

Dvojí život ATP

Mezibuněčný posel i zdroj buněčné energie

MARIE
JINDŘICHOVÁ

HANA
ZEMKOVÁ

Jako jednu z prvních informací se všichni studenti biologie dovídají, že molekuly ATP (adenosin 5'-trifosfátu) jsou nepostradatelnou součástí všech buněk – jsou univerzálním zdrojem energie. Méně se však ví, že ATP se vyskytuje i mimo buňky, kde slouží při mezibuněčné komunikaci a vyvolává řadu fyziologických účinků. Univerzální buněčné palivo funguje i jako posel.

ATP jako signál

Signalizační úloha mimobuněčného ATP dlouho unikala pozornosti fyziologů. Nepředpokládali totiž, že by ATP, který byl dosud vnímán pouze jako molekula s ryze nitrobuněčnou funkcí, mohl mít ještě jinou důležitou úlohu. Nyní však již s jistotou víme, že molekuly ATP uvolněné z jedné buňky se vážou na specifické membránové proteiny na povrchu jiných buněk. Tyto dynamické proteiny, označované jako *purinergní P2 receptory*, mění po navázání mimobuněčného ATP svou strukturu, čímž je mezibuněčný signál přijat.

Signalizační úloha je velkou měrou založena na zvýšení koncentrace vápenatých iontů uvnitř aktivované buňky. K navýšení dochází vstupem iontů z mezibuněčného prostředí (skrze aktivované *P2X receptory*) nebo uvolněním z vlastních buněčných zdrojů (při aktivaci *metabotropních P2Y receptorů*). Na rozdíl od enzymů či membránových transportních systémů, které z ATP získávají energii jeho štěpením, je ATP pro purinergní P2 receptory pouze signalizační molekula a není hydrolyzován. Z mezibuněčného prostředí je ATP odstraňován všudypřítomnými enzymy ektonukleotidázami a jeho koncentrace je v mezibuněčném prostředí řádově menší než uvnitř buňky. Produkty enzymatického štěpení ATP (ADP – adenosindifosfát, AMP – adenosinmonofosfát či adenosin) mohou být však v mezibuněčné signalizaci paradoxně účinnější než sám ATP.

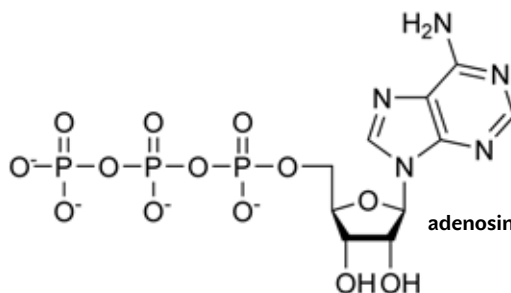
Purinergní receptory, na které se mezibuněčný ATP a produkty jeho štěpení vážou, byly popsány nedávno – v devadesátých letech minulého století. V současné době prudce roste zájem o studium účinků mimobuněčného ATP, jeho receptorů a možnosti léčebného využití purinergních látek. Ukazuje se totiž, že purinergní mezibuněčná signalizace je zásadní mechanismus při vnímání a přenosu bolesti, při zánětlivých procesech, při úpravě synaptického přenosu, regulaci apoptózy, uvolňování hormonů, stahu

hladkých svalů, tvorbě kostí a při mnoha dalších procesech. Novým purinergním lékem je například ticagrelor, orální P2Y12 antagonist, který byl vyvinut jako alternativa clopidogrelu proti srážení krevních destiček a který inhibuje aktivaci destiček stimulovanou ADP. Neustále se objevují nové a překvapivé informace o funkcích P2 receptorů. Podrobná znalost struktury a funkce těchto proteinů vzbuzuje naději, že by mohly být objeveny nové léky účinné u řady onemocnění, například tišící chronickou neuropatickou bolest nebo potlačující proliferaci některých typů nádorů.

