Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Neurovědy

Mgr. Barbora Krausová

Interakce steroidu s NMDA receptorem:

Strukturně-aktivitní studie a vliv na mutované lidské formy NMDA receptorů

Steroid-NMDA receptor interaction:

Structure-activity study and effect on mutant forms of human NMDA receptors

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. MUDr. Ladislav Vyklický, DrSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 26. 06. 2018

Jméno a příjmení: Barbora Krausová

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především svému školiteli prof. MUDr. Ladislavu Vyklickému, DrSc. za vstřícnost, trpělivost a veškerou jeho pomoc. Velice si vážím pozornosti, jež mi věnuje a díky které mohu pracovat na velmi zajímavých projektech. Velký dík patří také Magdě Kuntošové za vynikající laboratorní servis, dále Mgr. Martinu Horákovi, PhD. za pomoc s imunofluorescenčním značením a odborné konzultace, Ing. Ivanu Dittertovi, PhD. a za ochotu a pomoc při řešení technických problémů a RNDr. Janu Krůškovi PhD., Mgr. Miloslavu Kořínkovi, PhD. a Terezii Smejkalové, PhD. za cenné rady. Poděkování patří také celému kolektivu na oddělení Buněčné neurofyziologie za vytvoření příjemného a stimulujícího pracovního prostředí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému partnerovi, rodině a přátelům za veškerou podporu, díky níž se mohu plně věnovat tomu, co mě baví.

Identifikační záznam:

KRAUSOVÁ, Barbora. *Interakce steroidu s NMDA receptorem: Strukturně-aktivitní studie a vliv na mutované lidské formy NMDA receptorů. [Steroid-NMDA receptor interaction: Structure-activity study and effect on mutant forms of human NMDA receptors]*. Praha, 2018. 120 stran, 6 příloh. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i. Vedoucí práce Vyklický, Ladislav.

ABSTRAKT

N-metyl-*D*-aspartátové (NMDA) receptory jsou glutamátem aktivované iontové kanály propustné pro vápníkové ionty, které hrají klíčovou roli při excitačním synaptickém přenosu a plasticitě a jejich dysfunkce se podílí na patologii řady neuropsychiatrických onemocnění. Nadměrná aktivace NMDA receptorů prostřednictvím tonicky zvýšené hladiny glutamátu v okolí neuronů může vést k excitotoxicitě, spojené s různými akutními a chronickými neurologickými poruchami, jako je například ischemie, Alzheimerova a Parkinsonova choroba, epilepsie nebo deprese. Naproti tomu, v případě hypofunkce NMDA receptorů se předpokládá, že může být podkladem pro poruchy autistického spektra, schizofrenii, či mentální retardaci. Nedávná analýza DNA u neurologických a psychiatrických pacientů odhalila četné mutace v genech kódujících podjednotky NMDA receptorů. Aktivita NMDA receptorů je ovlivněna širokou škálou alosterických modulátorů, včetně neurosteroidů, které mohou jak inhibovat, tak potencovat aktivitu NMDA receptorů, což z nich činí slibný terapeutický cíl. V této dizertační práci popisujeme nové skupiny neurosteroidních analogů, které mají strukturní modifikace na uhlících v pozici C3 a C17 steroidního jádra, a analogy postrádající D-kruh (perhydrofenanthreny). Hodnotili jsme vztah mezi strukturou a aktivitou (SAR, z angl. Structure-Activity Relationship) pro jejich modulační účinek na rekombinantních GluN1/GluN2B receptorech. Naše výsledky ukazují, že: (*i*) endogenní neurosteroid pregnanolon sulfát (**PA-S**) a jeho analogy, substituované na C3 karboxylovými kyselinami s různou délkou řetězce, jsou účinnými inhibitory tonicky aktivovaných NMDA receptorů, přičemž vykazují minimální nebo žádný účinek na fazicky aktivované NMDA receptory. Rozdíl v účinnosti mezi tonickou a fazickou inhibicí se zvyšuje s rostoucí délkou substituentu na C3. (*ii*) Dále jsme prokázali, že všechny testované analogy **PA-S** s modifikací na C17 (látky **3.1-51.1**) jsou účinnějšími inhibitory NMDA receptorů (hodnoty IC_{50}, které odpovídají koncentraci látky vyvolávající 50 % inhibici, se pohybují od 84,0 nM do 5,4 μM) než endogenní **PA-S** (IC_{50} = 24,6 μM). (*iii*) Pro perhydrofenantrenové analogy (látky **1.2-10.2**) jsme ukázali, že působí jako inhibitory NMDA receptorů a látku **9.2** (IC_{50} = 15,6 μM) jsme vyhodnotili jako účinnější inhibitor NMDA receptorových proudů ve srovnání s endogenním **PA-S**. (*iv*) Testovali jsme také analogy **PA-S** a pregnanolon glutamátu (**PA-G**) s C3-substituentem napojeným na steroidní kostru pomocí amidu (látky **1.3-4.3**). Zjistili jsme, že inhibiční účinek sloučenin **3.3** a **4.3** na NMDA receptorech byl významně zlepšen (IC_{50} = 1,0 a 1,4 μM, respektive) v porovnání s endogenním **PA-S** a jeho neuroprotektivním analogem **PA-G** (IC_{50} = 51,7 μM). (*v*) Následně jsme testovali citlivost mutovaných lidských

NMDA receptorů vůči steroidům s potenciačním účinkem na NMDA receptorech. Ukázali jsme, že odpovědi mutovaných hGluN1/hGluN2B(V558I, W607C; V618G a L825V) receptorů (s přibližně desetinásobně sníženou pravděpodobností otevření iontového kanálu) byly v přítomnosti endogenního pregnenolon sulfátu (**PE-S**) a jeho analogu androsten hemisukcinátu potencovány z 59-197 % a 406-1647 %, respektive. (*vi*) V případě analogů **PE-S** (látky **2.4-24.4**) jsme zjistili, že všechny testované analogy potencují aktivitu NMDA receptorů (hodnoty EC_{50}, odpovídající koncentraci látky vyvolávající polovinu maximální potenciace (E_{max}), se pohybují od 1,8 μM do 151,4 μM a hodnoty E_{max} se pohybují od 48 % do 452 %), a 10 z nich vykazovalo vyšší zdánlivou afinitu pro GluN1/GluN2B receptory ve srovnání s endogenním **PE-S** (EC_{50} = 21,7 μM). Navíc, SAR studie odhalila vztah mezi délkou zbytku na C3 steroidní molekuly a potenciačním účinkem na GluN1/GluN2B receptorech pro různé modifikace na D-kruhu. Dané výsledky by mohly pomoci při vývoji nových terapeutik na bázi neurosteroidů, které mohou být případně využity při léčbě neuropsychiatrických onemocnění, podmíněných hyperfunkcí nebo hypofunkcí NMDA receptorů.

KLÍČOVÁ SLOVA: NMDA receptor, neurosteroid, strukturně-aktivitní vztah, pregnanové analogy, pregnenové analogy, lidské mutace

ABSTRACT

N-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptors are glutamate-gated calcium permeable ion channels that play a key role in excitatory synaptic transmission and plasticity, and their dysfunction underlies several neuropsychiatric disorders. The overactivation of NMDA receptors by tonically increased ambient glutamate can lead to excitotoxicity, associated with various acute and chronic neurological disorders, such as ischemia, Alzheimer and Parkinson's disease, epilepsy or depression. On the opposite, NMDA receptor hypofunction is thought to be implicated in autism, schizophrenia, or intellectual disability. Recent DNA screening for neurological and psychiatric patients revealed numerous mutations in genes encoding for NMDA receptor subunits. The activity of NMDA receptors is influenced by a wide variety of allosteric modulators, including neurosteroids that could both inhibit and potentiate the activity of NMDA receptors, which makes them promising therapeutic targets. In this thesis, we describe new classes of neurosteroid analogues which possess structural modifications at carbons C3 and C17 of the steroidal core, and analogues without D-ring region (perhydrophenanthrenes). We evaluated the structure-activity relationship (SAR) for their modulatory effect on recombinant GluN1/GluN2B receptors. Our results demonstrate that: (*i*) endogenous neurosteroid pregnanolone sulphate (**PA-S**) and its analogues, substituted at C3 with a carboxylic acid moiety of varying length, are effective antagonists of tonically activated NMDA receptors with a smaller or no effect on phasically activated NMDA receptors and that the difference in potency between tonic and phasic inhibition increased with the length of the C3-residue. (*ii*) We further demonstrated that all tested compounds with modifications at C17 (compounds **3.1-51.1**) are more potent inhibitors of NMDA receptors (with values of IC_{50}, the concentration of compound that produces 50% inhibition, varying from 84.0 nM to 5.4 μM) than the endogenous **PA-S** (IC_{50} = 24.6 μM). (*iii*) For perhydrophenanthrene analogues (compounds **1.2**-**10.2**) we showed that they act as inhibitors of NMDA receptors and compound **9.2** (IC_{50} = 15.6 μM) was assessed as a more potent inhibitor of NMDA receptor currents than the endogenous **PA-S**. (*iv*) We also tested analogues of **PA-S** and pregnanolone glutamate (**PA-G**) with C3-residue connected by amide (compounds **1.3**-**4.3**). We found that inhibitory effect of compounds **3.3** and **4.3** on NMDA receptors was significantly improved (IC_{50} = 1.0 and 1.4 μM, respectively) as compared with endogenous **PA-S** and its neuroprotective analogue **PA-G** (IC_{50} = 51.7 μM). (*v*) Further, we tested the sensitivity of mutated human NMDA receptors to steroids that potentiate the activity of NMDA receptors. We showed that responses induced in mutant

hGluN1/hGluN2B(V558I; W607C; V618G; and L825V) receptors (with diminished probability of channel opening by ~10-fold) were potentiated by 59-197% and 406-1647%, respectively, when recorded in the presence of endogenous pregnenolone sulphate (**PE-S**) and its analogue androstene hemisuccinate. (*vi*) In case of **PE-S** analogues (compounds **2.4-24.4**) we found out that they potentiate the activity of NMDA receptors (EC_{50} values, corresponding the concentration producing half-maximal potentiation, varying from 1.8 to 151.4 μM and E_{max} values varying from 48 to 452 %) and 10 of them were more potent NMDA receptor modulators than endogenous **PE-S** (EC_{50} = 21.7 μM). Moreover, the SAR study revealed a relationship between the length of the residues at C3 of the steroid molecule and the potentiating effect at GluN1/GluN2B receptors for various D-ring modifications. Our results provide an opportunity for the development of new therapeutic drugs based on neurosteroids that can be potentially used in the treatment of neuropsychiatric disorders involving hyperfunction or hypofunction of NMDA receptors.

KEYWORDS: NMDA receptor, neurosteroid, structure-activity relationship, pregnane analogues, pregnene analogues, human mutations

OBSAH

ABSTRAKT 5
ABSTRACT 7
SEZNAM ZKRATEK 12
1 ÚVOD 15
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED 16
2.1 Struktura NMDA receptorů 16
2.1.1 Topologie podjednotek NMDA receptoru 17
2.2 Aktivace NMDA receptorů 20
2.2.1 Kinetické schéma aktivace NMDA receptoru 21
2.3 Fyziologická a patologická funkce NMDA receptorů 22
2.3.1 Hyperfunkce NMDA receptorů 23
2.3.2 Hypofunkce NMDA receptorů 23
2.4 Farmakologie NMDA receptorů 24
2.4.1 Antagonisté NMDA receptorů 24
2.4.2 Pozitivní alosterické modulátory 31
3 CÍLE PRÁCE 36
3.1 Význam strukturních determinant pregnanových derivátů pro preferenční inhibici tonicky oproti fazicky aktivovaným NMDA receptorům 36
3.1.1 Hypotéza 36
3.1.2 Cíl 36
3.2 Charakterizace strukturních determinant PA-S analogů významných pro jejich inhibiční působení na NMDA receptorech 36
3.2.1 Hypotéza 36
3.2.2 Cíl 37
3.3 Funkční a farmakologické vlastnosti mutantních forem lidského typu NMDA receptorů 37
3.3.1 Hypotéza 37
3.3.2 Cíl 37
3.4 SAR studie pro C3-hemiesterové analogy neurosteroidů s potenciačním účinkem na NMDA receptorech 38
3.4.1 Hypotéza 38
3.4.2 Cíl 38
4 MATERIÁL A METODY 39
4.1 Chemikálie a roztoky 39
4.2 cDNA konstrukty 41
4.2.1 Cílená mutageneze 41
4.3 Buněčné kultury a transfekce 42
4.4 Imunofluorescenční mikroskopie 43
4.5 Metoda terčíkového zámku a rychlý aplikační systém 44
4.6 Analýza a statistické zpracování dat 45
5 VÝSLEDKY 49
5.1 Význam strukturních determinant preganových derivátů pro preferenční inhibici tonicky oproti fazicky aktivovaným NMDA receptorům 49
5.2 Charakterizace strukturních determinant PA-S analogů významných pro jejich inhibiční působení na NMDA receptorech 51
5.2.1 Sulfátové steroidy s lipofilními modifikacemi na D-kruhu steroidního jádra 51
5.2.2 Perhydrofenantreny se substituovanou sulfátovou a hemisukcinátovou skupinou 56

5.2.3 Nové steroidní analogy PA-S a PA-G na bázi amidů s inhibičním působením na NMDA receptorech 59
5.3 Funkční a farmakologické vlastnosti mutantních forem lidského typu NMDA receptorů 61
5.3.1 Vzácné mutace v MD snižují povrchovou expresi NMDA receptorů 63
5.3.2 Mutace související s lidskými neurologickými poruchami snižují zdánlivou afinitu k agonistům 66
5.3.3 Mutace v MD u hGluN2B podjednotky mění desenzitizaci receptorů a snižují P_o iontového kanálu 68
5.3.4 Mutace L825V má zvýšenou citlivost vůči endogenním a syntetickým steroidům 70
5.4 SAR studie pro C3-hemiesterové analogy neurosteroidů s potenciačním účinkem na NMDA receptorech 72
5.4.1 Modulační účinek látek 2.4-24.4 na proudy NMDA receptorů 73
5.4.2 Vliv substituentů na uhlících C3 a C17 steroidního jádra u látek 2.4-24.4 na jejich modulační účinek na NMDA receptorech 74
5.4.3 Účinek 20-Oxo-PE-hAdi (6.4) na rekombinantních GluN1/GluN2A-D receptorech 79
6 DISKUSE 81
6.1 Význam strukturních determinant preganových derivátů pro preferenční inhibici tonicky oproti fazicky aktivovaným NMDA receptorům 81
6.2 Charakterizace strukturních determinant PA-S analogů významných pro jejich inhibiční působení na NMDA receptorech 83
6.2.1 Vliv modifikací v oblasti D-kruhu na modulační účinek steroidních analogů na NMDA receptorech 83
6.2.2 Vliv podjednotkového složení NMDA receptorů na inhibiční působení steroidních analogů 85
6.2.3 Vliv C3-amidové vazby na inhibiční účinek steroidních analogů na NMDA receptorech 86
6.3 Funkční a farmakologické vlastnosti mutantních forem lidského typu NMDA receptorů 87
6.3.1 Mechanizmus dysregulace u hGluN1/hGluN2B(P553L) a hGluN1/hGluN2B(V558I) receptorů 87
6.3.2 Mechanizmy dysregulace v případě hGluN2B(W607C) a hGluN2B(V618G) mutací 89
6.3.3 Mechanizmus dysregulace u hGluN1/hGluN2B(S628F) receptorů 92
6.3.4 Mechanizmus dysregulace u hGluN2B(E657G) mutace 93
6.3.5 Mechanizmus dysregulace u hGluN2B(G820E), hGluN2B(M824R), a hGluN2B(L825V) mutací 94
6.3.6 Farmakologie mutantních forem lidských hGluN1/hGluN2B receptorů 95
6.4 SAR studie pro C3-hemiesterové analogy neurosteroidů s potenciačním účinkem na NMDA receptorech 96
6.4.1 Vliv substituentů na uhlíku C3 a C17 u sloučenin 2.4-24.4 na modulační účinek na NMDA receptorech 97
6.4.2 Účinek 20-Oxo-PE-hAdi (6.4) na rekombinantní NMDA receptory 98
7 SOUHRN 100
7.1 Význam strukturních determinant preganových derivátů pro preferenční inhibici tonicky oproti fazicky aktivovaným NMDA receptorům 100
7.2 Charakterizace strukturních determinant PA-S analogů významných pro jejich inhibiční působení na NMDA receptorech 100
7.3 Funkční a farmakologické vlastnosti mutantních forem lidského typu NMDA receptorů 100
7.4 SAR studie pro C3-hemiesterové analogy neurosteroidů s potenciačním účinkem na NMDA receptorech 101
7 SUMMARY 102

7.1 The importance of structural determinants of pregane derivatives for preferential inhibition of tonically versus phasically-activated NMDA receptors 102
7.2 Characterization of structural detreminants of PA-S analogues important for their inhibitory action at NMDA receptors 102
7.3 Functional and pharmacological properties of mutant forms of human NMDA receptors 102
7.4 SAR studies for neurosteroid C3-hemiester analogues with potentiating effect at NMDA receptors 103
8 ZÁVĚR 104
9 LITERATURA 105
10 SEZNAM PUBLIKACÍ 118
11 PŘÍLOHY 120

SEZNAM ZKRATEK

24*(S)*-HC	24*(S)*-hydroxycholesterol
ADHD	Hyperkinetická porucha (z angl. Attention deficit hyperactivity disorder)
AE-hSuc	Androsten hemisukcinát
Ach	Acetylcholin
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát
ASD	Poruchy autistického spektra (z angl. Autism Spectrum Disorders)
ATP	Adenosintrifosfát
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)
BAPTA	1,2-bis(2-aminofenoxy)etan-*N,N,N′,N′*-tetraoctová kyselina
cAMP	Cyklický andenosinmonofosfát
cDNA	Cirkulární kyselina deoxyribonukleová
CDX	Cyklodextrin
CIQ	(3-chlorofenyl)(6,7-dimetoxy-1-((4-metoxyfenoxy)metyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)metanon
CNS	Centrální nervová soustava
COS-7	Buňky ledvinných fibroblastů z Africké zelené opice
CTD	C-terminální doména
D	Relativní míra desenzitizace
D-APV	*D*-2-amino-5-fosfonovalerát
DD	Vývojové zpoždění (z angl. Developmental delay)
DMSO	Dimetylsulfoxid
E	Relativní míra potenciace
E_{max}	Maximální hodnota potenciace
ECS	Extracelulární aplikační roztok
EC_{50}	Koncentrace látky vyvolávající polovinu maximální potenciace
EDTA	Etylendiamin-*N,N,N´,N´*-tetraoctová kyselina
eGFP	Zelený fluorescenční protein (z angl. Green fluorescent protein)
EMEM	Eaglovo minimální esenciální médium
EPI	Epilepsie a/nebo záchvaty, dětské spasmy
EPS	Extracelulární promývací roztok

FTS	Fetální telecí sérum
GABA	Kyselina γ-amino-máselná
GNE-9278	4-cyklohexyl-N-(5-metyl-7-oxo-2-propyl-4,7-dihydro-[1,2,4]triazolo [1,5-a]pyrimidin-6-yl)benzensulfonamid
GluN	Podjednotky *N*-metyl-*D*-aspartátových receptorů
GRIN	Geny kódující podjednotky *N*-metyl-*D*-aspartátových receptorů
h	Hillův koeficient
HEPES	*N*-2-hydroxyetylpiperazin-*N´*-2-etansulfonová kyselina
HEK293	Lidské embryonální ledvinné buňky (z angl. Human Embryonic Kidney cells)
I	Relativní míra inhibice
I_a	Proudová odpověď na aplikaci nízké koncentrace agonisty
IC_{50}	Koncentrace látky vyvolávající 50% inhibici
ICS	Intracelulární aplikační roztok
I_i a I_e	Proudová odpověď během koaplikace steroidu s agonistou
I_P	Proudová odpověď v maximu
I_{SS}	Proudová odpověď v ustáleném stavu
k_{a+} a k_{a-}	Rychlostní konstanty vazby a odvazování agonisty
k_d a k_r	Rychlostní konstanty nástupu desenzitizace a resenzitizace
k_o a k_z	Rychlostní konstanty otevírání a zavírání iontového kanálu
k_b	Rychlostní konstanta nástupu blokády MK-801
LBD	Ligand-vázající doména (z angl. Ligand Binding Domain)
KYNA	Kyselina kynurenová
MD(M1-4)	Membránové domény receptoru
MK-801	Dizocilpin maleát
MR	Mentální retardace
NMDA	*N*-metyl-*D*-aspartát
NTD	N- terminální doména
P_o	Pravděpodobnost otevření iontového kanálu (angl. Channel open probability)
PA-S	20-oxopregn-5β-an-3α-yl sulfát (pregnanolon sulfát)
PA-G	Pregnanolon glutamát
PAM	Pozitivní alosterické modulátory (angl. Positive allosteric modulators)
PBS	Fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)

PCP	Fencyklidin
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PE-S	20-oxopregn-5-en-3β-yl sulfát (pregnenolon sulfát)
QNZ46	(*E*)-4-(6-metoxy-2-(3-nitrostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)-benzoová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
SAR	Strukturně-aktivitní vztah (z ang. Structure-Activity Relationship)
SEM	Střední chyba průměru (z ang. Standard Error of Meaning)
TCN-201	3-chloro-4-fluoro-*N*-[(4-[(2-(fenylcarbonyl)hydrazino)-carbonyl]fenyl)metyl]-benzensulfonamid
τ_d	Rychlost nástupu desenzitizace
WS	Westův syndrom

1 ÚVOD

Objev úlohy glutamátu jako neuropřenašeče v centrální nervové soustavě (CNS) savců spadá do padesátých let minulého století, kdy prof. Hayashi pozoroval, že přímá aplikace L-glutamátu na psí nebo opičí mozek vyvolává konvulzivní stavy (Hayashi 1954). Avšak trvalo to dalších téměř 30 let, než byl glutamát uznán jako hlavní excitační přenašeč na většině synapsí v CNS (Watkins & Evans 1981). Přibližně ve stejné době pak byla naznačena existence specifických receptorů pro glutamát (Watkins et al 1981). Jedná se tzv. ionotropní glutamátové receptory, což jsou ligandem řízené iontové kanály, které se nacházejí v postsynaptické membráně neuronů. Po vazbě glutamátu dochází k otevření s nimi spřaženého iontového kanálu, kterým následně prochází ionty po spádu elektrochemického potenciálu, čímž dochází k depolarizaci postsynaptického neuronu a převodu chemického signálu na elektrický. Kromě ionotropních glutamátových receptorů se v CNS nacházejí také tzv. metabotropní glutamátové receptory, jež jsou spřažené s G-proteiny a spouští intracelulární signální kaskády (Monaghan et al 1989, Pin & Acher 2002, Sugiyama et al 1987).

V osmdesátých letech došlo k farmakologickému rozlišení jednotlivých podtypů ionotropních glutamátových receptorů pomocí selektivních agonistů na: *N*-metyl-*D*-aspartátový (NMDA), α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátový (AMPA) a kainátový podtyp (Watkins & Evans 1981). Začátkem devadesátých let pak techniky molekulární biologie umožnily naklonování genů pro podjednotky glutamátových receptorů (Hollmann & Heinemann 1994, Monyer et al 1992, Moriyoshi et al 1991, Sucher et al 1996), což vedlo k výraznému urychlení dalšího výzkumu, vedoucímu až k objasnění jejich molekulární struktury a topologie na základě krystralografie (Karakas & Furukawa 2014, Sobolevsky et al 2009).

V této dizertační práci se věnujeme účinku steroidů na NMDA podtyp ionotropních glutamátových receptorů, zejména pak vztahům mezi strukturou a aktivitou (SAR), což by mohlo pomoci při navrhování látek pro prevenci a/nebo léčbu onemocnění, u kterých se předpokládá narušení glutamátergního systému.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

NMDA receptory jsou exprimovány v neuronech i gliích, a prakticky všechny neuronální okruhy v CNS jsou závislé na excitaci zprostředkované NMDA receptory. Tento NMDA receptory zprostředkovaný excitační synaptický přenos má význam pro celou řadu fyziologických procesů, včetně učení a paměti (Collingridge 1987).

2.1 Struktura NMDA receptorů

Rodina NMDA receptorů je složena ze tří různých typů podjednotek, označovaných GluN1-3. Díky posttranskripčním úpravám RNA vzniká osm různých sestřihových variant GluN1 podjednotky, které se mezi sebou liší převážně v C-terminální části (Zukin & Bennett 1995). GluN2 a GluN3 podjednotky jsou kódovány čtyřmi, respektive dvěma různými geny, označovanými jako GluN2A-D a GluN3A-B (Monyer et al 1992).

GluN1 podjednotka se rovnoměrně exprimuje v rámci celé CNS v průběhu všech vývojových stádií. Naproti tomu, exprese GluN2A-D podjednotek se liší časově i prostorově, a to nejen v rámci různých oblastí mozku, ale i na buněčné úrovni v rámci různých funkčně-morfologických částí neuronu (synapticky a extrasynapticky). V raném vývoji převládají GluN2B a GluN2D podjednotky, zatímco exprese GluN2A a GluN2C podjednotek začíná až po narození. V dospělém mozku se převážně vyskytují GluN2A a GluN2B podjednotky, exprimované zejména v předním mozku, kdežto exprese GluN2C podjednotky je omezena na mozeček a GluN2D podjednotka se nachází pouze ve vybraných oblastech středního mozku (Akazawa et al 1994, Monyer et al 1994).

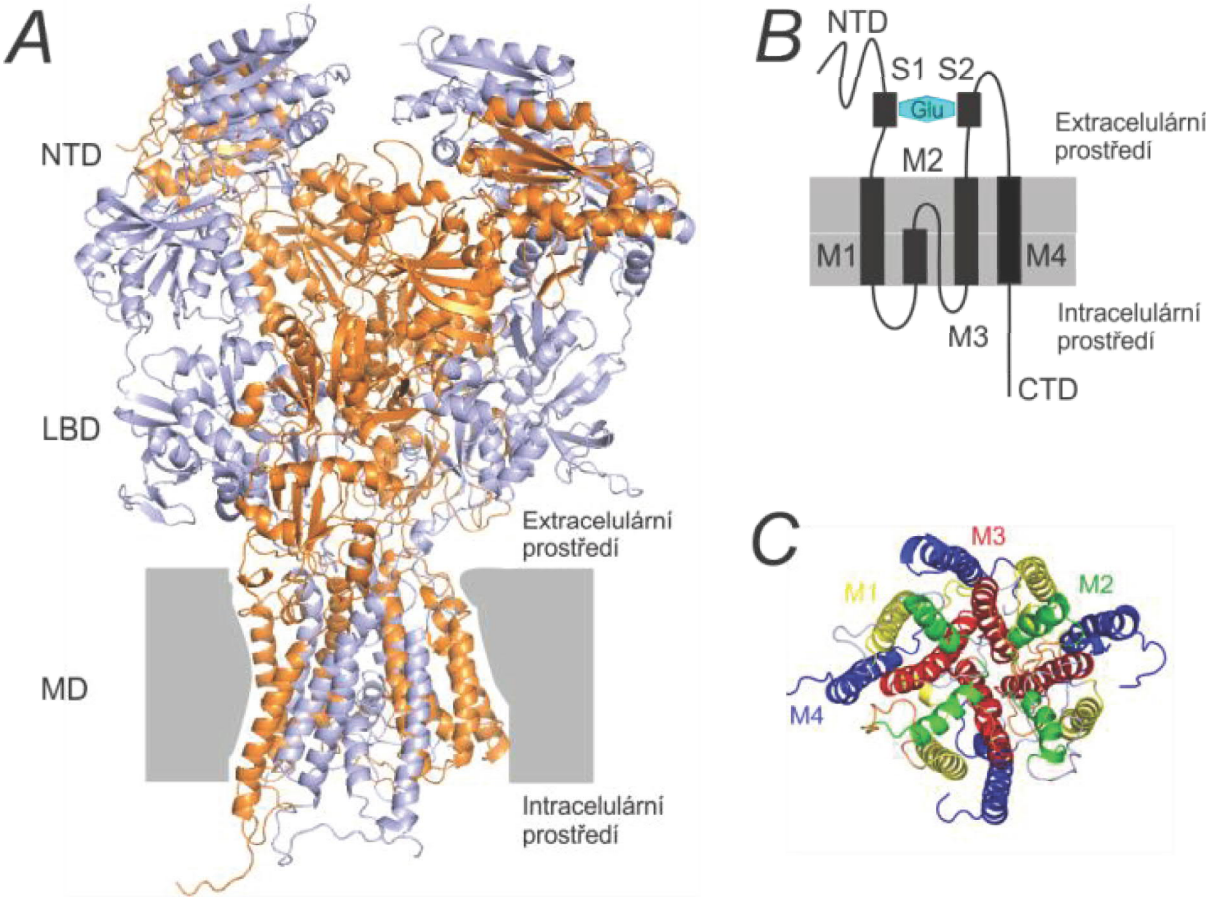
V souladu s překrývající se expresí různých GluN2 podjednotek v mnoha oblastech CNS, se vyskytují různorodé podtypy NMDA receptorů na úrovni odlišných neuronálních typů, v rámci jednotlivých neuronů, a dokonce i na konkrétních synapsích, vznikajících na stimulu závislým způsobem (Paoletti et al 2013). Na synapsích v dospělém předním mozku se vyskytují převážně diheteromerické GluN1/GluN2A receptory nebo triheteromerické GluN1/GluN2A/GluN2B receptory, ačkoliv jejich poměr se v závislosti na stimulu může výrazně měnit (Chazot & Stephenson 1997, Sheng et al 1994). Naproti tomu, peri- a extrasynaptické oblasti jsou obohaceny o GluN2B podjednotku (Tovar & Westbrook 1999), ačkoliv některé studie ukazují na rovnocennou distribuci GluN2B podjednotky v rámci synaptických a extrasynaptických oblastí (Harris & Pettit 2007).

Přítomnost různých sestřihových variant GluN1 podjednotky dále zvyšuje heterogenitu NMDA receptorových podtypů. Je však třeba zmínit, že molekulární složení NMDA receptorů se dynamicky mění v závislosti na senzorických zkušenostech a neuronální aktivitě, stejně tak při různých onemocněních, což má výrazný vliv na neuronální konektivitu (Lau & Zukin 2007, Paoletti et al 2013). Tato molekulární heterogenita se odrazí ve funkční rozmanitosti jednotlivých NMDA receptorových podtypů, neboť různé GluN2 podjednotky vykazují odlišné biofyzikální, farmakologické a signální vlastnosti (Paoletti 2011, Sanz-Clemente et al 2013).

2.1.1 Topologie podjednotek NMDA receptoru

Funkční NMDA receptory jsou heterotetramery (**Obr. 2.1*A***), složené ze dvou GluN1 podjednotek v kombinaci se dvěma GluN2 a/nebo GluN3 podjednotkami (Monyer et al 1992, Ulbrich & Isacoff 2008). NMDA receptory jsou uspořádány jako dimery dvou GluN1-GluN2/3 heterodimerů, s dvoučetnou symetrií procházející celou osou receptoru. Čtyři podjednotky zaujímají střídavé uspořádání 1-2-1-2, což je v souladu s předchozími strukturně-funkčními studiemi (Riou et al 2012, Salussolia et al 2011).

Všechny podjednotky sdílejí značnou úroveň sekvenční homologie a vykazují shodnou topologii s konzervovaným uspořádáním domén (**Obr. 2.1*B***). N-terminální doména (NTD) je propojena s extracelulárně orientovanou ligand-vázající doménou (LBD), která vytváří vazebná místa pro agonisty glutamát (na GluN2 podjednotce) a glycin (na GluN1 a GluN3 podjednotkách). LBD je dále propojena se čtyřmi membránovými doménami (MD), tvořícími iontový kanál receptoru, z nichž tři jsou transmembránové (M1, M3 a M4) a M2 doména tvoří v membráně intracelulárně orientovanou vratnou smyčku, jenž v rámci kompletního tetrameru tvoří selektivní pór iontového kanálu (**Obr. 2.1*C***). Na membránové domény navazuje intracelulární C-terminální doména (CTD), která komunikuje s vnitřním prostředím buňky (Traynelis et al 2010).



Obrázek 2.1. Struktura NMDA receptorů. **(*A*)** Vzájemné prostorové uspořádání podjednotek NMDA receptorů v rámci heterotetrameru (GluN1 podjednotka stříbrně, GluN2 podjednotka zlatě). **(*B*)** Schematické znázornění topologie podjednotek NMDA receptorů. NTD směřuje extracelulárně, CTD intracelulárně. S1 a S2 domény tvoří vazebné místo pro glycin (Gly) na GluN1 podjednotce a glutamát (Glu) na GluN2 podjednotce. Transmembránové domény (M1, M3, M4) a M2-smyčka, která vytváří iontový kanál, se nacházejí v cytoplazmatické membráně. **(*C*)** Molekulární struktura oblasti MD u GluN1/GluN2 heterotetrameru (pohled z intracelulární strany; M1- žlutě, M2 - zeleně, M3 - červeně a M4 - modře). Převzato a upraveno dle (Karakas & Furukawa 2014).

Nedávno byla objasněna kvarterní struktura NMDA receptoru, a sice krystalizací jeho GluN1/GluN2B podtypu (Karakas & Furukawa 2014, Lee et al 2014). Analýza odhalila, že v případě NTD, LBD a MD dochází k interakcím v rámci podjednotek i jednotlivých domén, které odlišují NMDA receptory od dalších členů rodiny glutamátových receptorů. Dále bylo ukázáno, že NTD a LBD jsou u NMDA receptorů mnohem kompaktněji sbaleny, než u AMPA/kainátových receptorů, což by mohlo vysvětlovat, proč je NTD zapojena do regulace aktivity iontového kanálu pouze v případě NMDA receptorů, avšak ne u AMPA/kainátových receptorů (Karakas & Furukawa 2014).

Na úrovni NTD vykazují jednotlivé podjednotky uspořádání s dvěma doménami (horní a spodní), jež mezi sebou svírají úhel 50°, což je poměrně neobvyklé pro tento typ škebli podobné (z angl. „clamshell-like“) struktury (Stroebel et al 2011). V důsledku toho dochází k vzájemné asociaci převážně horních domén v rámci GluN1-GluN2 NTD heterodimerů, a spodní domény jsou relativně volně pohyblivé. Na základě těchto strukturních odlišností hrají NTD klíčovou úlohu v alosterické regulaci aktivity NMDA receptorů, a mají zásadní význam pro funkční rozmanitost NMDA receptorů tím, že kontrolují některé biofyzikální parametry, jako například maximální pravděpodobnost otevření (P_o) iontového kanálu nebo deaktivační kinetiku NMDA receptoru (Gielen et al 2009, Yuan et al 2009). NTD je také hlavní oblast, zodpovědná za selektivní farmakologické ovlivnění jednotlivých NMDA receptorových podtypů prostřednictvím pozitivních i negativních alosterických modulátorů.

LBD se skládá ze dvou domén. Horní S1 doména tvoří těsný kontakt se sousední S1 doménou na rozhraní mezi dimery dvou LBD. Toto uspořádání udržuje obě S1 domény poměrně rigidní. Naproti tomu, spodní S2 domény jsou bez viditelného kontaktu v rámci dimerů, a jsou tedy relativně mobilní (Sobolevsky et al 2009). Pohyb S2 domén vyvolaný vazbou ligandu se okamžitě přenáší přes linkry na MD, tvořící iontový kanál receptoru, což vede k jeho otevření. Strukturní determinanty a flexibilita LBD-MD linkrů hraje významnou roli při regulaci vrátkování receptoru (Ladislav et al 2018).

Transmembránové M1, M3 a M4 domény jsou přímo propojeny s LBD, přičemž M2 a M3 domény jsou klíčové pro vrátkování receptoru. Pokusy založené na dostupnosti substituovaných cysteinů během otevírání kanálu odhalily značné přeuspořádání M3 domény během vrátkování receptoru (Sobolevsky et al 2002, Sobolevsky et al 2007). Toto přeuspořádání umožňuje přístup do centrální kavity iontového kanálu až k vlastnímu selektivnímu póru, tvořenému M2 doménami, který určuje základní vlastnosti kanálu, jako je propustnost pro ionty a jednotková vodivost. Na vrcholu M2 domény je kritické QRN místo, které primárně určuje propustnost pro Ca^{2+}. U všech GluN1 a GluN2 podjednotek je na této pozici asparagin, což vede k vysoké vodivosti pro Ca^{2+} - jedné z klíčových vlastností NMDA receptorů (Burnashev et al 1992). Funkce pre-M1, M1 a M4 domén není dosud plně objasněna. Výsledky studií s mutacemi v těchto oblastech ukazují, že tyto domény modulují různé stavy vrátkování receptoru (Ogden & Traynelis 2013, Villarroel et al 1998).

2.2 Aktivace NMDA receptorů

Aktivace NMDA receptorů složených z GluN1/GluN2 podjednotek vyžaduje dvě molekuly agonisty glutamátu (Clements & Westbrook 1991), spolu s dvěma molekulami koagonisty glycinu (Johnson & Ascher 1987, Kleckner & Dingledine 1988). Glycin se přirozeně vyskytuje v extracelulárním prostředí CNS (cerebrospinální mok obsahuje 4,2 ± 1,6 μM glycinu (Iijima et al 1978)). Vzhledem k tomu, že hodnota EC_{50} pro glycin u GluN1/GluN2 receptorů se pohybuje okolo 1 μM, většina vazebných míst je tak za přirozených podmínek obsazena. Nedávno byl také *D*-serin identifikován jako hlavní koagonista pro synaptické NMDA receptory, kdežto glycin je koagonistou na extracelulárních NMDA receptorech (Papouin et al 2012).

Glutamát je hlavním excitačním přenašečem v CNS a je uvolňován z presynaptických zakončení na glutamátergních synapsích. Časoprostorový profil extracelulární koncentrace glutamátu určuje specifické schéma aktivace NMDA receptoru. Synapticky uvolněný glutamát dosahuje při maximu koncentrace okolo 1 mM, a následně je ze synaptické štěrbiny rychle odstraňován prostřednictvím difuze a zpětného vychytávání, s časovou konstantou přibližně 1-2 ms (Clements et al 1992). Tato krátkodobá, přechodně zvýšená koncentrace glutamátu vede k fazické aktivaci NMDA receptorů, přispívající k normálnímu synaptickému přenosu.

Vysoce účinný systém zpětného vychytávání glutamátu udržuje za normálních okolností bazální hladiny extracelulárního glutamátu na nízké úrovni (v rozmezí nM) (Herman & Jahr 2007), což zabraňuje nadměrné aktivaci NMDA receptorů. Avšak za patologických podmínek dochází k narušení regulace výlevu/vychytávání glutamátu (Mattson 2003), což vede ke dlouhodobému zvýšení extracelulární koncentrace glutamátu, pravděpodobně dosahující μM hodnot (Heinrich et al 2012). Takto zvýšené hodnoty extracelulárního glutamátu způsobují tonickou aktivaci NMDA receptorů, vyvolávající excitotoxickou smrt neuronů.

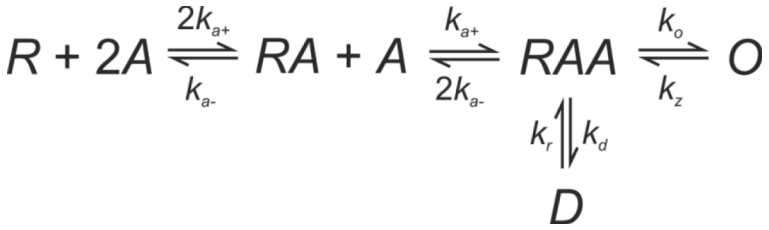
Po navázání glycinu a glutamátu se iontový kanál otevírá selektivně pro kationty, konkrétně pro Na^+, K^+ a Ca^{2+}. Extracelulární koncentrace Na^+ se typicky pohybuje okolo 150 mM, zatímco v případě Ca^{2+} je to pouhých 1-1,5 mM. Vzhledem k tomu, že relativní propustnost pro Ca^{2+} je u iontového kanálu NMDA receptoru desetkrát vyšší než pro Na^+ (Mayer & Westbrook 1987), značné množství Ca^{2+} pronikne do buňky. Intracelulární Ca^{2+} je klíčovou signální molekulou zapojenou do řady typů neuronální plasticity (Malenka & Nicoll

1999), avšak hraje také zásadní roli jako mediátor excitotoxické buněčné smrti v případě nadměrného vtoku Ca^{2+} do buňky (Choi 1987).

2.2.1 Kinetické schéma aktivace NMDA receptoru

Na **Obrázku 2.2** je znázorněno základní kinetické schéma aktivace NMDA receptoru, popisující vazbu agonisty (*A*) na receptor (*R*), stejně jako otevřený (*O*) a desenzitizovaný (*D*) stav receptoru. Pravděpodobnost obsazení jednotlivých stavů vyplývá z rychlosti přechodu mezi nimi a je určena koncentrací agonisty a rychlostními konstantami (*k*).

Stav NMDA receptoru se zavřeným iontovým kanálem, z něhož se receptor nemůže přímo otevřít, se označuje jako desenzitizovaný stav (*D*). Rychlostní konstanta resenzitizace (k_r) je pomalá, což vede k dlouhému nevodivému období mezi *RAA*-*O* přechody, které se makroskopicky projevuje postupným snížením amplitudy odpovědí v přítomnosti agonisty. Kromě desenzitizace může u NMDA receptorů docházet také k Ca^{2+}-závislé inaktivaci. Přechod do inaktivovaného stavu je vyvolán nadměrným vtokem Ca^{2+} přes aktivované NMDA receptory. Ve výsledku závisí rozsah této Ca^{2+}-závislé inaktivace na extracelulární koncentraci Ca^{2+} (Vyklicky 1993). Odpovědi NMDA receptorů mohou také vykazovat na glycinu závislou desenzitizaci, která je způsobena snížením afinity glycinu pro jeho vazebné místo, k níž dochází v důsledku vazby glutamátu na receptor (Benveniste et al 1990, Mayer et al 1989). Tento účinek je eliminován při saturujících koncentracích glycinu.



Obrázek 2.2 Kinetické schéma aktivace NMDA receptoru. Receptor (*R)* se muže nacházet buď ve stavu s jedním agonistou (*RA*), nebo se dvěma navázanými agonisty (*RAA*), z nichž následně přechází do otevřeného (*O*) nebo desenzitizovaného stavu (*D*); k_{a+} a k_{a-} – rychlostní konstanty vazby a odvazování agonisty, k_d a k_r – rychlostní konstanty desenzitizace a resenzitizace, k_o a k_z – rychlostní konstanty otevírání a zavírání iontového kanálu NMDA receptoru. Převzato a upraveno podle (Lester & Jahr 1992).

Ačkoliv je toto kinetické schéma postačující pro popis makroskopických odpovědí NMDA receptorů (aktivovaných buď fazicky, nebo tonicky), složitější situace nastává v případě jednotlivých kanálů ve vytržených terčících. Přestože byla analyzována celá řada

záznamů aktivity jednotlivých receptorů, jednotné kinetické schéma se dosud nepodařilo navrhnout. Bylo zjištěno, že otevření iontového kanálu nevychází přímo z *RAA* stavu, ale receptor spíše prochází 3 až 4 zavřeními a 1-2 otevřeními v průběhu *RAA* stavu (Banke & Traynelis 2003, Popescu & Auerbach 2003).

