněnku.

Na vazbě IVM se mohou samozřejmě podílet i zbytky citlivé k mutagenезi. Byla prokázána souvislost mezi citlivostí receptoru a rychlostí jeho deaktivace: čím vyšší citlivost receptoru k ATP, tím pomalejší je jeho odmývání a tím i deaktivace kanálu. V případě zbytků R33 a C353 neprobíhaly změny v citlivosti k ATP a v rychlosti deaktivace v přítomnosti IVM paralelně. Je tedy pravděpodobné, že změny v účinku IVM byly dány z části i změnou vazby IVM. Důležitý pro účinek IVM by mohl být také zbytek G29. Usuzujeme tak na základě neprezentovaných výsledků s alaninovou mutací P2X₄G29A, u které jsme pozorovali sníženou citlivost k ATP, ale rychlost deaktivace byla srovnatelná s WT P2X₄ receptorem. G29, R33 a C353 se tedy kromě své důležité role pro funkci receptoru podílejí patrně i na vazbě molekuly IVM.

Těsně před dokončením této dizertační práce uveřejnili Silberberg a kol. práci, v níž ukázali, že k vazbě IVM na P2X₄ receptor skutečně dochází v oblasti TM domén, zejména jejich horní části, a že ke vzájemné interakci dochází v otevřené konformaci receptoru (Silberberg, Li et al. 2007). Podobně jako naše, i jejich studie byla prováděna s využitím chimérických receptorů, avšak byla použita tryptofanová skenovací mutagenезe. Konkrétní určené zbytky se s našimi výsledky příliš neshodují. To je dáno jednak tím, že substituce objemným tryptofanem byla hůře tolerovaná, a také tím, že k vyhodnocení použili autoři jiného přístupu. Vyhodnocovali sice také hodnoty EC₅₀ a I_{max}, ale význam zbytku pro vazbu IVM posuzovali zejména podle násobku navýšení proudových odpovědí stimulovaných koncentrací ATP v hodnotě EC₅₀, která se pro každý receptor více či méně lišila. V naší práci jsme význam zbytků pro vazbu IVM hodnotili zejména podle rychlosti deaktivace, která je na koncentraci ATP nezávislá (Jelinkova, Yan et al. 2006). Zjištění časové deaktivační konstanty je ve srovnání s EC₅₀ přesnější, neboť hodnota EC₅₀ je snadno zatížitelná experimentální chybou.

Naše výsledky ukazují, že uspořádání zbytků, jejichž substituce cysteinem ovlivnila působení IVM, je v souladu s helikální sekundární strukturou TM domén (Rassendren, Buell et al. 1997; Jiang, Rassendren et al. 2001; Li, Migita et al. 2004; Silberberg, Chang et al. 2005), neboť zasažený byl vždy každý 3-4 zbytek a všechny tyto zbytky leží na stejné straně

helixu. Toto je zároveň v souladu s hypotézou, podle které jsou tyto zbytky v otevřeném stavu orientovány do lipidové dvojvrstvy a podílejí se přímo či nepřímo na tvorbě vazebného místa pro IVM. Tuto domněnku také podporují výsledky cysteinové skenovací mutagenese P2X₂ receptoru s využitím nenabitých methanthiosulfonátových činidel, o nichž se předpokládá, že mohou procházet přes membránu a interagovat se zbytky orientovanými k lipidům a to jak na extracelulární, tak na intracelulární straně receptoru. Zbytky P2X₂ receptoru, jež interagovaly s těmito činidly, se nacházely všechny na stejné straně předpokládaného α -helixu a korespondovaly se zbytky G29, R33, Q36, L40, V43 a V47 P2X₄ receptoru (Jiang, Rassendren et al. 2001). Lze se tedy domnívat, že zbytky P2X₂ receptoru, které byly přístupné nenabitým methanthiosulfonátovým činidlům, jsou u P2X₄ receptoru pravděpodobně přístupné lipofilní molekule IVM a jejich substituce se projevila sníženým účinkem IVM na receptor. Naši hypotézu o významu reziduí G29, R33, Q36, L40, V43, V47, W50, N338, G342, L346, A349 a I356 pro vazbu IVM podporuje i vzájemná podobnost v oblasti TM domén P2X₄ receptoru a schP2X receptoru, který je rovněž citlivý k IVM. Vzájemná identita TM domén těchto receptorů je pouze 52%, avšak 11 z výše uvedených 12 reziduí navržených jako důležitých pro vazbu IVM se vzájemně shoduje a navíc W50 je u schP2X nahrazen tyrosinem, který má velmi podobné chemické vlastnosti jako tryptofan (Agboh, Webb et al. 2004).