ATP jako energie

ATP se skládá ze tří částí: z purinové báze (adeninu), která je připojena k 1'-uhlíkovému atomu pentozového cukru (ribózy), a tří molekul fosfátového aniontu (PO_4^-). Spojením báze a cukru vzniká nukleosid; v našem případě adenosin. Nukleotid ATP má navíc k adenosinu připojeny tři fosfátové skupiny. Fosfátové skupiny jsou vzájemně propojené vysoce energetickými (makroergními) vazbami, které se snadno štěpí a uvolňují energii. Hydrolyzou ATP vznikne anorganický

1. Známá tvář ATP – nitrobuněčná zásobárna energie. Většina buněčného ATP (adenosintrifosfát) je syntetizována v mitochondriích oxidační fosforylací. Je to sloučenina obsahující vazby s vysokým obsahem využitelné energie, které se snadno štěpí a uvolňují energii. Odštěpením jedné fosfátové skupiny z ATP vzniká adenosindifosfát (ADP) za současného uvolnění asi 7300 kalorií. Opětovným připojením anorganického fosfátu lze z ADP znovu ATP vytvořit. Dalším štěpením vzniká adenosinmonofosfát (AMP) až adenosin.



AMP (adenosin 5'-monofosfát)

ADP (adenosin 5'-difosfát)

ATP (adenosin 5'-trifosfát)

MUDr. Marie Jindřichová, Ph.D., (*1980) vystudovala 3. lékařskou fakultu UK v Praze, ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v. v. i., se zabývá studiem strukturálně-funkčních vztahů ATP-citlivých P2X receptorů.

RNDr. Hana Zemková, CSc., (*1952) vystudovala Přírodovědeckou fakultu UK v Praze. Ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v. v. i., vede laboratoř Buněčné a molekulární neuroendokrinologie, kde se zabývá P2X receptory a elektrickou excitabilitou neuroendokrinních buněk, a přednáší molekulární endokrinologii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze.

fosfát (P_i) a ADP, který je dále hydrolyzován na AMP a další P_i . Obvykle je fosfát přenesen a navázán na jinou molekulu. Štěpením ATP se uvolňuje také teplo, ale většina energie je předávána spolu s fosfátem právě tam, kde je potřeba. energii pro své fungování potřebuje řada buněčných proteinů, například enzymy, membránové pumpy a jiné iontové transportéry.

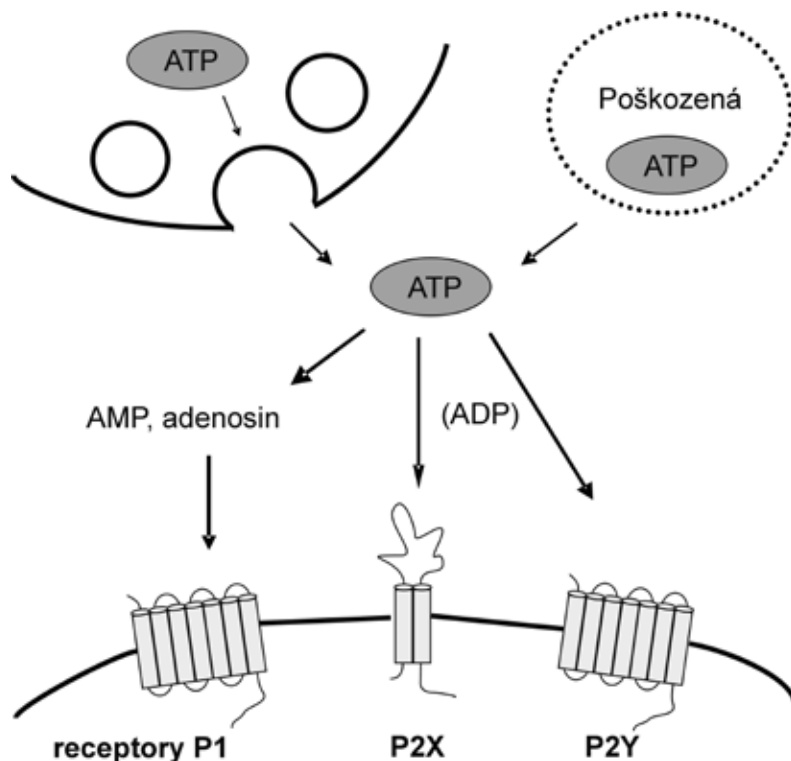
ATP je nejobvyklejší sloučeninou s makroergními vazbami, nikoli však jedinou. Další jsou například kreatinfosfát, acetylkoenzym A, fosfoenolpyruvát. Také ostatní nukleosidy (guanosin, uridin, cytidin) vytvářejí s fosfáty energeticky bohaté trifosfátové molekuly (guanosintrifosfát – GTP, uridintrifosfát – UTP, cytidintrifosfát – CTP). Tyto nukleotidy jsou však pro uchovávání energie méně důležité než ATP, je jich méně, primárně mají v buňce jiný úkol,¹ a rozhodně tedy nemohou v náročném buněčném metabolismu ATP zastoupit.