2.3 Fyziologická a patologická funkce NMDA receptorů

Zatímco AMPA receptory, a v menším rozsahu kainátové receptory, zprostředkovávají rychlý synaptický přenos, NMDA receptory působí jako detektory koincidence, což je dáno jejich unikátní napěťovou závislostí (kterou představuje přirozená blokáda iontového kanálu prostřednictvím Mg^{2+} při klidových hodnotách membránového potenciálu), pomalejší kinetikou a vysokou propustností pro Ca^{2+}. NMDA receptory se podílejí na vytváření dlouhodobých změn ve struktuře a funkci synapsí, čímž zprostředkovávají neuronální plasticitu a tvorbu paměťových stop (Paoletti et al 2013).

Exprese GluN2B podjednotky (kódované *GRIN2B* genem) v mozkové kůře převládá při rychlé synaptogenezi během pozdní embryogeneze a v raném postnatálním vývoji, a po narození začne hladina její exprese ve většině oblastí mozku klesat (Hall et al 2007). Několik studií ukazuje, že GluN2B podjednotka hraje důležitou roli při vývoji mozku, tvorbě neuronálních okruhů, diferenciaci a synaptické plasticitě (přehled viz (Cohen & Greenberg 2008)). Význam této podjednotky dokládá i neonatální letalita u *GRIN2B*-knockoutových myší (Kutsuwada et al 1996).

Dysfunkce NMDA receptorů hraje roli při celé řadě patologií CNS. Nedávné výsledky rozsáhlých genetických studií, zaměřených na sekevenování lidského genomu, odhalily výskyt několika kritických mutací v genech kódujících proteiny glutamátergního systému, jež byly nalezeny u pacientů, u nichž byla diagnostikována různá neuropsychiatrická onemocnění. Některé z mutací se nacházejí i v genech pro podjednotky NMDA receptorů. Gen kódující GluN2B podjednotku je nejčastěji *de novo* mutovaným *GRIN* genem při psychiatrických a neurovývojových poruchách. Naproti tomu, *de novo* mutace *GRIN1* a *GRIN2A* genů kódujících GluN1 a GluN2A podjednotky jsou méně časté, a je zajímavé, že v případě *GRIN2C/D, GRIN3A* a *GRIN3B* genů byly zaznamenány pouze vzácné zkracující mutace, které ovlivňují jak zdravé jedince, tak pacienty trpící neurovývojovými poruchami (Soto et al 2014, Tarabeux et al 2011). Tyto poznatky otvírají prostor pro vývoj cílené léčby

u pacientů se známým genetickým pozadím, se zaměřením na potlačení aktivity NMDA receptorů v případě nadměrné aktivace, a naopak k posílení aktivity v případě jejich hypofunkce.

2.3.1 Hyperfunkce NMDA receptorů

Za patologických podmínek dochází k tonické aktivaci extrasynaptických NMDA receptorů, která se podílí na vzniku excitotoxicity. Tento typ buněčné smrti neuronů je specificky závislý na vtoku Ca^{2+} prostřednictvím NMDA receptorů (Choi 1987) a podílí se na vzniku celé řady neuropatologických stavů (Parsons & Raymond 2014). Nadměrná aktivace NMDA receptorů se považuje jak za přispívající faktor, tak zároveň za terapeutický cíl při celé řadě akutních i chronických neurologických onemocnění, jako například při ischemii (Chen et al 2008), nebo Alzheimerově (Reisberg et al 2003), či Parkinsonově (Hallett & Standaert 2004) chorobě, epilepsii (Yuan et al 2015) a depresi (Berman et al 2000). Bylo zjištěno, že například v případě některých forem epilepsie se, kromě patologicky zvýšených hladin extracelulárního glutamátu, může na jejich vzniku podílet také hyperfunkce NMDA receptorů, zapříčiněna mutacemi v genech kódujících GluN2A a GluN2B podjednotky (Burnashev & Szepetowski 2015, DeVries & Patel 2013, Hu et al 2016, Lemke et al 2014, Mullier et al 2017, von Stulpnagel et al 2017).

Vzhledem k různým důsledkům tonické vs. fazické/synaptické signalizace existuje značný zájem o inhibitory NMDA receptorů, které by byly schopny selektivně blokovat tonicky aktivované NMDA receptory a zároveň by neovlivňovaly synaptické NMDA receptory, aktivované fazicky. Některé inhibitory NMDA receptorů vykazují slibné výsledky na modelech lidských neurodegenerativních onemocnění (Choi & Rothman 1990), avšak jejich širší využití je omezeno, neboť vyvolávají závažné vedlejší účinky typicky zahrnující psychomimetické příznaky, které jsou pravděpodobně způsobeny inhibicí normálního synaptického přenosu (Lipton 1993, Manahan-Vaughan et al 2008, Rogawski 1993, Rogawski & Wenk 2003).

2.3.2 Hypofunkce NMDA receptorů

V několika studiích bylo prokázáno, že rovněž nedostatečná funkce NMDA receptorů se podílí na rozvoji celé řady neuropsychiatrických onemocnění, jako například mentální retardace (MR) (Martin et al 2016), poruchy autistického spektra (ASD; z angl. Autism

Spectrum Disorders)(Carlson 2012) nebo schizofrenie (Coyle 2012, Olney et al 1999). Hypofunkce NMDA receptorů se předpokládá také u dalších neurologických poruch, jako je vývojové zpoždění (DD, z angl. Developmental Delay), fokální epilepsie (Gao et al 2017) a v menší míře hyperkinetická porucha (ADHD, z angl. Attention Deficit Hyperactivity Disorder; viz (Chang et al 2014)).

V rámci genetického vyšetření byly u pacientů s těmito poruchami nejčastěji identifikovány *de novo* mutantní varianty *GRIN2B* genu (přehled viz (Burnashev & Szepetowski 2015, Hu et al 2016, Soto et al 2014)). Na velkém kontrolním vzorku populace bylo zjištěno, že mutace se nachází v rámci celé kódující oblasti GluN2B podjednotky, avšak *de novo* mutace v LBD a MD se vyskytují pouze vzácně (Lek et al 2016). Z toho vyplývá, že mutace v oblasti LBD a MD pravděpodobně významně ovlivňují vlastnosti iontového kanálu NMDA receptoru, nezbytné pro jejich správnou funkci v CNS. Výsledky funkční analýzy u mutací v LBD, nalezených u pacientů, jsou v souladu s touto hypotézou (Adams et al 2014, Lemke et al 2014, Swanger et al 2016). V případě MD je však propojení mezi mutacemi a jejich důsledky pro funkci kanálu a/nebo povrchovou expresi NMDA receptoru mnohem méně objasněno.

Navzdory nedostatku účinných látek, které selektivně potencují NMDA receptory obsahující GluN2B podjednotku, existují důkazy podporující terapeutickou hodnotu takové látky. Například u transgenních „knock-in“ myší vede zvýšení exprese GluN2B podjednotky v předním mozku ke zlepšení učení a dlouhodobé paměti (White & Youngentob 2004).

2.4 Farmakologie NMDA receptorů

Na NMDA receptorech se vyskytuje celá řada míst schopných vázat extracelulární nízkomolekulární ligandy endogenního i exogenního původu, které mohou působit jako agonisté, koagonisté, antagonisté, či alosterické modulátory NMDA receptorů. Aktivita NMDA receptorů může být jejich prostřednictvím modulována jak negativně, tak pozitivně.

2.4.1 Antagonisté NMDA receptorů

Antagonisty NMDA receptorů lze rozdělit na základě jejich místa působení na − kompetitivní, které působí na vazebném místě pro agonisty, nekompetitivní, jenž působí na alosterickém modulačním místě, a blokátory otevřeného iontového kanálu, působící v póru v napěťovém poli membrány. Před třemi dekádami poskytl vývoj prvních kompetitivních

antagonistů a blokátorů otevřeného iontového kanálu klíčové poznatky ohledně funkce NMDA receptorů a navzdory řadě selhání v klinických studiích, z důvodu vedlejších účinků a krátkému terapeutickému oknu, si stále zachovávají určitý terapeutický potenciál (Kalia et al 2008).

Kompetitivní antagonisté se váží do stejného místa jako agonisté, avšak po jejich navázání nedochází k aktivaci receptoru. Jedním z prvních popsaných kompetitivních antagonistů glutamátového vazebného místa byl *D*-2-amino-5-fosfonovalerát (*D*-APV), který je vysoce selektivní pro NMDA receptory oproti AMPA a kainátovým receptorům (Davies et al 1981), avšak vykazuje nízkou selektivitu pro jednotlivé GluN2 podjednotky (Feng et al 2005). Mezi přirozené kompetitivní antagonisty glycinového vazebného místa patří kyselina kynurenová (KYNA), která se však váže také do glutamátového vazebného místa, i když s nižší afinitou. Jako selektivní antagonista glycinového vazebného místa pak působí její derivát, 5,7-dichlorokynureát (Leeson et al 1991).

2.4.1.1 Nekompetitivní antagonisté

Nekompetitivní antagonisté nepůsobí prostřednictvím vazebných míst pro agonisty, nýbrž se váží na jiné oblasti na receptoru, nejčastěji na NTD, případně v rámci MD, či CTD. Jedná se o nejslibnější kategorii látek, neboť je lze využít jednak jako farmakologické nástroje pro oddělení specifického příspěvku jednotlivých NMDA receptorových podtypů pro funkci CNS, a zároveň jako výchozí molekuly pro vývoj nových látek s případným terapeutickým využitím. Navíc, alosterická vazebná místa jsou mnohem méně konzervovaná, ve srovnání s vazebnými místy pro agonisty, případně s iontovým kanálem, což umožňuje vysokou selektivitu pro jednotlivé podjednotky NMDA receptorů (Mony et al 2009). V posledních letech bylo popsáno značné množství nových nekompetitivních antagonistů s různou selektivitou pro GluN2 podjednotky (viz **Obr. 2.3**).

2.4.1.1.1 Neurosteroidy

Steroidy jsou lipofilní tetracyklické látky odvozené od cyklopentanperhydrofenanthrenu, jenž v organismu vykonávají řadu fyziologických funkcí. Na začátku čtyřicátých let minulého století bylo zjištěno, že některé steroidy jsou schopny ovlivnit také excitabilitu neuronů (Selye 1941). Mechanismus tohoto účinku však zůstával dlouhou dobu neznámý. Teprve v osmdesátých letech byl prvně popsán vliv steroidů na ionotropní receptory

aktivované kyselinou γ-amino-máselnou ($GABA_A$ podtyp) (Harrison & Simmonds 1984) a následně byl odhalen i jejich účinek na ionotropních glutamátových receptorech (Wu et al 1991). Přibližně v téže době byla také pomocí molekulárně-biologických a biochemických technik v CNS prokázána přítomnost enzymů, zodpovědných za biosyntézu steroidních hormonů (Mellon & Deschepper 1993, Mensah-Nyagan et al 1999). Steroidy, produkované přímo nervovou tkání, byly označeny jako neurosteroidy (Corpechot et al 1981). Neurosteroidy vznikají *de novo* v gliových buňkách odštěpením postranního řetězce z cholesterolu (Baulieu 1998) a jsou schopny modulovat aktivitu NMDA receptorů jak negativně, tak pozitivně (Korinek et al 2011).

Endogenní neurosteroid pregnanolon sulfát (20-oxo-pregn-5β-an-3α-yl sulfát; **PA-S**; **Obr.2.3*A***) inhibuje aktivitu NMDA receptorů prostřednictvím snížení P_o iontového kanálu NMDA receptoru (Park-Chung et al 1994, Petrovic et al 2005). Další experimenty naznačily, že inhibiční působení **PA-S** souvisí s mechanismem, kdy po vazbě steroidu dochází ke zvýšení rychlostní konstanty přechodu receptoru do desenzitizovaného stavu, čím se snižuje poměr receptorů s iontovým kanálem v otevřené konformaci (Kussius et al 2009).

Pokusy zkoumající mechanismus účinku **PA-S** ukázaly, že působí tzv. akompetitivním způsobem (někdy též označovaným jako tzv. „use-dependentní“), což znamená, že je schopen se na receptor navázat až po jeho předchozí aktivaci prostřednictvím agonisty (Petrovic et al 2005). Účinek **PA-S** je napěťově-nezávislý (Park-Chung et al 1994, Petrovic et al 2005), což znamená, že působí ve stejném rozsahu na všech fyziologických hodnotách membránového potenciálu (Papouin et al 2012, Vyklicky et al 2015).

Experimenty zaměřené na význam strukturních determinant steroidů ukázaly, že pro inhibiční účinek je nezbytná přítomnost nabité skupiny na C3 u steroidního jádra, a dále prostorové uspořádání na chirálních uhlících C3 a C5 vedoucí k tomu, že molekula steroidu má lomený tvar (Borovska et al 2011, Park-Chung et al 1997, Rambousek et al 2011, Volgraf et al 2016, Wang et al 2017, Weaver et al 2000). Výsledky naší laboratoře naznačují, že kinetika vazby a odvazování inhibičního steroidu z receptoru je pomalá a není typická pro klasickou interakci receptoru s ligandem ve vodném prostředí. Tento závěr by podpořen pokusy s cyklodextriny (CDX), v nichž některé formy CDX urychlovaly kinetiku návratu z inhibice vyvolané steroidy (Borovska et al 2012). CDX jsou cyklické sloučeniny cukrů, které jsou schopné pojmout do své centrální kavity hydrofobní látky, jako například cholesterol vyvázaný z plazmatické membrány (Szejtli 1998, Yancey et al 1996). Dané

výsledky nepřímo naznačují význam membrány a membránových oblastí NMDA receptoru pro inhibiční působení steroidů.

V předchozích pokusech bylo zjištěno, že **PA-S** působí výhradně v případě, kdy je aplikován z extracelulární strany NMDA receptoru (Park-Chung et al 1997, Petrovic et al 2005). V naší nedávné studii jsme ukázali, že mutace v oblasti vysoce konzervovaného SYTANLAAF motivu v M3 doméně vedly k významnému snížení afinity receptoru pro **PA-S** (Vyklicky et al 2015). Extracelulární oblasti M3 domén u obou podjednotek tvoří vstupní vestibul iontového kanálu NMDA receptoru (Sobolevsky et al 2002). Vazebné místo pro **PA-S** se tedy nachází v extracelulárním vestibulu iontového kanálu, který je přístupný až po aktivaci NMDA receptoru prostřednictvím agonistů, což je v souladu s jeho akompetitivním mechanismem působení.

2.4.1.1.2 Ifenprodil

Prvním objeveným podjednotkově specifickým antagonistou NMDA receptorů byl ifenprodil, který představuje skupinu nekompetitivních, napěťově-nezávislých a „use-independentních“ inhibitorů NMDA receptorů (Legendre & Westbrook 1991). Ifenprodil inhibuje GluN1/GluN2B receptory s přibližně 200- až 400-krát vyšší afinitou než jiné podjednotkové kombinace GluN1/GluN2 receptorů (Williams 1993). Krystalografické studie odhalily, že vazebné místo pro ifenprodil a jeho derivát Ro25-6981 (viz **Obr. 2.3*B***) se nachází na rozhraní mezi NTD GluN1/GluN2B heterodimerů (Karakas et al 2011). Strukturní determinanty, zodpovědné za vysokou selektivitu ifenprodilu pro GluN1/GluN2B receptory, však musí být teprve odhaleny. Zajímavé je, že tyto determinanty pravděpodobně spočívají v odlišném upořádání GluN1-GluN2 NTD heterodimerů u receptorů obsahujících GluN2B anebo GluN2A podjednotku, spíše než v odlišnosti v rámci vazebné kapsy jako takové (Zhu et al 2014).

2.4.1.1.3 TCN-201

Z řady sulfonamidových derivátu, 3-chloro-4-fluoro-*N*-[(4-[(2-(fenylcarbonyl)hydrazino)-carbonyl]fenyl)metyl]-benzensulfonamid (TCN-201; viz **Obr. 2.3*C***) vykazoval přibližně 500-násobně vyšší selektivitou pro NMDA receptory obsahující GluN2A podjednotku, oproti GluN1/GluN2B receptorům (Bettini et al 2010). TCN-201 působí jako negativní alosterický modulátor vazby glycinu. Po vazbě TCN-201 dochází k urychlení disociace glycinu (zvýšené k_{a-}) z GluN1 podjednotky (Hansen et al 2012).

Nedávno odhalená krystalická struktura ukázala, že místo působení pro TCN-201 se nachází na rozhraní mezi dimery LBD u GluN1 a GluN2A podjednotek (Hackos et al 2016). Navzdory jejich omezené rozpustnosti se TCN-201 a odvozené sloučeniny ukázaly být užitečnými nástroji pro charakterizaci podjednotkového složení NMDA receptorů u kultivovaných neuronů (McKay et al 2012), kde je možné koncentraci koagonisty (glycinu nebo *D*-serinu) kontrolovat.

2.4.1.1.4 Quinazolinové deriváty (QNZ46)

Nedávno byla identifikována nová skupina látek selektivních pro GluN2C a GluN2D podjednotky (přibližně 50-násobný rozdíl v selektivitě mezi GluN2D a GluN2A podjednotkami). (*E*)-4-(6-metoxy-2-(3-nitrostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)-benzoová kyselina (QNZ46; **Obr. 2.3*D***) inhibuje aktivitu NMDA receptorů nekompetitivním, napěťově-nezávislým způsobem (Mosley et al 2010). Avšak mechanismus účinku QNZ46 je neobvyklý tím, že jeho inhibiční působení je akompetitivní a vyžaduje přítomnost glutamátu, což pro alosterické modulátory NMDA receptorů není typické (Hansen & Traynelis 2011). Po vazbě glutamátu dochází k přibližně 20-násobnému snížení hodnoty IC_{50} pro QNZ46, což značí, že vazebné místo pro inhibitor je přístupné až po vazbě glutamátu a že dochází k narušení otevření kanálu zvýšením energetické bariéry pro přechod ze zavřeného do otevřeného stavu receptoru.

2.4.1.2 Blokátory otevřeného iontového kanálu

Některá disociativní anestetika (např. fencyklidin (PCP) nebo ketamin), stejně jako široce užívaný inhibitor dizocilpin maleát (MK-801), působí jako účinné blokátory otevřeného iontového kanálu NMDA receptoru (Lodge & Anis 1982, Lodge et al 1982, Wong et al 1986). Blokáda iontového kanálu je akompetitivní (Rogawski 1993), podobně jako v případě neurosteroidů, avšak na rozdíl od nich je napěťově závislá (Woodhull 1973). Z tohoto důvodu je odvazování z inhibice, vyvolané blokátory otevřeného iontového kanálu, pomalé a zvyšuje se s P_o iontového kanálu.

V případě blokády otevřeného iontového kanálu rozlišujeme dva mechanismy − tzv. „trapping“ a „foot-in-the-door“ blokátory. „Trapping“ blokátory, mezi něž patří například Mg^{2+}, mají menší rozměry a váží se hluboko v rámci póru iontového kanálu. Během jejich působení může tedy dojít k uzavření kanálu a následnému odvázání agonisty, zatímco blokátor zůstává zachycen uvnitř iontového kanálu, dokud není receptor opětovně aktivován

saturující koncentrací agonisty (jejich odvazování je tzv. „use-dependentní“) (Blanpied et al 1997). „Trapping“ mechanismem působí celá řada dalších blokátorů, včetně MK-801, ketaminu, PCP, amantadinu a memantinu (Palmer 2001). Termínem „foot-in-the-door“ jsou označovány blokátory, jež jsou rozměrově větší, a nemohou se tedy vázat uvnitř iontového kanálu tak hluboko. Tyto blokátory při navázání fyzicky brání uzavření kanálu a následnému uvolnění agonisty z vazebného místa na LBD, z toho důvodu je jejich odvazování „use-independentní“ (Johnson & Kotermanski 2006). Několik blokátorů, například 9-aminoakridin či tetrapentylamonium, působí jako „foot-in-the-door“ typ blokátoru (Bolshakov et al 2003, Sobolevskii & Khodorov 2002, Sobolevsky et al 1999).

Až na několik výjimek je však farmakologické využití blokátorů otevřeného iontového kanálu omezené, vzhledem k jejich výrazným psychomimetickým účinkům (Kalia et al 2008). Další problém představuje napěťově-závislé působení blokátorů, díky němuž se postupně snižuje jejich inhibiční působení na NMDA receptorech u dlouhodobě depolarizovaných buněk, k čemuž dochází v důsledku tonicky zvýšených hladin extracelulárního glutamátu.

2.4.1.2.1 Hořčík

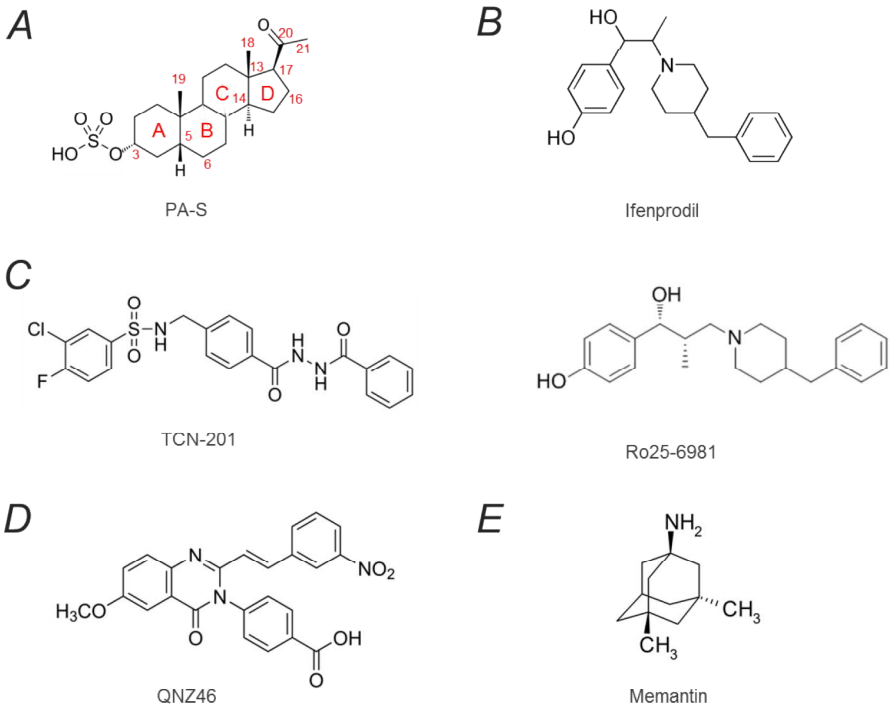
Mezi nejvýznamnější endogenní blokátory otevřeného kanálu NMDA receptorů patří Mg^{2+}. Za klidových podmínek jsou NMDA receptory blokovány fyziologickou koncentrací Mg^{2+} (přibližně 1 mM) napěťově-závislým způsobem a při depolarizaci buňky, vyvolané aktivací AMPA/kainátových receptorů v důsledku synaptického výlevu glutamátu, je tento blok uvolněn (Evans et al 1977, Mayer et al 1984, Nowak et al 1984). Z fyziologického hlediska hraje tato blokáda významnou roli, neboť k vyvolání depolarizace, dostatečné pro odstranění Mg^{2+} bloku, může dojít až při aktivaci dostatečného počtu AMPA/kainátových receptorů v krátkém časovém rozmezí, díky čemuž NMDA receptory fungují jako koincidenční detektory (Huganir & Nicoll 2013, Traynelis et al 2010).

Kromě Mg^{2+} jsou také další mono- a divalentní ionty schopné za fyziologických i patologických podmínek modulovat funkci NMDA receptorů, včetně H^{+} (Vyklicky et al 1990), Zn^{2+} (Mayer & Vyklicky 1989), či Ca^{2+} (Rosenmund et al 1995a). Tyto ionty však na rozdíl od Mg^{2+} působí napěťově-nezávislým způsobem prostřednictvím alosterických vazebných míst (pro přehled viz (Traynelis et al 2010)). Bylo rovněž ukázáno, že koncentrace H^{+} významně ovlivňuje účinek některých dalších modulátorů na NMDA receptorech (např. polyaminů, Zn^{2+}, ifenprodilu, či neurosteroidů), který se mění v závislosti na hodnotě extracelulárního pH (Dingledine et al 1999, Jang et al 2004).

2.4.1.2.2 Memantin

Memantin (viz **Obr.2.3*E***) je nízkoafinitní blokátor otevřeného iontového kanálu NMDA receptoru, jež se v současnosti využívá pro léčbu Alzheimerovy choroby. Je klinicky lépe tolerován, pravděpodobně z důvodu jeho rychlé disociace po deaktivaci receptoru, což vede k minimálnímu narušení normálního synaptického přenosu (Lipton 2005). Předpokládá se, že memantin bude preferenčně inhibovat tonicky aktivované extrasynaptické NMDA receptory, s více než dvojnásobným rozdílem v hodnotách IC_{50} (Xia et al 2010), avšak jiné studie udávají méně výrazný rozdíl (Emnett et al 2013).

Oblast iontového kanálu NMDA receptoru je vysoce konzervovaná v rámci různých podjednotkových typů, což je pravděpodobně důvod pro nízkou podjednotkovou selektivitu u různých blokátorů otevřeného iontového kanálu (Dravid et al 2007). Avšak bylo ukázáno, že fyziologická hladina Mg^{2+} přibližně 20-násobně snižuje inhibici vyvolanou memantinem u receptorů obsahujících GluN2A a GluN2B podjednotky, takže selektivita pro GluN1/GluN2C a GluN1/GluN2D receptory se přibližně 10-násobně zvyšuje (Kotermanski & Johnson 2009).



Obrázek 2.3. Struktury inhibitorů NMDA receptorů. Chemické struktury **(*A*) PA-S**, **(*B*)** ifenprodilu a jeho strukturního analogu Ro25-6981, **(*C*)** TCN-201, **(*D*)** QNZ46 a **(*E*)** memantinu.

2.4.2 Pozitivní alosterické modulátory

Pozitivní alosterické modulátory (PAM) zvyšují aktivitu NMDA receptorů, avšak nejsou schopny přímo aktivovat receptor bez přítomnosti agonisty a jejich vazebné místo je odlišné od místa pro glutamát a glycin. Díky tomu se lze v případě PAM potenciálně vyhnout toxicitě spojené s aplikací kompetitivních agonistů, neboť zachovávají přirozené schéma a časování agonistou vyvolané aktivace receptoru, zatímco stále potencují jeho funkci.

PAM mohou buď zvyšovat maximální odpověď, nebo afinitu k agonistům, či mohou mít smíšený efekt na aktivitu NMDA receptorů. Klíčovou vlastností PAM zvyšujících afinitu k agonistům je, že neovlivňují funkci receptorů při saturujících koncentracích agonisty. Naproti tomu, PAM, jež zvyšují maximální odpověď receptoru, jsou schopny potencovat aktivitu do stejné míry při všech koncentracích agonisty. Avšak výše popsané účinky jsou odvozeny z makroskopických změn v analýze vlivu dávky na potenciaci agonistou vyvolaných proudů a nemusí nutně odrážet změny ve specifických parametrech kinetiky aktivace a deaktivace receptoru (Hackos & Hanson 2017).

V poslední době byla identifikována celá řada PAM, selektivních pro jednotlivá podjednotková složení NMDA receptorů. Tyto PAM představují strukturně rozdílné skupiny látek (viz **Obr. 2.4**).

2.4.2.1 Neurosteroidy

Pregnenolon sulfát (20-oxo-pregn-5-en-3β-yl sulfát; **PE-S**; **Obr.2.4*A***) je v CNS hojně se vyskytující neurosteroid, který specificky potencuje aktivitu NMDA receptorů (Wu et al 1991). Z výzkumu, objasňujícího molekulární mechanismus potenciačního účinku **PE-S**, vyplývá, že tento neurosteroid působí prostřednictvím zvýšení P_o iontového kanálu NMDA receptoru a zvyšuje účinnost glutamátu, plynoucí z přechodu iontového kanálu do otevřeného stavu (Horak et al 2006, Horak et al 2004). **PE-S** vykazuje mnohem vyšší afinitu pro klidové, než aktivované receptory, což naznačuje negativní alosterické spojení vazebných míst pro **PE-S** a glutamát, kdy po aktivaci receptoru dochází k snížení účinnosti potenciace pomocí **PE-S** – tzv. „disuse-dependentní“ mechanismus působení (Horak et al 2004).

Potenciační účinek **PE-S** je podjednotkově specifický, kdy **PE-S** převážně potencuje receptory obsahující GluN2A a GluN2B podjednotku a inhibuje proudy vyvolané GluN1/GluN2C-D receptory (Ceccon et al 2001, Horak et al 2006, Horak et al 2004, Malayev et al 2002). Potenciační účinek **PE-S** byl prokázán také u GluN1/GluN2C a GluN1/GluN2D

receptorů, avšak míra potenciace vyvolaná **PE-S** je u nich přibližně 4-násobně nižší než u GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů, a je obvykle maskována jejich výraznější inhibicí (Horak et al 2006). Kinetika odvazování **PE-S** z potenciačního místa je pomalejší, než kinetika odvazování **PE-S** z inhibičního vazebného místa, a potenciace se tedy u GluN1/GluN2C-D receptorů objevuje jako pozdní nárůst odpovědi po ukončení aplikace steroidu (Horak et al 2004). Na rozdíl od potenciačního působení **PE-S**, jeho inhibiční účinek je nezávislý na aktivaci NMDA receptorů (Horak et al 2006).

Studie, zkoumající strukturní determinanty významné pro potenciační účinek **PE-S** na NMDA receptorech ukázaly, že sulfátová skupina na C3 je důležitá pro svůj záporný náboj, neboť jí lze nahradit hemiskucinátem, nikoliv však metylesterem, aniž by došlo ke ztrátě potenciačního působení na NMDA receptorech (Park-Chung et al 1997). Ohledně geometrie steroidního jádra je pro potenciační účinek rozhodující planární tvar molekuly **PE-S** (Weaver et al 2000). Význam dalších strukturních determinant **PE-S** důležitých pro jeho potenciační účinek, stejně jako vazebné místo na NMDA receptoru, zůstávají zatím neobjasněné.

2.4.3.2 Cholesterol a Oxysteroly

Cholesterol (**Obr. 2.4*B***) je jednou z hlavních složek plazmatické membrány v savčích buňkách, kde tvoří přibližně 10-45% všech lipidových molekul (Yeagle 1985). Výsledky našich experimentů ukazují, že nejen neurosteroidy, ale také samotný cholesterol je účinným endogenním modulátorem NMDA receptorů. Pomocí manipulace s obsahem cholesterolu v membráně granulárních mozečkových neuronů bylo ukázáno, že deplece cholesterolu v buňce vede u NMDA receptorů k výraznému snížení proudových odpovědí (v důsledku snížení P_o) a ke zvýšení desenzitizace, které je důsledkem zvýšení rychlostní konstanty přechodu receptoru do desenzitizovaného stavu. Naopak obohacení o cholesterol má na odpovědi NMDA receptorů potenciační vliv. Tento účinek je specifický pro NMDA receptory v rámci rodiny ionotropních glutamátových receptorů, neboť amplitudy odpovědí AMPA/kainátových receptorů nebyly manipulací s cholesterolem ovlivněny (Korinek et al 2015).

Kromě cholesterolu jsou další skupinou PAM působících na NMDA receptorech jeho oxysterolové deriváty (**Obr. 2.4*B***). 24*(S)*-hydroxycholesterol (24*(S)*-HC) je nejhojnějším metabolitem cholesterolu v CNS. V případě 24*(S)*-HC, stejně jako jeho syntetických derivátů

SGE201 a SGE301, se ukázalo, že působí jako neselektivní PAM pro GluN2 podjednotky NMDA receptorů (Paul et al 2013). 24*(S)*-HC a SGE201 (**Obr. 2.4*B***) účinně potencují proudy NMDA receptorů při saturujících hladinách glutamátu a glycinu, bez vlivu na účinnost glutamátu, či rychlost deaktivace receptoru (Linsenbardt et al 2014). Působení oxysterolů se zdá být v souladu s předpokladem, že je nejprve třeba jejich rozpuštění v plazmatické membráně, což by naznačovalo potenciální vazebné místo v rámci MD na NMDA receptoru (Linsenbardt et al 2014).

2.4.3.5 GNE modulátory

V nedávné době byla popsána série nových PAM selektivních pro GluN2A podjednotku, jež obsahují thiazolo-pyrimidinovou kostru (Volgraf et al 2016). Další snahy o vylepšení SAR vlastností vedly k identifikaci sloučenin GNE-6091 a GNE-8324 (**Obr. 2.4*C***), které přibližně dvojnásobně potencují aktivitu GluN1/GluN2A receptorů. Je zajímavé, že nepatrná strukturní modifikace vede ke vzniku látek s odlišným mechanismem působení. GNE-6091 působí jako PAM, který pouze minimálně ovlivňuje hodnotu EC_{50} pro glutamát a deaktivaci receptoru. Naproti tomu, GNE-8324 významně zvyšuje účinnost glutamátu, stejně jako signifikantně zpomaluje deaktivační kinetiku (Hackos et al 2016). Z krystalografické analýzy vyplývá, že GNE-6091 se váže v rámci LBD na rozhraní GluN1 a GluN2B podjednotky (Hackos et al 2016). Látky GNE-6091 a GNE-8324 se váží do stejného místa na LBD, akorát v odlišné orientaci.

V nedávné studii byly identifikovány aminokyseliny v pre-M1 oblasti a M3 doméně na GluN1 podjednotce, které jsou významné pro potenciační účinek GNE-9278 (**Obr. 2.4*C***), avšak pravděpodobně se spíše podílí na zprostředkování signálu, nežli na přímé vazbě GNE-9278 (Wang et al 2017). Bylo ukázáno, že vazba GNE-9278 se významně zvyšuje po aktivaci receptoru, což značí, že buď je vazebné místo přístupné akompetitivním způsobem, nebo že se při aktivovaném stavu zvyšuje afinita receptoru pro GNE-9278. Tyto výsledky nastiňují novou možnost pro vývoj PAM cílených na oblast MD u NMDA receptoru, jež vykazují unikátní mechanismus působení, vázaný na funkční stav receptoru.

2.4.3.3 Spermin/Polyaminy

Některé endogenní látky, jako například polyaminy, kromě svého inhibičního působení napěťově-závislým mechanismem, typickým pro blokátory otevřeného iontového kanálu,

mohou také aktivitu NMDA receptorů potencovat (Benveniste & Mayer 1993). Potenciační účinek sperminu (**Obr. 2.4*D*)**, je specifický pro receptory obsahující GluN2B podjednotku, což z něj činí GluN2B-selektivní PAM. Spermin potencuje aktivitu GluN1/GluN2B receptorů snížením citlivosti receptoru vůči tonické inhibici vyvolané protony při fyziologickém pH (Traynelis et al 1995). Spermin také přibližně trojnásobně snižuje hodnotu EC_{50} pro glycin, bez vlivu na EC_{50} pro glutamát (Benveniste & Mayer 1993).

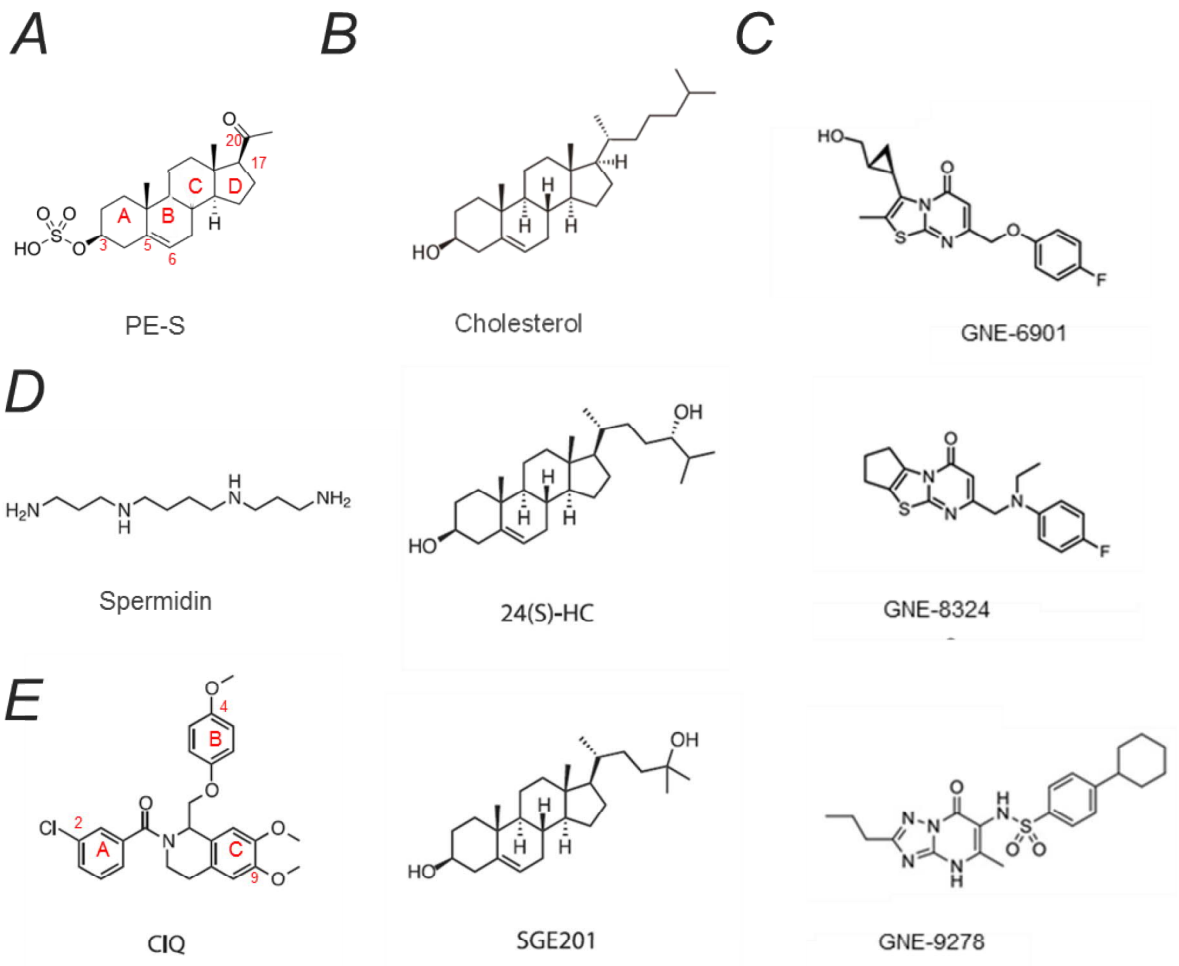
Studie vztahů mezi strukturou a aktivitou (SAR), porovnávající účinek di-, tri- a tetraminů, ukázala, že lineární tetraaminy jsou nejvíce účinnými pozitivními modulátory NMDA receptorů (Williams et al 1991). Ze SAR studie, v níž byla testována série N-terminálně dialkylovaných tetraaminů, vyplývá, že potenciační efekt polyaminů se projevuje při nízkých koncentracích a (*i*) je účinnější v případě primárních aminů (spermin), než N-terminálně alkylovaných polyaminů, (*ii*) závisí na délce polyaminové kostry a (*iii*) negativně koreluje s velikostí N-terminální alkylové skupiny (Bergeron et al 1995).

2.4.3.4 Tetrahydroisoquinoliny (CIQ)

(3-chlorofenyl)(6,7-dimethoxy-1-((4-metoxyfenoxy)metyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)methanon (CIQ; **Obr. 2.4*E***) představuje další skupinu PAM, identifikovanou prostřednictvím rozsáhlé studie zahrnující 100 000 látek, zaměřenou na selektivní PAM pro NMDA receptory obsahující GluN2C nebo GluN2D podjednotky (Mullasseril et al 2010). Nejvíce účinné analogy mají hodnoty EC_{50} v submikromolárním rozmezí a poskytují přibližně dvojnásobnou potenciaci maximální odpovědi GluN1/GluN2D receptorů. CIQ zvyšuje frekvenci otevírání kanálu NMDA receptoru (snížením průměrné doby zavření kanálu), aniž by měl vliv na EC_{50} pro glycin, či glutamát.

Ze SAR studie (Santangelo Freel et al 2013), zaměřené na odhalení strukturních determinant významných pro potenciační účinek CIQ, vyplývá, že přítomnost B-kruhu, spolu s dvouatomovým etherovým spojovacím úsekem mezi B- a C-kruhem, je nezbytná pro potenciační účinek CIQ (**Obr. 2.4*E***) na GluN1/GluN2C/D receptorech. Pro potenciační působení je také nutná přítomnost amidu na spojnici mezi C- a A-kruhem. Při zkoumání vlivu substituentů na C-kruhu bylo zjištěno, že v případě nejúčinnějšího analogu s O-benzylovým substituentem na pozici C9, došlo až k desetinásobnému snížení hodnoty EC_{50} oproti CIQ (z 3 μM na 300 nM), což značí, že v dané oblasti vazebná kapsa poskytuje prostor pro další modifikace, vedoucí ke zvýšení účinnosti potenciace.

Náhradou dimethylových skupin na C-kruhu za jednu isopropylovou skupinu je možno zacílit CIQ analogy na GluN2B podjednotku (Strong et al 2017). Další dvě záměny pak vedou k výrazné selektivitě těchto analogů pro GluN2B podjednotky, a sice náhrada O-methylového substituentu v pozici C4 na B-kruhu za O-etyl, spolu s fluorem v pozici C2 na A-kruhu. Tyto látky však vykazují pouze mírnou účinnost (EC_{50} = 7,2 µM).



Obrázek 2.4. Struktury PAM. Chemické struktury **(*A*) PE-S**, **(*B*)** cholesterolu, 24*(S)*-HC a syntetického analogu SGE201, **(*C*)** GNE-6091, GNE-8324 a GNE-9278, **(*D*)** spermidinu a **(*E*)** CIQ.

3 CÍLE PRÁCE

3.1 Význam strukturních determinant pregnanových derivátů pro preferenční inhibici tonicky oproti fazicky aktivovaným NMDA receptorům

3.1.1 Hypotéza

NMDA receptory mohou být aktivovány buď fazicky, pomocí synapticky uvolňovaného glutamátu, anebo tonicky, prostřednictvím extracelulárního glutamátu, zvýšeného za patologických podmínek. Kinetické simulace naznačují, že na základě odlišného mechanismu účinku inhibitorů NMDA receptorů lze očekávat jejich rozdílné působení na fazicky a tonicky aktivované receptory. Sloučeniny, jako je **PA-S**, s akompetitivním a napěťově-nezávislým mechanismem inhibice a se schopností se z receptoru kdykoliv odvázat, pravděpodobně přednostně inhibují tonicky oproti fazicky aktivovaným NMDA receptorům, a proto mohou mít žádoucí terapeutický profil (Vyklicky et al 2014).

3.1.2 Cíl

Cílem této studie bylo za použití elektrofyziologických technik porovnat účinek **PA-S** a jeho strukturních analogů na tonicky a fazicky aktivované NMDA receptory.

3.2 Charakterizace strukturních determinant PA-S analogů významných pro jejich inhibiční působení na NMDA receptorech

3.2.1 Hypotéza

Skupina na C3 u steroidní molekuly má význam jakožto nositel náboje, neboť její odstranění vede u steroidů ke ztrátě jejich inhibičního působení na NMDA receptorech (Park-Chung et al 1994). U hemiesterových zbytků na C3 předpokládáme, že by v organismu mohlo docházet k jejich hydrolýze prostřednictvím esteráz. To nás vedlo k navržení nové skupiny látek nesoucích záporně nabitý amidový zbytek na C3. U tohoto isosterického nahrazení esterového kyslíku za dusíkový atom jsme očekávali, že v případě nových analogů dojde ke zlepšení účinnosti, případně rozpustnosti, usnadnění propustnosti a snížení metabolické zátěže, zatímco zůstanou zachovány strukturní vlastnosti nezbytné pro jejich inhibiční působení na NMDA receptorech.