Zajímavá jsou naše pozorování týkající se zbytků citlivých k mutagenезi, které nebyly rozhodující pro působení IVM. Jednalo se o rezidua M31, Y42, G45, W46, V49, G340, S341, L343, A344, G347, T350, D354 a V357. Pokud je určení orientace helixu v membráně správné, směřovaly by tyto zbytky (s výjimkou S341) do hydrofilního póru kanálu. Mohly by se tedy podílet na důležitých funkcích receptoru, zejména otevírání kanálu. Jedním z používaných způsobů identifikace zbytků orientovaných do póru je cysteinová skenovací mutagenese spojená s aplikací Ag⁺ iontů či nabitých methanthiosulfonátových činidel. Výsledky těchto experimentů s P2X₂ receptorem prokázaly, že zbytky korespondující s L343, A344, G347, T350, D354 a V357 P2X₄ receptoru leží v uzavřeném stavu všechny na jedné straně helixu (Egan, Haines et al. 1998). Substituce D354 vedla ke vzniku nefunkčního receptoru. Nefunkčnost kanálu v důsledku substituce tryptofanem (Silberberg, Chang et al. 2005) podobně i jako substituce korespondujícího zbytku P2X₂ receptoru alaninem (Li, Migita et al. 2004; Khakh and Egan 2005) byla zaznamenána i v jiných studiích. Z toho lze usuzovat, že se jedná o velmi důležitý zbytek pro funkci receptoru. Existuje hypotéza, že tento zbytek se podílí na tvorbě brány, která by se měla nacházet mezi zbytky L343 a D354 (Rassendren, Buell et al. 1997). Také zbytek G347 podle několika předchozích studiích

na P2X₂ receptoru hraje důležitou roli ve funkci receptoru (Egan, Haines et al. 1998; Khakh and Egan 2005). Uvažuje se o tom, že vytváří jakýsi pant, který umožňuje otevírání a zavírání kanálu (Egan, Haines et al. 1998). Neméně významnou úlohu budou hrát také zbytky Y42 a G340. Podle některých studií vedla substituce Y42 ke vzniku zcela nefunkčních kanálů, popř. kanálů konstitutivně aktivních či s omezenou funkčností (Haines, Migita et al. 2001; Jiang, Rassendren et al. 2001; Li, Migita et al. 2004; Silberberg, Chang et al. 2005). Výrazné zvýšení citlivosti k ATP bylo provázeno zvýšením citlivosti k α,β -meATP. Výsledky experimentů s mutantními P2X₂ receptory naznačily, že P2X₂F44C (koresponduje s P2X₄V43C) je také citlivý k α,β -meATP, i přesto, že nezmutovaný P2X₂ receptor je k tomuto agonistovi necitlivý (Jiang, Rassendren et al. 2001). Podobně i v případě G340, jehož substituce se v mnoha ohledech projevovala podobně jako substituce Y42, byl mutantní receptor citlivý k α,β -meATP (Jindřichová, ústní sdělení). Vzhledem k tomu, že se tyto zbytky zřejmě nepodílejí na tvorbě ATP vazebného místa, je pravděpodobné, že jejich substitucí došlo k ovlivnění konformačních změn spojených s otevíráním kanálu.

Výsledky dosavadních prací na P2X₂ receptoru a jedné práce na P2X₄ receptoru naznačovaly helikální uspořádání pouze pro TM1 a horní část TM2 domény. Souhrnem lze říci, že v naší práci jsme potvrdili helikální uspořádání obou TM domén u P2X₄ receptoru a jako první jsme se u tohoto receptoru pokusili určit zbytky v TM1 a TM2, které jsou v otevřeném stavu orientované do lipidů a které se podílejí na vytváření vazebné kapsy pro IVM. Kromě hledání vazebného místa pro IVM, jsme tak popsali několik nových transmembránových zbytků, které hrají významnou úlohu ve funkci P2X₄ receptoru a pravděpodobně se podílejí na vytváření iontového póru receptoru.

V poslední části této práce jsme využili IVM jako farmakologický nástroj, s jehož pomocí jsme se pokusili určit pořadí důležitosti vybraných aminokyselinových zbytků pro vazbu ATP. V řadě případů totiž substituce těchto reziduí vede ke vzniku kanálů, které odpovídají buď až při stimulaci vysokými koncentracemi ATP (navíc jen velmi nízkými odpověďmi) nebo neodpovídají vůbec. Je pak nemožné rozlišit, zda je tato situace způsobena snížením citlivosti receptoru pro agonistu a/nebo ztrátou či změnou funkce kanálu. Využití IVM a jeho potenciačního účinku by pak tento problém mohlo odstranit. Testovali jsme zbytky, které byly v předchozích studiích s P2X₁, P2X₂ a P2X₄ receptory označeny jako potenciálně důležité pro svůj podíl na vazbě ATP/otevírání kanálu. Jednalo se o tyto mutantní receptory - P2X₄K67A, P2X₄K67R, P2X₄F185A, P2X₄F185W, P2X₄K190A, P2X₄K190R,

P2X₄F230A, P2X₄F230W, P2X₄R278A, P2X₄R278K, P2X₄D280A, P2X₄D280E, P2X₄F294A, P2X₄F294W, P2X₄R295A, P2X₄R295K, P2X₄K313A, P2X₄K313R.

V nepřítomnosti IVM odpovídaly buňky exprimující mutantní receptory až na vysoké koncentrace ATP (v řádu mM) a proudové odpovědi dosahovaly velmi nízkých hodnot. V řadě případů nebylo možno stanovit hodnotu EC₅₀ a bylo tedy téměř nemožné jednotlivé receptory vzájemně porovnat. Již publikované výsledky konfokální mikroskopie potvrdily, že všechny receptory s výjimkou P2X₄F230A byly lokalizovány v membráně buněk, a to v míře srovnatelné s WT P2X₄ receptorem, a že snížená citlivost těchto receptorů tedy nebyla důsledkem jejich špatné lokalizace (Yan, Liang et al. 2005; Zemkova, Yan et al. 2007).