Ale nenechme se mýlit, ani ATP není dlouhodobá zásobárna energie „na horší časy“. Množství ATP ve svalu by vystačilo i u trénovaného atleta při maximální zátěži sotva na tři vteřiny. Proto musí být molekuly ATP v metabolismu neustále vytvářeny. Dokonce bylo spočítáno, že svaly maratonského běžce Khalida Khannouchiho (bývalého držitele světového rekordu) musely během závodu syntetizovat neuvěřitelných 60 kg ATP za dvě hodiny a několik minut. Přitom sám běžec vážil v době závodu kolem 55 kg. Tento zdánlivý paradox lze vysvětlit tím, že každá molekula ATP byla v jeho těle mnohokrát spotřebována a následně opět sestavena. Pro doplnění uveďme, že průměrně dospělý člověk vytvoří a spotřebuje 60–80 kg ATP denně.

Rychlost tvorby ATP se však pohybuje ve velmi širokém rozmezí v závislosti na zátěži organismu. ATP zkrátka nemůže být v buňce skladován ve velkém množství, molekuly vnitrobuněčného ATP jsou neustále odbourávány, energie předávána a ATP zpětně syntetizován. Většina ATP není však syntetizována *de novo*, častěji jde o tvorbu ATP z ADP připojením anorganického fosfátu. Reakce může probíhat několika způsoby. Nejčastěji oxidační fosforylací pomocí enzymu ATP-syntázy. K syntéze ATP využívá energie vznikající při vyrovnávání koncentrace vodíkových iontů na stranách membrány mitochondrií. Nerovnováha na vnitřní membráně mitochondrií je důsledek dýchacího řetězce, kdy dochází k přečerpávání protonů do prostoru mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou. Předchozím krokem k dýchacímu řetězci je Krebsův cyklus, společná metabolická dráha při aerobní oxidaci sacharidů, lipidů a proteinů.

Pomalý objev

Zatímco objev ATP jako zdroje buněčné energie byl prakticky ihned všeobecně přijat, hypotéza o mimobuněčném působení ATP se prosazovala jen velmi pomalu. Existovalo sice několik starších pozorování o mimobuněčných účincích ATP (např. v srdci a cé-



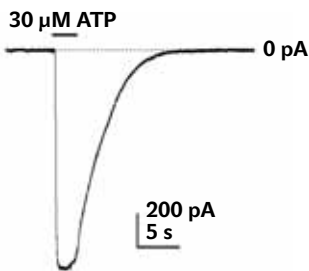
2. Druhá tvář molekuly ATP – aktivace purinergních P1 a P2 receptorů. ATP je v buňce zásobárnou energie, avšak mimo buňku slouží jako mezibuněčný signál. Molekuly ATP uvolněné z buňky do mezibuněčného prostředí (ať už ze synaptických váčků, nebo z poškozených buněk) mohou vazbou na P2 receptory (podtypu P2X nebo P2Y) na membráně jiných buněk působit jako mezibuněčné signály. Volné molekuly mimobuněčného ATP jsou enzymaticky štěpeny, přičemž ADP aktivuje purinergní P2 receptory, zatímco AMP a konečný produkt štěpení adenosin aktivuje purinergní P1 receptory. Tím se samostatně podílí na mezibuněčné komunikaci.

vách, 1929) a později o vlivu ATP na nervový systém (1948), ale opravdovým průkopníkem v objevu ATP jako mimobuněčné signalizační molekuly se stal až anglický vědec Geoffrey Burnstock. V šedesátých letech minulého století se jako mladý neurofyziolog působící na Melbournské universitě zabýval studiem autonomních nervů, zejména jejich působením na hladké svaly. Tehdy se signalizace autonomních nervů dávala do spojitosti se známým acetylcholinem nebo noradrenalinem. Inspirován Pamelou Holtonovou, která r. 1959 předložila tvrzení, že sensorické nervy uvolňují při antidromní stimulaci molekuly ATP, zkusel mladý Burnstock che-

¹⁾ Spolu s ATP jsou stavebními kameny pro klíčové vnitrobuněčné makromolekuly, jako jsou nukleové kyseliny DNA a RNA.