Acetylová skupina na C17 u D-kruhu steroidního jádra je další výrazná strukturní determinanta na molekule **PA-S**, avšak její význam pro inhibiční působení steroidů na NMDA receptorech nebyl dosud objasněn. Testovali jsme proto hypotézu, zda modifikace acetylového zbytku bude mít vliv na modulaci funkce NMDA receptorů, a dále, zda při odstranění celého D-kruhu zůstanou zachovány inhibiční vlastnosti těchto neuroaktivních sloučenin.

3.2.2 Cíl

Cílem naší práce bylo pomocí elektrofyziologických snímání objasnit vliv strukturních modifikací na pozicích C3, C17 a C20 a význam D-kruhu u syntetických analogů **PA-S** pro jejich inhibiční účinek na NMDA receptorech.

3.3 Funkční a farmakologické vlastnosti mutantních forem lidského typu NMDA receptorů

3.3.1 Hypotéza

Vývoj nové generace DNA sekvenování poskytl jedinečná data, která umožnila propojit konkrétní varianty *GRIN1* a *GRIN2* genů, nalezených u pacientů, s neurologickými a psychiatrickými poruchami, jimiž trpí. Zatímco seznam vzácných variant se rychle rozšiřuje, jejich důsledky pro fyziologii receptorů, jejich strukturu, funkci a farmakologii, byly dosud jen částečně objasněny (Fedele et al 2018, Chen et al 2017, Ogden et al 2017, Platzer et al 2017, Swanger et al 2016, Yuan et al 2014).

3.3.2 Cíl

Naším cílem bylo za použití molekulárně biologických, imunofluorescenčních a elektrofyziologických technik objasnit důsledky 9 vzácných mutací v MD u lidského typu GluN2B podjednotky, nalezených u pacientů s neurologickými poruchami, s ohledem na funkční vlastnosti a povrchovou expresi mutovaných NMDA receptorů. Navíc jsme testovali vliv steroidů s potenciačním účinkem jako možný farmakologický nástroj pro nápravu poškozené funkce u mutovaných NMDA receptorů.

3.4 SAR studie pro C3-hemiesterové analogy neurosteroidů s potenciačním účinkem na NMDA receptorech

3.4.1 Hypotéza

Záporně nabitá skupina v β-pozici na C3 v kombinaci s Δ^5-stereochemií (dvojná vazba mezi C5 a C6) jsou strukturní determinanty nezbytné pro potenciační působení steroidů na NMDA receptorech (Park-Chung et al 1997, Weaver et al 2000). V případě endogenního **PE-S** byl již *in vivo* při systematickém podání u myší prokázán povzbuzující účinek na paměť a učení (Flood et al 1992). Účinnost **PE-S** pro potenciaci odpovědí NMDA receptorů však není příliš vysoká, což nás vedlo k navržení a testování nových strukturních analogů **PE-S**. Vzhledem k tomu, že SAR pro účinek PAM na bázi steroidů v případě NMDA receptorů nejsou dosud plně objasněny, je třeba jejich rozsáhlejší charakterizace, zejména v kontextu vývoje nových látek pro prevenci a/nebo léčbu některých neuropsychiatrických onemocnění, spojených s hypofunkcí NMDA receptorů (Swanger et al 2016, Vyklicky et al 2018).

3.4.2 Cíl

Pomocí elektrofyziologických technik objasnit vliv různé délky substituentu na C3 a různých modifikací na C17 u **PE-S** analogů na jejich potenciační účinek na NMDA receptorech.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie a roztoky

Použité chemikálie, pokud není uvedeno jinak, byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Všechny použité steroidní látky byly syntetizovány na oddělení Steroidních inhibitorů na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (Praha, Česká republika) a jejich čistota byla opakovaně kontrolována pomocí nukleární magnetické rezonance, tenkovrstevné chromatografie a elementární analýzy. Pro přípravu veškerých roztoků byla použita deionizovaná voda, přečištěná pomocí přístroje Simplicity 185 (Millipore, Billerica, USA). Roztoky byly sterilizovány pomocí filtrace (filtr s velikostí pórů 0,22 μm, Millipore, Billerica, USA) a skladovány při teplotě 4 °C (aplikační roztoky po rozdělení na menší alikvoty při -20 °C).

4.1.1 Agarové plotny

Pro přípravu agarových ploten jsme rozpustili 40 g/l Nutrient agaru N°2 (Biolife, Milano, Itálie) ve vodě a následně roztok sterilizovali 15 min v autoklávu při 121 °C. Poté byl agar ochlazen na 50 °C, a bezprostředně před rozlitím do Petriho misek jsme do něj přidali antibiotikum pro selekci transformovaných bakterií.

4.1.2 LB médium

LB medium pro kultivaci bakterií obsahovalo: 1% pepton (Serva, Heidelberg, Německo), 0,5% kvasnicový extrakt (Serva) a 1% NaCl; rozpuštěno ve vodě a sterilizováno (15 min, 121 °C).

4.1.3 Fosfátový pufr (PBS)

PBS pro oplachování buněk obsahoval: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na_2HPO_4 a 1,5mM KH_2PO_4; pH upraveno na 7,3 pomocí NaOH.

4.1.4 Versenův roztok

Versenův roztok obsahoval 0,2% trypsin a 0,02% etylendiamin-*N,N,N′,N′*-tetraoctovou kyselinu (EDTA), rozpuštěné v PBS; pH = 7,3, upraveno pomocí NaOH.

4.1.5 Transfekční kultivační média

HEK293 buňky - Médium Opti-MEM (Life Technologies, Waltham, USA) bylo doplněno o 5% fetální telecí sérum (FTS, PAN Biotech, Aidenbach, Německo) a inhibitory NMDA receptorů (aby se snížil podíl buněk ohrožených po expresi NMDA receptorů buněčnou smrtí): 1mM *D*-APV, 3mM KYNA, 4,2μM ketamin a 20mM $MgCl_2$.

COS-7 buňky – Eagleovo minimální esenciální médium (EMEM, Life Technologies) bylo obohaceno o 5% FTS, 1mM *D*-APV, 4,2μM ketamin, 20mM $MgCl_2$, 3mM KYNA a antibiotikum (100 μg penicilinu a 100 μg streptomycinu/1 ml média).

4.1.6 Intracelulární roztok (ICS)

ICS používaný pro elektrofyziologická snímání z NMDA receptorů obsahoval: 120mM Cs-glukonát, 15mM CsCl, 10mM 1,2-bis(2-aminofenoxy)etan-*N,N,N′,N′*-tetraoctovou kyselinu (BAPTA), 10mM *N*-2-hydroxyetylpiperazin-*N´*-2-etansulfonovou kyselinu (HEPES), 1mM $CaCl_2$, 3mM $MgCl_2$, 2mM adenosintrifosfát (ATP; Mg^{2+} sůl); pH bylo pomocí CsOH upraveno na hodnotu 7,2 a výsledná osmolarita roztoku byla 290 mOsm/l.

4.1.7 Extracelulární promývací roztok (EPS)

EPS používaný na promývání buněk mezi jednotlivými elektrofyziologickými snímáními obsahoval: 160mM NaCl, 2,5mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 2mM $CaCl_2$, 10mM glukózu a 10mM HEPES; pH bylo upraveno na 7,3 pomocí NaOH a výsledná osmolarita EPS byla 320 mOsm/l.

4.1.8 Extracelulární aplikační roztok (ECS)

ECS používaný pro elektrofyziologická snímání z NMDA receptorů obsahoval: 160mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM glukózu, 10mM HEPES, 0,7mM $CaCl_2$ a 0,2mM EDTA; pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,3 a výsledná osmolarita ECS byla 320 mOsm/l.

ECS jsme v den měření ohřáli ve vodní lázni na 50 °C, přidali jsme agonisty NMDA receptorů, glycin a glutamát (pokud není uvedeno jinak, standardně jsme použili koncentraci: 10 μM glycinu a 1 mM, případně 1 μM glutamátu), a dále jsme z čerstvě namíchaných 5mM nebo 20mM zásobních roztoků přidali steroidní látky rozpuštěné v dimethylsulfoxidu (DMSO). Stejné množství DMSO (1 %), které jsme přidali do roztoků obsahujících steroid, jsme přidali i do kontrolních roztoků. V některých případech bylo nutné pro úplné rozpuštění steroidních látek zásobní a aplikační roztoky krátce sonikovat při 50 °C (Sonorex Digitec DT 100/H, Badelin electronic, Berlín, Německo).

4.2 cDNA konstrukty

Pro účely transfekce jsme použili následující cDNA konstrukty:

GluN1-1a (GenBank accession no. U08261; (Hollmann et al 1993)) v pcDNA I/AMP vektoru (dar od Dr.G. Westbrooka, Vollum institute)

GluN2A (GenBank accession no. D13211; (Ishii et al 1993)) v RK7 vektoru

GluN2B (GenBank accession no. M91562; (Monyer et al 1992)) v RK7 vektoru (dar od dr. S. Vinciniho, Georgetown University School of Medicine)

GluN2C (GenBank accession no.M91563; (Monyer et al 1992)) v RK7 vektoru

GluN2D (GenBank accession no.L31611; (Kohr et al 1994)) v RK7 vektoru

hGluN1 (GenBank accession no. NP_015566; (Hedegaard et al 2012)) v pCI-Neo vektoru (dar od Prof. S. Traynelise, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA)

YFP-hGluN1 (Lidská verze cDNA kódující GluN1-1a podjednotku značenou žlutým fluorescenčním proteinem (YFP), byla generována pomocí cílené mutageneze z YFP-značené potkaní varianty GluN1-1a podjednotky a konstrukt byl ověřen DNA sekvenováním, dar od Mgr. Kristýny Skřenkové)

hGluN2B (GenBank accession no. NP_000825; (Hedegaard et al 2012)) v pCI-Neo vektoru (dar od dr. S. Traynelise)

eGFP - Zelený fluorescenční protein (GFP) v pQBI 25 vektoru (Takara Bio Inc., Tokyo, Japonsko)

4.2.1 Cílená mutageneze

Bodové mutace jsme vnášeli do genů kódujících nemutované formy podjednotek NMDA receptorů za pomocí navržených komplementárních primerů, syntetizovaných na zakázku u firmy Sigma-Aldrich, metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) v Termo-cycleru (Eppendorf, Hamburg, Německo). Všechny potřebné chemikálie byly součástí QuikChange II XL Site-Directed mutagenesis kitu (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Po skončení PCR reakce byla templátová DNA naštěpena pomocí enzymu DpnI (1 h při 37 °C). Poté jsme použili ultrakompetentní bakterie *E.Coli* XL10-Gold z výše uvedeného kitu, které jsme transformovali 5 µl PCR produktu metodou teplotního šoku (1 h inkubace na ledu, 42 s při 45 °C, a poté opět 2 min na ledu). Transformované bakterie jsme přidali k 0,5 ml LB média bez antibiotika a na 1 h umístili na třepačku (200 rpm, 37 °C). Tuto bakteriální směs jsme nanesli na Petriho misky s agarem, obohaceným o ampicilin (100 µg/ml), a ponechali přes noc v inkubátoru při 37 °C. Narostlé monokolonie jsme zaočkovali do LB média s ampicilinem (100 µg/ml) a nechali za stálého třepání (200 rpm) kultivovat 16-20 h při

37 °C. Z těchto bakteriálních kultur jsme následně izolovali plazmidovou cDNA pomocí High-Speed Plasmid Mini Kitu (Geneaid, New Taipei City, Taiwan) dle návodu poskytnutého výrobcem a za použití centrifugy (Hettich Instruments, Tuttlingen, Germany). Koncentraci získané cDNA jsme stanovili spektrofotometricky na přístroji Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) a správnost mutantních konstruktů byla ověřena sekvenací (SEQme, Dobříš, Česká republika).

4.3 Buněčné kultury a transfekce

Pro expresi rekombinantních NMDA receptorů byly použity buněčné linie lidských embryonálních ledvinných (HEK293; z angl. Human Embryonic Kidney) buněk (ATCC, USA) a buňky ledvinných fibroblastů z Africké zelené opice (COS-7).

HEK293 buňky − Buňky byly kultivovány v Opti-MEM médiu obohaceném o 5% FTS v inkubátoru SANYO MCO-18AIC (SANYO E&E Europe BV) při teplotě 37 °C a v atmosféře 5% CO_2. Za účelem transfekce byly buňky nasazeny na 24-jamkové kultivační destičky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko; 0,5 ml kultivačního média na jamku) pokryté kolagenem (SERVA, Heidelberg, Německo), v hustotě $2x10^5$ buněk/cm^2, aby v den transfekce dosahovaly 80-90% konfluence.

HEK293 buňky pro elektrofyziologická měření jsme transfekovali pomocí činidla MATra-A Reagent a silného neodymového magnetu (IBA GmbH, Göttingen, Německo). Při přípravě transfekční směsi jsme do 50 µl kultivačního média Opti-MEM přidali 0,9 µl MATra-A činidla a cDNA o celkovém množství 0,9 µg (0,3 µg cDNA kódující jednotlivé podjednotky NMDA receptoru, spolu s cDNA kódující eGFP, sloužící k identifikaci úspěšně transfekovaných buněk). Tuto směs jsme inkubovali při pokojové teplotě a po 20 min přidali k buňkám na jamce. Kultivační destičku jsme následně na 15 min umístili na magnetickou podložku do inkubátoru. Po transfekci jsme buňky opláchli pomoci PBS a přidali 200 µl Versenova roztoku pro uvolnění buněk od podložky. Poté jsme HEK293 buňky nasadili do transfekčního kultivačního média na plastové kultivační misky (ϕ 35 mm), jež na svém dně obsahovaly krycí sklíčka (ϕ 24 mm), pokrytá kolagenem a poly-*L*-lysinem za účelem zvýšení přilnavosti buněk k podložce. Pro elektrofyziologická měření byly buňky použity 24-48 h po transfekci.

COS-7 buňky − Buňky byly pěstovány v inkubátoru při 37 °C a 5% CO_2 v EMEM obohaceném o 10% FTS, 22mM KCl, gentamycin (2 mg/100 ml; Life Technologies), 2mM

L-glutamin (Life Technologies) a 2% neuronální suplement B27 (Life Technologies).

Den před transfekcí byly COS-7 buňky nasazeny na 12-jamkové destičky s vloženými krycími sklíčky pokrytými poly-*L*-lysinem. Před začátkem transfekce jsme EMEM vyměnili za ohřátý Opti-MEM (1 ml/jamka). Buňky (COS-7 nebo HEK293) pro imunocytochemické značení jsme transfekovali pomocí Lipofectaminu ™ 2000 (Life Technologies). Do jedné mikrozkumavky jsme smíchali 150 µl Opti-MEMu spolu s 4 µl Lipofectaminu a do druhé jsme k 150 µl Opti-MEMu přidali celkové množství 1,8 µg cDNA (v případě kotransfekce bylo použito stejné množství (0,9 µg) cDNA kódující YFP-hGluN1 a hGluN2B podjednotky). Tyto transfekční směsi byly nejprve při pokojové teplotě inkubovány odděleně po dobu 5 min a následně pečlivě promíchány a inkubovány dalších 20 min při pokojové teplotě. Poté jsme transfekční směs přidali k buňkám na destičce a umístili je na 5 h do inkubátoru (37 °C a 5% CO_2). Po 5 h byla transfekční směs nahrazena za transfekční kultivační médium na COS-7 (nebo HEK293) buňky (2 ml/jamka). Imunofluorescenční značení jsme prováděli 22-24 h po ukončení transfekce.

4.4 Imunofluorescenční mikroskopie

Povrchovou expresi NMDA receptorů jsme v COS-7 a HEK293 buňkách studovali za použití imunocytochemického značení pomocí protilátek. Roztoky i buňky byly v průběhu značení udržovány na ledu, abychom zabránili internalizaci značených receptorů. Sklíčka s transfekovanými COS-7 nebo HEK293 buňkami jsme umístili na plastovou destičku pokrytou parafilmem. Buňky jsme nejprve omyli v PBS, a poté po dobu 10 min inkubovali v blokovacím roztoku obsahujícím PBS a 0,2% hovězí sérový albumin (BSA, MB Biomedicals, CA, USA). Po tomto blokovacím kroku jsme buňky označili pomocí primární protilátky (králičí anti-GFP, Merck Millipore, Burlington, MA, USA, 1: 1000) a následně sekundární protilátky (kozí anti-králičí Alexa Fluor® 555, Life technologies, 1: 1000). Protilátky byly zředěny v blokovacím roztoku a buňky byly inkubovány s každou protilátkou (200 µl/sklíčko) po dobu 30 min. Mezi primární a sekundární protilátkou jsme buňky dvakrát po 2 min omyli blokovacím roztokem. Po imunocytochemickém značení jsme buňky třikrát po 2 min promyli v PBS, následně po dobu 20 min fixovali v 4% paraformaldehydu v PBS a umístili na podložní sklíčka, kde jsme je k podložce připevnili pomocí zalévacího ProLong Antifade činidla (Life Technologies). Podložní sklíčka s buňkami jsme uchovávali v lednici.

Mikroskopické snímky jsme pořídili pomocí systému CellR (Olympus, Tokyo,

Japonsko), skládajícího se z digitální kamery Hamamatsu Orca ER (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japonsko), invertovaného mikroskopu IX81 (Olympus), monochromátoru Polychrome V (Till Photonics, Gräfelfing, Německo) a adaptéru DualView (Optical Insights, NM, USA) pro zobrazení poměru ve dvou různých vlnových délkách. Jednotlivé optické řezy byly snímány podél Z-osy ve vzdálenosti 0,1 μm. Značené NMDA receptory byly vizualizovány prostřednictvím excitace zeleného fluorescenčního signálu při vlnové délce 475 ± 10 nm (emise při vlnových délkách >510 nm) a excitace červeného fluorescenčního signálu při vlnové délce 555 ± 10 nm (emise při vlnových délkách >570 nm).

4.5 Metoda terčíkového zámku a rychlý aplikační systém

Pro měření proudových odpovědí NMDA receptorů, exprimovaných v HEK293 buňkách, jsme využili metodu terčíkového zámku („patch clamp technique“) v konfiguraci snímání z celé buňky („whole-cell patch clamp“). Elektrické proudy byly snímány pomocí zesilovače Axopatch 200B (Molecular Devices, CA, USA) v režimu napěťového zámku, v němž je membránový potenciál prostřednictvím zpětnovazebné regulace udržován na konstantní úrovni (Hamill et al 1981). Pomocí osmipólového Besselova filtru byly z analogového signálu odfiltrovány frekvence vyšší než 2 kHz, a záznamy byly dále digitalizovány vzorkovací frekvencí 5 kHz za použití A/D převodníku Digidata 1322A (Molecular Devices) a uschovány na pevném disku počítače pomocí programu pClamp verze 10.5 (Molecular Devices). Ke snímání jsme použili skleněné mikropipety o vnějším průměru 1,5 mm a vnitřním průměru 0,86 mm, které jsme získali vytažením z borosilikátových kapilár (BioMedical Instruments, Zöllnitz, Německo) za použití horizontálního tahače P-1000 (Sutter Instrument, Novato, USA). Po naplnění mikropipet pomocí ICS se hodnoty odporu pohybovaly v rozmezí 3-5 MΩ. Jak referenční elektrodu, tak elektrodu zajišťující elektrický kontakt mezi intracelulárním prostředím a zesilovačem, tvořila Ag/AgCl elektroda. Elektrické propojení mezi referenční elektrodou a miskou, v níž byly umístěny snímané buňky, bylo zajištěno pomocí solného agarového můstku. Přesné umístění snímací pipety do těsné blízkosti buňky bylo zajištěno pomocí mikromanipulátoru MP-225 (Sutter Instrument). Veškeré pokusy jsme prováděli při pokojové teplotě (23-25°C) a buňky jsme udržovali na membránovém potenciálu -60 mV. Chyby vzniklé sériovým odporem (< 10 MΩ) byly u všech buněk kompenzovány z 80-90 %. Z důvodu odstínění vibrací a elektromagnetického ruchu byla aparatura, obsahující invertovaný mikroskop Olympus CKX41 (Olympus), umístěna na antivibrační stůl TMC (Technical Manufacturing Co., Peabody, USA) a uzavřena do Faradayovy klece.

Pro aplikaci kontrolních a pokusných roztoků byl využit rychlý aplikační systém (viz. **Obr. 4.1**), vyvinutý v naší laboratoři, který umožňuje opakovanou aplikaci až deseti různých roztoků, s časovou konstantou výměny roztoků v okolí snímané buňky pod 10 ms (Vyklicky et al 1990). Pomocí mikroprocesorové řídící jednotky lze u daného systému přesně kontrolovat délku aplikace a vytvářet sekvenci časové posloupnosti aplikace jednotlivých roztoků v okolí snímaných buněk (Dittert et al 2006, Vyklicky et al 1990).

Obrázek 4.1. Rychlý aplikační systém. **(*A*)** Uspořádání elektrofyziologického snímání. Posuv aplikačních trubiček, zajištěný krokovým motorkem (vlevo), a snímací elektroda (vpravo) jsou v rámci aparatury umístěny naproti sobě a svírají s rovinou stolu úhel 45°. **(*B*)** Detail aplikačních trubiček se čtvercovým průměrem, vyrobených z borosilikátového skla.

4.6 Analýza a statistické zpracování dat

4.6.1. Povrchová exprese

Intenzita povrchového a celkového fluorescenčního signálu byla analyzována pomocí programu ImageJ (NIH, MD, USA). Hodnoty intenzit celkového a povrchového fluorescenčního signálu z NMDA receptorů jsme získali z vybraných oblastí značených buněk, od nichž byla následně odečtena hodnota intenzity pozadí, čímž došlo k normalizaci dat a umožnilo se porovnání průměrných hodnot v rámci jednotlivých experimentů. Pro jednotlivé varianty NMDA receptorů jsme analyzovali hodnoty intenzit pro nejméně 15 COS-7 buněk ve třech nezávislých pokusech.

4.6.2. Elektrofyziologická snímání

Naměřená data jsme analyzovali pomocí programu Clampfit 10.5, který je součástí pClamp 10.5 (Molecular Devices), a statisticky zpracovávali pomocí programů Sigma Plot 10 a Sigma Stat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, USA). Model receptoru byl zobrazen a upraven pomocí programu PyMol.

Pro určení relativní míry inhibice *I* (%) jsme požili následující vzorec:

$$I = \frac{(I_{ss} - I_i)}{I_{ss}} \times 100 \quad \text{(R1)},$$

kde I_{ss} je hodnota proudové odpovědi v ustáleném stavu při aplikaci agonisty a I_i je míra proudové odpovědi během koaplikace steroidu s agonistou (**Obr. 4.2*A***).

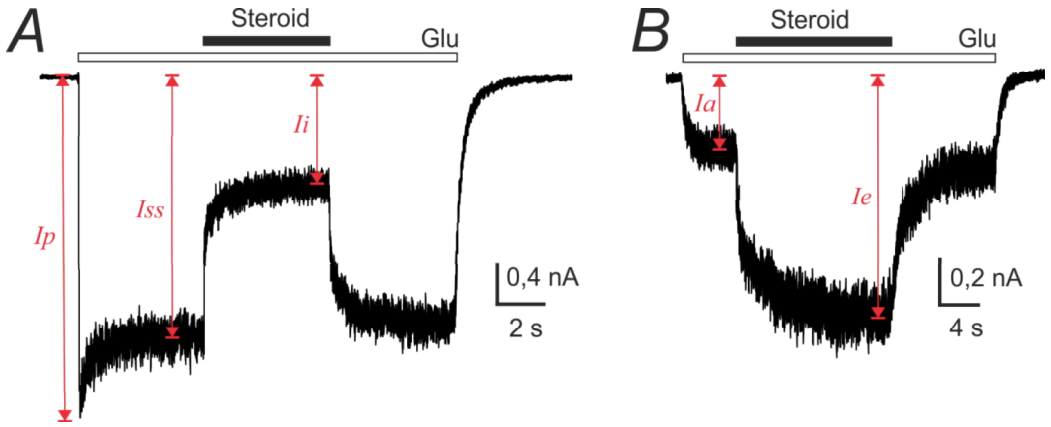
Koncentrace, při které látka vyvolává 50% inhibici agonistou vyvolaného proudu, je označena jako IC_{50}. Míra inhibice (I) glutamátových odpovědí, zaznamenaná v přítomnosti minimálně 5 různých dávek steroidu lišících se koncentrací v rozmezí dvou řádů, byla určena pro jednotlivé buňky a hodnota IC_{50} byla stanovena proložením dat následující logistickou rovnicí:

$$I = 100 / \left(1 + \left(\frac{IC_{50}}{[\text{steroid}]}\right)^h\right) \quad \text{(R2)},$$

nebo z jedné koncentrace steroidu použitím vzorce:

$$IC_{50} = [\text{steroid}] \times \sqrt[h]{\frac{100 - I}{I}} \quad \text{(R3)},$$

kde I je relativní míra inhibice v %, [steroid] označuje použitou koncentraci steroidu a h je zdánlivý Hillův koeficient. Hillův koeficient byl při určování hodnoty IC_{50} z jedné koncentrace steroidu pro inhibici odpovědí v ustáleném stavu fixován na hodnotě 1,2 (Petrovic et al 2005) a v případě maximálních odpovědí na hodnotě 1,0 (Vyklicky et al 2016). Hodnota IC_{50}, určená z jedné koncentrace, byla stanovena vždy minimálně pro 2 koncentrace daného steroidu, lišící se 2-násobně v rozmezí řádu. Při výpočtu hodnoty IC_{50} jsme předpokládali 100% míru inhibice při saturující koncentraci steroidu.



Obrázek 4.2. Analýza (***A***) inhibičního a (***B***) potenciačního účinku steroidů na NMDA receptorech. (***A***) I_p označuje maximální proudovou odpověď při aplikaci agonisty v saturující koncentraci, I_{ss} odpovídá ustálenému stavu proudové odpovědi po nástupu desenzitizace a I_i

vyjadřuje ustálený stav proudové odpovědi po nástupu inhibice, vyvolané koaplikací agonisty a steroidu s inhibičním působením. **(*B*)** I_a označuje proudovou odpověď při aplikaci agonisty v 1 μM koncentraci a I_e odpovídá proudové odpovědi v ustáleném stavu po nástupu potenciace, vyvolané koaplikací agonisty spolu se steroidem s potenciačním účinkem.

Pro určení relativní míry potenciace (E) v % jsme použili následující výpočet:

$$E = \frac{(I_e - I_a)}{I_a} \times 100 \qquad \text{(R4)},$$

kde I_e je míra proudové odpovědi během koaplikace steroidu s agonistou a I_a je hodnota proudové odpovědi při aplikaci agonisty (viz **Obr. 4.2*B***).

Míra potenciace (E) glutamátových odpovědí, zaznamenaných v přítomnosti minimálně 5 různých dávek steroidu lišících se koncentrací v rozmezí dvou řádů, byla stanovena pro jednotlivé buňky a data byla proložena následující logistickou funkcí:

$$E = \mathrm{E_{max}} / \left(1 + \left(\frac{\mathrm{EC_{50}}}{[\mathrm{steroid}]}\right)^h\right) \qquad \text{(R5)},$$

kde E_{max} je maximální hodnota potenciace, EC_{50} je koncentrace steroidu, která produkuje polovinu maximální hodnoty potenciace agonistou vyvolaného proudu, [steroid] je koncentrace sloučeniny a h je zdánlivý Hillův koeficient.

V případě stanovení vlivu dávky na účinek agonistů (glycinu a glutamátu) jsme použili následující logistickou rovnici:

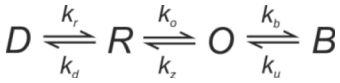
$$A = 1 / \left(1 + \left(\frac{\mathrm{EC_{50}}}{[\mathrm{agonista}]}\right)^h\right) \qquad \text{(R6)},$$

kde A je relativní hodnota proudové odpovědi na aplikaci agonisty, EC_{50} je hodnota koncentrace vyvolávající 50% aktivaci receptoru, [agonista] je koncentrace agonisty a h je zdánlivý Hillův koeficient.

4.6.3. Pravděpodobnost otevření

Pravděpodobnost otevření (P_o) iontového kanálu NMDA receptoru byla stanovena z kinetiky nástupu blokády (B) prostřednictvím MK-801 (1 μM) u odpovědí vyvolaných 1mM glutamátem. Data byla proložena kinetickým modelem za použití programu Gepasi (verze 3.21) (Mendes 1993, Mendes 1997, Mendes & Kell 1998). V kinetickém modelu nebyly zahrnuty kroky vazby agonisty, neboť v přítomnosti 1mM glutamátu se NMDA receptory

s vysokou pravděpodobností (>99.6%) nacházejí pouze ve stavu se dvěma navázanými agonisty s iontovým kanálem buď zavřeným (*R*), nebo otevřeným (*O*) a/nebo v desenzitizovaném stavu (*D*).



(R7)

Proces proložení dat kinetickým modelem se skládá ze dvou kroků (Turecek et al 2004). V prvním kroku jsme analyzovali odpovědi na 1mM glutamát vyvolané v HEK293 buňkách exprimujících nemutované a mutované NMDA receptory. U odpovědí jsme analyzovali proud v ustáleném stavu (I_{ss}) a proud v maximu (I_p). Rychlost nástupu desenzitizace (τ_d) jsme určili proložením dat jedno-exponenciální funkcí v programu Clampfit 10.5 za využití Levenberg-Marquardtova algoritmu. Hodnoty relativní míry desenzitizace (*D*) a rychlostních konstant popisujících nástup desenzitizace (k_d) a resenzitizace (k_r) byly určeny pomocí následujících rovnic (8-10):

$$D = 1 - (I_{SS}/I_P) \tag{R8}$$

$$k_d = D/\tau_d \tag{R9}$$

$$k_r = (1 - D)/\tau_d \tag{R10}$$

Ve druhém kroku byly rychlostní konstanty k_d a k_r fixovány na hodnotách získaných z prvního kroku a rychlostní konstanta zavření kanálu (k_z) na nahodilé hodnotě 200 s^{-1}. Odpověď NMDA receptorů, snímanou v přítomnosti 1mM glutamátu a 1μM MK-801, jsme proložili kinetickým modelem, kde rychlostní konstanta otevření (k_o) byla ponechána jako volný parametr. Rychlostní konstanta nástupu blokády MK-801 (k_b) byla stanovena na 25 μM^{-1} s^{-1}, dle (Huettner & Bean 1988, Jahr 1992, Rosenmund et al 1995b). Vazba MK-801 byla v průběhu času prakticky ireverzibilní pro nemutované i mutované receptory. Pravděpodobnost otevření (P_o) jsme vypočítali dle vzorce:

$$P_o = 100 \times k_o/(k_o + k_z) \tag{R11}$$

Prezentované výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± střední chyba průměru (SEM) z počtu *n* buněk. Pokud není uvedeno jinak, ke statistickému porovnání jednotlivých skupin dat byl použit nepárový Studentův t-test a Jednofaktorová („One-way“) ANOVA, s hladinou významnosti $P < 0{,}05$ nebo $P \leq 0{,}001$.

5 VÝSLEDKY

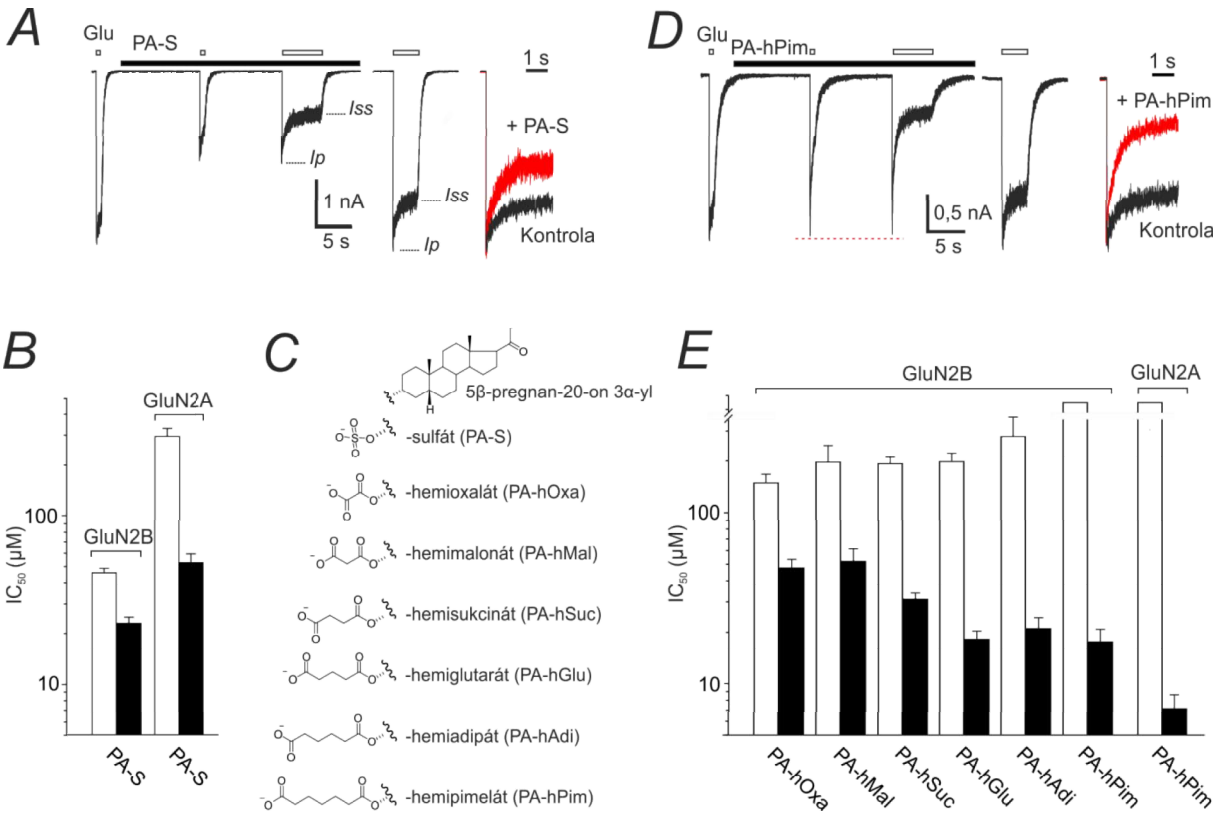
5.1 Význam strukturních determinant preganových derivátů pro preferenční inhibici tonicky oproti fazicky aktivovaným NMDA receptorům

V této části dizertační práce bylo našim cílem prozkoumat účinek **PA-S** a jeho C3-hemiesterových analogů na tonicky a fazicky aktivované rekombinantní NMDA receptory. Uvedené výsledky jsou součástí publikace uveřejněné v časopise *Journal of neuroscience* (Vyklicky et al 2016).

Nejprve jsme testovali účinek **PA-S** na rekombinantních GluN1/GluN2B receptorech exprimovaných v HEK293 buňkách a aktivovaných rychlou aplikací 1mM glutamátu. **Obrázek 5.1.1*A*** znázorňuje pokus, v němž jsme porovnávali schopnost 50μM **PA-S** inhibovat maximální (fazickou) odpověď, vyvolanou rychlou aplikací 1mM glutamátu (rychlost výměny roztoku v okolí buněk ~ 10 ms), oproti odpovědi při ustáleném stavu, následující po 5s aplikaci glutamátu. Výsledky ukazují (**Obr. 5.1.1*B***), že **PA-S** inhibuje odpovědi GluN1/GluN2B receptorů v ustáleném stavu přibližně 2-krát účinněji (IC_{50} = 23 ± 2 μM, n = 4), než maximální proudy (IC_{50} = 46 ± 3 μM, n = 4; párový Studentův t-test, P < 0,001). Zkoumali jsme rovněž účinek **PA-S** na rekombinantních GluN1/GluN2A receptorech, u nichž jsme pozorovali ještě výraznější, a sice přibližně 6-násobnou selektivitu **PA-S** pro inhibici odpovědí v ustáleném stavu (IC_{50} = 53 ± 7 μM, n = 6) oproti odpovědím v maximu (IC_{50} = 296 ± 34 μM, n = 6**;** párový Studentův t-test, P < 0,001; **Obr. 5.1.1*B***).

S cílem identifikovat nové steroidní inhibitory NMDA receptorů, u nichž by se dále zvýšila preference pro tonicky aktivované receptory, jsme navrhli a syntetizovali sérii 20-oxo-5β-pregnanů, substituovaných v α-pozici na C3 karboxylovými kyselinami s různě dlouhým uhlíkovým řetězcem (**Obr. 5.1.1*C***). Testovali jsme schopnost těchto látek inhibovat odpovědi GluN1/GluN2B receptorů při maximu a v ustáleném stavu. Odpovědi na 1mM glutamát v ustáleném stavu byly pomocí **PA-hPim** (30 μM) inhibovány z 66,18 ± 4,43 %, zatímco maximální odpověď nebyla **PA-hPim** prakticky ovlivněna (+0,02 ± 1,76 %, n = 8; **Obr. 5.1.1*D***). Inhibiční účinek **PA-hPim** byl plně reverzibilní v rámci několika sekund po odmytí steroidu a míra inhibice maxima vyvolaná **PA-hPim** byla stejná pro první a následující odpovědi, měřené v kontinuální přítomnosti steroidu. Je zajímavé, že hodnoty IC_{50} pro inhibici odpovědí GluN1/GluN2B receptorů v ustáleném stavu se u analogů postupně snižovaly s rostoucí délkou alifatického řetězce, směrem od **PA-hOxa** k **PA-hPim** (**Obr. 5.1.1*E***), přičemž vysoké hodnoty IC_{50} pro inhibici maximálních proudů zůstaly

pro všechny testované analogy nezměněné. V případě **PA-hPim** byla dokonce inhibice maximální odpovědi receptoru tak zanedbatelná, že nebylo možné hodnotu IC_{50} spolehlivě stanovit (**Obr. 5.1.1*D,E***). Výrazná preference **PA-hPim** pro ustálený stav oproti maximální odpovědi byla pozorována také u rekombinantních GluN1/GluN2A receptorů (**Obr. 5.1.1*E***).



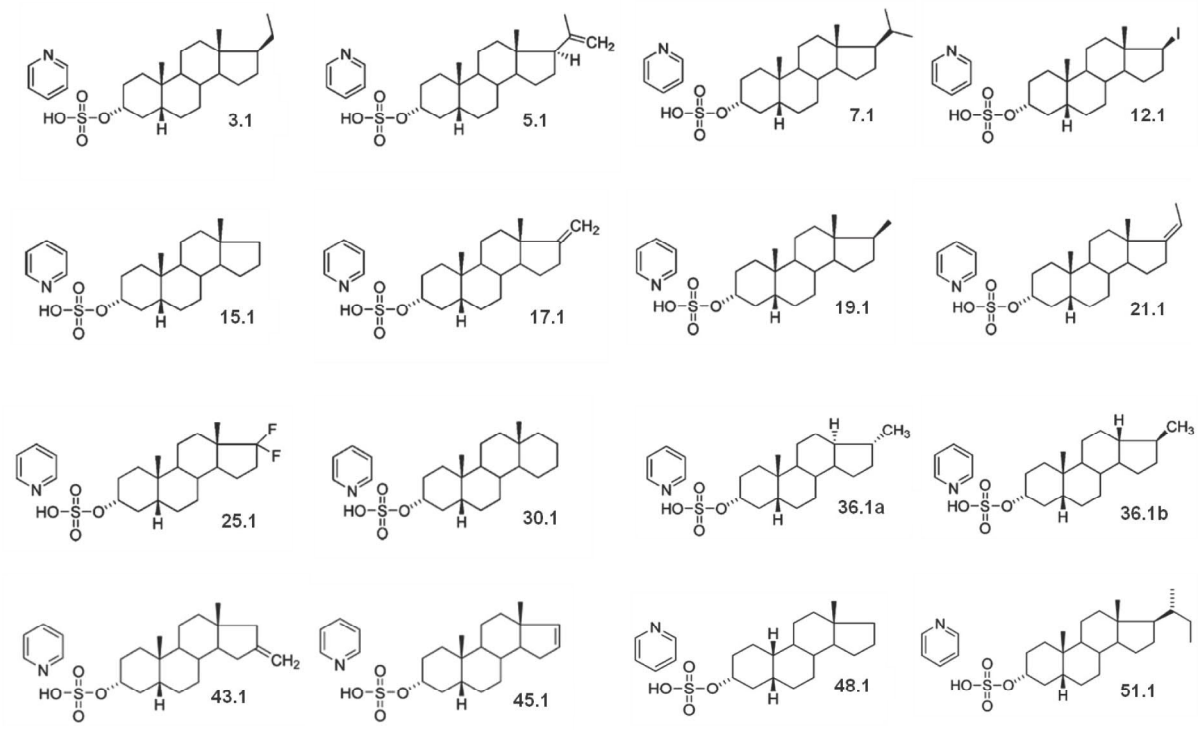
Obrázek 5.1.1. **PA-S** a jeho karboxylové analogy jsou účinnější při inhibici odpovědí v ustáleném stavu, než maximálních odpovědí, zprostředkovaných GluN1/GluN2B a GluN1/GluN2A receptory. **(*A*)** a **(*D*)** Odpovědi GluN1/GluN2B receptorů vyvolané rychlou aplikací 1mM glutamátu po dobu 0,5 s a 5 s, snímané bez přítomnosti a v kontinuální přítomnosti **(*A*) PA-S** (50 μM) a **(*D*) PA-hPim** (30 μM). Délka aplikace glutamátu a steroidů je vyznačena prázdnými a plnými obdélníky. Vpravo je znázorněn překryv kontrolní odpovědi na glutamát (černě) a odpovědí zaznamenaných v přítomnosti steroidů (červeně), normalizované vzhledem k jejich maximální amplitudě. **(*C*)** Chemické struktury steroidů testovaných pro jejich biologickou aktivitu na NMDA receptorech. Je ukázána struktura 20-oxo-5β-pregnanu a zbytků substituovaných v α-pozici na C3. **(*B*)** a **(*E*)** Grafy znázorňují průměr ± SEM hodnot IC_{50} získaných z rovnice (R3) pro **(*B*) PA-S** a **(*E*)** C3-hemiesterové analogy a jejich relativní inhibici v maximu (prázdné sloupce) a ustáleném stavu (plné sloupce) u GluN1/GluN2A (**PA-S** a **PA-hPim**) a GluN1/GluN2B receptorů. Hodnoty IC_{50} pro inhibici **PA-hPim** v maximu byly odečteny z buněk, ve kterých steroid vyvolával inhibici (5/8 buněk pro GluN1/GluN2B receptory a 5/6 buněk pro GluN1/GluN2A receptory).

5.2 Charakterizace strukturních determinant PA-S analogů významných pro jejich inhibiční působení na NMDA receptorech

Cílem této části dizertační práce bylo pomocí několika SAR studií pro syntetické analogy **PA-S** objasnit význam substituentů na pozicích C3, C17 a C20 a oblasti D-kruhu pro jejich inhibiční působení na NMDA receptorech. Dané výsledky jsou součástí dvou článků publikovaných v časopise *Journal of Medicinal Chemistry* (Kudova et al 2015, Slavikova et al 2016) a výsledky týkající se analogů **PA-S** s modifikací na C3 jsou součástí publikace uveřejněné v časopise *Steroids* (Adla et al 2017).