V přítomnosti IVM došlo ke zvýšení citlivosti a potenciaci proudových odpovědí, což nám umožnilo určit hodnotu EC₅₀ u všech receptorů a určit následující pořadí citlivosti mutant k ATP (od nejvyšší k nejnižší): P2X₄D280A, P2X₄R278A, P2X₄F185A, P2X₄K190A, P2X₄R295K, P2X₄K313R, P2X₄R295A, P2X₄K313A, P2X₄K67A a P2X₄K67R.

Naše pozorování, že zbytky K67 a K313 jsou kritické pro správnou funkci receptoru je v souladu s výsledky experimentů s P2X₁ (Ennion, Hagan et al. 2000) a P2X₂ receptory (Jiang, Rassendren et al. 2000), u nichž měla alaninová mutageneze za následek rovněž vznik prakticky nefunkčních kanálů. Podobně jako u P2X₄ receptoru ani v případě P2X₁ receptoru nevedlo zachování kladného náboje v pozici K67 (P2X₄ číslování) k obnovení funkčnosti receptoru (Ennion, Hagan et al. 2000), na rozdíl od ekvivalentního P2X₂ receptoru (EC₅₀ ~ 2,8 mM) (Jiang, Rassendren et al. 2000). Naopak z porovnání výsledků P2X₄K313A a P2X₄K313R receptorů s ekvivalentními mutantními P2X₁ a P2X₂ receptory vyplývá, že v případě zbytku K313 existuje větší podobnost mezi P2X₄ a P2X₂ receptorem. V přítomnosti IVM byl pozorován zhruba 3-násobný posun doleva v účinnosti ATP pro P2X₄K313R mutantní receptor ve srovnání s P2X₄K313A receptorem, proti zhruba 55-násobnému rozdílu v účinnosti ATP pro odpovídající P2X₁ mutantní receptory (Ennion, Hagan et al. 2000).

Je zřejmé, že také zbytek R295 hraje důležitou úlohu ve funkci P2X receptoru. Také korespondující P2X₂ mutantní receptor měl v důsledku mutageneze výrazně sníženou účinnost (EC₅₀ ~ 3 mM) (Jiang, Rassendren et al. 2000). V případě odpovídajícího P2X₁ mutantního receptoru byla pozorována výrazně snížená citlivost k ATP (Ennion, Hagan et al. 2000). V přítomnosti IVM jsme zaznamenali jen malý (cca 4,5-násobný) rozdíl v citlivosti P2X₄R295A a P2X₄R295K receptorů (obr. 5.19). U P2X₁ korespondujících mutantních receptorů nebyl žádný rozdíl (Ennion, Hagan et al. 2000) a pro P2X₂ mutantní receptory byl rozdíl zhruba 50-násobný (Jiang, Rassendren et al. 2000).

Aminokyselinové zbytky K67, R295 a K313 se nachází na opačných koncích extracelulární smyčky, poměrně v blízkosti transmembránových domén. Skutečnost, že jejich substituce nejvýrazněji ovlivnila účinnost ATP, může naznačovat mezipodjednotkovou organizaci ATP vazebného místa, což je hypotéza původně navržená Wilkinsonem a kol. (Wilkinson, Jiang et al. 2006). Tuto teorii podporují také nedávno zveřejněné výsledky experimentů s P2X₁ mutantními receptory, v nichž byla prokázána spontánní dimerizace receptorů s cysteinovými mutacemi v pozici K67 a F294 a téměř kompletní trimerizace při použití receptorů s dvojitou mutací P2X₁K67CF294C (Marquez-Klaka, Rettinger et al. 2007). Tato zjištění jsou v souladu s myšlenkou, že extracelulární smyčky ze sousedních P2X podjednotek jsou v blízkosti a že toto uspořádání je kritické pro zformování funkční ATP vazebné domény a/nebo převod signálu k bráně kanálu.

Ennion a kol. navrhli, že zbytky P2X₁ receptoru K67, R295 a K313 by se mohly podílet na koordinaci fosfátových skupin ATP (Ennion, Hagan et al. 2000). Pokud by byla tato hypotéza správná, pak by (vzhledem k prokázané blízkosti zbytků K67 a F294) mohl zbytek F294 přispívat ke koordinaci adeninového kruhu ATP. Tuto hypotézu také podporují výsledky experimentů, podle kterých způsobila substituce zbytku F294 alaninem silné (140-násobný) snížení citlivosti P2X₁ receptoru k ATP (Roberts and Evans 2004). U P2X₄ receptoru nicméně korespondující mutace vyvolala jen 10-násobný pokles citlivosti receptoru k ATP a P2X₄F294W mutantní receptor ukázal 4-násobné snížení citlivosti. Naopak substituce F185 vedla u P2X₁ receptoru pouze asi k 10-násobnému snížení citlivosti (Roberts and Evans 2004), zatímco u P2X₄ receptoru byl korespondující mutantní receptor v nepřítomnosti IVM prakticky nefunkční. Funkci P2X₄ receptoru se podařilo obnovit vnesením jiného aromatického zbytku, jak dokazují výsledky s receptorem P2X₄F185W. To by naznačovalo, že v případě P2X₁ by mohl mít významnější roli ve funkci receptoru zbytek F294. Pro funkci P2X₄ receptoru by pak mohl být důležitější zbytek F185.