ATP byl v roce 1929 objeven hned dvakrát. Představitelem první vědecké skupiny z Heidelbergu je Karl Lohmann, který jej izoloval z masového výtažku. Tento německý biochemik pracoval několik let ve skupině Otto Meyerhafa, laureáta Nobelovy ceny (1922) za práci v oblasti metabolismu svalů – konkrétně objevil vztah mezi spotřebou kyslíku a metabolismem kyseliny mléčné. Druhou vědeckou skupinu tvořili američtí biochemici Cyrus Hartwell Fiske a jeho student Yellagapada SubbaRow z Harvard Medical School.

O deset let později Fritz Albert Lipmann objasnil úlohu ATP v buněčném metabolismu a přiřkl ATP funkci univerzálního přenašeče energie. Lipmann se ve své vědecké kariéře zabýval otázkou buněčného metabolismu velmi úspěšně – r. 1953 byl oceněn Nobelovou cenou za objev koenzymu A, který se účastní řady enzymatických reakcí. V témže roce byl ve stejné kategorii – za fyziologii a lékařství – oceněn rovněž Hans Adolf Krebs za objev citrátového neboli Krebsova cyklu, který je pilířem buněčného metabolismu.



3. Studium aktivace P2X receptorů. Mimobuněčný ATP působí na purinergní receptory, a tím zvyšuje koncentraci vápníku uvnitř buňky, čímž vyvolává řadu biologických účinků. Při elektrofyziologickém měření technikou „patch clamp“, kdy se stabilizuje membránové napětí buňky a měří se proudová odpověď způsobená ionty protékajícími přes membránu, se aktivace P2X receptorů projeví jako dovnitř směřující proud. Je to dáno tím, že se P2X receptory po navázání mimobuněčného ATP stanou prostupnými pro proud Na^+ a Ca^{2+} iontů směřující dovnitř buňky. Jasně to na obrázku vidíme z elektrofyziologického záznamu z buňky exprimované P2X4 receptory, kdy se během aplikace ATP do blízkosti buňky projeví aktivace P2X4 receptorů jako detekovatelná proudová odpověď s charakteristickým průběhem.

micky blokovat signalizaci klasicky známých neurotransmiterů a prokázal, že na signalizaci mezi nervem a hladkým svalem se podílejí molekuly ATP.

V pokusech pokračoval řadu let, až se r. 1972 cítil natolik jistý, že navrhl existenci „purinergních nervů“, tedy nervů vylučujících ATP jako neuropřenašeč. Poprvé tak byla molekule ATP přiznána role mimobuněčné signalizační molekuly, což bylo do té doby nemyšlitelné. Začalo se mluvit o *purinergní signalizaci* jako o mezibuněčném přenosu informace molekulou ATP. Nicméně i nadále panovala vůči představě mimobuněčné funkce ATP jistá skepse. Mnozí si totiž mysleli, že je nepravděpodobné, aby tak všudypřítomná molekula mohla vykonávat ještě jinou důležitou funkci. Kromě toho každá signalizační molekula může fungovat až po navázání na specifický receptor na povrchu cílové buňky, a pro ATP nebyl žádný znám.