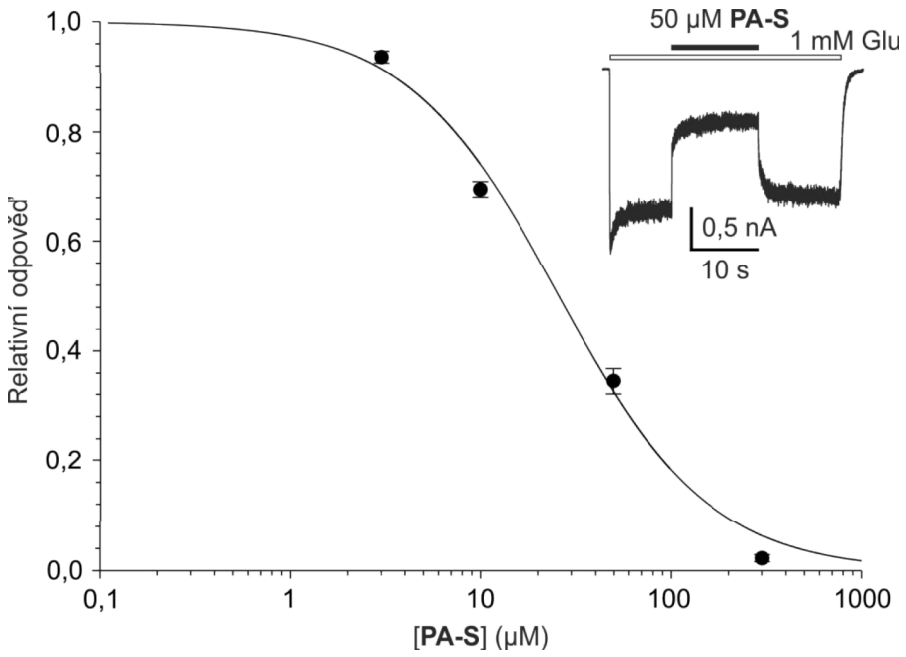
5.2.1 Sulfátové steroidy s lipofilními modifikacemi na D-kruhu steroidního jádra

Nejprve jsme se věnovali strukturním modifikacím v oblasti D-kruhu steroidního jádra. Pro odhalení významu 20-oxo skupiny na pregnanové kostře byly syntetizovány série nepolárních analogů **PA-S** (viz **Obr.5.2.1**), jejichž biologická aktivita byla zkoumána na rekombinantních GluN1/GluN2B receptorech aktivovaných 1mM glutamátem a 10μM glycinem.



Obrázek 5.2.1. Struktury **PA-S** analogů s modifikací na D-kruhu.

Z analýzy vlivu dávky na inhibiční účinek **PA-S** u GluN1/GluN2B receptorů jsme získali hodnoty $IC_{50} = 23{,}4 \pm 0{,}7$ μM s $h = 1{,}2 \pm 0{,}1$ ($n = 5$; viz **Obr. 5.2.2**). Naše předcházející studie ukázala, že amfipatický charakter steroidních molekul dává ve vodném prostředí předpoklad pro tvorbu micel, které se mohou dále shlukovat (Vyklicky et al 2015). Abychom se vyhnuli chybné interpretaci dat pro steroidy při vyšších koncetracích, stanovovali jsme hodnoty IC_{50} pro nově syntetizované analogy z jedné koncentrace za použití rovnice (R3) (Hillův koeficent byl fixován na hodnotě 1,2). Hodnota IC_{50} byla stanovena vždy minimálně pro 2 koncentrace dané látky, lišící se 2-násobně v rozmezí řádu. Hodnoty IC_{50} pro D-modifikované pregnanové analogy jsou shrnuty v **Tabulce 5.2.1.** Výsledky ukazují, že všechny testované látky měly statisticky významně sníženou hodnotu IC_{50} (IC_{50} v rozmezí od 84,0 nM pro nejúčinnější látku **51.1** do 5,4 μM pro nejméně účinnou látku **48.1**), ve srovnání s endogenním **PA-S** (IC_{50}= 24,6 μM).



Obrázek 5.2.2. Účinek **PA-S** na GluN1/Glu2B receptorech. Křivka koncentrační závislosti pro účinek **PA-S** na GluN1/Glu2B receptorech. Body v grafu jsou průměrné hodnoty normalizovaných odpovědí z pěti nezávislých měření. Chybové úsečky představují SEM. Relativní proudy (*I*) vyvolané 1mM glutamátem, zaznamenané v přítomnosti **PA-S** (3-300 μM) a stanovené v jednotlivých buňkách, byly proloženy logistickou rovnicí (R2). Vložený obrázek je reprezentativní záznam proudové odpovědi snímané z HEK293 buněk transfekovaných pomocí cDNA kódující podjednotky GluN1/GluN2B receptorů. **PA-S** (50 μM) byl aplikován současně s 1mM glutamátem (délka aplikace glutamátu a **PA-S** je vyznačena prázdnými a plnými obdélníky).

Tabulka 5.2.1. Účinek **PA-S** a jeho D-modifikovaných analogů na odpovědi GluN1/GluN2B receptorů v HEK293 buňkách aktivovaných 1mM glutamátem.

Látka[a]	**IC_{50} ± SEM (*n*)** (μM) (*h* = 1,2)	**Koncentrace látky** (μM)
PA-S	24,60 ± 2,37 (5)	100
3.1 (17β-CH_2CH_3)	0,43 ± 0,06 (4)	1
5.1 (C_{20}=CH_2)	0,47 ± 0,06 (5)	1
7.1 (17β-$CH(CH_3)_2$)	0,17 ± 0,02 (3)	0,3
12.1 (17β-I)	0,59 ± 0,03 (3)	0,3
15.1 (17β-H,17α-H)	1,24 ± 0,06 (11)	3
17.1 (C_{17}=CH_2)	1,59 ± 0,11 (6)	3
19.1 (17β-CH_3)	0,63 ± 0,06 (5)	1
21.1 (C_{17}=$CHCH_3$)	0,82 ± 0,04 (4)	1
25.1 (17β-F,17α-F)	6,52 ± 0,82 (5)	10
30.1 ($_D$-homo)	1,13 ± 0,14 (4)	1
36.1a (17α-CH_3,18α-H)	0,89 ± 0,04 (6)	3
36.1b (17β-CH_3,18β-H)	0,75 ± 0,07 (4)	0,3
43.1 (C_{16}=CH_2)	2,22 ± 0,13 (5)	3
45.1[b] ($\Delta^{16,17}$)	ND	1, 3, 10, 50
48.1 (17α-H,17β-H,19β-H)	5,37 ± 0,60 (6)	10
51.1 (17β-$CH(CH_3)CH_2CH_3$)	0,08 ± 0,01 (3)	0,3

[a]*Zkratka pro modifikaci na D-kruhu je uvedená v závorce.* [b]*Žádný účinek při 1, 3, 10 μM, nerozpustné při 50 μM (ND - není dostupné).*

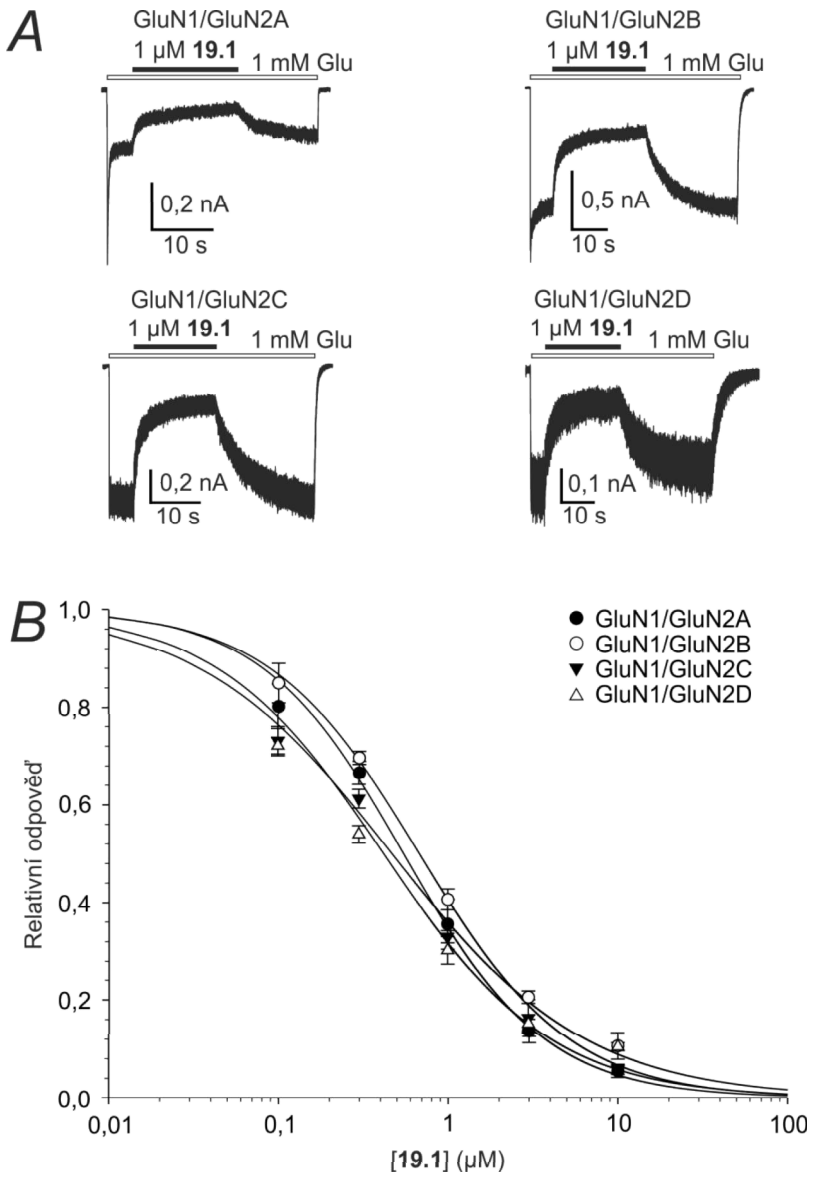
V případech, kdy byla 20-oxo skupina nahrazena deoxy-skupinou (látka **3.1**), případně methylenovou či methylovou skupinou (látky **5.1** a **7.1**), došlo k přibližně 50-násobnému snížení hodnoty IC_{50}, což naznačuje, že 20-oxo skupina na acetylovém zbytku pregnanu muže být odstraněna při současném zachování schopnosti inhibovat NMDA receptorové proudy. V případech, kdy byl acetylový zbytek na C17 nahrazen různě dlouhou alkylovou skupinou (látky **19.1**, **3.1**, **7.1**, a **51.1**), docházelo s postupně se prodlužující délkou uhlíkového řetězce ke snížení hodnoty IC_{50} až o 2-3 řády (hodnoty IC_{50} se pohybovaly v rozmezí od 0,63 až po 0,08 μM), v porovnání s **PA-S**. Z pokusů lze usoudit, že acetylový zbytek na C17 u D-kruhu steroidního jádra není klíčový pro inhibiční působení **PA-S** na NMDA receptorech. Výsledky dále naznačují, že nahrazení acetylové skupiny na C17 za alkylovou má u steroidních analogů pozitivní vliv na jejich schopnost inhibovat NMDA receptorové proudy.

Následně jsme testovali, zda přítomnost dvojné vazby ve formě methylenové skupiny v pozici C16, C17 nebo C20 bude mít vliv na hodnotu IC_{50}. Z výsledků vyplývá, že

nejúčinnější jsou analogy obsahující methylen na pozici původního karbonylového zbytku (20-methylen; látka **5.1**). Zajímavé je, že látka **45.1**, u níž byla dvojná vazba umístěna přímo v D-kruhu, neměla na proudy GluN1/GluN2B receptorů žádný vliv. Z pokusů, v níchž byly použity steroidní analogy s opačnou konformací izomerů v pozicích C13 a C17 (látky **36.1a** a **36.1b**), vyplývá, že methylová skupina na C13 nemá výrazný effekt na inhibiční působení steroidu na NMDA receptorech. Srovnání účinku steroidu s pětičlenným D-kruhem (látka **15.1**) s účinkem analogu s šestičlenným D-kruhem (látka **3.1**) naznačuje, že rozšíření kruhu, ani substituent na C17 v α-pozici nemají na hodnotu IC_{50} vliv.

*5.2.1.1. Účinek 17-methyl-5β-androstan-3-sulfátu (látky **19.1**) na rekombinantních NMDA receptorech*

Abychom prozkoumali vliv podjednotkového složení NMDA receptorů na účinek látky **19.1** byla cDNA kódující GluN1 a GluN2A-D podjednotky kotransfekována do HEK293 buněk. Porovnání hodnot IC_{50} a Hillova koeficientu pro účinek látky **19.1** na GluN1/GluN2A-D receptorech neukázalo žádné statisticky významné rozdíly (**Obr. 5.2.3** a **Tab. 5.2.2**).



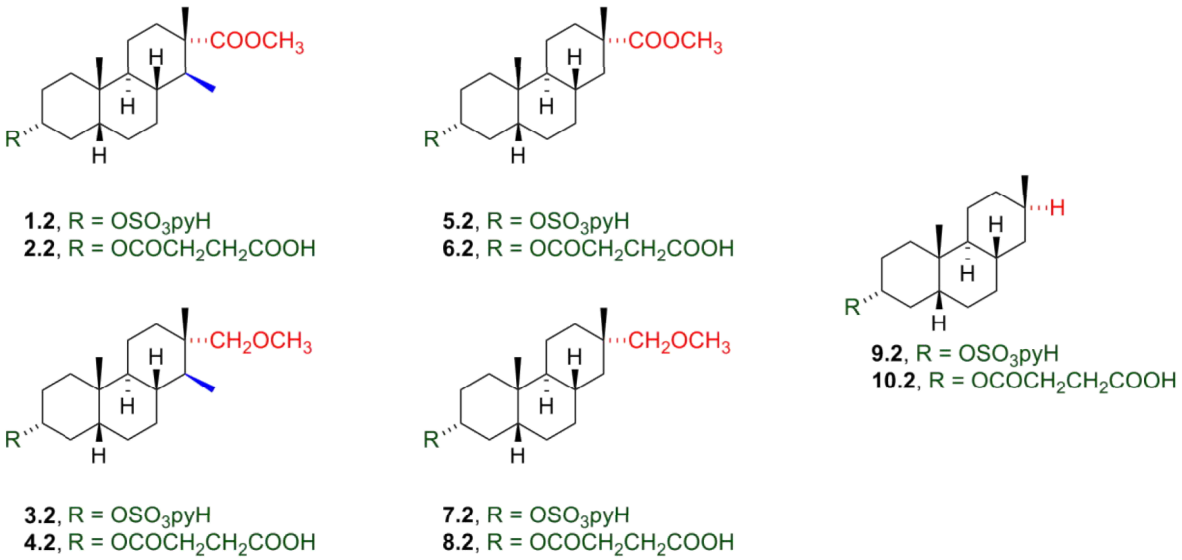
Obrázek 5.2.3. Účinek látky **19.1** na GluN1/Glu2A-D receptorech. **(*A*)** Ukázka záznamů z HEK293 buněk transfekovaných cDNA kódující podjednotky GluN1/GluN2A-D receptorů. Látka **19.1** (1 μM) byla aplikována současně s 1mM glutamátem (délka aplikace glutamátu a látky **19.1** je vyznačena prázdnými a plnými obdélníky). **(*B*)** Křivky koncentrační závislosti pro účinek látky **19.1** na GluN1/Glu2A-D receptorech. Body v grafu jsou průměrné hodnoty normalizovaných odpovědí z pěti nezávislých měření. Chybové úsečky představují SEM. Relativní proudy (*I*) vyvolané 1mM glutamátem, snímané v přítomnosti látky **19.1** (0,1−10 μM) a stanovené v jednotlivých buňkách, byly proloženy logistickou funkcí (R2).

Tabulka 5.2.2. Účinek látky **19.1** na odpovědi GluN1/GluN2A-D receptorů exprimovaných HEK293 buňkách vyvolané aplikací 1mM glutamátu.

Receptor	IC_{50} ± SEM (μM)	*h* ± SEM	*n*
GluN1/GluN2A	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	5
GluN1/GluN2B	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	5
GluN1/GluN2C	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	5
GluN1/GluN2D	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	5
Jednofaktorová ANOVA	P = 0,215	P = 0,592	

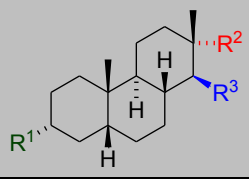
5.2.2 Perhydrofenantreny se substituovanou sulfátovou a hemisukcinátovou skupinou

Za účelem rozšíření poznatků předchozí SAR studie, zaměřené na význam substituentu na C17, jsme testovali sérii perhydrofenantrenů (látky **1.2-10.2**), obsahujících pouze ABC kruh steroidního jádra (**Obr. 5.2.4**), za účelem zjištění úlohy D-kruhu v inhibičním působení neurosteroidů. U plně saturovaných perhydrofenantrenů byla zachována stereochemie na pozicích C13 a C14, stejně jako *5β*-pozice a substituent na C3 v *α*-konfiguraci, které jsou klíčové pro inhibiční účinek pregnanových steroidů, spolu s přítomností nabitého zbytku na pozici C3 (v našem případě sulfátová nebo hemisukcinátová esterová skupina).



Obrázek 5.2.4. Struktury C3-sulfátových (**1.2**, **3.2**, **5.2**, **7.2**, **9.2**) a C3-hemisukcinátových (**2.2**, **4.2**, **6.2**, **8.2**, **10.2**) analogů perhydrofenantrenu.

Tabulka 5.2.3. Účinek **PA-S**[a] a jeho perhydrofenantrenových analogů (látky **1.2-10.2**) na proudové odpovědi GluN1/GluN2B receptorů v HEK293 buňkách.

	**IC_{50} ± SEM (*n*)** (μM) (*h* = 1,2)	**Koncentrace látky** (μM)
(PA-S)[a] (R^1 = OSO_3pyH, R^2 = $CH(COCH_3)CH_2CH_2$, R^3 = R^2)	24,6 ± 2,4 (5)	100
5β-androsten-3α-yl sulfát/15.1[a] (R^1 = OSO_3pyH, R^2 = $CH_2CH_2CH_2$, R^3 = R^2)	1,2 ± 0,1 (11)	3
1.2 (R^1 = OSO_3pyH, R^2 = $COOCH_3$, R^3 = CH_3)	74,6 ± 9,1 (5)	50
2.2 (R^1 = $OCOCH_2CH_2COOH$, R^2 = $COOCH_3$, R^3 = CH_3)	63,4 ± 3,2 (3)	10
3.2 (R^1 = OSO_3pyH, R^2 = CH_2OCH_3, R^3 = CH_3)	33,0 ± 2,8 (5)	50
4.2 (R^1 = $OCOCH_2CH_2COOH$, R^2 = CH_2OCH_3, R^3 = CH_3)	29,2 ± 0,4 (3)	10
5.2 (R^1 = OSO_3pyH, R^2 = $COOCH_3$, R^3 = H)	224,0 ± 14,0 (4)	50
6.2 (R^1 = $OCOCH_2CH_2COOH$, R^2 = $COOCH_3$, R^3 = H)	87,6 ± 23,5 (4)	10
7.2 (R^1 = OSO_3pyH, R^2 = CH_2OCH_3, R^3 = H)	77,0 ± 4,1 (6)	50
8.2 (R^1 = $OCOCH_2CH_2COOH$, R^2 = CH_2OCH_3, R^3 = H)	33,3 ± 4,1 (7)	10
9.2 (R^1 = OSO_3pyH, R^2 = H, R^3 = H)	15,6 ± 1,5 (4)	10
10.2 (R^1 = $OCOCH_2CH_2COOH$, R^2 = H, R^3 = H)	23,2 ± 2,9 (5)	10

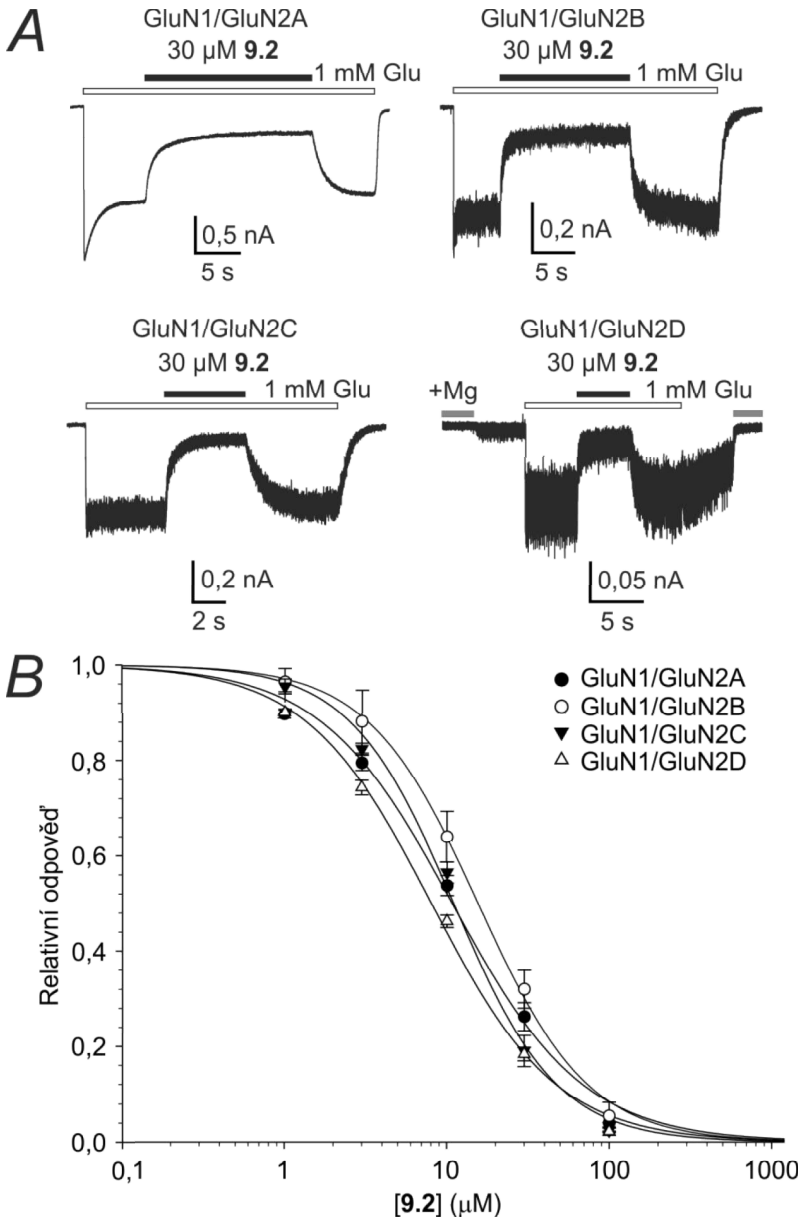
[a] *Viz data z **Tab.5.2.1** pro srovnání.*

V pokusech, kde jsme porovnávali účinek **PA-S** a jednoduchých perhydrofenantrenů (látky **9.2** a **10.2**), které nesou pouze ABC kruh bez dalších modifikací, jsme zjistili, že ABC kruh je dostačující pro zachování inhibičního působení steroidu. Avšak pokud porovnáme jejich účinek s účinkem 5β-androsten-3α-yl sulfátu (látka **15.1**), který na C17 v rámci D-kruhu nese pouze vodík, dochází přibližně k 10-ti násobnému zvýšení hodnoty IC_{50} v případě pehydrofenantren 3-sulfátu.

Ze získaných výsledků (**Tab. 5.2.3**) můžeme dále usoudit, že látky s metyl-esterem na pozici C14 v rámci C-kruhu steroidního jádra mají signifikantně vyšší hodnoty IC_{50}, než látky obsahující na této pozici metyl-ether. Za účelem porovnání vlivu sulfátového a hemisukcinátového zbytku na pozici C3 v rámci A-kruhu na hodnotu IC_{50}, jsme látky rozdělili do dvou skupin. V případě látek **9.2** s **10.2** bez substituentu na C13 byl přibližně o polovinu účinnější analog nesoucí na C3 sulfátovou skupinu (IC_{50} = 15,6 μM pro látku **9.2**, oproti IC_{50} = 23,2 μM pro látku **10.2**). Je zajímavé, že u látek se substituentem na C13, jenž obsahuje kyslík, byly mnohem účinnější hemiesterové analogy (látky **2.2**, **4.2**, **6.2** a **8.2**).

*5.2.2.1 Účinek látky **9.2** na rekombinantních NMDA receptorech*

Vzhledem k tomu, že látka **9.2** byla vyhodnocena jako nejúčinnější modulátor z testovaných perhydrofenantrenových analogů (**1.2**-**10.2**; **Tab. 5.2.3**), byla zvolena pro další biologické testování. Abychom prozkoumali selektivitu látky **9.2** pro jednotlivé podjednotky NMDA receptorů, byla cDNA kódující GluN1 a GluN2A-D podjednotky kotransfekována do HEK293 buněk. Statistické porovnání hodnot IC_{50} pro inhibiční účinek látky **9.2** u GluN1/GluN2A-D receptorů ukázalo statisticky významný rozdíl mezi hodnotami IC_{50} pro GluN1/GluN2B receptory a pro receptory obsahující GluN2A, GluN2C a GluN2D podjednotky (**Obr. 5.2.5** a **Tab. 5.2.4**).



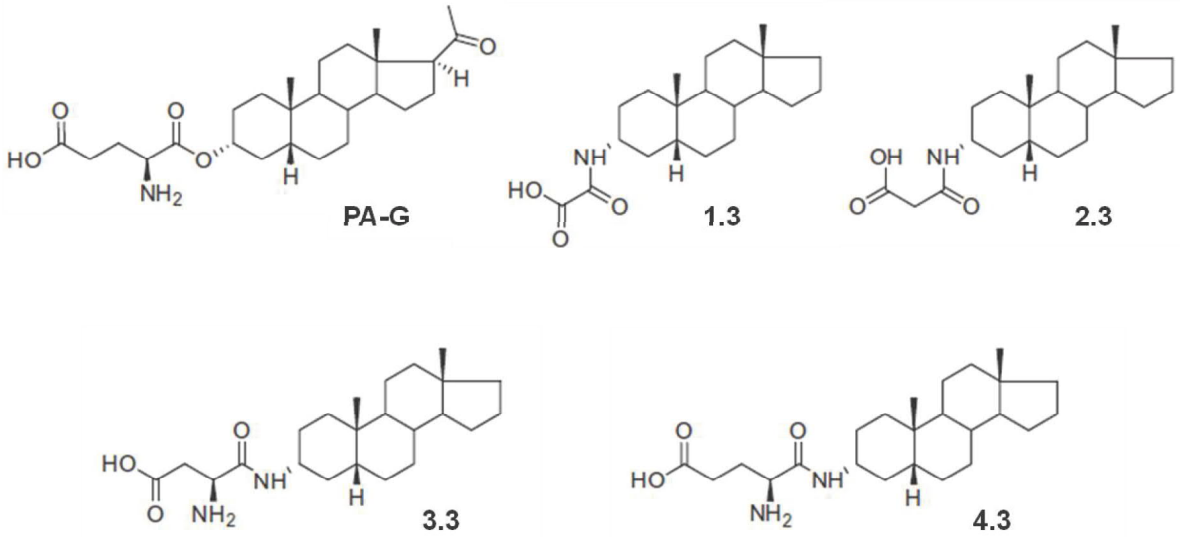
Obrázek 5.2.5. Účinek látky **9.2** na GluN1/GluN2A-D receptorech. **(*A*)** Ukázka záznamů získaných z HEK293 buněk transfekovaných cDNA kódující GluN1 a GluN2A-D podjednotky. Látka **9.2** (30 μM) byla aplikována současně s 1mM glutamátem (délka aplikace látky **9.2** a glutamátu je vyznačena plnými a prázdnými obdélníky). Šedý obdélník vyznačuje aplikaci ECS, obsahujícího 1mM Mg^{2+}. **(*B*)** Křivky koncentrační závislosti účinku látky **9.2** na GluN1/GluN2A-D receptorech. Body v grafu jsou průměrné hodnoty normalizovaných odpovědí z minimálně čtyř nezávislých měření. Chybové úsečky představují SEM. Relativní proudy (*I*) vyvolané glutamátem, zaznamenané v přítomnosti látky **9.2** (1–100 μM) a stanovené v jednotlivých buňkách, byly proloženy logistickou funkcí (R2).

Tabulka 5.2.4. Účinek látky **9.2** na glutamátové odpovědi GluN1/GluN2A-D receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách.

Receptor	**IC_{50} ± SEM** (μM)	**h ± SEM**	***n***
GluN1/GluN2A	10,9 ± 0,4	1,1 ± 0,1	6
GluN1/GluN2B	15,6 ± 0,4	1,3 ± 0,1	5
GluN1/GluN2C	11,1 ± 0,4	1,4 ± 0,1	4
GluN1/GluN2D	8,1 ± 0,3	1,1 ± 0,1	4
Jednofaktorová ANOVA	**P = 0,007**	P = 0,157	

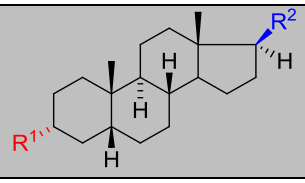
5.2.3 Nové steroidní analogy PA-S a PA-G na bázi amidů s inhibičním působením na NMDA receptorech

Na základě naší předchozí SAR studie, zaměřené na modifikace v oblasti D-kruhu (Kudova et al 2015), jsme zvolili strukturní motiv, zahrnující D-kruh bez substituentu, v kombinaci s amidovým substituentem na C3 o různé délce (**Obr. 5.2.6**). Účinek pregnanolon glutamátu (**PA-G**) a amidových analogů (látek **1.3-4.3**) na rekombinantní NMDA receptory byl zkoumán v HEK293 buňkách, transfekovaných pomocí cDNA kódující GluN1 a GluN2B podjednotky. Hodnoty IC_{50} určené pro testované analogy z jedné koncentrace pomocí rovnice (R3) jsou shrnuty v **Tabulce 5.2.5**.



Obrázek 5.2.6. Struktury **PA-G** a amidových analogů s různou délkou C3-substituentu (látky **1.3-4.3**).

Tabulka 5.2.5. Účinek **PA-S**[a], **PA-G** a látek **1.3-4.3** na proudové odpovědi GluN1/GluN2B receptorů v HEK293 buňkách vyvolané 1mM glutamátem.

	**IC_{50} ± SEM (*n*)** (μM) (*h* = 1,2)	**Koncentrace látky** (μM)
PA-S[a] (R^1= OSO_3pyH, R^2 = (C=O)CH_3)	24,6 ± 2,4 (5)	100
PA-G (R^1= HOOC-$(CH_2)_2$CH(NH_2)-COO, R^2 = (CO)CH_3)	51,7 ± 3,8 (5)	200
1.3 (R^1= HOOC-CONH, R^2 = H)	21,7 ± 1,8 (7)	10
2.3 (R^1= HOOC-CH_2-CONH, R^2 = H)	15,4 ± 1,4 (6)	10
3.3 (R^1= HOOC-CH_2CH(NH_2)-CONH, R^2 = H)	1,0 ± 0,1 (6)	3
4.3 (R^1= HOOC-$(CH_2)_2$CH(NH_2)-CONH, R^2 = H)	1,4 ± 0,1 (6)	3

[a]*Viz data z **Tab.5.2.1** pro srovnání.*

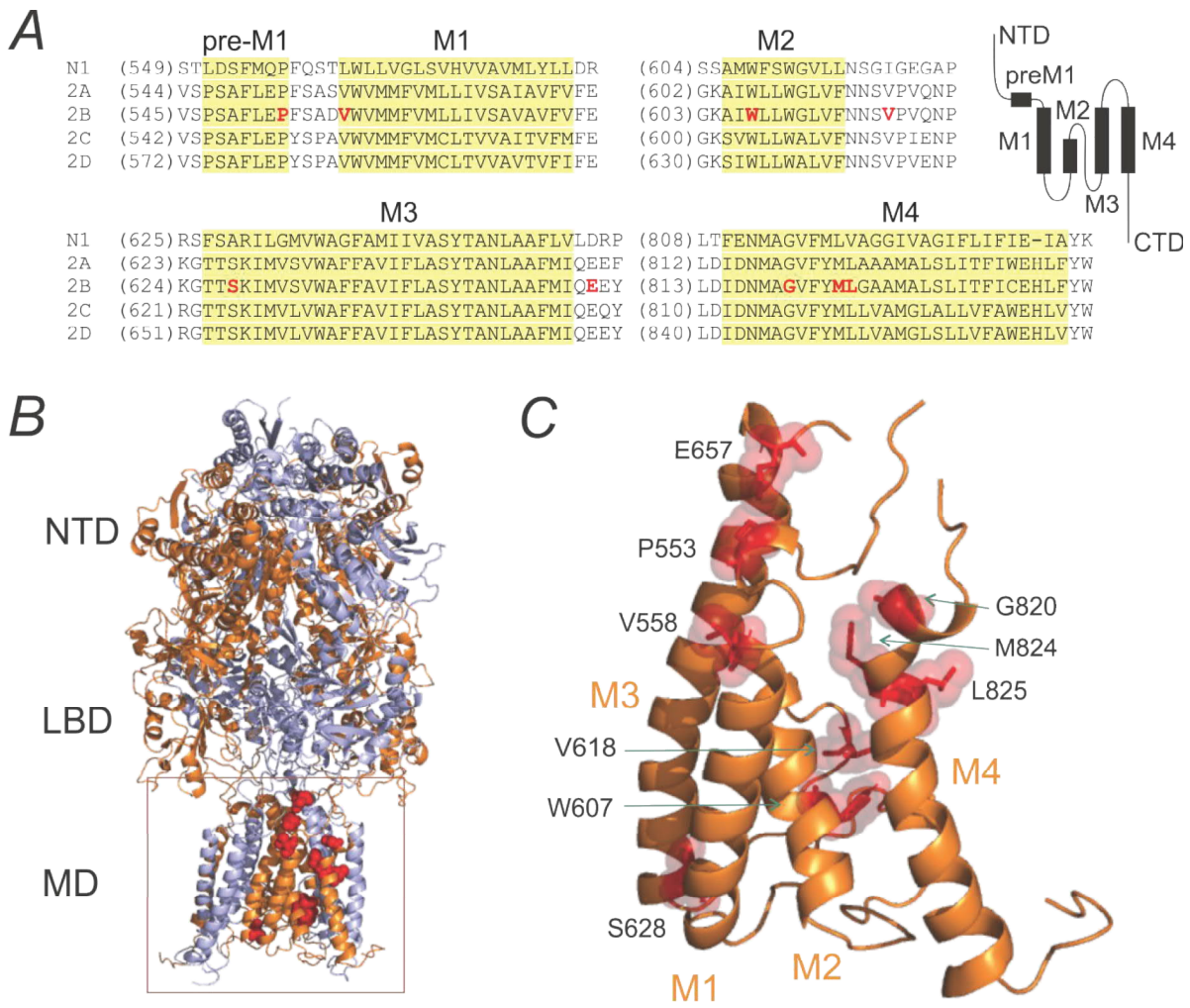
Z výsledků (**Tab. 5.2.5**) vyplývá, že hodnota IC_{50} pro **PA-G** na GluN1/GluN2B receptorech (IC_{50} = 51,7 μM) je přibližně 2-krát vyšší, než v případě endogenního **PA-S** (IC_{50} = 24,6 μM). V případě účinku látek **1.3** a **2.3** došlo k přibližně 1,1- a 1,5-násobnému snížení hodnoty IC_{50} (IC_{50} = 21,7 μM pro látku **1.3** a IC_{50} = 15,4 μM pro látku **2.3**)

ve srovnání s **PA-S**. Látky **3.3** a **4.3** vykazují dokonce až 20-násobné snížení hodnoty IC_{50} ve srovnání s **PA-S**. Lze říci, že využití amidu jako linkeru na C3 významně zlepšuje účinnost látek **3.3** a **4.3** při inhibici proudových odpovědí GluN1/GluN2B receptorů.

5.3 Funkční a farmakologické vlastnosti mutantních forem lidského typu NMDA receptorů

V nedávné studii jsme zkoumali účinky různých mutací v genech kódujících podjednotky GluN1/GluN2B receptorů ve snaze identifikovat místo působení pro inhibiční steroidy, a také objasnit mechanizmus vrátkování iontového kanálu NMDA receptoru (Ladislav et al 2018, Vyklicky et al 2015). Druhotným výsledkem těchto experimentů bylo zjištění, že mutace v MD a sousedních oblastech vedou ve většině případů k narušení funkce NMDA receptorů. Proto jsme prozkoumali dostupné databáze (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) a vybrali 9 *de novo* mutací (P553L; V558I; W607C; V618G; S628F; E657G; G820E; M824R; L825V) umístěných v membránových oblastech (preM1, M1, M2, M3 a M4) u hGluN2B podjednotky (**Obr. 5.3.1** a **Tab. 5.3.1**).

Neexistují žádné nebo pouze neúplné informace o účincích těchto mutací na funkci NMDA receptorů. Z tohoto důvodu bylo našim cílem u těchto mutantních hGluN1/hGluN2B receptorů otestovat: amplitudu odpovědí vyvolaných saturující koncentrací glutamátu, relativní expresi na povrchu buněk, účinnost agonistů, desenzitizaci, relativní P_o a jejich farmakologické vlastnosti, jako počáteční krok pro pochopení, jakou roli hraje dysfunkce NMDA receptoru v patofyziologii některých neurologických onemocnění. Uvedené výsledky jsou součástí publikace v časopise *Frontiers in molecular neuroscience* (Vyklicky et al 2018).



Obrázek 5.3.1. Umístění vzácných *de novo* mutací v rámci hGluN2B podjednotky. **(*A*)** Uspořádání domén NMDA receptoru a srovnání aminokyselinových sekvencí pro oblasti pre-Ml, Ml, M2, M3 a M4 mezi podjednotkami NMDA receptorů. Membránové oblasti jsou vyznačeny žlutou barvou. **(*B-C*)** Molekulární struktura homologního modelu hGluN1/hGluN2B receptoru (Karakas & Furukawa 2014, Lee et al 2014) (hGluN1 ve stříbrné barvě, hGluN2B ve zlaté barvě). Aminokyselinové zbytky, které byly u pacientů mutovány, jsou zvýrazněny červeně.

Tabulka 5.3.1. Vybrané *de novo* varianty v lidském *GRIN2B* genu a jejich fenotypová charakterizace.

hGluN2B mutace	Genotyp	Fenotyp	Věk nástupu	Zdroj
P553L	c.1658C>T	MR, hypotonie	Časně postnatální	(de Ligt et al 2012)
V558I	c.1672G>A	MR	-	(Hamdan et al 2014) (Lelieveld et al 2016)
W607C	c.1821G>T	MR, DD, znaky dysmorfismu	-	(Yavarna et al 2015)
V618G	c.1853T>G	MR, WS,	4 měsíce	(Lemke et al 2014)
S628F	c.1883C>T	MR, DD	-	(Platzer et al 2017)
E657G	c.1970A>G	MR, DD	-	(Platzer et al 2017)
G820E	c.2459G>A	MR, mikrocefalie	Časně postnatální	(Hamdan et al 2014)
M824R	c.2471T>G	MR, DD, mikrocefalie, EPI aktivita na EEG	2 měsíce	(Zhu et al 2015)
L825V	c.2473T>G	ASD	-	(Awadalla et al 2010) (Swanger et al 2016)

MR – mentální retardace; DD – vývojové zpoždění (z angl. Developmental Delay); WS – Westův syndrom; EPI – epilepsie a/nebo záchvaty, dětské spasmy; EEG – elektroencefalogram; ASD – poruchy autistického spektra (z angl. Autism Spectrum Disorder).

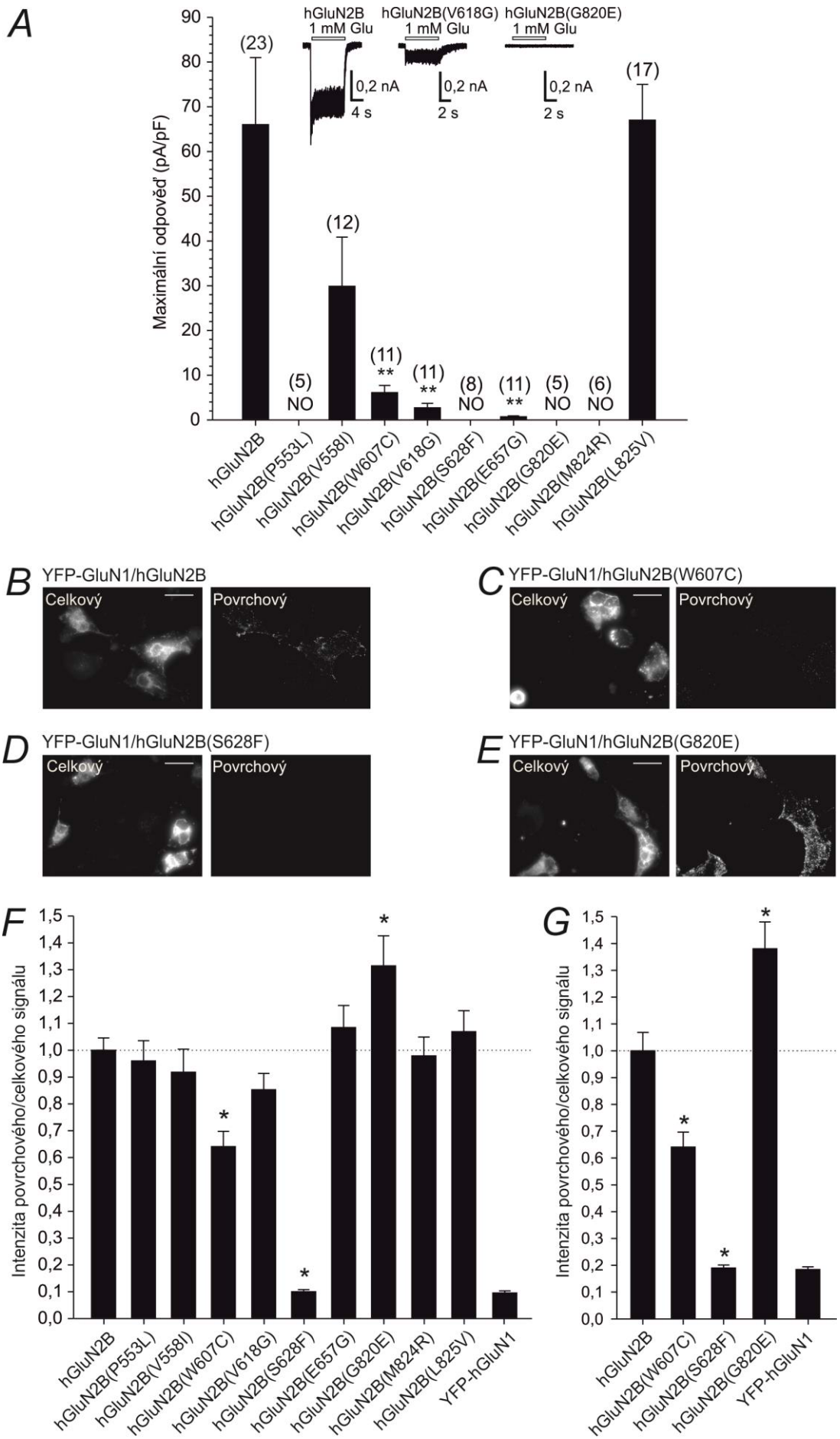
5.3.1 Vzácné mutace v MD snižují povrchovou expresi NMDA receptorů

Odpovědi HEK293 buněk exprimujících hGluN1/hGluN2B receptory na 1mM glutamát (aplikovaný v kontinuální přítomnosti 30μM glycinu) měly v maximu relativní proudy v průměru 66 pA/pF. Receptory s mutovanou hGluN2B podjednotkou buď vůbec neodpovídaly na aplikaci glutamátu (proudy <5 pA; hGluN1/hGluN2B(P553L; S628F; G820E; M824R) receptory), nebo odpovídaly s významně sníženými amplitudami (hGluN1/hGluN2B(W607C; V618G; E657G) receptory). Amplituda odpovědí se významně nelišila pro hGluN1/hGluN2B(V558I) a hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory (**Obr. 5.3.2*A***). Rozdíly v maximální amplitudě, normalizované s ohledem na kapacitu buňky (pF), však musí být interpretovány opatrně, neboť jsou ovlivněny faktory, které nemůžeme plně kontrolovat.