Poslední testovaný fenylalaninový mutantní receptor P2X₄F230A byl prakticky nefunkční. Příčinou snížené amplitudy proudu, jak ukázaly výsledky z konfokální mikroskopie, byla zřejmě snížená hladina inzerce tohoto mutantního receptoru do plasmatické membrány. Podobně i Roberts a kol. pozorovali u mutantních receptorů P2X₁F195A a P2X₁W295A dramaticky sníženou expresi v plasmatické membráně (Roberts and Evans 2004). To by podporovalo domněnku, že specifické aromatické zbytky jsou důležité pro transport P2X receptoru z endoplasmatického retikula do plasmatické membrány.

Ukázali jsme, že řada P2X₄ mutantních receptorů, dříve označených jako nefunkčních a/nebo jen málo odpovídajících, byla funkční. Pomocí IVM jsme ukázali rozdílnou účinnost

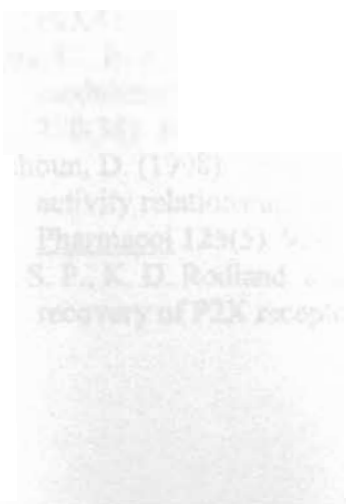
ATP pro tyto receptory, která je závislá na jejich lokalizaci v extracelulární doméně. Pozorovaná snížená účinnost agonisty u mutantních receptorů může být důsledek redukované vazebné afinity a/nebo redukované účinnosti v převodu signálu směrem k bráně a otevírání kanálů. V současné době je nemožné rozlišit mezi těmito dvěma možnostmi (Colquhoun 1998). Další studie by měly určit úlohu těchto zbytků ve vazbě agonisty a/nebo v otevírání kanálu.

7. ZÁVĚR

Pomocí elektrofyziologických a molekulárně biologických metod jsme zkoumali účinek IVM na P2X₄ receptor. Pokusili jsme se identifikovat oblasti receptoru a konkrétní aminokyselinové zbytky důležité pro jeho působení na tento receptor. IVM jsme dále využili také jako farmakologický nástroj k určení struktury vodivého póru P2X₄ receptoru a významu vybraných extracelulárních zbytků v procesu vazby ATP/otevření kanálu.

1. Velká část ektodomény P2X₄ receptoru, konkrétně sekvence V64-Y315, se patrně nepodílí na specifickém účinku IVM na tento receptor. Naproti tomu obě transmembránové domény a sekvence V49-V61 těsně nad první transmembránovou doménou hrají významnou roli v účinku IVM.
2. Záměna P2X₄ receptor-specifických zbytků v oblasti transmembránových domén za alanin nevede k vymizení potenciačního účinku IVM, pouze v případě mutant P2X₄W50A, P2X₄V60A a P2X₄V357A byla pozorována změna v deaktivaci receptoru.
3. V této práci jsme potvrdili helikální uspořádání TM domén. Aminokyselinové zbytky obou transmembránových domén (Q36, L40, V43, V47, N338, G342, L346, A349 a I356), společně s W50, které byly tolerantní k cysteinové mutagenезi a jsou v otevřeném stavu pravděpodobně orientované do lipidové dvojvrstvy, pravděpodobně vytvářejí vazebnou kapsu pro IVM.
4. Určili jsme zbytky v TM1 a TM2 (M31, Y42, G45, W46, V49, G340, S341, L343, A344, G347, T350, D354 a V357), které směřují v otevřeném stavu do hydrofilního póru kanálu a mají důležitou úlohu ve funkci receptoru.
5. Ukázali jsme, že řada ektodoménových mutantních receptorů, dříve označovaných jako nefunkční, byla funkční.

6. Z vybraných extracelulárních zbytků, navržených jako důležité pro vazbu agonisty a/nebo otevírání kanálu, jsme pomocí IVM určili 3 zbytky – K67, R295 a K313 jako nejdůležitější pro funkci P2X₄ receptoru.