Navzdory této skepsi Geoffrey Burnstock pokračoval v pokusech. Farmakologicky testoval cesty, kterými molekuly ATP uvolněné z nervů přenášejí informace do svalů a jiných buněk v těle. V roce 1978 navrhl existenci samostatné rodiny receptorů citlivých k ATP (označil je P2 receptory) a rodiny receptorů citlivých k finálnímu produktu rozpadu ATP, k adenosinu (tyto receptory označil jako P1). Další studie ukázaly, že molekula ATP může aktivací P2 receptorů na membráně cílové buňky způsobit různé buněčné účinky. To vedlo Burnstocka a jeho spolupracovníka Charlese Kennedyho k předpovědi existence podskupin P2 receptorů, které pojmenovali P2X a P2Y. Přesto v té době zůstávala představa ATP jako neuropřenašeče stále sporná a fyziology nepřilíhli přijímána. Obrat nastal až r. 1994, kdy byl v Anglii v laboratoři Alana Northa naklonován první receptor pro extracelulární ATP, *purinergní ionotropní P2X4 receptor*. Brzy nato byl naklonován také první *metabotropní P2Y receptor*. Existoval tedy nesporný důkaz o mimobuněčném působení ATP. Následovala exploze zájmu o purinergní receptory, a to především v souvislosti s rolí purinergní signalizace ve vnímání bolesti. Geoffrey Burnstock se stal jedním z nejcitovanějších autorů.

Potvrzení signalizační role

V současné době existuje dostatek důkazů na molekulární, buněčné i systémové úrovni o tom, že mimobuněčný ATP je signalizační molekula, která hraje roli v mnoha fyziologických procesech. Navíc je prokázáno, že se ATP do mezibuněčného prostředí nevolně

je pouze z nervových zakončení vylitím synaptických váčků, ale vylučují ho také jiné buňky, například epitelové a gliové. Samozřejmě výrazným zdrojem mimobuněčného ATP jsou rozbité a poškozené buňky v místě poranění, kdy se ATP zevnitř buněk jednoduše vylíje.

Role extracelulárního ATP byla prokázána v nervovém, nervosvalovém, kardiovaskulárním, respiračním, imunitním, gastrointestinálním, urogenitálním, neuroendokrinním i reprodukčním systému a ve funkci specializovaných smyslů. Purinergní receptory pro extracelulární ATP se vyskytují na povrchu buněk prakticky všech tkání obratlovců a byly zjištěny i u mnoha organismů bezobratlých, byla potvrzena jejich úloha při vývoji organismu. Purinergní ATP signalizaci byla nedávno přiznána ústřední role v mezibuněčné signalizaci, která mění náš pohled na mnoho fyziologických procesů i nemocí.

Profesor G. Burnstock ve své úvodní přednášce na 8. mezinárodním symposiu o adenosinu a adenosinových nukleotidech dokonce vyslovil hypotézu, že by funkce ATP mimo buňku mohla být starší než jeho funkce uvnitř buňky, a až v průběhu evoluce se ATP stal nepostradatelným v nitrobuněčném přenosu energie.

Vyhledky a význam P2X receptorů

Devatenáct let poté, co byl naklonován první P2X receptor, naše porozumění molekulární struktuře a fyziologické funkci těchto receptorů udělalo velký pokrok. Je známo do nejmenších detailů, jak se mění struktura molekuly po kontaktu s ATP i jak se z buněčné membrány vysouvají receptorové šroubovice a otevírá se mezi nimi průchod pro ionty. U savců je známo sedm typů P2X receptorů a dnes je již zřejmé, že se jejich počet nebude dále zvyšovat. Nevíme však nic o tom, jakým způsobem buňky regulují množství receptorů, jak se vytvářejí funkční receptory, jak jsou tyto receptory dopravovány na buněčnou membránu a kde působí farmaka na struktuře receptorů. Receptory pro extracelulární ATP obecně hrají roli v mnoha životně důležitých fyziologických procesech. Jsou přítomny u mnoha fylogeneticky odlišných organismů. Na druhou stranu je záhadou, proč je má hlenka nebo motolice *Schistosoma mansoni*, ale nemá je muška *Drosophila melanogaster* a červ *Caenorhabditis elegans* – používá snad drozofila jiný, dosud neznámý typ ATP receptoru? Mohl by P2X receptor být u motolice použit při léčbě schistosomiázy? Budou identifikovány další organismy s P2X receptory? Jak mohou P2X receptory využít energii z vazby (kontaktu) s ATP k otevření iontového póru a jak pracují vrátka a selektivní filtr, který umožní vstup vápenatých iontů i přes mnohem větší nabídku sodných iontů? Neví se dosud a zůstává otázkou, jak rozšířen je ATP jako neuropřenašeč v centrálním nervovém systému a zdali je tento nález tak zásadní, že bude znamenat revizi dosavadních učebnicových znalostí.