Předpokládáme, že snížené hladiny povrchové exprese a/nebo změněná funkce receptoru mohou být důvodem pro snížení odpovědí na 1mM glutamát v případě mutovaných NMDA receptorů.

Následně jsme použili imunofluorescenční mikroskopii pro stanovení relativní povrchové exprese u mutovaných NMDA receptorů. COS-7 buňky byly transfekovány pomocí cDNA nesoucí geny kódující YFP-hGluN1 podjednotku a nativní nebo mutovanou formu hGluN2B podjednotky. Kvantitativní analýza ukázala, že ve srovnání s nemutovanými YFP-hGluN1/hGluN2B receptory (**Obr. 5.3.2*B***) byl poměr povrchové vůči celkové expresi významně snížen pro YFP-hGluN1/hGluN2B(W607C) receptory (**Obr. 5.3.2*C***) a povrchová exprese YFP-hGluNl/hGluN2B(S628F) receptorů (**Obr. 5.3.2*D***) byla pravděpodobně výrazně omezena, neboť poměr povrchových vůči celkovým hladinám receptorů byl stejný, jako v případě COS-7 buněk transfekovaných pouze YFP-hGluN1 podjednotkou (Horak et al 2008, Kaniakova et al 2012). YFP-hGluN1 podjednotka se nedostává na povrch, pokud není koexprimována spolu s hGluN2B podjednotkou (Okabe et al 1999, Standley et al 2000). Analýza navíc ukázala zvýšenou povrchovou expresi v případě YFP-hGluN1/hGluN2B(G820E) receptorů (**Obr. 5.3.2*E***), ve srovnání s nemutovanými YFP-hGluN1/hGluN2B receptory. Graf na **Obrázku 5.3.2*F*** ukazuje relativní povrchovou expresi v COS-7 buňkách pro receptory obsahující nemutované a mutované hGluN2B podjednotky. Výsledky, získané pro YFP-hGluN1/hGluN2B(W607C), YFP-hGluNl/hGluN2B(S628F) a YFP-hGluN1/hGluN2B(G820E) receptory na COS-7 buňkách byly navíc potvrzeny pomocí imunofluorescenční mikroskopie na HEK293 buňkách (**Obr. 5.3.2*G***).

V případě HEK293 buněk transfekovaných hGluN1/hGluN2B(S628F) receptory je tedy možné vysvětlit necitlivost vůči glutamátu tím, že se na povrchu prakticky nevyskytují žádné receptory, a sníženou citlivost v případě hGluN1/hGluN2B(W607C) receptorů z důvodu jejich snížené povrchové exprese. Naproti tomu, necitlivost nebo snížená citlivost vůči glutamátu u HEK293 buněk transfekovaných pomocí hGluN1 spolu s hGluN2B(P553L), hGluN2B(V618G), hGluN2B(E657G), hGluN2B(G820E) nebo hGluN2B(M824R) podjednotkami není v souladu s jejich normální nebo zvýšenou povrchovou expresí a naznačuje, že dochází k narušení funkčních vlastností receptoru.


A
hGluN2B
1 mM Glu
hGluN2B(V618G)
1 mM Glu
hGluN2B(G820E)
1 mM Glu
0,2 nA
4 s
0,2 nA
2 s
0,2 nA
2 s
Maximální odpověď (pA/pF)
(23)
(5) NO
(12)
(11) **
(11) **
(8) NO
(11) **
(5) NO
(6) NO
(17)
hGluN2B
hGluN2B(P553L)
hGluN2B(V558I)
hGluN2B(W607C)
hGluN2B(V618G)
hGluN2B(S628F)
hGluN2B(E657G)
hGluN2B(G820E)
hGluN2B(M824R)
hGluN2B(L825V)
B YFP-GluN1/hGluN2B
Celkový
Povrchový
C YFP-GluN1/hGluN2B(W607C)
Celkový
Povrchový
D YFP-GluN1/hGluN2B(S628F)
Celkový
Povrchový
E YFP-GluN1/hGluN2B(G820E)
Celkový
Povrchový
F
Intenzita povrchového/celkového signálu
hGluN2B
hGluN2B(P553L)
hGluN2B(V558I)
hGluN2B(W607C)
hGluN2B(V618G)
hGluN2B(S628F)
hGluN2B(E657G)
hGluN2B(G820E)
hGluN2B(M824R)
hGluN2B(L825V)
YFP-hGluN1
G
Intenzita povrchového/celkového signálu
hGluN2B
hGluN2B(W607C)
hGluN2B(S628F)
hGluN2B(G820E)
YFP-hGluN1

Obrázek 5.3.2. Mutace v MD u hGluN2B podjednotky ovlivňují amplitudu odpovědí na 1mM glutamát a povrchovou expresi NMDA receptorů. **(*A*)** Reprezentativní záznamy proudových odpovědí vyvolaných v HEK293 buňkách transfekovaných cDNA kódující podjednotky hGluN1/hGluN2B, hGluN1/hGluN2B(V618G) a hGluN1/hGluN2B(G820E) receptorů. Glutamát byl aplikován po dobu 10 s (1 mM, bílý obdélník) v kontinuální přítomnosti 30μM glycinu. Sloupcový graf ukazuje průměrné amplitudy ± SEM (*n*) proudových odpovědí vyvolaných 1mM glutamátem, normalizované vůči kapacitě HEK293 buněk. Mutované receptory, které nevykazují detekovatelné proudy, jsou označeny jako NO (neodpovídající). Rozdíly v průměrných hodnotách mezi jednotlivými skupinami byly statisticky významné - Kruskal-Wallisova Jednofaktorová ANOVA ($P < 0{,}001$). Mann-Whitney Rank Sum Test byl použit pro určení hladiny významnosti ve srovnání s nemutovanými receptory; $*P = 0{,}001 - 0{,}050$; $**P < 0{,}001$. ***(B-E)*** Ukázky celkových (levé panely) a povrchových (pravé panely) signálů z YFP-hGluN1/hGluN2B receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách. COS-7 buňky byly transfekovány pomocí cDNA kódující podjednotky: **(*B*)** YFP-hGluN1/hGluN2B, **(*C*)** YFP-hGluN1/hGluN2B(W607C), **(*D*)** YFP-hGluN1/hGluN2B(S628F) a **(*E*)** YFP-hGluN1/hGluN2B(G820E) receptorů. Měřítko odpovídá 20 μm. **(*F*)** Kvantitativní imunocytochemická analýza byla použita pro stanovení relativní hladiny povrchové vůči celkové expresi NMDA receptorů v COS-7 buňkách, transfekovaných buď pouze YFP-hGluN1 podjednotkou (negativní kontrola), nebo YFP-hGluN1 spolu s nemutovanou (pozitivní kontrola), či mutovanou formou hGluN2B podjednotky. Data ukazují průměr ± SEM; $n \geq 35$ ze třech nezávislých pokusů; $*P < 0{,}05$ vůči pozitivní kontrole, Jednofaktorová ANOVA (vícečetné srovnání vůči kontrole-Dunnettova metoda). **(*G*)** Imunofluorescenční mikroskopie byla použita k určení relativní hladiny povrchové vůči celkové expresi NMDA receptorů v HEK293 buňkách transfekovaných buď pouze YFP-hGluN1 podjednotkou (negativní kontrola), nebo YFP-hGluN1 spolu s nemutovanou (pozitivní kontrola), nebo mutovanou hGluN2B podjednotkou. Data ukazují průměr ± SEM; $n = 35$ ze dvou nezávislých experimentů; $*P < 0{,}05$ vůči pozitivní kontrole, Jednofaktorová ANOVA (vícečetné srovnání vůči kontrole - Dunnettova metoda).

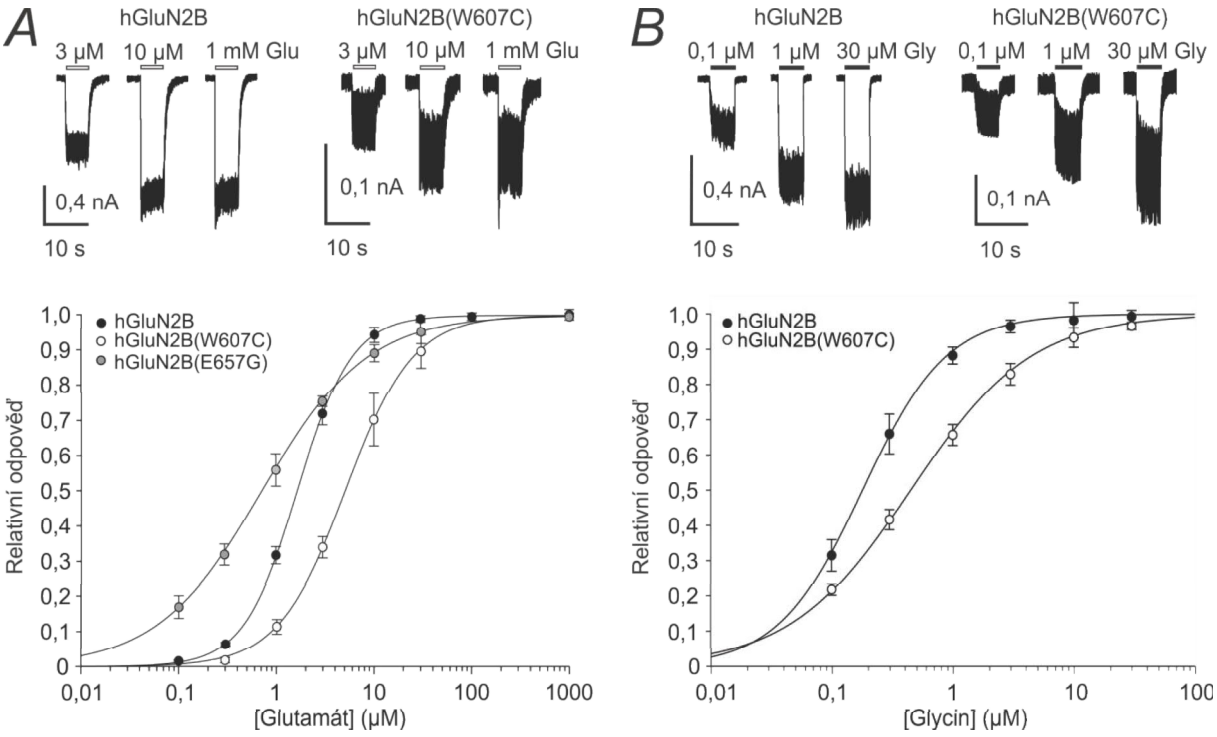
5.3.2 Mutace související s lidskými neurologickými poruchami snižují zdánlivou afinitu k agonistům

Analýza vlivu dávky na účinek glutamátu u mutovaných hGluN1/hGluN2B receptorů ukázala, že glutamát je přibližně 3,2-krát méně účinný v případě hGluN1/hGluN2B(W607C) receptorů a 2,3-krát účinnější na hGluN1/hGluN2B(E657G) receptorech, ve srovnání s nemutovanými receptory (**Tab. 5.3.2** a **Obr. 5.3.3*A***). Analýza vlivu dávky na účinek glycinu naznačuje, že hodnoty EC_{50} pro glycin byly přibližně 2-krát zvýšeny v případě hGluN1/hGluN2B(W607C) receptorů a přibližně 1,7-krát u hGluN1/hGluN2B(E657G) receptorů (**Tab. 5.3.2** a **Obr. 5.3.3*B***). Změna v hodnotě EC_{50} pro glutamát v případě hGluN1/hGluN2B(W607C) receptorů a pro glycin v případě hGluN1/hGluN2B(W607C) a hGluN1/hGluN2B(E657G) receptorů byla doprovázena také statisticky významným snížením hodnot Hillova koeficientu, což značí, že dochází ke změně míry kooperativity při vazbě agonistů na NMDA receptor (Weiss 1997).

Tabulka 5.3.2. Přehled hodnot EC_{50} pro glycin a glutamát u mutací v MD u hGluN2B podjednotky.

Receptor (hGluN1/)	**Glutamát**			**Glycin**		
	EC_{50} ± SEM[a] (μM)	***h* ± SEM**[a]	***n***	**EC_{50} ± SEM**[a] (μM)	***h* ± SEM**[a]	***n***
hGluN2B	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	15	0,22 ± 0,03	1,45 ± 0,11	9
hGluN2B(V558I)	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,2	5	0,22 ± 0,05	1,14 ± 0,05	5
hGluN2B(W607C)	5,1 ± 0,4*	1,3 ± 0,2	5	0,45 ± 0,08*	0,87 ± 0,05*	7
hGluN2B(V618G)	1,7 ± 0,2	1,2 ± 0,1	5	0,28 ± 0,03	1,43 ± 0,09	5
hGluN2B(E657G)	0,7 ± 0,1*	0,8 ± 0,1 *	9	0,39 ± 0,08*	0,97 ± 0,10*	5
hGluN2B(L825V)	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1	9	0,16 ± 0,01	1,26 ± 0,12	5

[a]*Hodnoty EC_{50} a Hillova koeficientu byly stanoveny z rovnice (R6) pro proudy vyvolané 0,3−30μM glutamátem v kontinuální přítomnosti 30μM glycinu, nebo 0,1−30μM glycinem aplikovaným společně s 1mM glutamátem. Statické porovnání bylo provedeno pro log EC50 log Hill hodnoty na hladině významnosti *P < 0,05 vůči nemutovaným receptorům (Jednofaktorová ANOVA; vícečetné srovnání vůči kontrole - Dunnettova metoda).*



Obrázek 5.3.3. Mutantní varianty hGluN2B podjednotky mění zdánlivou afinitu pro glutamát a glycin. **(*A*)** Reprezentativní záznamy odpovědí na aplikaci 3, 10 a 1000μM glutamátu (bílé obdélníky) v přítomnosti 30μM glycinu jsou ukázány pro nemutované hGluN1/hGluN2B a mutované hGluN1/hGluN2B(W607C) receptory. Křivka koncentrační závislosti pro účinek glutamátu na hGluN1/hGluN2B, hGluN1/hGluN2B(W607C) a hGluN1/hGluN2B(E657G) receptorech. **(*B*)** Reprezentativní záznamy odpovědí na 0,1, 1 a 30μM glycin (černé obdélníky) v přítomnosti 1mM glutamátu pro nemutované a hGluN1/hGluN2B(W607C) receptory. Křivka koncentrační závislosti účinku glycinu je znázorněna pro nemutované hGluN1/hGluN2B a mutované hGluN1/hGluN2B(W607C) receptory. Body v grafu

představují průměrné hodnoty relativních proudů z nejméně pěti nezávislých měření. Chybové úsečky představují SEM. Hodnoty EC_{50}, *h* a *n* pro glutamát a glycin jsou uvedeny v **Tabulce 5.3.2**.

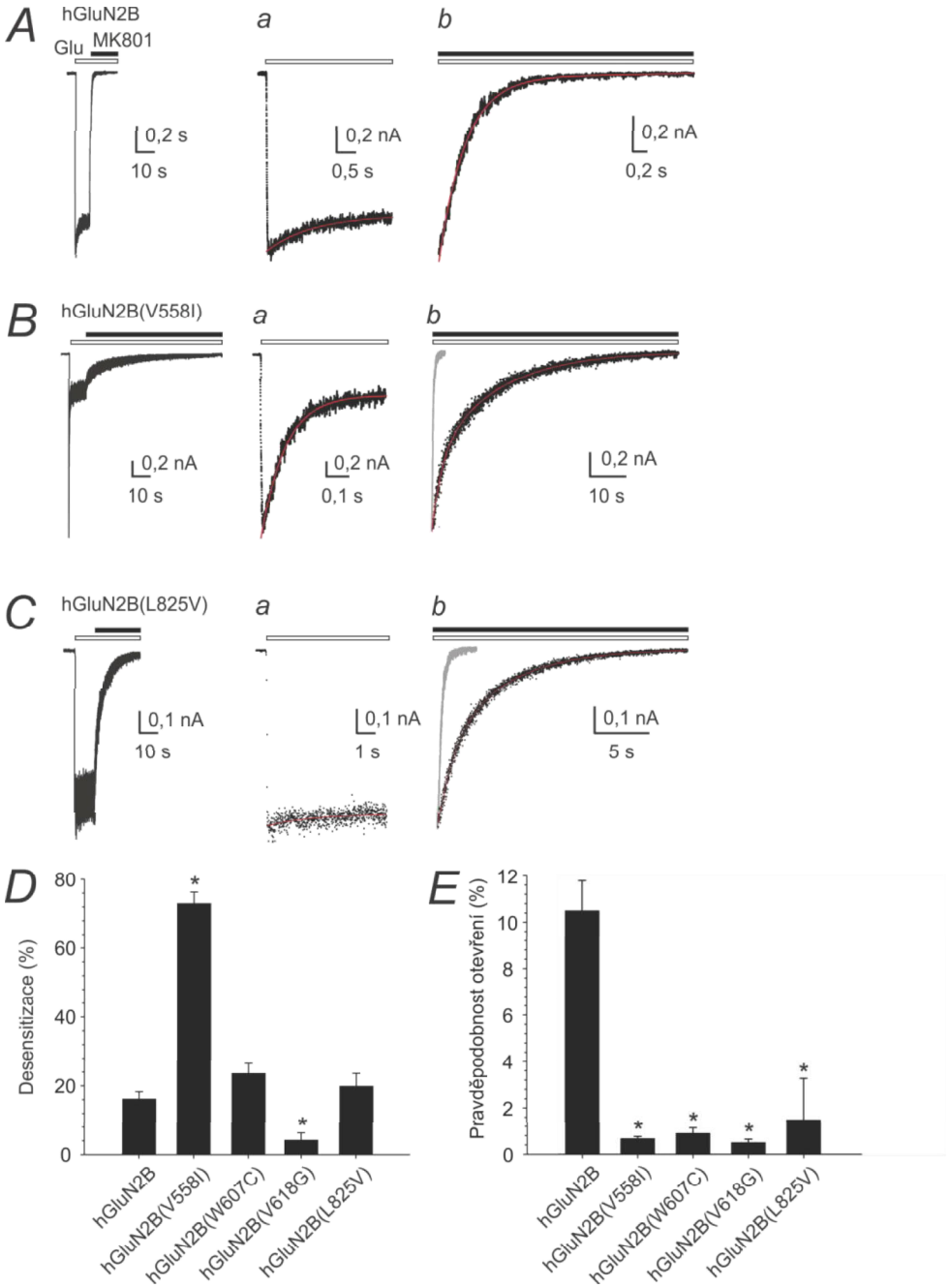
5.3.3 Mutace v MD u hGluN2B podjednotky mění desenzitizaci receptorů a snižují P_o iontového kanálu

Abychom stanovili vliv mutací v MD na desenzitizaci NMDA receptorů, byly hGluN1/hGluN2B receptory aktivovány saturující koncentrací glutamátu (1 mM) v kontinuální přítomnosti glycinu (30 μM). Analýza míry desenzitizace − časově závislého poklesu odpovědí (viz (R8)) ukázala, že nemutované receptory desenzitizuji přibližně z 16,1 % (**Obr. 5.3.4*A***). Míra desenzitizace u hGluN1/hGluN2B(V558I) receptorů byla signifikantně zvýšena na 72,9 % (**Obr. 5.3.4*B***), avšak v případě hGluN1/hGluN2B(L825V) receptorů nebyla míra desenzitizace významně ovlivněna (**Obr. 5.3.4*C***). Naproti tomu, hGluN1/hGluN2B(V618G) receptory desenzitizovaly pouze ze 4,1 % (**Obr. 5.3.4*D***).

Následně jsme analyzovali časový průběh nástupu desenzitizace a určili jsme hodnoty rychlostních konstant desenzitizace (k_d) a resenzitizace (k_r) za pomocí rovnic (R8-R10). Desenzitizace u nemutovaných receptorů byla charakterizována pomocí $k_d = 0{,}24 \pm 0{,}08\ s^{-1}$ a $k_r = 1{,}06 \pm 0{,}17\ s^{-1}$ ($n = 10$). Hodnota k_d byla významně zvýšena v případě hGluN1/hGluN2B(V558I) receptorů na $3{,}55 \pm 0{,}46\ s^{-1}$ ($n = 7$) a v případě hGluN1/hGluN2B(W607C) receptorů na $1{,}59 \pm 0{,}54\ s^{-1}$ ($n = 4$; Jednofaktorová ANOVA, $P < 0{,}001$; následováno vícečetným srovnáním vůči nemutovaným receptorům – Dunettova metoda, $P < 0{,}050$). Hodnota k_d, určená pro hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory ($0{,}43 \pm 0{,}16\ s^{-1}$; $n = 6$), nebyla významně odlišná od hodnoty k_d, určené pro nemutované receptory. Hodnota k_r byla statisticky významně zvýšená v případě hGluN1/hGluN2B(W607C) receptorů ($4{,}79 \pm 1{,}22\ s^{-1}$; $n = 4$; Jednofaktorová ANOVA, $P < 0{,}001$; následováno vícečetným srovnáním vůči nemutovaným receptorům – Dunettova metoda, $P < 0{,}050$). Hodnoty k_r určené pro hGluN1/hGluN2B(V558I) receptory ($1{,}29 \pm 0{,}28\ s^{-1}$; $n = 7$) a hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory ($1{,}47 \pm 0{,}20\ s^{-1}$; $n = 6$) se významně nelišily od hodnoty k_r, určené pro nemutované receptory. Nízká amplituda proudových odpovědí znemožnila detailní analýzu časového průběhu nástupu desenzitizace u hGluN1/hGluN2B(V618G) receptorů.

Abychom určili vliv mutací v MD u hGluN2B podjednotky na P_o iontového kanálu NMDA receptoru, byly nemutované a mutované receptory aktivovány saturující koncentrací glutamátu (1 mM) a rychlost nástupu blokády iontového kanálu prostřednictvím 1μM

MK-801 byla proložena kinetickým modelem pro určení P_o (viz **Kapitola 4.6.3**). Proložené křivky naznačují, že u hGluN1/hGluN2B(V558I) a hGluN1/hGluN2B(L825V) receptorů (**Obr. 5.3.4*B, C***) byl nástup blokády prostřednictvím MK-801 zpomalen, ve srovnání s nemutovanými receptory (**Obr. 5.3.4*A***). Výsledky analýzy ukázaly, že P_o byla snížena z hodnoty 10,5 % pro nemutované receptory na 0,66 % u hGluN1/hGluN2B(V558I) a 1,47 % u hGluN1/hGluN2B(L825V) receptorů. Podobné snížení P_o bylo pozorováno také u hGluN1/hGluN2B(W607C) a hGluN1/hGluN2B(V618G) receptorů (**Obr. 5.3.4*E***). Tato data naznačují, že *de novo* mutace v MD mění desenzitizaci a P_o iontového kanálu hGluN1/hGluN2B receptorů.



Obrázek 5.3.4. Mutace v MD mění desenzitizaci a P_o iontového kanálu hGluN1/hGluN2B receptorů. **(*A-C*)** Reprezentativní záznamy proudových odpovědí z **(*A*)** nemutovaných hGluN1/hGluN2B a mutovaných **(*B*)** hGluN1/hGluN2B(L825V) a **(*C*)** hGluN1/hGluN2B(V558I) receptorů, vyvolaných rychlou aplikací 1mM glutamátu (v kontinuální přítomnosti 30μM glycinu) a jejich blokáda prostřednictvím 1μM MK-801 (délka aplikace MK-801 a glutamátu je vyznačena plnými a prázdnými obdélníky). Panely **(*Aa-Ca*)** ukazují odpověď na glutamát v rozšířeném časovém měřítku. Panely **(*Ab-Cb*)** ukazují nástup blokády prostřednictvím MK-801 v rozšířeném časovém měřítku. **(*D-E*)** Grafy zobrazují souhrn průměrných hodnot ± SEM (*n*) pro **(*D*)** míru desenzitizace a **(*E*)** P_o iontového kanálu u nemutovaných a mutovaných hGluN1/hGluN2B receptorů. Průměrné hodnoty míry desenzitizace a P_o stanovené pro nemutované a mutované receptory se významně lišily na hladině $P < 0{,}001$ (Kruskal-Wallisova Jednofaktorová ANOVA); následný Mann-Whitney Rank Sum Test nebo nepárový Studentův t-test byl použit pro statistické porovnání vůči nemutovaným receptorům; *$P < 0{,}001$.

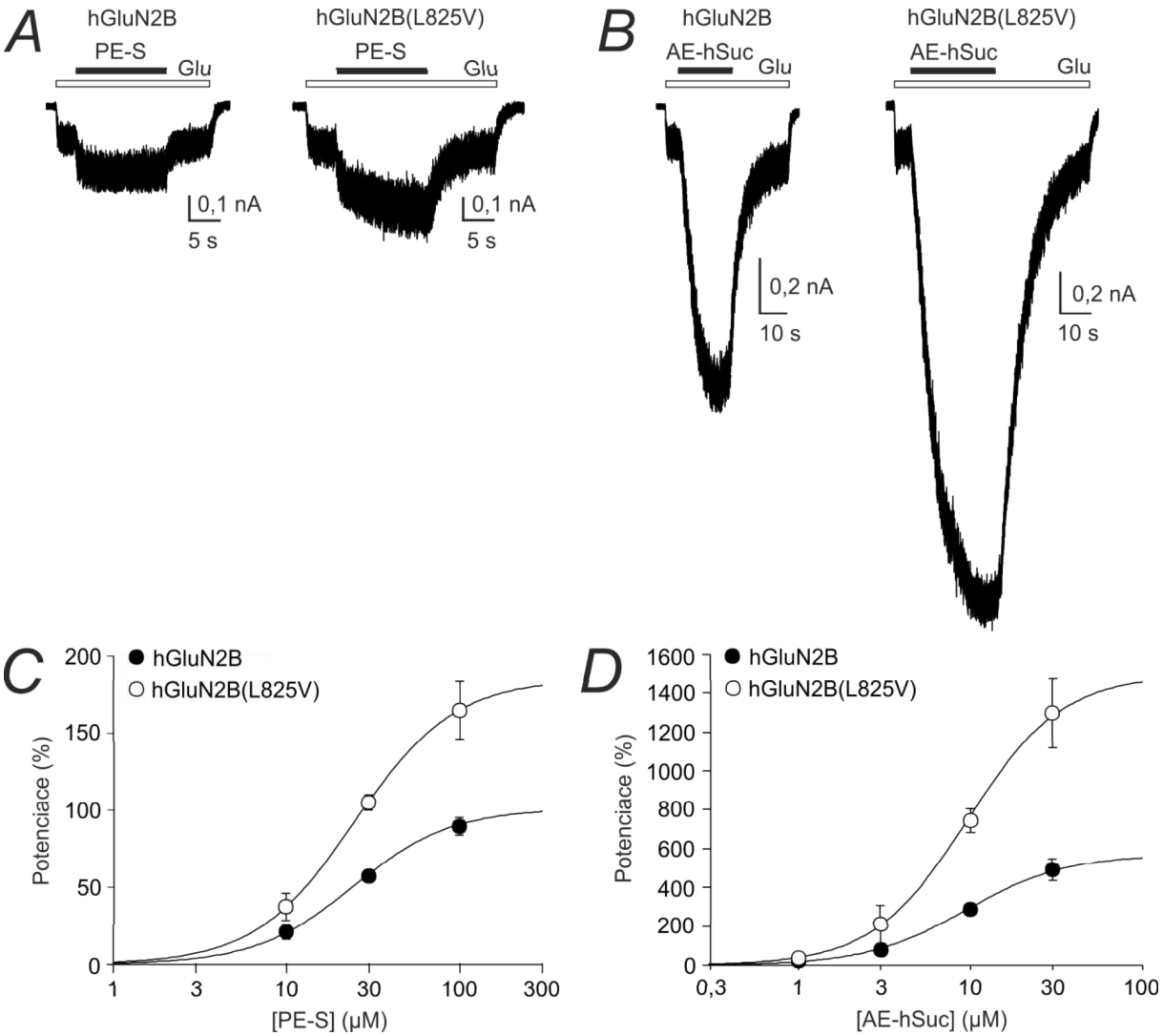
5.3.4 Mutace L825V má zvýšenou citlivost vůči endogenním a syntetickým steroidům

Na nemutovaných hGluN1/hGluN2B receptorech a mutovaných hGluN1/hGluN2B(V558I, W607C, V618G, L825V) receptorech se sníženou P_o jsme zkoumali potenciační účinek endogenního neurosteroidu **PE-S**, a jeho účinnějšího syntetického analogu, androsten hemisukcinátu (**AE-hSuc**; viz látka **15.4**) (Krausova et al 2018), neboť z předchozích studií je známo, že potenciační účinek **PE-S** je specificky zprostředkován zvýšením P_o (Horak et al 2004, Korinek et al 2011). Receptory byly aktivovány 30μM glycinem a nízkou koncentrací glutamátu (1 μM), z důvodu „disuse-dependentního“ působení obou steroidů (Horak et al 2004, Krausova et al 2018). Analýza ukázala (**Tab. 5.3.3**), že hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory byly signifikantně více potencovány **PE-S** (100 μM) a **AE-hSuc** (30 μM), než odpovědi nemutovaných receptorů (**Obr. 5.3.5*A,B***). Odpovědi hGluN1/hGluN2B(V558I, W607C, V618G) receptorů byly **PE-S** a **AE-hSuc** potencovány v rozsahu, který se významně nelišil od potenciace stanovené pro nemutované receptory (**Tab. 5.3.3**). Analýza vlivu dávky na účinek **PE-S** a **AE-hSuc** u nemutovaných a mutovaných hGluN1/hGluN2B(L825V) receptorů naznačila, že zvýšená potenciace v případě hGluN1/hGluN2B(L825V) receptorů je důsledkem zvýšení efektivity obou steroidů, spíše než jejich zdánlivé afinity (**Obr. 5.3.5*C,D*** a **Tab. 5.3.4**).

Tabulka 5.3.3. Přehled potenciačního účinku **PE-S** a **AE-hSuc** u mutovaných receptorů se sníženou P_o.

Receptor (hGluN1/)	**PE-S**[a] (100 μM) (%)	**AE-hSuc**[a] (30 μM) (%)
hGluN2B	85 ± 4 (31)	575 ± 69 (18)
hGluN2B(V558I)	59 ± 8 (5); P = 0,117	685 ± 67 (6); P = 0,448
hGluN2B(W607C)	73 ± 16 (8); P = 0,412	406 ± 49 (8); P = 0,489
hGluN2B(V618G)	96 ± 10 (8); P = 0,542	509 ± 61 (5); P = 0,966
hGluN2B(L825V)	197 ± 36 (9); P < 0,001	1647 ± 425 (7); P < 0,001

[a]*Data značí průměr ± SEM (n) odpovídající počtu buněk. Hodnota P určuje významnost v porovnání s nemutovanými hGluN1/hGluN2B receptory (nepárový Studentův t-test).*



Obrázek 5.3.5. hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory mají zvýšenou citlivost vůči steroidům. Reprezentativní záznamy jsou zobrazeny pro nemutované a hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory. **(*A*) PE-S** (100 μM) a **(*B*) AE-hSuc** (30 μM) potencovaly odpovědi nemutovaných receptorů vyvolané koaplikací steroidů s 1μM glutamátem (v kontinuální přítomnosti 30μM glycinu) z 85 % a 575 %, respektive (délka aplikace steroidů a glutamátu je vyznačena plnými a prázdnými obdélníky). Oba steroidy potencovaly odpovědi hGluN1/hGluN2B(L825V) receptorů přibližně 2-krát více, než v případě nemutovaných receptorů. Křivky koncentrační závislosti účinku **(*C*) PE-S** (1−100 μM) a **(*D*) AE-hSuc** (0,3−30 μM) pro nemutované a

hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory aktivované 1μM glutamátem v kontinuální přítomnosti 30μM glycinu. Parametry z analýzy vlivu dávky na účinek steroidů získané proložením dat rovnicí (R5) jsou uvedeny v **Tabulce 5.3.4**.

Tabulka 5.3.4. Parametry z analýzy vlivu dávky na potenciační účinek **PE-S** a **AE-hSuc** u nemutovaných a hGluN1/hGluN2B(L825V) receptorů aktivovaných 1μM glutamátem.

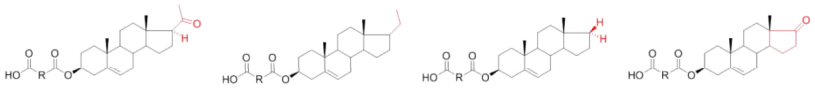
Receptor (hGluN1/)	**E_{max} ± SEM**[a] (%)	**EC_{50} ± SEM**[a] (μM)	***h* ± SEM**[a]	***n***
PE-S				
hGluN2B	101 ± 9	24,3 ± 1,8	1,54 ± 0,08	7
hGluN2B(L825V)	185 ± 50	24,8 ± 1,2	1,52 ± 0,12	5
Nepárový Studentův t-test	**P = 0,030**	P = 0,842	P = 0,907	
AE-hSuc				
hGluN2B	570 ± 57	9,5 ± 1,0	1,50 ± 0,16	6
hGluN2B(L825V)	1492 ± 514	9,6 ± 2,3	1,58 ± 0,36	6
Nepárový Studentův t-test	**P = 0,026**	P = 0,961	P = 0,786	

[a]*Míra potenciace (E) proudových odpovědí mutovaných a nemutovaných hGluN1/hGluN2B receptorů, zaznamenaných v přítomnosti **PE-S** (1−100 μM) a **AE-hSuc** (0,3−30 μM) byla stanovena pro jednotlivé buňky a data byla proložena rovnici (R5). Statistické porovnání účinnosti **PE-S** a **AE-hSuc** pro jednotlivé receptory bylo provedeno pro hodnoty log EC50 a log Hill (nepárový Studentův t-test); hladina $P \leq 0,05$ byla použita pro stanovení významnosti, jak je vyznačeno tučným písmem.*

5.4 SAR studie pro C3-hemiesterové analogy neurosteroidů s potenciačním účinkem na NMDA receptorech

V dané části dizertační práce byla našim cílem optimalizace potenciačního účinku neurosteroidů na NMDA receptorech za použití SAR studie pro hemiesterové analogy **PE-S** (látky **2.4-24.4**) se strukturními modifikacemi, zahrnujícími různou délku substituentu na C3 a různé typy zbytků na C17 u D-kruhu steroidního jádra (viz **Tab. 5.4.1**). Biologická aktivita pro látky **2.4-24.4** byla stanovena měřením z HEK293 buněk, transfekovaných pomocí cDNA kódující podjednotky GluN1/GluN2B receptorů. Výsledky, uvedené v této kapitole jsou součástí publikace uveřejněné v časopise *Journal of Medicinal Chemistry* (Krausova et al 2018).

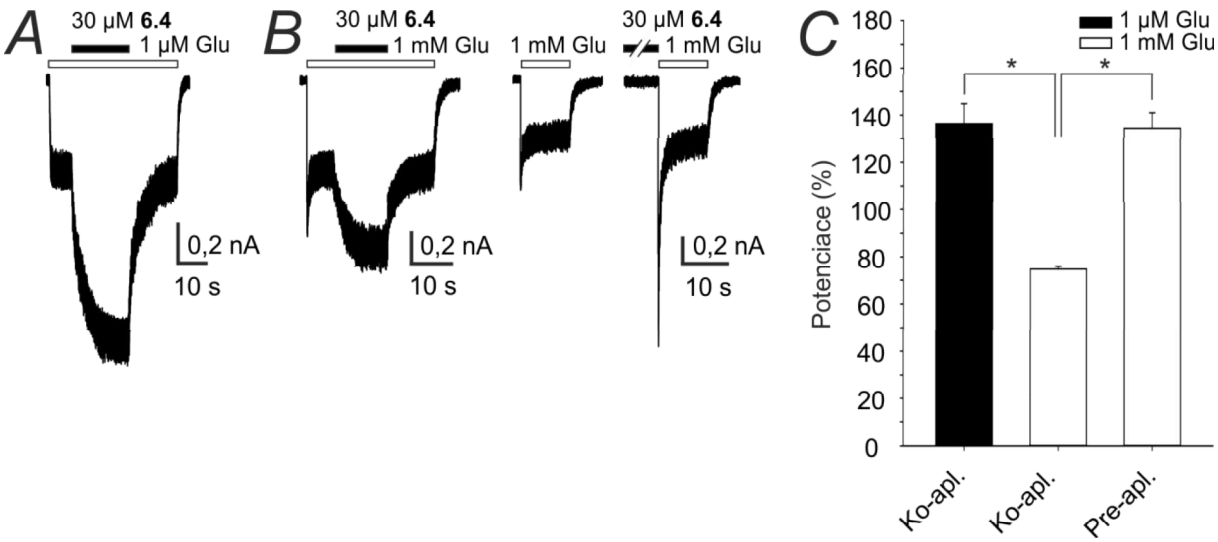
Tabulka 5.4.1. Struktury C3-hemiesterových analogů - látky **2.4-24.4**.



Steroidy / C3 Zbytek	20-Oxo-pregn-5-eny	Pregn-5-eny	Androst-5-eny	17-Oxo-androst-5-eny
C_2 (hemiOxalát), R = žádný	2.4 (20-Oxo-PE-hOxa)	-	-	-
C_3 (hemiMalonát), R = CH_2	3.4 (20-Oxo-PE-hMal)	9.4 (PE-hMal)	14.4 (AE-hMal)	-
C_4 (hemiSukcinát), R = $(CH_2)_2$	4.4 (20-Oxo-PE-hSuc)	10.4 (PE-hSuc)	15.4 (AE-hSuc)	-
C_5 (hemiGlutarát), R = $(CH_2)_3$	5.4 (20-Oxo-PE-hGlu)	11.4 (PE-hGlu)	16.4 (AE-hGlu)	19.4 (17-Oxo-AE-hGlu)
C_6 (hemiAdipát), R = $(CH_2)_4$	6.4 (20-Oxo-PE-hAdi)	12.4 (PE-hAdi)	17.4 (AE-hAdi)	20.4 (17-Oxo-AE-hAdi)
C_7 (hemiPimelát), R = $(CH_2)_5$	7.4 (20-Oxo-PE-hPim)	13.4 (PE-hPim)	18.4 (AE-hPim)	21.4 (17-Oxo-AE-hPim)
C_8 (hemiSuberát), R = $(CH_2)_6$	8.4 (20-Oxo-PE-hSub)	-	-	22.4 (17-Oxo-AE-hSub)
C_9 (hemiAzelát), R = $(CH_2)_7$	-	-	-	23.4 (17-Oxo-AE-hAze)
C_{10} (hemiSebakát), R = $(CH_2)_8$	-	-	-	24.4 (17-Oxo-AE-hSeb)

5.4.1 Modulační účinek látek 2.4-24.4 na proudy NMDA receptorů

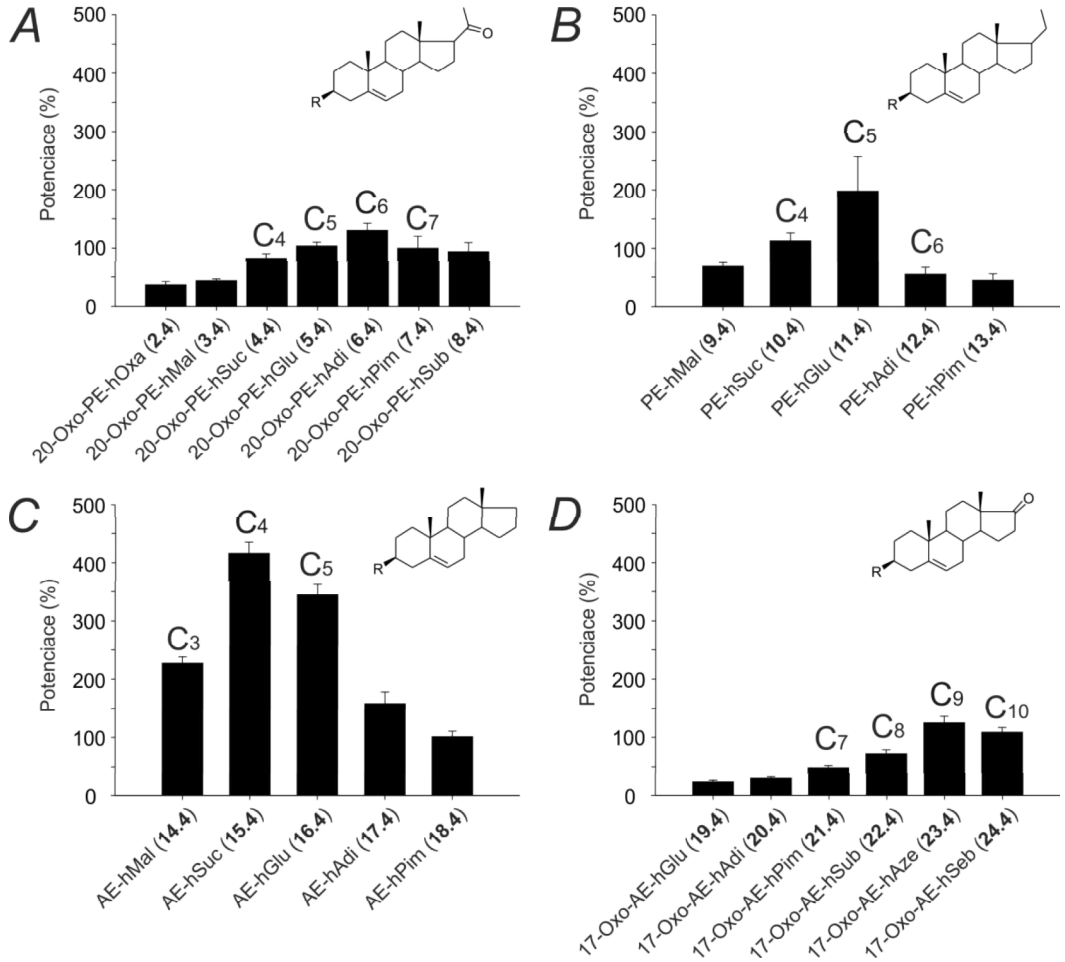
Na **Obrázku 5.4.1** je ukázáno, že látka **6.4** potencuje odpovědi GluN1/GluN2B receptorů. Míra potenciace je však ovlivněna relativním načasováním aplikace látky a glutamátu, a navíc závisí na koncentraci glutamátu. Odpovědi vyvolané 1μM glutamátem byly potencovány ze 136 ± 8 % (n = 10) v případě, že látka **6.4** byla aplikována současně s agonistou. Míra potenciace byla pouze 75 ± 1 % (n = 6), když byla látka **6.4** aplikována spolu se saturující koncentrací glutamátu (1 mM). Odpovědi na 1mM glutamát byly potencovány ze 134 ± 7% (n = 8), pokud byla látka **6.4** preaplikována před glutamátem, a to v rozsahu, který se statisticky významně nelišil od potenciace, vyvolané při nízké koncentraci glutamátu (nepárový Studentův t-test; P = 0,398; **Obr. 5.4.1*A-C***). V následujících experimentech jsme proto využili současnou aplikaci látky s 1μM glutamátem.