8. LITERATURA

- Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1994). "Purinceptors: are there families of P2X and P2Y purinceptors?" *Pharmacol Ther* **64**(3): 445-75.
- Acuna-Castillo, C., B. Morales, et al. (2000). "Zinc and copper modulate differentially the P2X₄ receptor." *J Neurochem* **74**(4): 1529-37.
- Adelsberger, H., A. Lepier, et al. (2000). "Activation of rat recombinant alpha(1)beta(2)gamma(2S) GABA(A) receptor by the insecticide ivermectin." *Eur J Pharmacol* **394**(2-3): 163-70.
- Agboh, K. C., T. E. Webb, et al. (2004). "Functional characterization of a P2X receptor from *Schistosoma mansoni*." *J Biol Chem* **279**(40): 41650-7.
- Aschrafi, A., S. Sadtler, et al. (2004). "Trimeric architecture of homomeric P2X₂ and heteromeric P2X₁₊₂ receptor subtypes." *J Mol Biol* **342**(1): 333-43.
- Bianchi, B. R., K. J. Lynch, et al. (1999). "Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes." *Eur J Pharmacol* **376**(1-2): 127-38.
- Bo, X., L. H. Jiang, et al. (2003). "Pharmacological and biophysical properties of the human P2X₅ receptor." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1407-16.
- Bo, X., M. Kim, et al. (2003). "Tissue distribution of P2X₄ receptors studied with an ectodomain antibody." *Cell Tissue Res* **313**(2): 159-65.
- Bo, X., Y. Zhang, et al. (1995). "A P2X purinceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile." *FEBS Lett* **375**(1-2): 129-33.
- Bobanovic, L. K., S. J. Royle, et al. (2002). "P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific." *J Neurosci* **22**(12): 4814-24.
- Boue-Grabot, E., V. Archambault, 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): 10190-5.
- Brake, A. J., M. J. Wagenbach, et al. (1994). "New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor." *Nature* **371**(6497): 519-23.
- Brandle, U., P. Spielmanns, et al. (1997). "Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing." *FEBS Lett* **404**(2-3): 294-8.
- Brown, D. A., J. I. Bruce, et al. (2004). "cAMP potentiates ATP-evoked calcium signaling in human parotid acinar cells." *J Biol Chem* **279**(38): 39485-94.
- Brown, S. G., A. Townsend-Nicholson, et al. (2002). "Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH." *J Pharmacol Exp Ther* **300**(2): 673-80.
- Buell, G., C. Lewis, et al. (1996). "An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain." *Embo J* **15**(1): 55-62.
- Clyne, J. D., L. F. Wang, et al. (2002). "Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X₂ purinceptor." *J Neurosci* **22**(10): 3873-80.
- Coddou, C., R. A. Lorca, et al. (2005). "Heavy metals modulate the activity of the purinergic P2X₄ receptor." *Toxicol Appl Pharmacol* **202**(2): 121-31.
- Coddou, C., B. Morales, et al. (2003). "Histidine 140 plays a key role in the inhibitory modulation of the P2X₄ nucleotide receptor by copper but not zinc." *J Biol Chem* **278**(38): 36777-85.
- Colquhoun, D. (1998). "Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors." *Br J Pharmacol* **125**(5): 924-47.
- Cook, S. P., K. D. Rodland, et al. (1998). "A memory for extracellular Ca²⁺ by speeding recovery of P2X receptors from desensitization." *J Neurosci* **18**(22): 9238-44.

- Cully, D. F., P. S. Pares, et al. (1996). "Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent ivermectin." J Biol Chem **271**(33): 20187-91.
- Dent, J. A., M. W. Davis, et al. (1997). "avr-15 encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*." Embo J **16**(19): 5867-79.
- Dent, J. A., M. M. Smith, et al. (2000). "The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2674-9.
- Ding, S. and F. Sachs (1999). "Ion permeation and block of P2X(2) purinoceptors: single channel recordings." J Membr Biol **172**(3): 215-23.
- Ding, S. and F. Sachs (1999). "Single channel properties of P2X2 purinoceptors." J Gen Physiol **113**(5): 695-720.
- Ding, S. and F. Sachs (2000). "Inactivation of P2X2 purinoceptors by divalent cations." J Physiol **522 Pt 2**: 199-214.
- Duckwitz, W., R. Hausmann, et al. (2006). "P2X5 subunit assembly requires scaffolding by the second transmembrane domain and a conserved aspartate." J Biol Chem **281**(51): 39561-72.
- Edwards, G. (2003). "Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity?" Filaria J **2 Suppl 1**: S8.
- Egan, T. M., W. R. Haines, et al. (1998). "A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method." J Neurosci **18**(7): 2350-9.
- Egan, T. M. and B. S. Khakh (2004). "Contribution of calcium ions to P2X channel responses." J Neurosci **24**(13): 3413-20.
- Egan, T. M., D. S. Samways, et al. (2006). "Biophysics of P2X receptors." Pflugers Arch **452**(5): 501-12.
- Eickhorst, A. N., A. Berson, et al. (2002). "Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain." J Gen Physiol **120**(2): 119-31.
- Ennion, S., S. Hagan, et al. (2000). "The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors." J Biol Chem **275**(45): 35656.
- Ennion, S. J. and R. J. Evans (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**(2): 303-11.
- Ennion, S. J. and R. J. Evans (2002). "P2X(1) receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant." Biochem Biophys Res Commun **291**(3): 611-6.
- Ennion, S. J., J. Ritson, et al. (2001). "Conserved negatively charged residues are not required for ATP action at P2X(1) receptors." Biochem Biophys Res Commun **289**(3): 700-4.
- Evans, R. J., C. Lewis, et al. (1995). "Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors)." Mol Pharmacol **48**(2): 178-83.
- Evans, R. J., C. Lewis, et al. (1996). "Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells." J Physiol **497 (Pt 2)**: 413-22.
- Fabbretti, E., E. Sokolova, et al. (2004). "Identification of negative residues in the P2X3 ATP receptor ectodomain as structural determinants for desensitization and the Ca²⁺-sensing modulatory sites." J Biol Chem **279**(51): 53109-15.
- Fisher, J. A., G. Girdler, et al. (2004). "Time-resolved measurement of state-specific P2X2 ion channel cytosolic gating motions." J Neurosci **24**(46): 10475-87.