Obrázek 5.4.1. Potenciační účinek látky **6.4** na GluN1/GluN2B receptorech. Ukázky záznamů získaných z HEK293 buněk přechodně exprimujících GluN1/GluN2B receptory. **(*A*)** Látka **6.4** (30 μM) byla aplikována současně s 1μM glutamátem (délka aplikace látky **6.4** a glutamátu je vyznačena plnými a prázdnými obdélníky). **(*B*)** Látka **6.4** (30 μM) byla buď koaplikována (nalevo), nebo preaplikována před 1mM glutamátem (kontrolní a potencovaná odpověď napravo). **(*C*)** Sloupcové grafy ukazují míru potenciace vyvolanou látkou **6.4** (30 μM) při koaplikaci s 1μM glutamátem (prázdný sloupec), nebo ko- a preaplikaci s 1mM glutamátem (plné sloupce). Hvězdičky značí významnost na $P \leq 0{,}001$ hladině (nepárový Studentův t-test).

5.4.2 Vliv substituentů na uhlících C3 a C17 steroidního jádra u látek 2.4-24.4 na jejich modulační účinek na NMDA receptorech

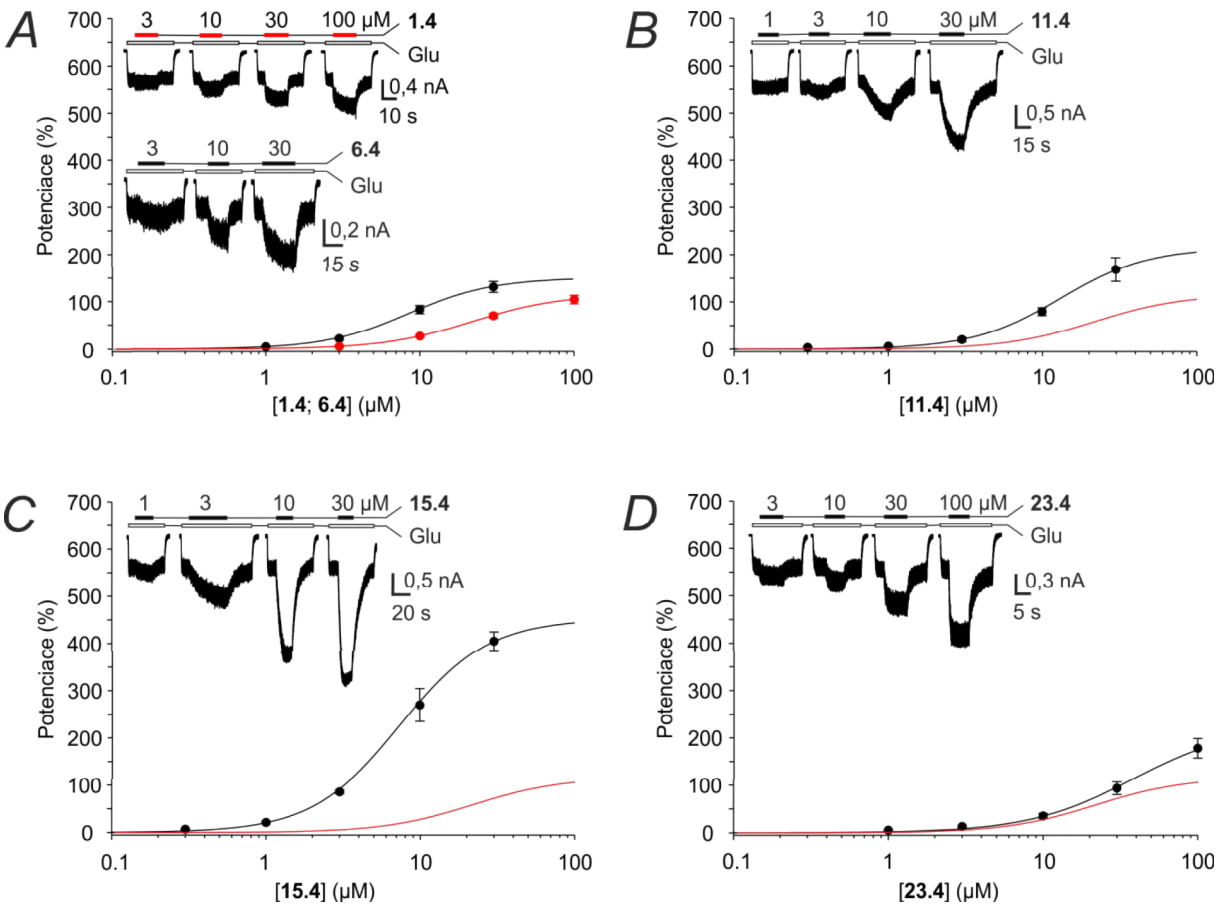
Abychom určili, zda látky **2.4-24.4** potencují odpovědi GluN1/GluN2B receptorů, testovali jsme nejprve jejich účinek při jedné koncentraci (30 μM). **Obrázek 5.4.2** ukazuje SAR pro řadu 20-oxo-pregn-5-enů (**2.4-8.4**), pregn-5-enů (**9.4-13.4**), androst-5-enů (**14.4-18.4**) a 17-oxo-androst-5-enů (**19.4-24.4**). Z výsledků vyplývá, že všechny testované látky mají potenciační působení na GluN1/GluN2B receptorech. Výsledky dále ukazují, že existuje optimální délka substituentů na C3 spolu s modifikací na C17 u D-kruhu steroidního jádra pro dosažení požadovaného biologického účinku. Po odstranění 20-oxo substituentu z **20-Oxo-PE-hAdi** (látky **6.4**) byl nejúčinnějším pozitivním modulátorem **PE-hGlu** (látka **11.4**), který má C3-skupinu s šesti atomy uhlíku. Analogicky, pokud steroidní kostra nese acylový substituent na C17, nejúčinnějším PAM je **AE-hSuc** (látka **15.4**), který má C3-skupinu se čtyřmi uhlíky.



Obrázek 5.4.2. Účinek látek **2.4-24.4** na proudové odpovědi GluN1/GluN2B receptorů. Sloupcové grafy ukazují změny v odpovědi na aplikaci látek **2.4-24.4** při koncentraci 30 μM. Čísla nad sloupci označují počet uhlíků v řetězci pro konkrétní C3-hemiesterový zbytek. ***(A)*** 18-Oxo-pregn-5-en-3β-yl hemiestery. ***(B)*** Pregn-5-en-3β-yl hemiestery. ***(C)*** Androst-5-en-3β-yl hemiestery. ***(D)*** 17-Oxo-androst-5-en-3β-yl hemiestery. Statistická analýza ukazuje, že průměrné hodnoty potenciace, vyvolané látkami (**2.4-8.4**, **9.4-13.4**, **14.4-18.4** a **19.4-24.4**), se v rámci jednotlivých strukturních skupin významně liší na hladině významnosti $P < 0{,}001$ (Jednofaktorová ANOVA).

Následně jsme provedli analýzu vlivu dávky na potenciační účinek u látek **1.4-24.4** na GluN1/GluN2B receptorech aktivovaných 1μM glutamátem. **Obrázek 5.4.3*A*** ukazuje analýzu vlivu dávky na potenciační účinek pro endogenní neurosteroid **PE-S** (látka **1.4**). Proložení dat rovnicí (R5) poskytlo pro **PE-S** (3-100 μM) hodnoty $E_{max} = 116 \pm 10$ % a $EC_{50} = 21{,}7 \pm 1{,}6$ μM ($h = 1{,}5 \pm 0{,}1$, $n = 8$). Hodnoty E_{max} a EC_{50} pro látky **2.4-24.4** jsou uvedeny v **Tabulce 5.4.2**. Látky **2.4-8.4** a **21.4-24.4** byly měřeny do koncentrace 100 μM a látky **19.4-20.4** až do koncentrace 300 μM. Látky **9.4-18.4** byly měřeny do koncentrace 30 μM z důvodu jejich omezené rozpustnosti. Výsledky ukazují (viz **Tab. 5.4.2**), že z 23 testovaných hemiesterových analogů − 12 mělo statisticky významně vyšší hodnoty E_{max}

(látky **4.4-5.4**, **11.4**, **14.4-17.4** a **20.4-24.4**) a 10 mělo statisticky významně nižší hodnoty EC_{50} (látky **6.4**, **9.4-11.4**, **14.4-18.4** a **24.4**) při potenciaci aktivity GluN1/GluN2B receptorů, ve srovnání s endogenním **PE-S**.



Obrázek 5.4.3. Analýza vlivu dávky na účinek látek **1.4-24.4** na GluN1/GluN2B receptorech. Grafy znázorňují křivky koncentrační závislosti pro potenciační účinek látek: **(*A*) PE-S (1.4)** (červeně) a **20-Oxo-PE-hAdi** (**6.4**), **(*B*) PE-hGlu** (**11.4**), **(*C*) AE-hSuc** (**15.4**) a **(*D*) 17-Oxo-AE-hAze** (**23.4**) na GluN1/GluN2B receptorech. Červená křivka v **(*B-D*)** reprezentuje koncentrační závislost účinku **PE-S**, pro srovnání. Body v grafu představují průměrné hodnoty potenciace získané z nejméně pěti nezávislých měření. Chybové úsečky představují SEM. Míra potenciace glutamátových odpovědí, zaznamenaná v přítomnosti látky **1.4** (3-100 µM), **6.4** (1-30 µM), **11.4** (0,3-30 µM), **15.4** (0,3-30 µM) a **23.4** (1-100 µM), byla stanovena pro jednotlivé buňky a data byla proložena logistickou rovnicí (R5). Vloženy jsou ukázky záznamů proudových odpovědí získaných z HEK293 buněk transfekovaných cDNA kódující podjednotky GluN1/GluN2B receptorů. Látky **1.4, 6.4, 11.4, 15.4** a **23.4** byly aplikovány současně s 1µM glutamátem (délka trvání aplikace látky a glutamátu je vyznačena plnými a prázdnými obdélníky, **PE-S(1.4)** červeně).

Tabulka 5.4.2. Parametry z analýzy vlivu dávky na potenciační účinek látek **2.4-24.4** na odpovědi GluN1/GluN2B receptorů aktivovaných 1μM glutamátem.

Látka	E_{max} ± SEM[a] (%)	EC_{50} ± SEM[a] (μM)	*h* ± SEM[a]	*n*
20-Oxo-PE-hOxa (2.4)	93 ± 25	48,6 ± 12,4*	1,3 ± 0,0	5
20-Oxo-PE-hMal (3.4)	108 ± 15	39,8 ± 10,3	1,3 ± 0,1	5
20-Oxo-PE-hSuc (4.4)	177 ± 46*	27,6 ± 12,1	1,5 ± 0,2	4
20-Oxo-PE-hGlu (5.4)	183 ± 25*	19,0 ± 3,4	1,4 ± 0,1	4
20-Oxo-PE-hAdi (6.4)	151 ± 16	8,5 ± 1,0**	1,6 ± 0,1	10
20-Oxo-PE-hPim (7.4)	191 ± 63	18,0 ± 7,9	1,4 ± 0,2	5
20-Oxo-PE-hSub (8.4)	156 ± 30	19,3 ± 1,7	1,5 ± 0,1	5
Jednofaktorová ANOVA	P = 0,346	**P < 0,001**	P = 0,494	
PE-hMal (9.4)	71 ± 7*	10,7 ± 0,8**	1,5 ± 0,2	7
PE-hSuc (10.4)	133 ± 19	9,9 ± 5,2*	1,4 ± 0,2	6
PE-hGlu (11.4)	209 ± 22*	9,9 ± 3,7*	1,8 ± 0,3	5
PE-hAdi (12.4)	60 ± 12*	17,2 ± 4,5	1,5 ± 0,4	4
PE-hPim (13.4)	48 ± 11*	26,2 ± 8,1	1,4 ± 0,4	4
Jednofaktorová ANOVA	**P = 0,002**	P = 0,080	P = 0,820	
AE-hMal (14.4)	236 ± 27**	4,7 ± 1,0**	1,4 ± 0,2	4
AE-hSuc (15.4)	452 ± 46*	7,4 ± 0,4**	1,5 ± 0,1	5
AE-hGlu (16.4)	348 ± 32**	5,2 ± 1,2**	1,7 ± 0,2	7
AE-hAdi (17.4)	191 ± 10**	2,8 ± 0,5**	1,7 ± 0,5	5
AE-hPim (18.4)	109 ± 13	1,8 ± 0,3**	1,8 ± 0,3	4
Jednofaktorová ANOVA	**P <0,001**	**P < 0,001**	P = 0,892	
17-Oxo-AE-hGlu (19.4)	154 ± 34	151,4 ± 32,7**	1,2 ± 0,1	4
17-Oxo-AE-hAdi (20.4)	180 ± 17*	108,9 ± 20,2**	1,4 ± 0,1	7
17-Oxo-AE-hPim (21.4)	187 ± 27*	82,4 ± 16,9**	1,2 ± 0,1	7
17-Oxo-AE-hSub (22.4)	189 ± 35*	49,1 ± 13,7**	1,4 ± 0,2	5
17-Oxo-AE-hAze (23.4)	226 ± 45*	38,2 ± 14,5	1,3 ± 0,2	5
17-Oxo-AE-hSeb (24.4)	165 ± 11*	16,1 ± 0,9*	1,6 ± 0,2	5
Jednofaktorová ANOVA	P = 0,654	**P < 0,001**	P = 0,661	

[a]*Míra potenciace (E) proudových odpovědí GluN1/GluN2B receptorů, zaznamenaných v přítomnosti dané látky v koncentracích 0,3-30 μM (pro látky **9.4-18.4**), 1-100 μM (u látek **2.4-8.4** a **21.4-24.4**) a 1-300 μM (u látek **19.4** a **20.4**) byla stanovena pro jednotlivé buňky a data byla proložena rovnici (R5). Statistické porovnání účinnosti látek (**2.4-8.4**, **9.4-13.4**, **14.4-18.4** a **19.4-24.4**) v rámci jednotlivých strukturních skupin bylo provedeno pro hodnoty log EC50 a log Hill (Jednofaktorová ANOVA); hladina P ≤ 0,05 byla použita pro stanovení významnosti, jak je vyznačeno tučným písmem. Nepárový Studentův t-test byl použit pro statistické porovnání hodnot Emax a logEC50 u látek **2.4-24.4** vůči **PE-S** (**1.4**; *P = 0,001 - 0,050; **P < 0,001).*

Z analýzy vlivu dávky na potenciační účinek vyplývá (**Tab. 5.4.2**), že látky **2.4-8.4** ze série 20-oxo-pregn-5-enů vykazují v rámci dané strukturní skupiny podobné hodnoty E_{max} (E_{max} se pohybovala od 93 % pro nejméně efektivní látku **2.4** do 191 % pro nejefektivnější látku **7.4**). Naproti tomu, hodnoty EC_{50} se u látek **2.4-8.4** významně liší, přičemž látka **6.4** (EC_{50} = 8,5 μM; viz **Obr. 5.4.3*A***) s nejvyšší zdánlivou afinitou je až 6-násobně účinnější při potenciaci GluN1/GluN2B receptorů, ve srovnání s látkou **2.4** s nejnižší zdánlivou afinitou (EC_{50} = 48,5 μM). Analýza vlivu dávky na potenciační účinek dále ukázala, že látky **4.4-7.4** při koncentraci 100 μM potencovaly více, než bychom očekávali z analýzy jejich potenciačního účinku při koncentracích 1−30 μM. Míra potenciace (*E*) vyvolaná danými látkami při koncentraci 100 μM byla: 267 ± 47 % (n = 4) v případě látky **4.4**, 460 ± 17 % (n = 4) u látky **5.4**, 614 ± 56 % (n = 10) pro látku **6.4** a 458 ± 119 % (n = 4) v případě látky **7.4**. U látek **1.4-3.4** a **8.4-24.4** nebyla tato zvýšená míra potenciace při 100 μM pozorována. Důvod zvýšené míry potenciace u látek **4.4-7.4** při saturující koncentraci není znám, a dále jsme ho podrobněji nezkoumali.

Abychom posoudili význam 20-oxo skupiny na D-kruhu pro potenciační působení steroidů na GluN1/GluN2B receptorech, byla syntetizována série pregn-5-enů (látky **9.4-13.4**). Je zajímavé, že látky v rámci této série vykazují více než 4-násobný rozdíl v hodnotách E_{max} (od 48 % pro nejméně efektivní látku **13.4** do 209 % pro nejefektivnější látku **11.4**; viz **Obr. 5.4.3*B***), přičemž hodnoty EC_{50} se pohybovaly od 9,9 μM pro látku **11.4** s nevyšší zdánlivou afinitou do 26,2 μM pro látku **13.4** s nejnižší zdánlivou afinitou (viz **Tab. 5.4.2**).

Dále jsme analyzovali sérii androst-5-enů (látky **14.4-18.4**), postrádajících substituent v pozici C17 na D-kruhu steroidního jádra. **AE-hSuc** (látka **15.4**) byl stanoven jako nejefektivnější PAM v rámci této série s hodnotou E_{max} = 452 % (viz **Obr. 5.4.3*C***), přibližně 4,5-krát vyšší, než v případě nejméně efektivní látky **18.4** (E_{max} = 109 %). Celkově byly látky **14.4-18.4** shledány jako nejvíce účinné PAM ze všech testovaných látek **2.4-24.4**, neboť hodnoty EC_{50} se pohybovaly v rozmezí od 1,8 μM pro látku **18.4** s nevyšší zdánlivou afinitou do 7,4 μM pro látku **15.4** s nejnižší zdánlivou afinitou z této série (viz **Tab. 5.4.2**).

Následně jsme testovali skupinu 17-oxo analogů (látky **19.4-24.4**), se 17-oxo skupinou na D-kruhu steroidního jádra. Látky **19.4-24.4** vykazovaly podobné hodnoty E_{max} v rámci této strukturní skupiny (od 154 % pro nejméně efektivní látku **19.4** do 226 % pro nejefektivnější látku **23.4**; viz **Obr. 5.4.3*D***). Hodnoty EC_{50} se však u látek **19.4-24.4** statisticky významně

liší, přičemž vykazují až 9-násobné snížení zdánlivé afinity v případě látky **24.4** (EC_{50} = 16,1 μM), ve srovnání se látkou **19.4** (EC_{50} = 151,4 μM; viz **Tab. 5.4.2**).

5.4.3 Účinek 20-Oxo-PE-hAdi (6.4) na rekombinantních GluN1/GluN2A-D receptorech

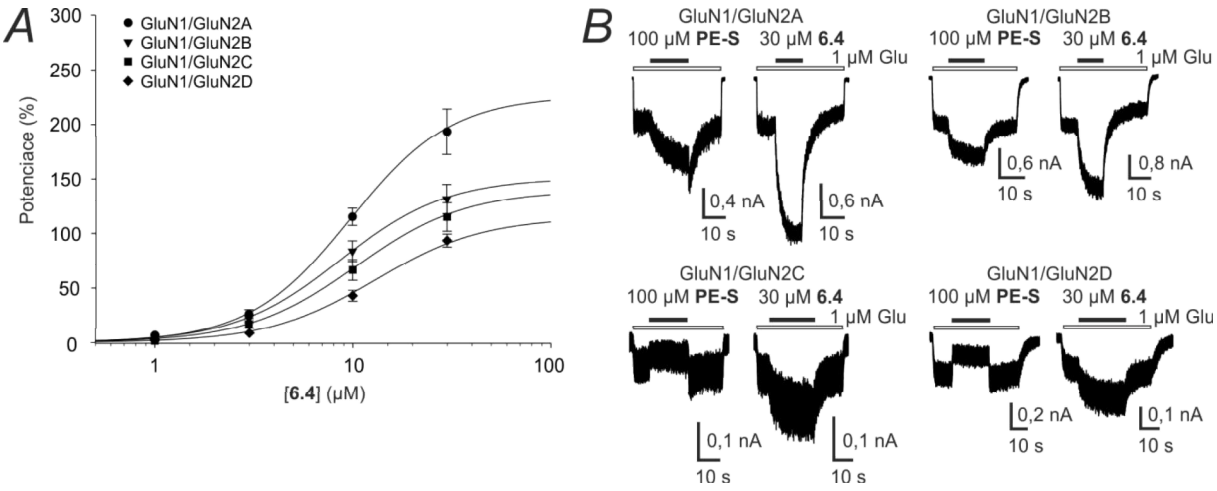
20-Oxo-PE-hAdi (látka **6.4**) byl vybrán z knihovny látek **2.4-24.4**, pro další testování. K prozkoumání selektivity **20-Oxo-PE-hAdi** (látky **6.4**) pro jednotlivé podjednotky NMDA receptorů byla cDNA kódující GluN1 a GluN2A-D podjednotky kotransfekována do HEK293 buněk. Analýza vlivu dávky na potenciační účinek látky **6.4** (1−30 μM) na GluN1/GluN2A-D receptorech neukázala pro jednotlivá podjednotková složení statisticky významný rozdíl v hodnotách E_{max} ani EC_{50} (**Tab. 5.4.3 a Obr. 5.4.4*A***).

Následně jsme srovnávali účinek **20-Oxo-PE-hAdi** (**6.4**) a endogenního **PE-S** na rekombinantních GluN1/GluN2A-D receptorech (**Obr. 5.4.4*B***). Z výsledků je patrné, že látka **6.4** (30 μM) potencuje všechny podjednotkové kombinace GluN1/GluN2A-D receptorů (míra potenciace byla: 192 ± 21 % pro GluN1/GluN2A, 137 ± 11 % pro GluN1/GluN2B, 118 ± 17 % pro GluN1/GluN2C a 88 ± 11 % pro GluN1/GluN2D receptory; n = 6). **PE-S** (100 μM) potencoval odpovědi GluN1/GluN2A-B receptorů (107 ± 17 % (n = 4) pro GluN1/GluN2A a 78 ± 4 % (n = 13) pro GluN1/GluN2B), zatímco inhiboval odpovědi GluN1/GluN2C-D receptorů (-47 ± 4 % pro GluN1/GluN2C a -48 ± 3 % pro GluN1/GluN2D; n = 4).

Tabulka 5.4.3. Analýza vlivu dávky na potenciační účinek **20-Oxo-PE-hAdi** (látky **6.4**) na odpovědi GluNl/GluN2A-D receptorů vyvolané aplikací 1μM glutamátu v HEK293 buňkách.

Receptor	**E_{max} ± SEM[a] (%)**	**EC_{50} ± SEM[a] (μM)**	**h ± SEM[a]**	***n***
GluN1/GluN2A	203 ± 43	8,9 ± 1,4	1,7 ± 0,2	*7*
GluN1/GluN2B	157 ± 16	9,1 ± 1,1	1,7 ± 0,1	*8*
GluN1/GluN2C	145 ± 39	10,4 ± 3,5	1,7 ± 0,2	*6*
GluN1/GluN2D	115 ± 9	13,0 ± 1,9	1,7 ± 0,3	*5*
Jednofaktorová ANOVA	P = 0,363	P = 0,520	P = 0,997	

[a]*Míra potenciace odpovědí (E) vyvolaných glutamátem v přítomnosti látky **6.4** (1-30 μM) byla stanovena v jednotlivých buňkách a data byla proložena rovnicí (R5). Statistické porovnání účinku látky **6.4** na GluNl/GluN2A-D receptorech bylo provedeno pro hodnoty log EC50 a log Hill (Jednofaktorová ANOVA); hladina P ≤ 0,05 byla použita pro stanovení významnosti, jak je vyznačeno tučným písmem.*



Obrázek 5.4.4. Vliv **PE-S** (**1.4**) a **20-Oxo-PE-hAdi** (**6.4**) na odpovědi GluN1/GluN2A-D receptorů. **(*A*)** Křivky koncentrační závislosti pro účinek látky **6.4** (1-30 μM) na GluN1/GluN2A-D receptorech. **(*B*)** Ukázky záznamů získaných z HEK293 buněk transfekovaných cDNA kódující podjednotky GluN1/GluN2A-D receptorů. **PE-S** (100 μM) a látka **6.4** (30 μM) byly aplikovány současně s 1μM glutamátem (délka aplikace steroidů a glutamátu je vyznačena plnými a prázdnými obdélníky).

6 DISKUSE

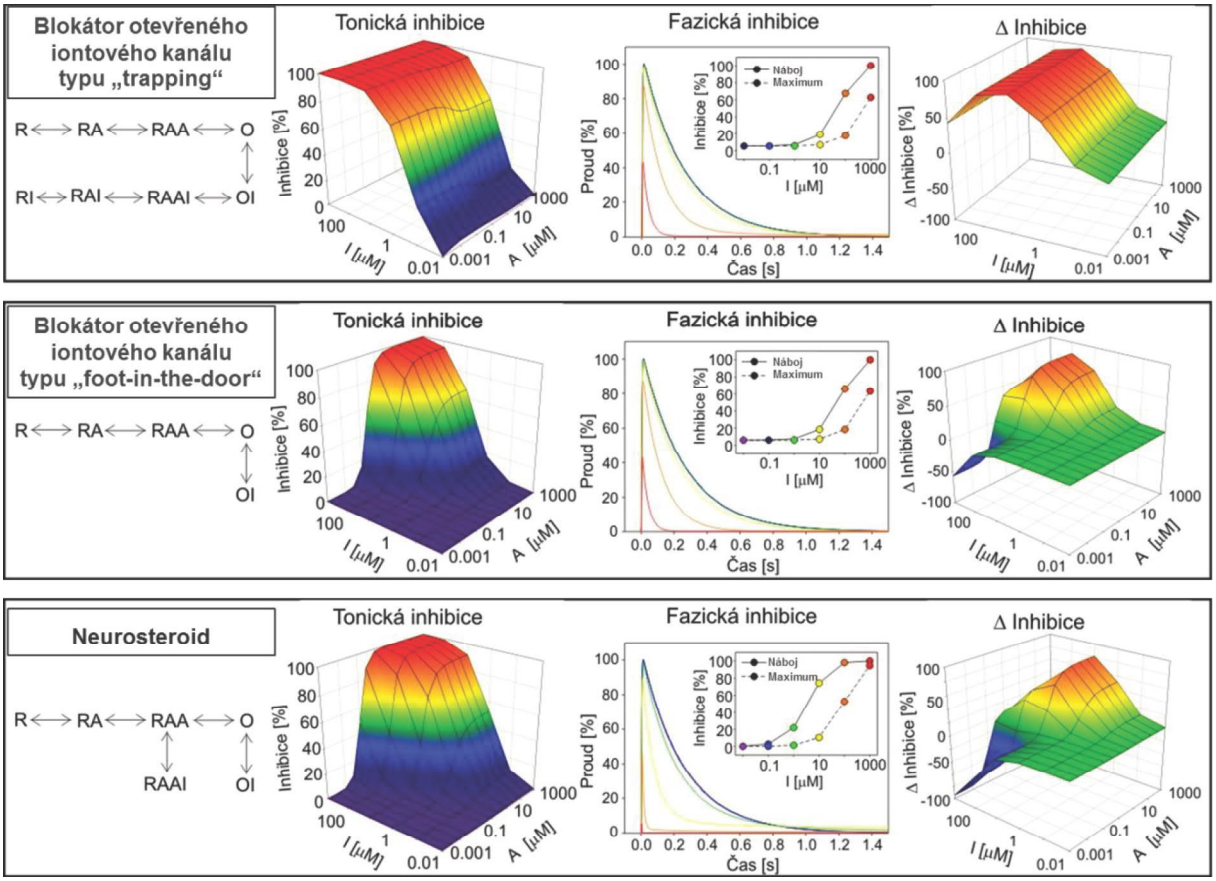
6.1 Význam strukturních determinant preganových derivátů pro preferenční inhibici tonicky oproti fazicky aktivovaným NMDA receptorům

Zjistili jsme, že **PA-S** a jeho syntetické analogy inhibují tonicky aktivované GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptory s vyšší účinností, než receptory aktivované fazicky. V případě GluN1/GluN2B receptorů byl tento rozdíl v účinnosti 2-násobný pro endogenní neurosteroid **PA-S** a 3-násobný pro syntetické steroidy s krátkým substituentem, jako například **PA-hOxa**. Je pozoruhodné, že **PA-hPim**, syntetický derivát s nejdelším substituentem, nevykazoval žádný účinek na fazicky aktivovaných receptorech, zatímco poměrně účinně inhiboval tonicky aktivované receptory. Abychom předešli následkům pomalé difúze steroidů do místa jejich působení na NMDA receptoru (Borovska et al 2012, Vyklicky et al 2015), inhibice tonicky a fazicky aktivovaných NMDA receptorů byla odečítána z odpovědí snímaných v kontinuální přítomnosti steroidů. Vzhledem k povaze interakce steroidu s receptorem je nástup inhibice pomalý (stovky milisekund), v porovnání s relativně rychlým nástupem odpovědí NMDA receptorů, vyvolaných saturující koncentrací glutamátu (desítky milisekund). Tento rozdíl spolu se skutečností, že vazba **PA-S** na NMDA receptory je akompetitivní a může se uskutečnit pouze za přítomnosti agonisty (Kussius et al 2009, Petrovic et al 2005, Sedlacek et al 2008, Vyklicky et al 2015), přispívá k preferenční inhibici odpovědí v ustáleném stavu, oproti maximálním proudům NMDA receptorů.

Deriváty pregnanolonu s delšími alifatickými řetězci vykazují pomalejší nástup inhibice ve srovnání s **PA-S**, což má význam pro jejich výraznou selektivitu pro odpovědi NMDA receptorů v ustáleném stavu oproti maximálním proudům. Výsledky našich výpočetních studií naznačují (Vyklicky et al 2015, Vyklicky et al 2016), že steroidy mají nespecifickou afinitu k celému vnitřnímu povrchu vstupního vestibulu iontového kanálu NMDA receptoru. Tyto nepolární interakce steroidu a receptoru jsou doprovázeny změnou konformace steroidu ve vestibulu iontového kanálu. Inhibitor s nejdelším řetězcem (**PA-hPim**) vytváří intramolekulární interakce mezi steroidní kostrou a alifatickým řetězcem, což mu umožňuje dosáhnout kompaktnější konformace. Pozorovaný charakter inhibice lze vysvětlit rovnováhou mezi energií pro změnu konformace a zvýšením interakční energie v důsledku rostoucího počtu interagujících atomů. Tento proces je pomalý kvůli řadě na sebe navazujících vazeb a disociací, což způsobuje pomalý nástup inhibice steroidů.

Předchozí studie našich spolupracovníku využívající klasické molekulárně dynamické simulace ukazují na **PA-G** (Riedlova et al 2017), že steroidní molekula s delším alifatickým řetězcem na pozici C3 je orientována v membráně vertikálně, s glutamátovým zbytkem lokalizovaným v oblasti fosfátových hlaviček lipidové dvojvrstvy. Jak typ, tak délka zbytku na C3 určují expozici C3-zbytku na rozhraní voda-lipid, nebo jinak řečeno, jak hluboko v membráně je C3-skupina zanořena (Riedlova et al 2017).

Inhibice NMDA receptorů prostřednictvím steroidů vykazuje další dvě farmakodynamické vlastnosti, které lze považovat za klinicky relevantní. Zaprvé, maximální amplituda, stejně jako poměr inhibice ustáleného stavu vůči maximu, nebyly významně změněny pro první a následující odpovědi NMDA receptorů, snímané za přítomnosti steroidu. To naznačuje, že na rozdíl od nástupu inhibice, která vyžaduje aktivaci NMDA receptoru, probíhá odvazování steroidu z receptoru stejnou rychlostí nezávisle na aktivaci (Petrovic et al 2005). Tento mechanismus inhibice typu "foot-in-the-door" (Sobolevskii & Khodorov 2002, Vyklicky et al 2014, Vyklicky et al 2015) je klíčový pro schopnost steroidů inhibovat odpovědi receptorů v ustáleném stavu, zatímco maximální proudové odpovědi zůstávají relativně neovlivněné. Dané předpoklady jsou v souladu s matematickými simulacemi popisujícími chování neurosteroidů s inhibičním působením, které ukazují, že tonicky aktivované receptory budou inhibovány více, než v případě fazicky aktivovaných receptorů (viz **Obr. 6.1.1**). Naproti tomu tzv. "trapping" blokátory, jako například memantin, se nemohou z receptoru bez přítomnosti agonisty odvázat, čímž dochází s opakovanou aktivací receptoru k postupnému zvyšování inhibice maximálních proudů (Emnett et al 2013, Vyklicky et al 2016, Xia et al 2010). Druhou významnou vlastností inhibičního účinku steroidů je napěťová nezávislost (Petrovic et al 2005), která zajišťuje, že steroidy zůstanou účinné i v případě patologicky depolarizovaných buněk. Vzhledem k tomu, že extracelulární vestibul se nachází mimo napěťové pole membrány, je steroid schopen se z receptoru kdykoliv odvázat a nezůstává uvězněn uvnitř kanálu pod odvázání agonistů, což je v souladu s mechanismem typu „foot-in-the-door“ (Vyklicky et al 2014). Naproti tomu inhibice NMDA receptorů zprostředkovaná memantinem se na depolarizovaných potenciálech snižuje (Chen et al 1992).



Obrázek 6.1.1. Matematické simulace pro inhibiční působení blokátorů otevřeného iontového kanálu typu „trapping“ a „foot-in-the-door“ a neurosteroidů na tonicky a fazicky aktivované NMDA receptory. Vlevo je kinetické schéma popisující jednotlivé stavy NMDA receptoru, do nichž je schopen se vázat inhibitor (*I*). V grafech je vynesena míra inhibice v závislosti na koncentraci agonisty (*A*) a koncentraci inhibitoru (*I*). Rozdíl v inhibici (Δ inhibice) odpovídá rozdílu v míře inhibice pro tonicky aktivované receptory (5 s po aktivaci) a receptory aktivované fazicky pomocí 1mM glutamátu po dobu 5 ms (převzato z (Vyklicky et al 2014)).

6.2 Charakterizace strukturních determinant PA-S analogů významných pro jejich inhibiční působení na NMDA receptorech

6.2.1 Vliv modifikací v oblasti D-kruhu na modulační účinek steroidních analogů na NMDA receptorech

Podařilo se nám ukázat, že acetylová skupina na C17 může podstoupit celou řadu nepolárních modifikací při zachování inhibičního působení pregnanových analogů na NMDA receptorech. Navíc jsme v případě všech testovaných preganových analogů se strukturními modifikacemi v oblasti D-kruhu steroidního jádra prokázali, že se jedná o účinnější inhibitory NMDA receptorových proudů, ve srovnání s přirozeně se vyskytujícím neurosteroidem **PA-S**. U D-modifikovaných analogů je však nezbytná přítomnost záporně nabité skupiny na C3

steroidního jádra, neboť bylo ukázáno, že nenabité analogy nebo analogy postrádající substituent na C3 ztrácejí schopnost inhibovat proudy NMDA receptorů (Park-Chung et al 1994, Weaver et al 2000). Výsledky dále ukazují, že látky **36.1a** a **36.1b**, s opačnou konformací izomerů na pozicích C13 a C17, vykazují podobné hodnoty IC_{50} (0,9 a 0,8 μM, respektive). Z toho mimo jiné vyplývá, že inhibiční účinek analogů není stereospecifický (α nebo β pozice) ohledně orientace substituentů na D-kruhu. Inhibiční působení steroidů na NMDA receptorech by tedy teoreticky mohlo být zprostředkováno nepřímo, např. změnou fyzikálních vlastností plazmatické membrány, neboť bylo ukázáno, že α a β izomery ovlivňují fyzikální vlastnosti membrány stejným způsobem (Casado & Ascher 1998). Proti této teorii však hovoří pokusy s opačnou orientací objemných substituentů na pozici C3 steroidního jádra, kde bylo ukázáno, že mezi jednotlivými izomery se hodnoty IC_{50} liší více než 10-násobně (Cerny et al 2012), což ukazuje spíše na přímou interakci steroidu s NMDA receptorem.

Z pokusů s perhydrofentantrenovými analogy, nesoucími pouze ABC kruh steroidního jádra, můžeme usoudit, že ačkoliv lze D-kruh kompletně odbourat při zachování inhibičního účinku, tato strukturní modifikace vede ke snížení lipofilicity dané molekuly, což může nežádoucím způsobem ovlivnit hodnoty IC_{50}. Vliv lipofilicity na inhibiční účinek byl potvrzen také pomocí výpočetní analýzy fyziko-chemikálních parametrů, jak pro analogy s modifikovaným D-kruhem, tak pro perhydrofenantrenové analogy, kde bylo ukázáno, že čím je daný analog více lipofilní (nižší log D), tím účinněji inhibuje aktivitu NMDA receptorů (Kudova et al 2015, Slavikova et al 2016). Hodnota logD by tedy mohla být jedním z vodítek při navrhování nových steroidních analogů. Je však třeba mimo jiné stanovit, jaký vliv má lipofilicita na přechod steroidů přes hematoencefalickou bariéru.

Bylo ukázáno, že metabolity pregnanolonu (allopregnanolon, pregnanolon, epipregnanolon, etiocholanon) se sulfátem na pozici C3 se v krevní plazmě nacházejí v rozmezí nM, s malými rozdíly mezi pohlavími (Havlikova et al 2006, Kancheva et al 2007). Tyto metabolity jsou syntetizovány také v nervové tkáni (Baulieu 1997, Mellon & Griffin 2002) a předpokládá se, že působí lokálně jako modulátory neuronální aktivity (Korinek et al 2011). Relativně nízká účinnost těchto steroidů na NMDA receptorech však může být zavádějící, neboť koncentrace steroidu v micelární formě (jež ve vodném roztoku při biologicky relevantních koncentracích převládá) je pravděpodobně mnohem vyšší, než koncentrace monomerní formy (relevantní pro interakci látky s receptorem). Výpočty založené na experimentálních datech naznačují, že v případě **PA-S** při koncentraci, která

odpovídá hodnotě IC_{50} pro NMDA receptory, se bude 99,5 % molekul přítomných v ECS vyskytovat v micelární formě (Vyklicky et al 2015). Na povrchu membrány se však předpokládá, že dochází ke zvýšení koncentrace monomerní formy až na úroveň μM.

Zjištění, že účinnost steroidu pozitivně koreluje s jeho lipofilicitou, poskytuje dodatečný důkaz o významu plazmatické membrány jako cesty pro přístup steroidu k jeho vazebnému místu na NMDA receptoru (Borovska et al 2012, Vyklicky et al 2015), podobně, jak bylo ukázáno v případě $GABA_A$ receptorů (Akk et al 2007, Akk et al 2005, Hosie et al 2007). V naší předchozí studii jsme ukázali, že steroidy tvoří ve vodném prostředí micely. K tomu, aby steroid mohl působit na NMDA receptory, je třeba, aby steroidní micela nejprve splynula s plazmatickou membránou, a poté jednotlivé molekuly steroidu opouštějí membránu a vstupují do extracelulárního ústí iontového kanálu NMDA receptoru, tvořeného membránovými M3 helixy, kde se nachází místo působení pro steroidy s inhibičním účinkem (Vyklicky et al 2015). Je však třeba dalšího výzkumu pro objasnění, zda je nižší hodnota IC_{50} u více lipofilních analogů způsobena zvýšenou zdánlivou afinitou steroidů vůči NMDA receptorům, nebo jejich vyšší koncentrací v blízkosti receptoru v důsledku akumulace steroidu v membráně (Tarcsay et al 2012, Vyklicky et al 2015).

6.2.2 Vliv podjednotkového složení NMDA receptorů na inhibiční působení steroidních analogů

Výsledky také naznačují, že inhibiční působení látky **19.1** (nesoucí na C17 pouze methylovou skupinu) není závislé na podjednotkovém složení NMDA receptoru. V případě perhydrofenantrenových analogů se ukázalo, že účinek látky **9.2** je pouze mírně podjednotkově závislý, a že GluN2B podjednotka je méně citlivá vůči látce **9.2**, než jiná podjednotková složení NMDA receptorů. Naproti tomu, v případě endogenního **PA-S** bylo prokázáno, že je přibližně dvakrát více účinný při inhibici NMDA receptorů obsahujících GluN2C a GluN2D podjednotku, oproti GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorům (Petrovic et al 2005), přičemž studie na oocytech ukazuje až 4-násobný rozdíl v preferenci **PA-S** pro GluN1/GluN2C-D receptory (Malayev et al 2002). Z toho vyplývá, že D-kruh steroidního jádra pravděpodobně nehraje roli v preferenci steroidů pro jednotlivá podjednotková složení NMDA receptorů.

Měření na rekombinantních GluN1/GluN2A-D receptorech byla také potvrzena na nativních NMDA receptorech, kde bylo dále ukázáno, že analogy s modifikací na C17 i

perhydrofenantrenové analogy inhibují proudy nativních NMDA a $GABA_A$ receptorů s vyšší účinností, než v případě nativních AMPA receptorů (Kudova et al 2015, Slavikova et al 2016). Dříve prokázané neuroprotektivní působení **PA-G** bez nežádoucích psychomimetických symptomů (Rambousek et al 2011), by tedy mohlo být výsledkem kombinovaného účinku steroidů na NMDA, AMPA a $GABA_A$ receptorech (Park-Chung et al 1999, Park-Chung et al 1994, Yaghoubi et al 1998).

6.2.3 Vliv C3-amidové vazby na inhibiční účinek steroidních analogů na NMDA receptorech

Schopnost inhibovat proudy NMDA receptorů v případě látek **1.3-4.3**, u nichž byl C3-substituent propojen se steroidní kostrou prostřednictvím amidového zbytku, byla významně zlepšena, v porovnání s endogenním **PA-S** a **PA-G.** Z našich výsledků dále vyplývá, že ačkoliv byly v předchozích pokusech prokázány výborné neuroprotektivní vlastnosti **PA-G** (Kleteckova et al 2014, Rambousek et al 2011), má pro NMDA receptory přibližně 2-krát nižší afinitu, v porovnání s endogenním **PA-S**. Předchozí SAR studie, zaměřené na modifikace substituentu na C3, nevedly k významnému zlepšení účinnosti pregnanových analogů (Borovska et al 2012, Park-Chung et al 1994, Stastna et al 2009, Weaver et al 2000). Navíc bylo ukázáno, že kromě **PA-G**, i další syntetický analog - pregnanolon hemisukcinát ester - má neuroprotektivní účinek jak v *in vitro*, tak *in vivo* modelu neurodegenerace (Lapchak 2004, Weaver et al 1997).

Avšak sulfátový nebo esterově vázaný zbytek na C3 může v organismu podléhat hydrolýze prostřednictvím sulfatáz a esteráz, což má za následek ztrátu modulačního účinku na NMDA receptorech v případě analogů bez C3-substituentu (Park-Chung et al 1994). Nahrazení esteru za amid tak může u steroidů vest k metabolicky stabilnějším látkám, které si zároveň zachovávají vysokou účinnost inhibičního působení na NMDA receptorech. V případě amidových analogů (látek **1.3-4.3**) již bylo ukázáno, že přechází přes hematoencefalickou bariéru a mají minimální nebo žádný hepatotoxický účinek (Adla et al 2017). Je však potřeba stanovit jejich biologické vlastnosti v behaviorálních experimentech pro vyloučení nežádoucích vedlejších účinků, případně otestovat jejich potenciální neuroprotektivní působení v animálních modelech lidských onemocnění.

6.3 Funkční a farmakologické vlastnosti mutantních forem lidského typu NMDA receptorů

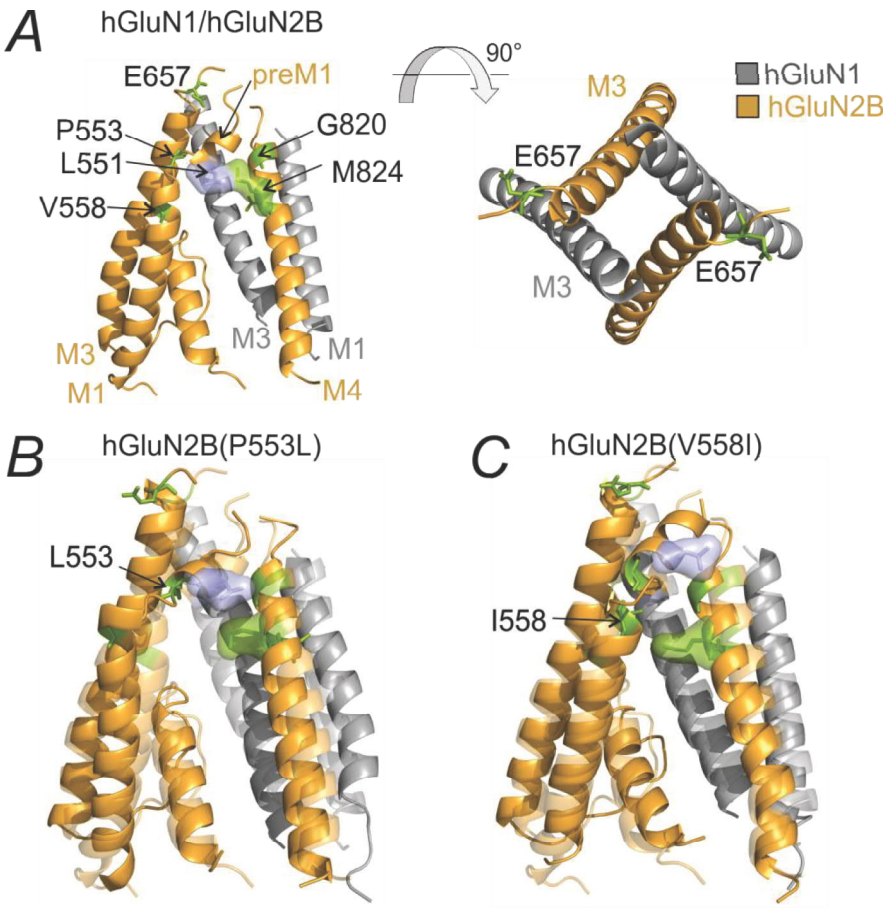
V této studii jsme zkoumali 9 vzácných variant hGluN2B podjednotky s bodovou záměnou v MD a zjistili jsme, že dysregulace NMDA receptorů zahrnuje několik mechanismů – změněnou povrchovou expresi, afinitu k agonistům, desenzitizaci receptorů, P_o iontového kanálů – a jejich kombinace. Na základě analýzy funkčních vlastností jsme ukázali, že je možné ztrátu funkce kompenzovat farmakologicky, pomocí endogenního steroidu **PE-S** a jeho syntetického analogu **AE-hSuc**. Narušení povrchové exprese a/nebo funkce NMDA receptoru má významné důsledky, které mohou pomoci nalézt propojení mezi genetickými variantami a onemocněním, stejně jako objasnit úlohu NMDA receptorů v patofyziologii neurologických poruch (Mcrae et al 2017).

6.3.1 Mechanizmus dysregulace u hGluN1/hGluN2B(P553L) a hGluN1/hGluN2B(V558I) receptorů

Krystalické struktury GluN1/GluN2B receptoru ukazují, že LBD, pre-M1 oblast a M1 helix jsou strukturně provázané, což naznačuje jejich úlohu ve vrátkování receptoru (Lee et al 2014). Konzervované zbytky hGluN2B(P553) a hGluN2B(V558) jsou součástí pre-M1 a M1 helixu (Karakas & Furukawa 2014, Sobolevsky et al 2009) (**Obr. 5.3.1*A***), a navzdory jejich fyzické blízkosti, mutace hGluN2B(P553L) způsobuje, že transfekované buňky prakticky nereagují na glutamát, zatímco hGluN1/hGluN2B(V558I) receptory odpovídají na 1mM glutamát podobně jako nemutované receptory, nicméně s výraznou desenzitizací a sníženou P_o (**Obr. 5.3.2*A*** a **5.3.4*D,E***). Povrchová exprese YFP-hGluN1/hGluN2B(P553L) receptorů nebyla změněna (viz **Obr. 5.3.2*F***), ačkoliv v (Ogden & Traynelis 2013) bylo ukázáno, že dochází k mírnému snížení povrchové exprese (o 33 %). Necitlivost vůči 1mM glutamátu není tedy u hGluN1/hGluN2B(P553L) receptorů způsobena nedostatkem receptorů na povrchu buňky, ale spíše změněnou funkcí receptoru. Můžeme předpokládat, že ztrátu funkce u hGluN1/hGluN2B(P553L) receptorů lze přičíst jejich zvýšené desenzitizaci, neboť potkaní GluN1/GluN2A(P552R) receptory (homologní pozice k GluN2B(P553)) vykazují vysokou míru desenzitizace (98,5 %). Je méně pravděpodobné, že necitlivost vůči glutamátu je způsobena změnou zdánlivé afinity k agonistům a/nebo P_o, neboť potkaní GluN1/GluN2A(P552R) a GluN1/GluN2B(P553R) receptory mají naopak hodnoty EC_{50} pro glutamát i glycin nižší, ve srovnaní s nemutovanými receptory, v kombinaci se zvýšenou P_o (Ogden & Traynelis 2013). Zvýšená desenzitizace v případě hGluN1/hGluN2B(V558I)

receptorů je v souladu s výsledky předchozích experimentů s chimérickými receptory, obsahujícími desenzitizující GluN2A a nedensizitizující GluN2C podjednotku, stejně jako s pokusy s bodovými mutacemi, v nichž byla oblast pre-Ml a Ml helixu identifikována jako klíčová pro rychlou, na glycinu a Ca^{2+} nezávislou desenzitizaci NMDA receptorů (Krupp et al 1998, Thomas et al 2006, Villarroel et al 1998). Navíc se ukázalo, že tato oblast ovlivňuje také P_o iontových kanálů NMDA receptorů (Ogden & Traynelis 2013). V případě hGluN1/hGluN2B(V558I) receptorů jsme nepozorovali rozdíl v hodnotách EC_{50} pro glutamát, či glycin, ačkoliv (Platzer et al 2017) ukazuje na snížení zdánlivé afinity pro glutamát u hGluN1/hGluN2B(V558I) receptorů.

Abychom odvodili strukturální důsledky *de novo* mutací měnících význam („missense"), využili jsme výpočetní metody pro vytvoření homologního modelu, který je založen na konformačním stavu receptoru s navázaným agonistou a s iontovým kanálem těsně před otevřením (Vyklicky et al 2015). Homologní model je odvozen z dostupných krystalických struktur pro potkaní variantu GluN1/GluN2B receptoru (Karakas & Furukawa 2014, Lee et al 2014). Ve stavu receptoru s navázaným agonistou a těsně před otevřením kontroluje pre-M1 oblast rozestup mezi M1 a M4 helixy. Pre-M1 oblast se rovněž podílí na přenosu mechanického signálu při změně orientace LBD, vyvolané vazbou agonisty, přes M3 helixy, tvořící iontový kanál, na M1 a M4 helixy (viz **Obr. 6.3.1*A***). Z homologního modelu vyplývá, že zbytek hGluN2B(P553) z pre-M1 oblasti slabě interaguje s L650 a F653 zbytky v M3 helixu. Molekulárně-dynamická simulace dále naznačuje, že hGluN2B(P553L) mutace vede k vytvoření téměř kontinuálního M1 helixu, v důsledku odstranění helix-ukončujícího prolinového zbytku (**Obr. 6.3.1*B***). V konformačním stavu receptoru s navázaným agonistou zprostředkovává hGluN2B(V558) zbytek interakci s okolními hydrofobními zbytky v M3 helixu. Z molekulárně-dynamické simulace vyplývá, že hGluN2B(V558I) mutace vyvolává silnější interakci těchto zbytků, což vede ke změně orientace pre-M1 oblasti z její horizontální polohy (**Obr. 6.3.1*C***). Ve výsledku dochází k oslabení interakce mezi M1 a M4 helixy.



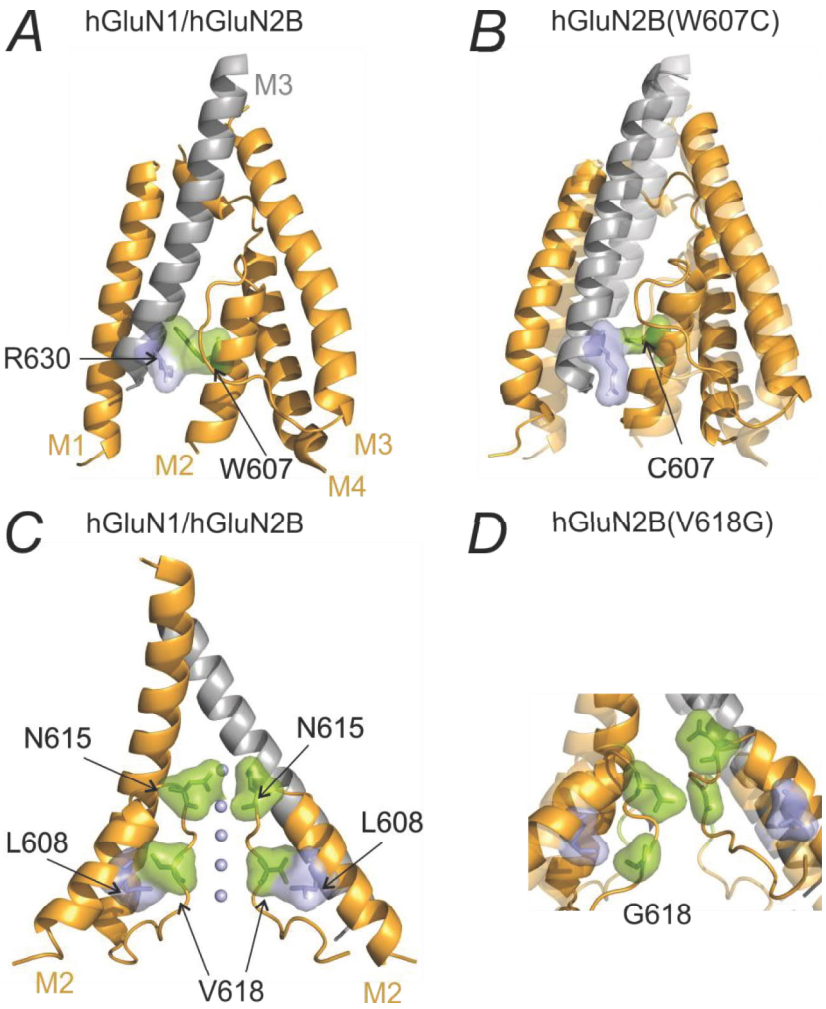
Obrázek 6.3.1. Strukturální důsledky hGluN2B(P553L) a hGluN2B(V558I) mutací. **(*A*)** Reprezentativní struktura homologního modelu oblasti MD u hGluN1/hGluN2B receptoru, který byl vytvořen na základě krystalografických dat z potkaní varianty GluN1/GluN2B receptoru (Karakas & Furukawa 2014, Lee et al 2014) (hGluN1 ve stříbrné barvě, hGluN2B ve zlaté barvě). Molekulárně-dynamická simulace u nemutovaného receptoru naznačuje kontakt prostřednictvím van der Waalsových interakcí mezi zbytky L551 a M824 v hGluN2B podjednotce, který je důležitý pro uspořádání M1, pre-M1 a M3 helixů. Vpravo jsou ukázány M3 helixy, tvořící iontový kanál NMDA receptoru (pohled z extracelulární strany). **(*B*)** a **(*C*)** Na strukturním modelu jsou zobrazeny výsledky molekulárně-dynamických simulací pro hGluN1/hGluN2B(P553L) a hGluN1/hGluN2B(V558I) receptory (plné barvy), v porovnání s nemutovaným receptorem (průsvitné barvy). **(*B*)** Srovnání při překryvu obou strukturních modelů naznačuje, že u hGluN1/hGluN2B(P553L) receptorů je helikální struktura pre-M1 oblasti prodloužena, což má za následek přerušení kontaktu mezi hGluN2B(L551 a M824) zbytky a přemístění M1 a M4 helixů. **(*C*)** Překryv obou modelů ukazuje, že u hGluN1/hGluN2B(V558I) receptorů je helikální struktura M1 prodloužena, čímž je opět narušen kontakt mezi hGluN2B(L551 a M824) zbytky a dochází k přemístění M1 a M4 helixů.

6.3.2 Mechanizmy dysregulace v případě hGluN2B(W607C) a hGluN2B(V618G) mutací

Pokusy s dostupností cysteinů pro sulfhydrylová činidla ukazují, že konzervované zbytky hGluN2B(W607) a hGluN2B(V618) jsou orientovány směrem do vnitřního prostoru iontového kanálu NMDA receptoru (Kuner et al 1996). Naše výsledky ukazují, že mutace těchto zbytků mají za následek, že hGluN1/hGluN2B(W607C) receptory mají sníženou

povrchovou expresi, sníženou afinitu k oběma agonistům a sníženou P_o, zatímco hGluN1/hGluN2B(V618G) receptory mají pouze sníženou P_o (**Obr. 5.3.2−5.3.4**). Vzhledem k tomu, že se dané aminokyselinové zbytky nacházejí v oblasti selektivního póru iontového kanálu, předpokládá se, že se podílejí na blokádě receptoru prostřednictvím Mg^{2+} (Williams et al 1998). V našich pokusech jsme dále potvrdili, že v případě hGluN1/hGluN2B(W607C) a hGluN1/hGluN2B(V618G) receptorů dochází ke ztrátě citlivosti vůči Mg^{2+} (Vyklicky et al 2018), což je také v souladu s výsledky ostatních studií (Fedele et al 2018, Mullier et al 2017).

Pro odvození strukturálních změn vyvolaných mutacemi v oblasti vratné M2 smyčky jsme použili předchozí model oblasti MD s iontovým kanálem v otevřené konformaci (Vyklicky et al 2015). Selektivní pór iontového kanálu, stejně jako spodní část M1, M3 a M4 helixů, se mezi homologním modelem receptoru ve stavu s navázaným agonistou těsně před otevřením a v otevřeném stavu výrazně neliší. Použitý homologní model iontového kanálu u nemutovaného NMDA receptoru je kompatibilní s předchozími odhady minimálního průřezu kanálu pro průchod iontů ve vodivém stavu: 6,0 Å (Vyklicky et al 1988), 5,5 Å (Villarroel et al 1995) a ~ 4,5 x 5,7 Å (Zarei & Dani 1995), a v rámci hodnot navržených pro průměr kanálu na úrovni extracelulárního vestibulu v aktivovaném stavu receptoru, která byla odhadnuta na 7,3 Å (Villarroel et al 1995) a 11,0 Å (Sobolevskii & Khodorov 2002). Zbytek hGluN2B(W607) se podílí na zpevňující interakci s hGluN1(R630) zbytkem v M1 helixu, což přispívá ke správnému uspořádání M2 helixů vůči jejich okolí (**Obr. 6.3.2*A***). Molekulárně-dynamická simulace naznačuje, že hGluN2B(W607C) mutace narušuje tuto interakci a relativní orientaci M2 helixu (**Obr. 6.3.2*B***). Zbytek hGluN2B(V618) interagující s L608 zbytkem přispívá ke správné orientaci postranních karbonylových skupin v rámci selektivního póru iontového kanálu (**Obr. 6.3.2*C***). Strukturní důsledky hGluN2B(V618G) mutace naznačují ztrátu této orientace, což může mít za následek snížení selektivity a účinnosti iontového transportu (**Obr. 6.3.2*D***).

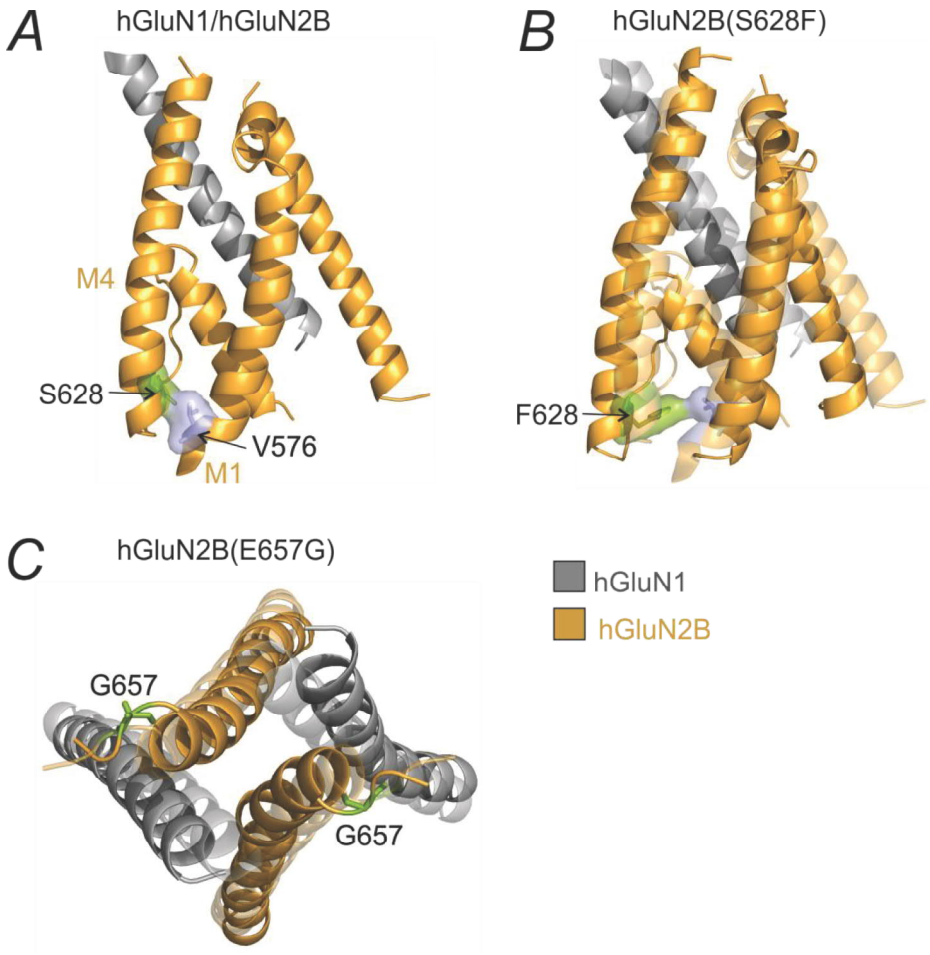


Obrázek 6.3.2. Strukturální důsledky hGluN2B(W607C) a hGluN2B(V618G) mutací. **(*A-B*)** Homologní modely pro nemutované a mutované hGluN1/hGluN2B(W607C) receptory získané z molekulárně-dynamické simulace. V případě nemutovaných receptorů je van der Waalsova interakce mezi R630 a W607 zbytky v hGluN2B podjednotce nahrazena slabým kontaktem mezi hGluN2B(R630) zbytkem a cysteinem v hGluN2B(W607C) podjednotce, který má menší rozměry. Tato změna má za následek přemístění pozic M3 a M2 helixů v hGluN2B podjednotce. **(*C-D*)** Zobrazuje homologní model kanálu pro průchod iontů u nemutovaných a mutovaných hGluN1/hGluN2B(V618G) receptorů. Pozice iontů v kanálu u nemutovaného receptoru byla odvozena z krystalografických dat pro strukturně příbuzný K^+ kanál, pdb id 1k4c (Zhou et al 2001). Molekulárně-dynamická simulace v případě nemutovaných receptorů ukazuje na význam van der Waalsovy interakce mezi L608 a V618 zbytky v hGluN2B podjednotce, které umožňují optimální orientaci a přesné polohování vratné M2 smyčky při průchodu iontů kanálem. Procházející ionty (Na^+/K^+/Ca^{2+}, označené modrými kuličkami) interagují s postranními řetězci polárního hGluN2B(N615) zbytku a s karbonylovými skupinami u hGluN2B(V618) zbytku. Molekulárně dynamická simulace pro hGluN1/hGluN2B(V618G) receptory naznačuje, že dochází k přerušení kontaktu mezi L608 a V618 zbytky v hGluN2B podjednotce, a v důsledku toho je M2 smyčka destabilizována prostřednictvím častých přechodů mezi různými konformačními stavy iontového kanálu receptoru.

6.3.3 Mechanizmus dysregulace u hGluN1/hGluN2B(S628F) receptorů

Ztráta odpovědí na 1mM glutamát u HEK293 buněk transfekovaných hGluN1/hGluN2B(S628F) receptory (**Obr. 5.3.2*A***) koreluje s jejich sníženou povrchovou expresí (**Obr. 5.3.2*F***). Zbytek hGluN2B(S628) je umístěn v intracelulární části M3 helixu a je v rámci GluN2 podjednotek konzervovaný (**Obr. 5.3.1**). Již dříve jsme ukázali, že aminokyselinové zbytky v M3 helixu u GluN2B podjednotky (W635; S645; Y646; T647) přispívají k regulaci povrchové exprese NMDA receptorů, a navíc mění jejich funkční vlastnosti (Kaniakova et al 2012). Kontrola kvality proteinů na intracelulární úrovni je pouze částečně objasněna a můžeme pouze spekulovat, zda narušení povrchové exprese, popsané zde u hGluN1/hGluN2B(S628F) receptorů, zahrnuje podobný mechanismus, jako v případě uvedených mutací v M3 helixu nebo v dalších membránových oblastech NMDA receptoru.

Naše molekulárně-dynamické simulace naznačují, že u hGluN1/hGluN2B(S628F) receptorů vede záměna malého polárního serinu za větší nepolární fenylalanin ke sterickému bránění, přičemž spodní část M1 helixu mění kvarterní strukturu oblasti MD. To může být důvodem, pro jejich vyřazení z transportu na buněčný povrch (**Obr. 6.3.3*A,B***)



Obrázek 6.3.3. Strukturální důsledky hGluN2B(S628F) a hGluN2B(E657G) mutací. **(*A*)** Molekulárně-dynamická simulace pro nemutovaný receptor naznačuje řadu intrahelikálních, zipu-podobných interakci podél M1 a M4 helixů u hGluN2B podjednotky. Na obrázku je znázorněn kontakt mezi S628 a V576 zbytky v hGluN2B podjednotce. **(*B*)** Na základě molekulárně-dynamické simulace vede substituce hGluN2B(S628F) zbytku k většímu oddělení M1 a M4 helixů. Na rozdíl od očekávané silnější van der Waalsovy interakce s hGluN2B(V576) zbytkem, vede sterický účinek v případě většího hydrofobního fenylalaninu k přeskupení zbytků podél M4 helixu, čímž vzniká řetězec van der Waalsových interakcí, jejichž prostřednictvím dochází ke stabilizaci zbytků v rámci M4 helixu. **(*C*)** Molekulárně-dynamická simulace pro hGluN2B(E657G) mutaci naznačuje uzavření iontového kanálu v důsledku ztráty specifických interakcí podél linkru, spojujícího MD s LBD u hGluN2B podjednotky.

6.3.4 Mechanizmus dysregulace u hGluN2B(E657G) mutace

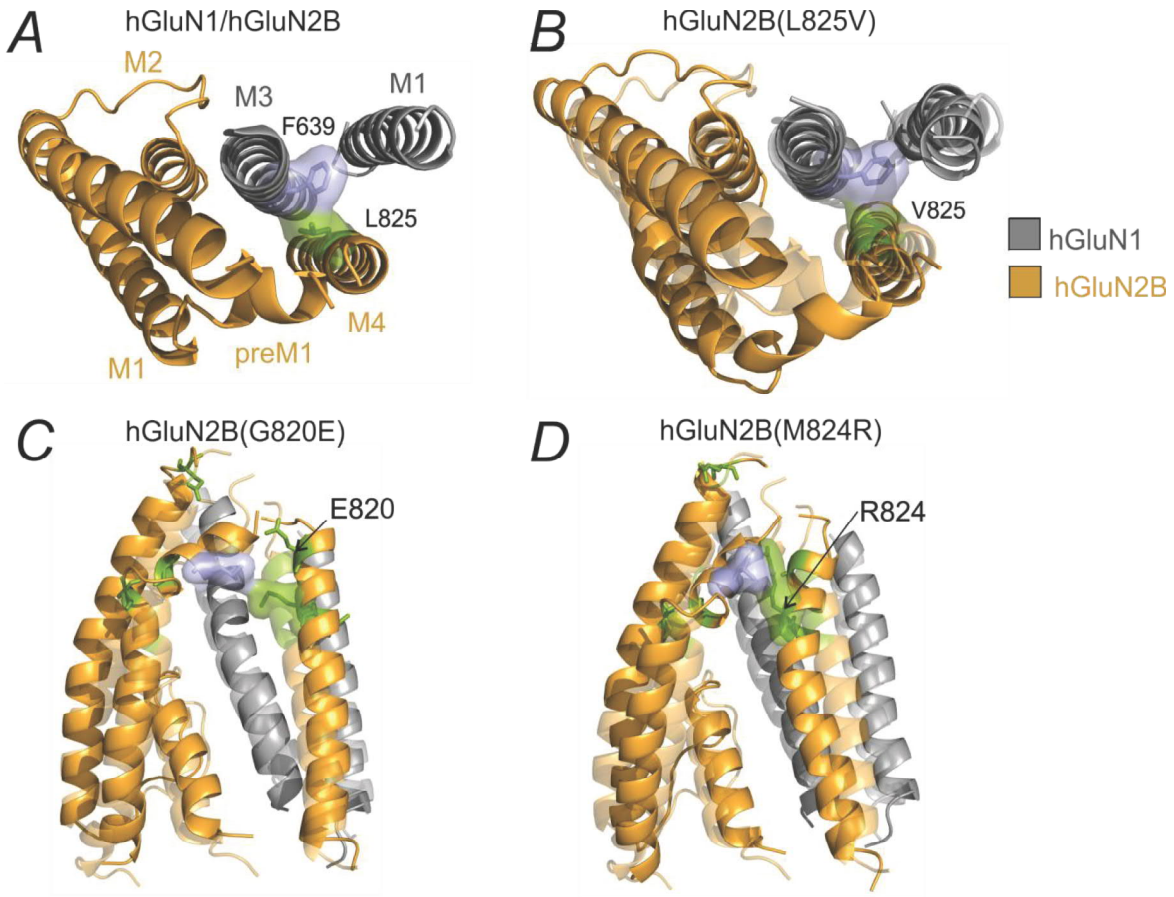
Snížené odpovědi na 1mM glutamát v případě hGluN1/hGluN2B(E657G) receptorů, jež mají normální povrchovou expresi, naznačují, že mutace způsobuje závažné narušení funkčních vlastností receptoru. Glutamátový zbytek (E657) je konzervován v rámci rodiny GluN2, GluA a GluK podjednotek a je součástí linkru, který spojuje LBD s M3 helixem. Přeskupení M3 helixů při aktivaci receptoru zpřístupňuje centrální dutinu iontového kanálu pro ionty, což znamená, že M3-S2 linkry hrají klíčovou roli při otevírání kanálu (Sobolevsky et al 2004). Naše nedávná data ukazují, že zbytek E657 je umístěn hned vedle tzv. LILI motivu, což je extracelulární brána, která reguluje otevírání a zavírání iontového kanálu NMDA receptoru. Mutace v této oblasti vedou k výrazné změně funkčních vlastností iontového kanálu, charakterizované snížením P_o a změnou přenosu aktivace receptoru prostřednictvím agonisty na otevření iontového kanálu (Kazi et al 2014, Ladislav et al 2018).

Chybějící experimentální data pro elektronovou denzitu v dostupných krystalických strukturách (Karakas & Furukawa 2014, Lee et al 2014) znemožňují lokalizaci zbytků v linkrových oblastech a související strukturní informace většinou chybí, proto jsme se rozhodli prozkoumat strukturu linkrů pomocí výpočetních metod (Ladislav et al 2018). Z molekulárně-dynamické simulace vyplývá, že účinek substituce za glycin u hGluN2B(E657G) mutace na vrátkování NMDA receptoru lze vysvětlit interakcí specifických zbytků na místě lokalizovaném v blízkosti M3 helixů (**Obr. 6.3.1*A*** a **6.3.3*C***).

6.3.5 Mechanizmus dysregulace u hGluN2B(G820E), hGluN2B(M824R), a hGluN2B(L825V) mutací

Úplná ztráta odpovědí na 1mM glutamát pozorovaná v HEK293 buňkách transfekovaných geny kódujícími podjednotky hGluN1/hGluN2B(G820E) a hGluN1/hGluN2B(M824R) receptorů není důsledkem změněné povrchové exprese, neboť ta byla v případě uvedených receptorů normální, nebo dokonce zvýšená (**Obr. 5.3.2*F***). Naproti tomu, odpovědi na 1mM glutamát u hGluN1/hGluN2B(L825V) receptorů, stejně jako jejich relativní povrchová exprese, se významně nelišily od nemutovaných receptorů. Překvapivě však hGluN2B(L825V) mutace vyvolala významné snížení P_o až o 86 % oproti nemutovaným receptorům. Důvod tohoto paradoxu, kdy snížení P_o nevede u receptorů ke snížení amplitudy odpovědí, není znám. Může to být mimo jiné způsobeno náhodou, neboť amplitudy odpovědí na glutamát v HEK293 buňkách transfekovaných nemutovanými hGluN1/hGluN2B receptory jsou značně variabilní.

Strukturně konzervované zbytky G820, M824 a L825 (**Obr. 5.3.1**) jsou v rámci M4 helixů umístěny ve vzájemné blízkosti. Několik důkazů naznačuje, že M1 a M4 helixy se nacházejí na okraji MD a mají pravděpodobně modulační úlohu při vrátkování kanálu, jež je primárně zprostředkováno M3 helixy, které v aktivovaném stavu receptoru vytvářejí centrální dutinu iontového kanálu (Karakas & Furukawa 2014, Ogden & Traynelis 2013, Sobolevsky et al 2004, Villarroel et al 1998). Z homologního modelu vyplývá, že hGluN2B(L825) zbytek interaguje s F639 zbytkem z M1 helixu na hGluN1 podjednotce v konformačním stavu receptoru s navázaným agonistou (**Obr. 6.3.4*A***). Molekulárně-dynamické simulace naznačují, že hGluN2B(L825V) mutace vede ke slabší interakci s hGluN1(F639) zbytkem, avšak strukturní důsledky jsou v tomto případě nedostatečně pro objasnění funkčního narušení u mutovaných receptorů (**Obr. 6.3.4*B***). Tato simulace dále ukázala, že hGluN2B(G820) je posledním zbytkem v M4 helixu, který umožňuje nezbytné prodloužení předcházejícího linkru v reakci na změnu orientace LBD. Mutace hGluN2B(G820E) zůstává v helikálním uspořádání a substituovaný postranní řetězec interaguje se zbytky z pre-M1 oblasti, čímž dochází ke změně horizontální pozice pre-M1oblasti, stejně jako relativní polohy M1 a M4 helixů (**Obr. 6.3.4*C***). V konformačním stavu receptoru s navázaným agonistou je hGluN2B(M824) zbytek je zapojen do interakce s hGluN2B(L551) zbytkem v pre-M1 oblasti (**Obr. 6.3.1*A***). V důsledku hGluN2B(M824R) mutace se interakce s pre-M1 netvoří (**Obr. 6.3.4*D***), což vede ke změně relativní polohy M1 a M4 helixů a následně k neúčinnému přenosu mechanického signálu z LBD po vazbě agonisty.



Obrázek 6.3.4. Strukturální důsledky hGluN2B(L825V), hGluN2B(G820E) a hGluN2B(M824R) mutací. **(*A*)** Molekulárně-dynamická simulace pro nemutovaný hGluN1/hGluN2B receptor identifikovala van der Waalsový kontakt mezi F639 a L825 zbytky u hGluN2B podjednotky, který je zapojený do interakce M3 helixu z hGluN1podjednotky s M4 helixem z hGluN2B podjednotky. **(*B*)** Substituce hGluN2B(L825) za menší alifatický valinový zbytek vede k oslabení van der Waalsovy interakce s hGluN1(F639) zbytkem, což vede k mírnému oddělení interagujících helixů. Strukturní důsledky nejsou však dostatečně průkazné. **(*C*)** Mutace hGluN2B(G820E) zachovává helikální uspořádání a postranní řetězec glutamátového zbytku interaguje se zbytky z pre-M1 oblasti, čímž dochází ke změně horizontální pozice pre-M1oblasti, stejně jako relativní polohy M1 a M4 helixů. **(*D*)** Mutace hGluN2B(M824R) zabraňuje interakci s pre-M1 oblastí a vede ke změně relativní polohy M1 a M4 helixů a k narušení přenosu mechanického signálu z LBD po vazbě agonisty.

6.3.6 Farmakologie mutantních forem lidských hGluN1/hGluN2B receptorů

Naše výsledky naznačují, že terapeutické strategie, zaměřené na vývoj nových účinných léků pro obnovení ztráty funkce u mutací spojených se sníženou P_o iontového kanálu NMDA receptoru, by mohly potenciálně zahrnovat **PE-S** a jeho deriváty. Oba steroidy, endogenní **PE-S** i jeho syntetický analog **AE-hSuc**, byly přibližně stejně účinné u nemutovaných a hGluN1/hGluNB(V558I), hGluN1/hGluNB(W607C) a hGluN1/hGluNB(V618G) receptorů. Je zajímavé, že oba steroidy potencovaly amplitudu tonicky i synapticky (Vyklicky et al

2018) aktivovaných hGluN1/hGluN2B(L825V) receptorů mnohem účinněji, než v případě nemutovaných receptorů, což naznačuje jejich potenciální budoucí využití v personalizované medicíně. Je pravděpodobné, že zvýšený potenciační účinek **PE-S** není omezen pouze na mutace v MD, neboť podobný efekt byl nedávno pozorován také u receptorů s mutacemi (V685G a D731N) v LBD u GluN2A podjednotky (Swanger et al 2016).

Narušení funkce u mutovaných NMDA receptorů, popsané v této dizertační práci, by však platilo pouze v případě, pokud by byly obě alely u pacienta mutovány na přesně stejném místě. Předpokládá se, že se bude jednat spíše o vzácný případ, a mnohem pravděpodobněji se budou v populaci vyskytovat heterozygotní jedinci, nesoucí pouze jednu mutovanou alelu. V tomto případě lze na základě genotypového poměru předpokládat, že každý neuron bude obsahovat: 25% nemutovaných NMDA receptorů, 50% receptorů složených z jedné mutované a jedné nemutované hGluN2B podjednotky a 25% receptorů složených z obou mutovaných hGluN2B podjednotek.

Abychom si vytvořili představu o míře poškození NMDA receptorů, můžeme jako příklad využít mutací vyvolaný pokles P_o (P_o = 10 % pro nemutované receptory a P_o = 1 % pro receptory s mutací obou hGluN2B podjednotek). Na základě Mendelovských zákonů dědičnosti a zákona o dominanci lze předpovědět, že celková aktivita NMDA receptorů bude snížena v závislosti na tom, zda je mutace recesivní, nezávislá nebo dominantní, na 77,5 %, 55 % a 32,5 %, ve srovnání s aktivitou NMDA receptorů u zdravých jedinců. Tyto výpočty naznačují, že pro úplnou farmakologickou kompenzaci poškození NMDA receptorů je potřeba receptory potencovat ze 25,5 %, 45 % a 67,5 %. Vzhledem k tomu, že většina neuronů exprimuje více než jeden typ GluN2/GluN3 podjednotky (Monyer et al 1994), potřebný potenciační účinek může být ještě nižší. Je však třeba dalšího výzkumu pro objasnění, do jaké míry je hypofunkce NMDA receptoru spojená s různými klinickými příznaky.

6.4 SAR studie pro C3-hemiesterové analogy neurosteroidů s potenciačním účinkem na NMDA receptorech

Naše výsledky ukazují, že C3-hemiesterové analogy pregnenolonu a androstenu (látky **2.4-24.4**) potencují odpovědi GluN1/GluN2B receptorů. Po aktivaci receptoru saturující koncentrací glutamátu však dochází ke snížení míry potenciace vyvolané **20-Oxo-PE-hAdi** (látkou **6.4**). Avšak v případě, kdy **20-Oxo-PE-hAdi** (**6.4**) preaplikujeme

před aplikací glutamátu v saturující koncentraci, je míra potenciace shodná s potenciací vyvolanou při současné aplikaci **20-Oxo-PE-hAdi** (**6.4**) s nízkou koncentraci glutamátu. To je v souladu s „disuse-dependentním“ mechanismem účinku **PE-S** na NMDA receptorech (Horak et al 2004). Tento mechanismus může odrážet vyšší afinitu steroidů pro klidový stav receptoru, oproti receptorům v aktivovaném stavu, a také vysvětlit vyšší míru potenciace při následné aplikaci steroidu a glutamátu. „Disuse-dependentní“ mechanismus působení steroidů by tak teoreticky mohl přispívat k vyšší potenciaci fazicky aktivovaných, synaptických odpovědí NMDA receptorů, oproti tonicky aktivovaným, extrasynaptickým NMDA receptorům (Burnell et al 2018). Snížení afinity steroidu pro aktivovaný stav NMDA receptoru by naopak mohl zabránit nadměrně aktivaci receptorů v kontinuální přítomnosti steroidu. Pro potvrzení této teorie je však zapotřebí ještě dalších experimentů, zaměřených na vliv potenciačních steroidů na excitační synaptický přenos v nativních kulturách neuronů a následné experimenty se systematickým podáním steroidů u potkanů.

Skutečnost, že **20-Oxo-PE-hAdi** (**6.4**) vykazuje „disuse-dependentní“ působení podobně jako **PE-S**, naznačuje, že typ substituentu na C3 pravděpodobně není klíčový pro „disuse-dependentní“ mechanismus účinku neurosteroidů, které potencují aktivitu NMDA receptorů, ačkoliv nelze vyloučit možnost, že je třeba záporného náboje na C3, případně vazby C3-substituentu prostřednictvím kyslíku.

6.4.1 Vliv substituentů na uhlících C3 a C17 u sloučenin 2.4-24.4 na modulační účinek na NMDA receptorech

Z našich výsledků vyplývá, že existuje optimální délka substituentů na C3 v kombinaci se strukturní modifikací na C17 u D-kruhu, jež u steroidních analogů vedou k optimalizaci jejich PAM účinku na NMDA receptorech. Tyto strukturní motivy pro látky **2.4-24.4** mohou charakterizovat farmakofor pro strukturní požadavky místa působení steroidů na molekule NMDA receptoru a/nebo farmakofor pro fúzi steroidu s membránou a způsob transportu z membrány do místa působení. Výpočetní analýza fyzikochemikálních parametrů pro jednotlivé C3-hemiesterové analogy, která ukazuje, že látky s podobnou lipofilicitou se významně liší v hodnotách EC_{50} (Krausova et al 2018), svědčí spíše pro první variantu, ačkoliv vzhledem k lipofilnímu charakteru molekuly nelze vliv rozpustnosti v membráně na potenciační účinek steroidů u NMDA receptorů vyloučit. Abychom potvrdili, či vyvrátili danou teorii, bude potřeba připravit a otestovat další série látek.

Z analýzy vlivu dávky na potenciační účinek látek **1.4-24.4** vyplývá, že 17 z 23 testovaných analogů se ukázalo být účinnějšími PAM (vyšší hodnoty E_{max} a/nebo nižší hodnoty EC_{50}), ve srovnání s endogenním **PE-S**. Nejvíce účinné byly androstenové analogy (látky **14.4-18.4)**, jejichž hodnoty EC_{50} se pohybovaly v jednotkách μM, a nejefektivnější analog z dané série, **AE-hSuc** (látka **15.4**), zvyšoval maximální proudové odpovědi GluN1/GluN2B receptorů více než 4-násobně. Tyto výsledky naznačují, že D-kruh bez substituentu je strukturní modifikací, která u steroidů vede k významnému zvýšení účinnosti. Naše pozorování jsou v souladu s výsledky předchozích studií, zaměřených na modifikace v oblasti D-kruhu steroidního jádra u **PE-S**, kde bylo ukázáno, že přidání hydroxylové skupiny na C17 u **PE-S** nemá vliv na jeho potenciační působení na NMDA receptorech, zatímco přidání 21-acetoxy nebo 20β-dihydroxy skupiny na **PE-S** vedlo k významnému snížení jejich potenciačního účinku na NMDA receptorech exprimovaných v primárních kulturách míšních neuronů z kuřete (Park-Chung et al 1997). Nahrazení acetylové skupiny na C17 u **PE-S** za ketonovou skupinu v případě dehydroepiandrosteron sulfátu (DHEAS) vede u steroidu ke ztrátě jejich potenciačního účinku na GluN1/GluN2A receptorech exprimovaných v oocytech (Yaghoubi et al 1998). V případě hemiesterových analogů (látek **19.4-24.4**) nevede adice ketonové skupiny na C17 k vymizení potenciačního účinku, avšak tyto analogy obecně vykazují nižší zdánlivou afinitu, ve srovnání s **PE-S** a ostatními testovanými analogy.

Výsledky naší studie dále značí, že vazebné místo pro potenciační steroidy je schopné pojmout i poměrně dlouhé zbytky na C3, čítající až deset uhlíků v řetězci (viz **17-Oxo-AE-hSeb**, látka **24.4**), při zachování potenciačního účinku na NMDA receptorech. Toto je v souladu s výsledky předchozí studie, kde již byly látky **2.4**, **4.4** a **5.4** testovány pro jejich schopnost urychlit NMDA receptory zprostředkovanou akumulaci Ca^{2+} v hipokampálních neuronech (Weaver et al 2000).

6.4.2 Účinek 20-Oxo-PE-hAdi (6.4) na rekombinantní NMDA receptory

Výsledky ukazují (**Obr. 5.4.4**), že **20-Oxo-PE-hAdi** (**6.4**) potencuje GluN1/GluN2A-D receptory, bez výrazné selektivity pro některé z podjednotkových složení. Dané výsledky byly potvrzeny také na nativních NMDA receptorech, exprimovaných v hipokampálních neuronech, které byly potencovány do stejné míry jako rekombinantní NMDA receptory (Krausova et al 2018). Naproti tomu, v případě endogenního **PE-S** převažuje u GluN1/GluN2A-B receptorů potenciační účinek, zatímco u GluN1/GluN2C-D receptorů převládá inhibice. Naše pozorování ohledně **PE-S** jsou v souladu s předchozími experimenty,

které ukazují, že **PE-S** má duální, potenciačně-inhibiční působení na NMDA receptorech (Horak et al 2006, Horak et al 2004). Převládající účinek **PE-S** (potenciace u GluN1/GluN2A-B a inhibice u GluN1/GluN2C-D receptorů) je výsledkem různé efektivity, spíše než zdánlivé afinity, která je naopak vyšší pro GluN1/GluN2C-D, než pro GluN1/GluN2A-B receptory (Horak et al 2006, Horak et al 2004). V našich pokusech jsme neviděli žádný náznak duálního působení pro **20-Oxo-PE-hAdi** (**6.4**).

7 SOUHRN

7.1 Význam strukturních determinant preganových derivátů pro preferenční inhibici tonicky oproti fazicky aktivovaným NMDA receptorům

- **PA-S** a jeho syntetické analogy inhibují tonicky aktivované NMDA receptory s vyšší účinností, než receptory aktivované fazicky.
- S prodlužující se délkou uhlíkového řetězce u C3-substituentu se postupně zvyšuje preference analogů pro tonicky aktivované receptory (od **PA-hMal** k **PA-hPim**).
- Analog s nejdelším substituentem na C3 (**PA-hPim**) prakticky nemá na fazicky aktivované NMDA receptory vliv a inhibuje tonicky aktivované receptory s vyšší účinností, než endogenní **PA-S**.