- Forrester, S. G., R. K. Prichard, et al. (2003). "Haemonchus contortus: HcGluCla expressed in *Xenopus* oocytes forms a glutamate-gated ion channel that is activated by ibotenate and the antiparasitic drug ivermectin." *Mol Biochem Parasitol* **129**(1): 115-21.
- Fountain, S. J. and R. A. North (2006). "A C-terminal lysine that controls human P2X4 receptor desensitization." *J Biol Chem* **281**(22): 15044-9.
- Freist, W., J. F. Verhey, et al. (1998). "ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases." *FEBS Lett* **434**(1-2): 61-5.
- Garcia-Guzman, M., F. Soto, et al. (1997). "Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue." *Mol Pharmacol* **51**(1): 109-18.
- Garcia-Guzman, M., F. Soto, et al. (1996). "Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor." *FEBS Lett* **388**(2-3): 123-7.
- Garcia-Guzman, M., W. Stuhmer, et al. (1997). "Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor." *Brain Res Mol Brain Res* **47**(1-2): 59-66.
- Gever, J. R., D. A. Cockayne, et al. (2006). "Pharmacology of P2X channels." *Pflugers Arch* **452**(5): 513-37.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." *Electrophoresis* **18**(15): 2714-23.
- Haines, W. R., K. Migita, et al. (2001). "The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel." *J Biol Chem* **276**(35): 32793-8.
- Haines, W. R., M. M. Voigt, et al. (2001). "On the contribution of the first transmembrane domain to whole-cell current through an ATP-gated ionotropic P2X receptor." *J Neurosci* **21**(16): 5885-92.
- Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* **391**(2): 85-100.
- Hassinen, T. and M. Perakyla (2001). "New energy terms for reduced protein models implemented in an off-lattice force field." *J Comput Chem* **22**: 1229-1242.
- He, M. L., T. A. Koshimizu, et al. (2002). "Purinergic P2X(2) receptor desensitization depends on coupling between ectodomain and C-terminal domain." *Mol Pharmacol* **62**(5): 1187-97.
- He, M. L., H. Zemkova, et al. (2003). "Dependence of purinergic P2X receptor activity on ectodomain structure." *J Biol Chem* **278**(12): 10182-8.
- Hibell, A. D., E. J. Kidd, et al. (2000). "Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors." *Br J Pharmacol* **130**(1): 167-73.
- Chabala, J. C., H. Mrozik, et al. (1980). "Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent." *J Med Chem* **23**(10): 1134-6.
- Chaumont, S., 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): 29628-38.
- Chessell, I. P., A. D. Michel, et al. (1998). "Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor." *Br J Pharmacol* **124**(6): 1314-20.
- Chessell, I. P., J. Simon, et al. (1998). "Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor." *FEBS Lett* **439**(1-2): 26-30.
- Chow, Y. W. and H. L. Wang (1998). "Functional modulation of P2X2 receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase." *J Neurochem* **70**(6): 2606-12.
- Inoue, K., M. Tsuda, et al. (2004). "ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4." *J Pharmacol Sci* **94**(2): 112-4.

- Jelinkova, I., Z. Yan, et al. (2006). "Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation." Biochem Biophys Res Commun **349**(2): 619-25.
- Jiang, L. H., M. Kim, et al. (2003). "Subunit arrangement in P2X receptors." J Neurosci **23**(26): 8903-10.
- Jiang, L. H., F. Rassendren, et al. (2005). "N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors." Am J Physiol Cell Physiol **289**(5): C1295-302.
- Jiang, L. H., F. Rassendren, et al. (2001). "Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor." J Biol Chem **276**(18): 14902-8.
- Jiang, L. H., F. Rassendren, et al. (2000). "Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor." J Biol Chem **275**(44): 34190-6.
- Jones, C. A., I. P. Chessell, et al. (2000). "Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues." Br J Pharmacol **129**(2): 388-94.
- Khakh, B. S., X. R. Bao, et al. (1999). "Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds." Nat Neurosci **2**(4): 322-30.
- Khakh, B. S. and T. M. Egan (2005). "Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics." J Biol Chem **280**(7): 6118-29.
- Khakh, B. S., W. R. Proctor, et al. (1999). "Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels." J Neurosci **19**(17): 7289-99.
- King, B. F., A. Townsend-Nicholson, et al. (2000). "Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes." J Neurosci **20**(13): 4871-7.
- Koshimizu, T., M. Koshimizu, et al. (1999). "Contributions of the C-terminal domain to the control of P2X receptor desensitization." J Biol Chem **274**(53): 37651-7.
- Koshimizu, T., M. Tomic, et al. (1998). "Identification of amino acid residues contributing to desensitization of the P2X2 receptor channel." J Biol Chem **273**(21): 12853-7.
- Koshimizu, T., M. Tomic, et al. (1998). "Functional role of alternative splicing in pituitary P2X2 receptor-channel activation and desensitization." Mol Endocrinol **12**(7): 901-13.
- Krause, R. M., B. Buisson, et al. (1998). "Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor." Mol Pharmacol **53**(2): 283-94.
- Krusek, J. and H. Zemkova (1994). "Effect of ivermectin on gamma-aminobutyric acid-induced chloride currents in mouse hippocampal embryonic neurones." Eur J Pharmacol **259**(2): 121-8.
- Le, K. T., K. Babinski, et al. (1998). "Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor." J Neurosci **18**(18): 7152-9.
- Le, K. T., E. Boue-Grabot, et al. (1999). "Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits." J Biol Chem **274**(22): 15415-9.
- Lewis, C., S. Neidhart, et al. (1995). "Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons." Nature **377**(6548): 432-5.
- Li, Z., K. Migita, et al. (2004). "Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor." J Neurosci **24**(33): 7378-86.
- Lynch, K. J., E. Touma, et al. (1999). "Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors." Mol Pharmacol **56**(6): 1171-81.
- Mager, P. P., A. Weber, et al. (2004). "Bridging the gap between structural bioinformatics and receptor research: the membrane-embedded, ligand-gated, P2X glycoprotein receptor." Curr Top Med Chem **4**(16): 1657-705.

- Marquez-Klaka, B., J. Rettinger, et al. (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**(6): 1456-66.
- Migita, K., W. R. Haines, et al. (2001). "Polar residues of the second transmembrane domain influence cation permeability of the ATP-gated P2X(2) receptor." *J Biol Chem* **276**(33): 30934-41.
- Miller, K. J., A. D. Michel, et al. (1998). "Cibacron blue allosterically modulates the rat P2X4 receptor." *Neuropharmacology* **37**(12): 1579-86.
- Mio, K., Y. Kubo, et al. (2005). "Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain." *Biochem Biophys Res Commun* **337**(3): 998-1005.
- Nakazawa, K., H. Ojima, et al. (2004). "Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X2 receptor activation." *Eur J Pharmacol* **483**(1): 29-35.
- Negulyaev, Y. A. and F. Markwardt (2000). "Block by extracellular Mg²⁺ of single human purinergic P2X4 receptor channels expressed in human embryonic kidney cells." *Neurosci Lett* **279**(3): 165-8.
- Newbolt, A., R. Stoop, et al. (1998). "Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor)." *J Biol Chem* **273**(24): 15177-82.
- Nicke, A., H. G. Baumert, et al. (1998). "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." *Embo J* **17**(11): 3016-28.
- Nicke, A., D. Kerschensteiner, et al. (2005). "Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits." *J Neurochem* **92**(4): 925-33.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." *Physiol Rev* **82**(4): 1013-67.
- Ormond, S. J., 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): 1692-700.
- Paukert, M., R. Osteroth, et al. (2001). "Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X(3) subunit." *J Biol Chem* **276**(24): 21077-82.
- Pratt, E. B., T. S. Brink, et al. (2005). "Use-dependent inhibition of P2X3 receptors by nanomolar agonist." *J Neurosci* **25**(32): 7359-65.
- Priel, A. and S. D. Silberberg (2004). "Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels." *J Gen Physiol* **123**(3): 281-93.
- Radford, K. M., C. Virginio, et al. (1997). "Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors." *J Neurosci* **17**(17): 6529-33.
- Rassendren, F., G. Bnell, et al. (1997). "Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor." *Embo J* **16**(12): 3446-54.
- Rettinger, J., A. Aschrafi, et al. (2000). "Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor." *J Biol Chem* **275**(43): 33542-7.
- Rettinger, J. and G. Schmalzing (2004). "Desensitization masks nanomolar potency of ATP for the P2X1 receptor." *J Biol Chem* **279**(8): 6426-33.
- Rettinger, J., G. Schmalzing, et al. (2000). "The suramin analogue NF279 is a novel and potent antagonist selective for the P2X(1) receptor." *Neuropharmacology* **39**(11): 2044-53.
- Roberts, J. A. and R. J. Evans (2004). "ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists." *J Biol Chem* **279**(10): 9043-55.
- Roberts, J. A. and R. J. Evans (2006). "Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP." *J Neurochem* **96**(3): 843-52.
- Roberts, J. A., C. Vial, et al. (2006). "Molecular properties of P2X receptors." *Pflugers Arch* **452**(5): 486-500.

- Rohrer, S. P., P. T. Meinke, et al. (1992). "Photoaffinity labeling of avermectin binding sites from *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 4168-72.
- Royle, S. J., L. K. Bobanovic, et al. (2002). "Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor." J Biol Chem **277**(38): 35378-85.
- Royle, S. J., O. S. Qureshi, et al. (2005). "Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors." J Cell Sci **118**(Pt 14): 3073-80.
- Seguela, P., A. Haghghi, et al. (1996). "A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain." J Neurosci **16**(2): 448-55.
- Shan, Q., J. L. Haddrill, et al. (2001). "Ivermectin, an unconventional agonist of the glycine receptor chloride channel." J Biol Chem **276**(16): 12556-64.
- Silberberg, S. D., T. H. Chang, et al. (2005). "Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels." J Gen Physiol **125**(4): 347-59.
- Silberberg, S. D., M. Li, et al. (2007). "Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels." Neuron **54**(2): 263-74.
- Smith, F. M., P. P. Humphrey, et al. (1999). "Identification of amino acids within the P2X2 receptor C-terminus that regulate desensitization." J Physiol **520 Pt 1**: 91-9.
- Soto, F., M. Garcia-Guzman, et al. (1996). "P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3684-8.
- Soto, F., M. Garcia-Guzman, et al. (1996). "Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain." Biochem Biophys Res Commun **223**(2): 456-60.
- Stoop, R., A. Surprenant, et al. (1997). "Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors." J Neurophysiol **78**(4): 1837-40.
- Stoop, R., S. Thomas, et al. (1999). "Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C." Mol Pharmacol **56**(5): 973-81.
- Surprenant, A., D. A. Schneider, et al. (2000). "Functional properties of heteromeric P2X(1/5) receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles." J Auton Nerv Syst **81**(1-3): 249-63.
- Thomas, S. A. and R. I. Hume (1990). "Permeation of both cations and anions through a single class of ATP-activated ion channels in developing chick skeletal muscle." J Gen Physiol **95**(4): 569-90.
- Torres, G. E., T. M. Egan, et al. (1998). "N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor." Biochemistry **37**(42): 14845-51.
- Torres, G. E., T. M. Egan, et al. (1998). "Topological analysis of the ATP-gated ionotropic [correction of ionotrophic] P2X2 receptor subunit." FEBS Lett **425**(1): 19-23.
- Torres, G. E., T. M. Egan, et al. (1999). "Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners." J Biol Chem **274**(10): 6653-9.
- Torres, G. E., T. M. Egan, et al. (1999). "Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly." J Biol Chem **274**(32): 22359-65.
- Torres, G. E., W. R. Haines, et al. (1998). "Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel." Mol Pharmacol **54**(6): 989-93.
- Toulme, E., F. Soto, et al. (2006). "Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin." Mol Pharmacol **69**(2): 576-87.

- Townsend-Nicholson, A., B. F. King, et al. (1999). "Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X4 and P2X4a receptors." *Brain Res Mol Brain Res* **64**(2): 246-54.
- Valera, S., N. Hussy, et al. (1994). "A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP." *Nature* **371**(6497): 516-9.
- Vial, C., J. A. Roberts, et al. (2004). "Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels." *Trends Pharmacol Sci* **25**(9): 487-93.
- Virginio, C., A. MacKenzie, et al. (1999). "Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor." *J Physiol* **519 Pt 2**: 335-46.
- Virginio, C., A. MacKenzie, et al. (1999). "Pore dilation of neuronal P2X receptor channels." *Nat Neurosci* **2**(4): 315-21.
- Virginio, C., G. Robertson, et al. (1998). "Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors." *Mol Pharmacol* **53**(6): 969-73.
- Wang, C. Z., N. Namba, et al. (1996). "Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues." *Biochem Biophys Res Commun* **220**(1): 196-202.
- Werner, P., E. P. Seward, et al. (1996). "Domains of P2X receptors involved in desensitization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15485-90.
- Wildman, S. S., S. G. Brown, et al. (1999). "Selectivity of diadenosine polyphosphates for rat P2X receptor subunits." *Eur J Pharmacol* **367**(1): 119-23.
- Wildman, S. S., B. F. King, et al. (1999). "Modulation of ATP-responses at recombinant rP2X4 receptors by extracellular pH and zinc." *Br J Pharmacol* **126**(3): 762-8.
- Wilkinson, W. J., L. H. Jiang, et al. (2006). "Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor." *Mol Pharmacol* **70**(4): 1159-63.
- Wirkner, K., D. Stanchev, et al. (2005). "Regulation of human recombinant P2X3 receptors by ecto-protein kinase C." *J Neurosci* **25**(34): 7734-42.
- Xiong, K., X. Q. Hu, et al. (2005). "The mechanism by which ethanol inhibits rat P2X4 receptors is altered by mutation of histidine 241." *Br J Pharmacol* **145**(5): 576-86.
- Xiong, K., R. W. Peoples, et al. (1999). "Differential modulation by copper and zinc of P2X2 and P2X4 receptor function." *J Neurophysiol* **81**(5): 2088-94.
- Xu, G. Y. and L. Y. Huang (2004). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II potentiates ATP responses by promoting trafficking of P2X receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32): 11868-73.
- Yan, Z., Z. Liang, et al. (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**(43): 32649-59.
- Yan, Z., Z. Liang, et al. (2005). "Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel." *Mol Pharmacol* **67**(4): 1078-88.
- Zemkova, H., M. L. He, et al. (2004). "Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors." *J Neurosci* **24**(31): 6968-78.
- Zemkova, H., Z. Yan, et al. (2007). "Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions." *J Neurochem* **102**(4): 1139-50.
- Zheng, Y., B. Hirschberg, et al. (2002). "Identification of two novel *Drosophila melanogaster* histamine-gated chloride channel subunits expressed in the eye." *J Biol Chem* **277**(3): 2000-5.

9. PUBLIKACE

Zemkova H., Yan Z., Liang Z., Jelinkova I., Tomic M. and Stojilkovic S.S. (2007) "Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X₄ receptor functions." J Neurochem **102** (4): 1139-50

Jelinkova I., Yan Z., Liang Z., Moonat S., Teisinger J., Stojilkovic S.S. and Zemkova H. (2006) "Identification of P2X₄ receptor specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation." Biochem Biophys Res Commun **349** (2): 619 - 25

Mazna P., Berka K., Jelinkova I., Balik A., Svoboda P., Obsilova V., Obsil T. and Teisinger J. (2005) "Ligand binding to the human MT2 melatonin receptor: The role of residues in transmembrane domains 3, 6 and 7." Biochem Biophys Res Commun **332** (3): 726-34

Mazna P., Obsilova V., Jelinkova I., Balik A., Berka K., Sovova Z., Rudiger E., Svoboda P., Obsil T. and Teisinger J. (2004) "Molecular modeling of human MT2 melatonin receptor: the role of Val 204, Leu 272 and Tyr 298 in ligand binding." J Neurochem **91** (6): 836-42