7.2 Charakterizace strukturních determinant PA-S analogů významných pro jejich inhibiční působení na NMDA receptorech

- D-kruh na pregnanové kostře může podstoupit celou řadu strukturních modifikaci, či být úplně odstraněn, aniž by došlo ke ztrátě inhibičního působení příslušných analogů.
- Naopak, ve většině případů došlo ke zvýšení účinnosti dané látky, ve srovnání s endogením neurosteroidem **PA-S**.
- Nahrazení esteru za amidový zbytek pro napojení C3-substituentu na steroidní kostru, má pozitivní vliv na schopnost steroidů inhibovat proudy NMDA receptorů.

7.3 Funkční a farmakologické vlastnosti mutantních forem lidského typu NMDA receptorů

- Mutace v MD u hGluN2B podjednotky, nalezené u pacientů trpících celou řadou neurovývojových onemocnění, vedou u NMDA receptorů k významnému narušení jejich funkčních vlastností.
- Tyto změny zahrnují výrazně sníženou povrchovou expresi (v případě hGluN1/hGluN2B(S628F) receptorů), snížení zdánlivé afinity vůči oběma agonistům (u hGluN1/hGluN2B(W607C; a E657G) receptorů), zvýšenou desenzitizaci (u hGluN1/hGluN2B(V558I) receptorů) nebo dramatický pokles P_o iontového kanálu

NMDA receptoru (v případě hGluN1/hGluN2B(V558I; W607C; V618G; a L825V) receptorů).

- **PE-S** a **AE-hSuc** mají potenciační účinek na lidských hGluN1/hGluN2B receptorech.
- **AE-hSuc** je efektivnější PAM než endogenní **PE-S**.
- Přestože steroidy potencují aktivitu NMDA receptorů prostřednictvím zvýšení P_o, účinek **PE-S** a **AE-hSuc** byl podobný u nemutovaných a mutovaných hGluN1/hGluN2B(V558I; W607C; a V618G) receptorů, u nichž byla hodnota P_o více než desetinásobně snížená.
- Mutované hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory jsou steroidy potencovány více, než nemutované a další testované mutované receptory.
- Zvýšení potenciačního účinku obou steroidů v případě hGluN1/hGluN2B(L825V) receptorů je způsobeno zvýšením jejich efektivity, spíše než zdánlivé afinity.

7.4 SAR studie pro C3-hemiesterové analogy neurosteroidů s potenciačním účinkem na NMDA receptorech

- Substituent na C17 u D-kruhu steroidního jádra pregnenu může být strukturně modifikován nebo zcela odstraněn při zachování potenciačního účinku na NMDA receptorech.
- Schopnost těchto nových analogů potencovat odpovědi GluN1/GluN2B receptorů vykazuje závislost na délce C3-substituentu pro každou modifikaci D-kruhu.
- Jako nejvíce účinné PAM u GluN1/GluN2B receptorů byly vyhodnoceny hemiesterové analogy androstenu.
- **20-Oxo-PE-hAdi** má na rekombinantních NMDA receptorech podjednotkově nezávislý účinek, na rozdíl od endogenního **PE-S**.

7 SUMMARY

7.1 The importance of structural determinants of pregnane derivatives for preferential inhibition of tonically versus phasically-activated NMDA receptors

- **PA-S** and its synthetic analogues inhibit tonically-activated NMDA receptors with higher potency than phasically-activated NMDA receptors.
- With the prolonged length of the carbon chain at the C3-substituent (from **PA-hMal** to **PA-hPim**), the preference of the analogs for tonically-activated receptors is gradually increasing.
- An analogue with the longest substituent at C3 (**PA-hPim**) practically does not affect phasically-activated NMDA receptors and inhibits tonically-activated receptors with higher potency than endogenous **PA-S**.

7.2 Characterization of structural determinants of PA-S analogues important for their inhibitory action at NMDA receptors

- The D-ring of the pregnane skeleton may undergo a number of structural modifications or be completely eliminated without losing the inhibitory effect of the analogs on NMDA receptor activity.
- On the contrary, in most cases, these analogues are more effective NMDA receptor inhibitors than the endogenous neurosteroid **PA-S**.
- The substitution of the ester for the amide as the attachment of the C3 substituent to the steroidal skeleton has a positive effect on the ability of steroids to inhibit NMDA receptor currents.

7.3 Functional and pharmacological properties of mutant forms of human NMDA receptors

- Mutations in the membrane domains of hGluN2B subunit found in patients suffering from a variety of neurodevelopmental disorders lead to significant impairment in functional properties of NMDA receptors.
- These changes include markedly reduced surface expression (in the case of hGluN1/hGluN2B(S628F) receptors), decreased apparent affinity for both agonists

(hGluN1/hGluN2B(W607C and E657G) receptors), increased desensitization (for hGluN1/hGluN2B(V558I) receptors) or a dramatic decrease in the NMDA receptor channel open probability (P_o; in the case of hGluN1/hGluN2B(V558I; W607C; V618G; and L825V) receptors).

- **PE-S** and **AE-hSuc** have a potentiating effect on human hGluN1/hGluN2B receptors.
- **AE-hSuc** is a more efficient positive allosteric modulator (PAM) than endogenous **PE-S**.
- Although steroids potentiate NMDA receptor activity by increasing the P_o, the effect of **PE-S** and **AE-hSuc** was similar for non-mutated and mutated hGluN1/hGluN2B(V558I; W607C; and V618G) receptors in which the P_o was more than 10-fold decreased.
- Mutated hGluN1/hGluN2B(L825V) receptors were more potentiated by **PE-S** and **AE-hSuc** than non-mutated and other mutated receptors tested.
- Increased positive modulatory effect of both steroids at hGluN1/hGluN2B(L825V) receptors is due to an increase in their efficacy rather than apparent affinity.

7.4 SAR studies for neurosteroid C3-hemiester analogues with potentiating effect at NMDA receptors

- The C17 substituent on the D-ring of the pregnene core can be structurally modified or completely removed while maintaining potentiating effect at NMDA receptors.
- The ability of these new analogs to potentiate the GluN1/GluN2B receptor responses is dependent on the length of the substituent at C3 for each D-ring modification.
- The androstene hemiester analogues were evaluated as the most potent PAM of GluN1/GluN2B receptors.
- **20-Oxo-PE-hAdi** has a subunit-independent effect on recombinant NMDA receptors, in contrast to endogenous **PE-S**.

8 ZÁVĚR

Správné fungování NMDA receptorů je nezbytné pro normální funkci CNS, zejména pak pro učení a paměť. Jejich dysregulace se podílí na vzniku a rozvoji celé řady neurpsychiatrických onemocnění, a to jak nadměrná aktivace, vedoucí k excitotoxicitě a následné smrti neuronů, tak i jejich nedostatečná funkce, jež je základem pro různé kognitivní deficity. I přes značné úsilí mnoha vědeckých týmů a farmaceutických společností, které v posledních 28 letech vynaložily miliardy dolarů na vývoj účinných modulátorů NMDA receptorů (Monaghan et al 2012), existuje dosud pouze velmi omezené množství látek, u nichž se v klinických studiích podařilo prokázat léčebný efekt, a zároveň nebyly posléze vyřazeny z důvodu nežádoucích vedlejších účinků.

Syntetické deriváty endogenních neurosteroidů jsou vzhledem k jejich příznivým farmakologickým a farmakokinetickým vlastnostem nadějnou skupinou NMDA modulátorů. Nicméně k nalezení finální struktury případného léčiva, stejně jako propojení mezi genetickou variantou a konkrétním vlivem na rozvoj onemocnění, vede ještě poměrně dlouhá cesta. Případné pokusy *in silico*, zaměřené na predikci vlivu jednotlivých strukturních modifikací na chování molekuly steroidu v membráně, stejně jako molekulárně-dynamické simulace modelující důsledky jednotlivých mutací pro strukturně-funkční vlastnosti NMDA receptoru, jsou však pouhými vodítky, které je vždy třeba následně ověřit pomocí elektrofyziologických snímání. Dalším krokem je pak vytvoření transgenních myší pro objasnění fenotypového projevu konkrétních mutovaných variant genů kódujících podjednotky NMDA receptorů.

Předložená dizertační práce odhaluje nové strukturní determinanty přirozeně se vyskytujících neurosteroidů **PA-S** a **PE-S**, které poskytují prostor pro další modifikaci a optimalizaci jejich inhibičního a potenciačního účinku na NMDA receptorech, a objasňuje jejich význam pro modulaci aktivity dysfunkčních NMDA receptorů, založený na unikátním mechanismu působení těchto neuroaktivních steroidů. Doufáme, že tyto poznatky v budoucnu pomohou přispět k nalezení nových účinných látek, které mohou být případně využity v klinické praxi pro léčbu onemocnění, spojených s poruchami glutamátergního systému.

9 LITERATURA

Adams DR, Yuan H, Holyoak T, Arajs KH, Hakimi P, et al. 2014. Three rare diseases in one Sib pair: RAI1, PCK1, GRIN2B mutations associated with Smith-Magenis Syndrome, cytosolic PEPCK deficiency and NMDA receptor glutamate insensitivity. *Mol Genet Metab* 113: 161-70

Adla SK, Slavikova B, Smidkova M, Tloustova E, Svoboda M, et al. 2017. Physicochemical and biological properties of novel amide-based steroidal inhibitors of NMDA receptors. *Steroids* 117: 52-61

Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N. 1994. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347: 150-60

Akk G, Covey DF, Evers AS, Steinbach JH, Zorumski CF, Mennerick S. 2007. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors. *Pharmacology & therapeutics* 116: 35-57

Akk G, Shu HJ, Wang C, Steinbach JH, Zorumski CF, et al. 2005. Neurosteroid access to the GABAA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 11605-13

Awadalla P, Gauthier J, Myers RA, Casals F, Hamdan FF, et al. 2010. Direct measure of the de novo mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. *American journal of human genetics* 87: 316-24

Banke TG, Traynelis SF. 2003. Activation of NR1/NR2B NMDA receptors. *Nature neuroscience* 6: 144-52

Baulieu EE. 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent progress in hormone research* 52: 1-32

Baulieu EE. 1998. NEUROSTEROIDS: A NOVEL FUNCTION OF THE BRAIN. *Psychoneuroendocrinology* 23: 963-87

Benveniste M, Clements J, Vyklicky L, Jr., Mayer ML. 1990. A kinetic analysis of the modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptors by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *The Journal of physiology* 428: 333-57

Benveniste M, Mayer ML. 1993. Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *The Journal of physiology* 464: 131-63

Bergeron RJ, Weimar WR, Wu Q, Austin JK, Jr., McManis JS. 1995. Impact of polyamine analogues on the NMDA receptor. *Journal of medicinal chemistry* 38: 425-8

Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, et al. 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biological psychiatry* 47: 351-4

Bettini E, Sava A, Griffante C, Carignani C, Buson A, et al. 2010. Identification and characterization of novel NMDA receptor antagonists selective for NR2A- over NR2B-containing receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 335: 636-44

Blanpied TA, Boeckman FA, Aizenman E, Johnson JW. 1997. Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *Journal of neurophysiology* 77: 309-23

Bolshakov KV, Gmiro VE, Tikhonov DB, Magazanik LG. 2003. Determinants of trapping block of N-methyl-d-aspartate receptor channels. *Journal of neurochemistry* 87: 56-65

Borovska J, Vyklicky V, Stastna E, Kapras V, Slavikova B, et al. 2011. Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *British journal of pharmacology*

Borovska J, Vyklicky V, Stastna E, Kapras V, Slavikova B, et al. 2012. Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *British journal of pharmacology* 166: 1069-83

Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg JP, Gunther W, et al. 1992. Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257: 1415-9

Burnashev N, Szepetowski P. 2015. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Pharmacol* 20: 73-82

Burnell ES, Irvine M, Fang G, Sapkota K, Jane DE, Monaghan DT. 2018. Positive and Negative Allosteric Modulators of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) Receptors: Structure-Activity Relationships and Mechanisms of Action. *Journal of medicinal chemistry*

Carlson GC. 2012. Glutamate receptor dysfunction and drug targets across models of autism spectrum disorders. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 100: 850-4

Casado M, Ascher P. 1998. Opposite modulation of NMDA receptors by lysophospholipids and arachidonic acid: common features with mechanosensitivity. *J Physiol (Lond)* 513: 317-30

Ceccon M, Rumbaugh G, Vicini S. 2001. Distinct effect of pregnenolone sulfate on NMDA receptor subtypes. *Neuropharmacology* 40: 491-500

Cerny I, Budesinsky M, Pouzar V, Vyklicky V, Krausova B, Vyklicky L, Jr. 2012. Neuroactive steroids with perfluorobenzoyl group. *Steroids* 77: 1233-41

Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL. 1992. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258: 1498-501

Clements JD, Westbrook GL. 1991. Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* 7: 605-13

Cohen S, Greenberg ME. 2008. Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 183-209

Collingridge G. 1987. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 330: 604-5

Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjovall J, Baulieu EE. 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 4704-7

Coyle JT. 2012. NMDA receptor and schizophrenia: a brief history. *Schizophrenia bulletin* 38: 920-6

Davies J, Francis AA, Jones AW, Watkins JC. 1981. 2-Amino-5-phosphonovalerate (2APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neuroscience letters* 21: 77-81

de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, et al. 2012. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *The New England journal of medicine* 367: 1921-9

DeVries SP, Patel AD. 2013. Two patients with a GRIN2A mutation and childhood-onset epilepsy. *Pediatric neurology* 49: 482-5

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61

Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachova V. 2006. Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *Journal of neuroscience methods* 151: 178-85

Dravid SM, Erreger K, Yuan H, Nicholson K, Le P, et al. 2007. Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *The Journal of physiology* 581: 107-28

Emnett CM, Eisenman LN, Taylor AM, Izumi Y, Zorumski CF, Mennerick S. 2013. Indistinguishable synaptic pharmacodynamics of the N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers memantine and ketamine. *Molecular pharmacology* 84: 935-47

Evans RH, Francis AA, Watkins JC. 1977. Selective antagonism by Mg2+ of amino acid-induced depolarization of spinal neurones. *Experientia* 33: 489-91

Fedele L, Newcombe J, Topf M, Gibb A, Harvey RJ, Smart TG. 2018. Disease-associated missense mutations in GluN2B subunit alter NMDA receptor ligand binding and ion channel properties. *Nature communications* 9: 957

Feng B, Morley RM, Jane DE, Monaghan DT. 2005. The effect of competitive antagonist chain length on NMDA receptor subunit selectivity. *Neuropharmacology* 48: 354-9

Flood JF, Morley JE, Roberts E. 1992. Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 1567-71

Gao K, Tankovic A, Zhang Y, Kusumoto H, Zhang J, et al. 2017. A de novo loss-of-function GRIN2A mutation associated with childhood focal epilepsy and acquired epileptic aphasia. *PloS one* 12: e0170818

Gielen M, Siegler Retchless B, Mony L, Johnson JW, Paoletti P. 2009. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459: 703-7

Hackos DH, Hanson JE. 2017. Diverse modes of NMDA receptor positive allosteric modulation: Mechanisms and consequences. *Neuropharmacology* 112: 34-45

Hackos DH, Lupardus PJ, Grand T, Chen Y, Wang TM, et al. 2016. Positive Allosteric Modulators of GluN2A-Containing NMDARs with Distinct Modes of Action and Impacts on Circuit Function. *Neuron* 89: 983-99

Hall BJ, Ripley B, Ghosh A. 2007. NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 13446-56

Hallett PJ, Standaert DG. 2004. Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacology & therapeutics* 102: 155-74

Hamdan FF, Srour M, Capo-Chichi JM, Daoud H, Nassif C, et al. 2014. De novo mutations in moderate or severe intellectual disability. *PLoS genetics* 10: e1004772

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 391: 85-100

Hansen KB, Ogden KK, Traynelis SF. 2012. Subunit-selective allosteric inhibition of glycine binding to NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32: 6197-208

Hansen KB, Traynelis SF. 2011. Structural and mechanistic determinants of a novel site for noncompetitive inhibition of GluN2D-containing NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 3650-61

Harris AZ, Pettit DL. 2007. Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *The Journal of physiology* 584: 509-19

Harrison NL, Simmonds MA. 1984. Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* 323: 287-92

Havlikova H, Hill M, Kancheva L, Vrbikova J, Pouzar V, et al. 2006. Serum profiles of free and conjugated neuroactive pregnanolone isomers in nonpregnant women of fertile age. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91: 3092-9

Hayashi T. 1954. EFFECTS OF SODIUM GLUTAMATE ON THE NERVOUS SYSTEM. *The Keio Journal of Medicine* 3: 183-92

Hedegaard M, Hansen KB, Andersen KT, Brauner-Osborne H, Traynelis SF. 2012. Molecular pharmacology of human NMDA receptors. *Neurochem Int* 61: 601-9

Heinrich A, Ando RD, Turi G, Rozsa B, Sperlagh B. 2012. K+ depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study. *British journal of pharmacology* 167: 1003-20

Herman MA, Jahr CE. 2007. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 9736-41

Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, et al. 1993. Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10: 943-54

Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108

Horak M, Chang K, Wenthold RJ. 2008. Masking of the endoplasmic reticulum retention signals during assembly of the NMDA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 3500-9

Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2006. Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* 137: 93-102

Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2004. Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 10318-25

Hosie AM, Wilkins ME, Smart TG. 2007. Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacology & therapeutics* 116: 7-19

Hu C, Chen W, Myers SJ, Yuan H, Traynelis SF. 2016. Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. *Journal of pharmacological sciences* 132: 115-21

Huettner JE, Bean BP. 1988. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1307-11

Huganir RL, Nicoll RA. 2013. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* 80: 704-17

Chang JP, Lane HY, Tsai GE. 2014. Attention deficit hyperactivity disorder and N-methyl-D-aspartate (NMDA) dysregulation. *Current pharmaceutical design* 20: 5180-5

Chazot PL, Stephenson FA. 1997. Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *Journal of neurochemistry* 69: 2138-44

Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, et al. 1992. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12: 4427-36

Chen M, Lu TJ, Chen XJ, Zhou Y, Chen Q, et al. 2008. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke* 39: 3042-8

Chen W, Shieh C, Swanger SA, Tankovic A, Au M, et al. 2017. GRIN1 mutation associated with intellectual disability alters NMDA receptor trafficking and function. *J Hum Genet* 62: 589-97

Choi DW. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 7: 369-79

Choi DW, Rothman SM. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13: 171-82

Iijima K, Takase S, Tsumuraya K, Endo M, Itahara K. 1978. Changes in free amino acids of cerebrospinal fluid and plasma in various neurological diseases. *The Tohoku journal of experimental medicine* 126: 133-50

Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, et al. 1993. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *The Journal of biological chemistry* 268: 2836-43

Jahr CE. 1992. High probability opening of NMDA receptor channels by L-glutamate. *Science* 255: 470-2

Jang MK, Mierke DF, Russek SJ, Farb DH. 2004. A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8198-203

Johnson JW, Ascher P. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325: 529-31

Johnson JW, Kotermanski SE. 2006. Mechanism of action of memantine. *Current opinion in pharmacology* 6: 61-7

Kalia LV, Kalia SK, Salter MW. 2008. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *The Lancet. Neurology* 7: 742-55

Kancheva R, Hill M, Cibula D, Vcelakova H, Kancheva L, et al. 2007. Relationships of circulating pregnanolone isomers and their polar conjugates to the status of sex, menstrual cycle, and pregnancy. *The Journal of endocrinology* 195: 67-78

Kaniakova M, Krausova B, Vyklicky V, Korinek M, Lichnerova K, et al. 2012. Key amino acid residues within the third membrane domains of NR1 and NR2 subunits contribute to the regulation of the surface delivery of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of biological chemistry* 287: 26423-34

Karakas E, Furukawa H. 2014. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* 344: 992-7

Karakas E, Simorowski N, Furukawa H. 2011. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475: 249-53

Kazi R, Dai J, Sweeney C, Zhou HX, Wollmuth LP. 2014. Mechanical coupling maintains the fidelity of NMDA receptor-mediated currents. *Nature neuroscience* 17: 914-22

Kleckner NW, Dingledine R. 1988. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in Xenopus oocytes. *Science* 241: 835-7

Kleteckova L, Tsenov G, Kubova H, Stuchlik A, Vales K. 2014. Neuroprotective effect of the 3alpha5beta-pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats. *Neuroscience letters* 564: 11-5

Kohr G, Eckardt S, Luddens H, Monyer H, Seeburg PH. 1994. NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents. *Neuron* 12: 1031-40

Korinek M, Kapras V, Vyklicky V, Adamusova E, Borovska J, et al. 2011. Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids* 76: 1409-18

Korinek M, Vyklicky V, Borovska J, Lichnerova K, Kaniakova M, et al. 2015. Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. *The Journal of physiology* 593: 2279-93

Kotermanski SE, Johnson JW. 2009. Mg2+ imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 2774-9

Krausova B, Slavikova B, Nekardova M, Hubalkova P, Vyklicky V, et al. 2018. Positive Modulators of the N-Methyl-d-aspartate Receptor: Structure-Activity Relationship Study of Steroidal 3-Hemiesters. *Journal of medicinal chemistry* 61: 4505-16

Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL. 1998. N-terminal domains in the NR2 subunit control desensitization of NMDA receptors. *Neuron* 20: 317-27

Kudova E, Chodounska H, Slavikova B, Budesinsky M, Nekardova M, et al. 2015. A New Class of Potent N-Methyl-D-Aspartate Receptor Inhibitors: Sulfated Neuroactive

Steroids with Lipophilic D-Ring Modifications. *Journal of medicinal chemistry* 58: 5950-66

Kuner T, Wollmuth LP, Karlin A, Seeburg PH, Sakmann B. 1996. Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17: 343-52

Kussius CL, Kaur N, Popescu GK. 2009. Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 6819-27

Kutsuwada T, Sakimura K, Manabe T, Takayama C, Katakura N, et al. 1996. Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron* 16: 333-44

Ladislav M, Cerny J, Krusek J, Horak M, Balik A, Vyklicky L. 2018. The LILI Motif of M3-S2 Linkers Is a Component of the NMDA Receptor Channel Gate. *Frontiers in molecular neuroscience* 11: 113

Lapchak PA. 2004. The neuroactive steroid 3-alpha-ol-5-beta-pregnan-20-one hemisuccinate, a selective NMDA receptor antagonist improves behavioral performance following spinal cord ischemia. *Brain Res* 997: 152-8

Lau CG, Zukin RS. 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature reviews. Neuroscience* 8: 413-26

Lee CH, Lu W, Michel JC, Goehring A, Du J, et al. 2014. NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature* 511: 191-7

Leeson PD, Baker R, Carling RW, Curtis NR, Moore KW, et al. 1991. Kynurenic acid derivatives. Structure-activity relationships for excitatory amino acid antagonism and identification of potent and selective antagonists at the glycine site on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of medicinal chemistry* 34: 1243-52

Legendre P, Westbrook GL. 1991. Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. *Molecular pharmacology* 40: 289-98

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, et al. 2016. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536: 285-91

Lelieveld SH, Reijnders MR, Pfundt R, Yntema HG, Kamsteeg EJ, et al. 2016. Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nature neuroscience* 19: 1194-6

Lemke JR, Hendrickx R, Geider K, Laube B, Schwake M, et al. 2014. GRIN2B mutations in West syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. *Annals of neurology* 75: 147-54

Lester RA, Jahr CE. 1992. NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12: 635-43

Linsenbardt AJ, Taylor A, Emnett CM, Doherty JJ, Krishnan K, et al. 2014. Different oxysterols have opposing actions at N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuropharmacology* 85: 232-42

Lipton SA. 1993. Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends in neurosciences* 16: 527-32

Lipton SA. 2005. The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Current Alzheimer research* 2: 155-65

Lodge D, Anis NA. 1982. Effects of phencyclidine on excitatory amino acid activation of spinal interneurones in the cat. *European journal of pharmacology* 77: 203-4

Lodge D, Anis NA, Burton NR. 1982. Effects of optical isomers of ketamine on excitation of cat and rat spinal neurones by amino acids and acetylcholine. *Neuroscience letters* 29: 281-6

Malayev A, Gibbs TT, Farb DH. 2002. Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. *British journal of pharmacology* 135: 901-9

Malenka RC, Nicoll RA. 1999. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285: 1870-4

Manahan-Vaughan D, von Haebler D, Winter C, Juckel G, Heinemann U. 2008. A single application of MK801 causes symptoms of acute psychosis, deficits in spatial memory, and impairment of synaptic plasticity in rats. *Hippocampus* 18: 125-34

Martin HGS, Lassalle O, Brown JT, Manzoni OJ. 2016. Age-Dependent Long-Term Potentiation Deficits in the Prefrontal Cortex of the Fmr1 Knockout Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Cerebral cortex* 26: 2084-92

Mattson MP. 2003. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular medicine* 3: 65-94

Mayer ML, Vyklicky L, Jr. 1989. The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. *The Journal of physiology* 415: 351-65

Mayer ML, Vyklicky L, Jr., Clements J. 1989. Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* 338: 425-7

Mayer ML, Westbrook GL. 1987. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *The Journal of physiology* 394: 501-27

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. 1984. Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261-3

McKay S, Griffiths NH, Butters PA, Thubron EB, Hardingham GE, Wyllie DJ. 2012. Direct pharmacological monitoring of the developmental switch in NMDA receptor subunit composition using TCN 213, a GluN2A-selective, glycine-dependent antagonist. *British journal of pharmacology* 166: 924-37

Mcrae JF, Clayton S, Fitzgerald TW, Kaplanis J, Prigmore E, et al. 2017. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature* 542: 433-+

Mellon SH, Deschepper CF. 1993. Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain research* 629: 283-92

Mellon SH, Griffin LD. 2002. Synthesis, regulation, and function of neurosteroids. *Endocrine research* 28: 463

Mendes P. 1993. GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput Appl Biosci* 9: 563-71.

Mendes P. 1997. Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends in biochemical sciences* 22: 361-3.

Mendes P, Kell D. 1998. Non-linear optimization of biochemical pathways: applications to metabolic engineering and parameter estimation. *Bioinformatics* 14: 869-83

Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacological reviews* 51: 63-81

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. 1989. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual review of pharmacology and toxicology* 29: 365-402

Monaghan DT, Irvine MW, Costa BM, Fang G, Jane DE. 2012. Pharmacological modulation of NMDA receptor activity and the advent of negative and positive allosteric modulators. *Neurochem Int* 61: 581-92

Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P. 2009. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *British journal of pharmacology* 157: 1301-17

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529-40

Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, et al. 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256: 1217-21

Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-7

Mosley CA, Acker TM, Hansen KB, Mullasseril P, Andersen KT, et al. 2010. Quinazolin-4-one derivatives: A novel class of noncompetitive NR2C/D subunit-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Journal of medicinal chemistry* 53: 5476-90

Mullasseril P, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Yuan H, et al. 2010. A subunit-selective potentiator of NR2C- and NR2D-containing NMDA receptors. *Nature communications* 1: 90

Mullier B, Wolff C, Sands ZA, Ghisdal P, Muglia P, et al. 2017. GRIN2B gain of function mutations are sensitive to radiprodil, a negative allosteric modulator of GluN2B-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology* 123: 322-31

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-5

Ogden KK, Chen W, Swanger SA, McDaniel MJ, Fan LZ, et al. 2017. Molecular Mechanism of Disease-Associated Mutations in the Pre-M1 Helix of NMDA Receptors and Potential Rescue Pharmacology. *PLoS genetics* 13: e1006536

Ogden KK, Traynelis SF. 2013. Contribution of the M1 transmembrane helix and pre-M1 region to positive allosteric modulation and gating of N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular pharmacology* 83: 1045-56

Okabe S, Miwa A, Okado H. 1999. Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 7781-92

Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. 1999. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *Journal of psychiatric research* 33: 523-33

Palmer GC. 2001. Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Current drug targets* 2: 241-71

Paoletti P. 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *The European journal of neuroscience* 33: 1351-65

Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience* 14: 383-400

Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, et al. 2012. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150: 633-46

Park-Chung M, Malayev A, Purdy RH, Gibbs TT, Farb DH. 1999. Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain research* 830: 72-87

Park-Chung M, Wu FS, Farb DH. 1994. 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Molecular pharmacology* 46: 146-50

Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev AA, Gibbs TT, Farb DH. 1997. Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Molecular pharmacology* 52: 1113-23

Parsons MP, Raymond LA. 2014. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron* 82: 279-93

Paul SM, Doherty JJ, Robichaud AJ, Belfort GM, Chow BY, et al. 2013. The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33: 17290-300

Petrovic M, Sedlacek M, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2005. 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 8439-50

Pin J-P, Acher F. 2002. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders* 1: 297-317

Platzer K, Yuan H, Schutz H, Winschel A, Chen W, et al. 2017. GRIN2B encephalopathy: novel findings on phenotype, variant clustering, functional consequences and treatment aspects. *J Med Genet* 54: 460-70

Popescu G, Auerbach A. 2003. Modal gating of NMDA receptors and the shape of their synaptic response. *Nature neuroscience* 6: 476-83

Rambousek L, Bubenikova-Valesova V, Kacer P, Syslova K, Kenney J, et al. 2011. Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-d-aspartate receptor 3alpha5beta-pregnanolone glutamate. *Neuropharmacology* 61: 61-8

Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, et al. 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 348: 1333-41

Riedlova K, Nekardova M, Kacer P, Syslova K, Vazdar M, et al. 2017. Distributions of therapeutically promising neurosteroids in cellular membranes. *Chemistry and physics of lipids* 203: 78-86

Riou M, Stroebel D, Edwardson JM, Paoletti P. 2012. An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors. *PloS one* 7: e35134

Rogawski MA. 1993. Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends in pharmacological sciences* 14: 325-31

Rogawski MA, Wenk GL. 2003. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev* 9: 275-308

Rosenmund C, Feltz A, Westbrook GL. 1995a. Calcium-dependent inactivation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology* 73: 427-30

Rosenmund C, Feltz A, Westbrook GL. 1995b. Synaptic NMDA receptor channels have a low open probability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15: 2788-95

Salussolia CL, Prodromou ML, Borker P, Wollmuth LP. 2011. Arrangement of subunits in functional NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 11295-304

Santangelo Freel RM, Ogden KK, Strong KL, Khatri A, Chepiga KM, et al. 2013. Synthesis and structure activity relationship of tetrahydroisoquinoline-based potentiators of GluN2C and GluN2D containing N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of medicinal chemistry* 56: 5351-81

Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW. 2013. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 19: 62-75

Sedlacek M, Korinek M, Petrovic M, Cais O, Adamusova E, et al. 2008. Neurosteroid modulation of ionotropic glutamate receptors and excitatory synaptic transmission. *Physiological research* 57 Suppl 3: S49-57

Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY. 1994. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368: 144-7

Slavikova B, Chodounska H, Nekardova M, Vyklicky V, Ladislav M, et al. 2016. Neurosteroid-like Inhibitors of N-Methyl-d-aspartate Receptor: Substituted 2-Sulfates and 2-Hemisuccinates of Perhydrophenanthrene. *Journal of medicinal chemistry* 59: 4724-39

Sobolevskii AI, Khodorov BI. 2002. Blocker studies of the functional architecture of the NMDA receptor channel. *Neuroscience and behavioral physiology* 32: 157-71

Sobolevsky AI, Beck C, Wollmuth LP. 2002. Molecular rearrangements of the extracellular vestibule in NMDAR channels during gating. *Neuron* 33: 75-85

Sobolevsky AI, Koshelev SG, Khodorov BI. 1999. Probing of NMDA channels with fast blockers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 10611-26

Sobolevsky AI, Prodromou ML, Yelshansky MV, Wollmuth LP. 2007. Subunit-specific contribution of pore-forming domains to NMDA receptor channel structure and gating. *The Journal of general physiology* 129: 509-25

Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E. 2009. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462: 745-56

Sobolevsky AI, Yelshansky MV, Wollmuth LP. 2004. The outer pore of the glutamate receptor channel has 2-fold rotational symmetry. *Neuron* 41: 367-78

Soto D, Altafaj X, Sindreu C, Bayes A. 2014. Glutamate receptor mutations in psychiatric and neurodevelopmental disorders. *Commun Integr Biol* 7: e27887

Standley S, Roche KW, McCallum J, Sans N, Wenthold RJ. 2000. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28: 887-98

Stastna E, Chodounska H, Pouzar V, Kapras V, Borovska J, et al. 2009. Synthesis of C3, C5, and C7 pregnane derivatives and their effect on NMDA receptor responses in cultured rat hippocampal neurons. *Steroids* 74: 256-63

Stroebel D, Carvalho S, Paoletti P. 2011. Functional evidence for a twisted conformation of the NMDA receptor GluN2A subunit N-terminal domain. *Neuropharmacology* 60: 151-8

Strong KL, Epplin MP, Bacsa J, Butch CJ, Burger PB, et al. 2017. The Structure Activity Relationship of a Tetrahydroisoquinoline Class of N-Methyl--Aspartate Receptor Modulators that Potentiates GluN2B-Containing N-Methyl--Aspartate Receptors. *Journal of medicinal chemistry*

Sugiyama H, Ito I, Hirono C. 1987. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325: 531-3

Sucher NJ, Awobuluyi M, Choi Y-B, Lipton SA. 1996. NMDA receptors: from genes to channels. *Trends in pharmacological sciences* 17: 348-55

Swanger SA, Chen W, Wells G, Burger PB, Tankovic A, et al. 2016. Mechanistic Insight into NMDA Receptor Dysregulation by Rare Variants in the GluN2A and GluN2B Agonist Binding Domains. *American journal of human genetics* 99: 1261-80

Szejtli J. 1998. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical reviews* 98: 1743-54

Tarabeux J, Kebir O, Gauthier J, Hamdan FF, Xiong L, et al. 2011. Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Translational psychiatry* 1: e55

Tarcsay A, Nyiri K, Keseru GM. 2012. Impact of lipophilic efficiency on compound quality. *Journal of medicinal chemistry* 55: 1252-60

Thomas CG, Krupp JJ, Bagley EE, Bauzon R, Heinemann SF, et al. 2006. Probing N-methyl-D-aspartate receptor desensitization with the substituted-cysteine accessibility method. *Molecular pharmacology* 69: 1296-303

Tovar KR, Westbrook GL. 1999. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 4180-8

Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. 1995. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268: 873-6

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, et al. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62: 405-96

Turecek R, Vlcek K, Petrovic M, Horak M, Vlachova V, Vyklicky L, Jr. 2004. Intracellular spermine decreases open probability ofN-methyl-d-aspartate receptor channels. *Neuroscience* 125: 879-87

Ulbrich MH, Isacoff EY. 2008. Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14163-8

Villarroel A, Burnashev N, Sakmann B. 1995. Dimensions of the narrow portion of a recombinant NMDA receptor channel. *Biophysical journal* 68: 866-75

Villarroel A, Regalado MP, Lerma J. 1998. Glycine-independent NMDA receptor desensitization: localization of structural determinants. *Neuron* 20: 329-39

Volgraf M, Sellers BD, Jiang Y, Wu G, Ly CQ, et al. 2016. Discovery of GluN2A-Selective NMDA Receptor Positive Allosteric Modulators (PAMs): Tuning Deactivation Kinetics via Structure-Based Design. *Journal of medicinal chemistry* 59: 2760-79

von Stulpnagel C, Ensslen M, Moller RS, Pal DK, Masnada S, et al. 2017. Epilepsy in patients with GRIN2A alterations: Genetics, neurodevelopment, epileptic phenotype and response to anticonvulsive drugs. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society* 21: 530-41

Vyklicky L, Jr. 1993. Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. *The Journal of physiology* 470: 575-600

Vyklicky L, Jr., Krusek J, Edwards C. 1988. Differences in the pore sizes of the N-methyl-D-aspartate and kainate cation channels. *Neuroscience letters* 89: 313-8

Vyklicky L, Jr., Vlachova V, Krusek J. 1990. The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *The Journal of physiology* 430: 497-517

Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, et al. 2014. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological research* 63 Suppl 1: S191-203

Vyklicky V, Krausova B, Cerny J, Balik A, Zapotocky M, et al. 2015. Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the agonist induced conformational states of the channel vestibule. *Scientific reports* 5: 10935

Vyklicky V, Krausova B, Cerny J, Ladislav M, Smejkalova T, et al. 2018. Surface Expression, Function, and Pharmacology of Disease-Associated Mutations in the Membrane Domain of the Human GluN2B Subunit. *Frontiers in molecular neuroscience* 11: 110

Vyklicky V, Smejkalova T, Krausova B, Balik A, Korinek M, et al. 2016. Preferential Inhibition of Tonically over Phasically Activated NMDA Receptors by Pregnane Derivatives. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36: 2161-75

Wang TM, Brown BM, Deng L, Sellers BD, Lupardus PJ, et al. 2017. A novel NMDA receptor positive allosteric modulator that acts via the transmembrane domain. *Neuropharmacology*

Watkins JC, Davies J, Evans RH, Francis AA, Jones AW. 1981. Pharmacology of receptors for excitatory amino acids. *Advances in biochemical psychopharmacology* 27: 263-73

Watkins JC, Evans RH. 1981. Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21: 165-204

Weaver CE, Jr., Marek P, Park-Chung M, Tam SW, Farb DH. 1997. Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10450-4

Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT, Farb DH. 2000. Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca(2+) accumulation and cell death. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 293: 747-54

Weiss JN. 1997. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11: 835-41

White TL, Youngentob SL. 2004. The effect of NMDA-NR2B receptor subunit over-expression on olfactory memory task performance in the mouse. *Brain research* 1021: 1-7

Williams K. 1993. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular pharmacology* 44: 851-9

Williams K, Pahk AJ, Kashiwagi K, Masuko T, Nguyen ND, Igarashi K. 1998. The selectivity filter of the N-methyl-D-aspartate receptor: a tryptophan residue controls block and permeation of Mg2+. *Molecular pharmacology* 53: 933-41

Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB. 1991. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life sciences* 48: 469-98

Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL. 1986. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 7104-8

Woodhull AM. 1973. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *The Journal of general physiology* 61: 687-708

Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. 1991. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular pharmacology* 40: 333-6

Xia P, Chen HS, Zhang D, Lipton SA. 2010. Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 11246-50

Yaghoubi N, Malayev A, Russek SJ, Gibbs TT, Farb DH. 1998. Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. *Brain research* 803: 153-60

Yancey PG, Rodrigueza WV, Kilsdonk EP, Stoudt GW, Johnson WJ, et al. 1996. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux. *The Journal of biological chemistry* 271: 16026-34

Yavarna T, Al-Dewik N, Al-Mureikhi M, Ali R, Al-Mesaifri F, et al. 2015. High diagnostic yield of clinical exome sequencing in Middle Eastern patients with Mendelian disorders. *Human genetics* 134: 967-80

Yeagle PL. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochimica et biophysica acta* 822: 267-87

Yuan H, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Traynelis SF. 2009. Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 12045-58

Yuan H, Hansen KB, Zhang J, Pierson TM, Markello TC, et al. 2014. Functional analysis of a de novo GRIN2A missense mutation associated with early-onset epileptic encephalopathy. *Nature communications* 5: 3251

Yuan H, Low CM, Moody OA, Jenkins A, Traynelis SF. 2015. Ionotropic GABA and Glutamate Receptor Mutations and Human Neurologic Diseases. *Molecular pharmacology* 88: 203-17

Zarei MM, Dani JA. 1995. Structural basis for explaining open-channel blockade of the NMDA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15: 1446-54

Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K+ channel-Fab complex at 2.0 A resolution. *Nature* 414: 43-8

Zhu S, Riou M, Yao CA, Carvalho S, Rodriguez PC, et al. 2014. Genetically encoding a light switch in an ionotropic glutamate receptor reveals subunit-specific interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 6081-6

Zhu X, Petrovski S, Xie P, Ruzzo EK, Lu YF, et al. 2015. Whole-exome sequencing in undiagnosed genetic diseases: interpreting 119 trios. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 17: 774-81

Zukin RS, Bennett MV. 1995. Alternatively spliced isoforms of the NMDARI receptor subunit. *Trends in neurosciences* 18: 306-13

10 SEZNAM PUBLIKACÍ

9.1 Tato dizertační práce je založena na výsledcích uveřejněných v následujících impaktovaných publikacích:

Krausova B, Slavikova B, Nekardova M, Hubalkova P, Vyklicky V, Chodounska H,Vyklicky L, Kudova E (2018) Positive Modulators of the N-Methyl-d-aspartate Receptor: Structure-Activity Relationship Study of Steroidal 3-Hemiesters. *Journal of medicinal chemistry* 61:4505-4516. (IF = 6.259; rok 2016)
[**BK** - návrh experimentů, provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza, psaní manuskriptu]

Vyklicky V, **Krausova B**, Cerny J, Ladislav M, Smejkalova T, Kysilov B, Korinek M, Danacikova S, Horak M, Chodounska H, Kudova E, Vyklicky L (2018) Surface Expression, Function, and Pharmacology of Disease-Associated Mutations in the Membrane Domain of the Human GluN2B Subunit. *Frontiers in molecular neuroscience* 11:110. (IF = 5.076; rok 2016)
[**BK** - provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza, provádění imunofluorescenčních experimentů a jejich analýza, příprava bodových mutací]

Adla SK, Slavikova B, Smidkova M, Tloustova E, Svoboda M, Vyklicky V, **Krausova B**, Hubalkova P, Nekardova M, Holubova K, Vales K, Budesinsky M, Vyklicky L, Chodounska H, Kudova E (2017) Physicochemical and biological properties of novel amide-based steroidal inhibitors of NMDA receptors. *Steroids* S0039-128X(16)30106-4. (IF= 2.282; rok 2016)
[**BK** - provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza]

Vyklicky V, Smejkalova T, **Krausova B**, Balik A, Korinek M, Borovska J, Horak M, Chvojkova M, Kleteckova L, Vales K, Cerny J, Nekardova M, Chodounska H, Kudova E, Vyklicky L (2016) Preferential Inhibition of Tonically over Phasically Activated NMDA Receptors by Pregnane Derivatives. *The Journal of neuroscience* 36(7):2161-75. (IF= 5.988; rok 2016)
[**BK** - provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza]

Slavikova B, Chodounska H, Nekardova M, Vyklicky V, Ladislav M, Hubalkova P, **Krausova B**, Vyklicky L, Kudova E (2016) Neurosteroid-like Inhibitors of N-Methyl-D-aspartate Receptor: Substituted 2-Sulfates and 2-Hemisuccinates of Perhydrophenanthrene. *Journal of medicinal chemistry* 59(10):4724-39. (IF= 6.259; rok 2016)
[**BK** - provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza]

Kudova E, Chodounska H, Slavikova B, Budesinsky M, Nekardova M, Vyklicky V, **Krausova B**, Svehla P, Vyklicky L (2015) A New Class of Potent N-Methyl-D-Aspartate

Receptor Inhibitors: Sulfated Neuroactive Steroids with Lipophilic D-ring Modifications. *Journal of medicinal chemistry* 58(15):5950-66. (IF= 5.589; rok 2015)
[**BK** - provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza]

Uvedené publikace jsou součástí příloh.

9.2 Ostatní autorčiny impaktované publikace:

Vyklicky V, **Krausova B**, Cerny J, Balik A, Zapotocky M, Novotny M, Lichnerova K, Smejkalova T, Kaniakova M, Korinek M, Petrovic M, Kacer P, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L (2015) Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the agonist induced conformational states of the channel vestibule. *Scientific reports* 5: 10935. (IF= 5.228; rok 2015)

Korinek M, Vyklicky V, Borovska J, Lichnerova K, Kaniakova M, **Krausova B**, Krusek J, Balik A, Smejkalova T, Horak M, Vyklicky L (2015) Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. *The Journal of Physiology* 593(10):2279-93. (IF = 4.544; rok 2015)

Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, **Krausova B**, Kaniakova M, Lichnerova K, Cerny J, Krusek J, Dittert I, Horak M, Vyklicky L (2014) Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res 63 Suppl* 1:S191-203. (IF = 1.293; rok 2014)

Cerny I, Budesinsky M, Pouzar V, Vyklicky V, **Krausova B**, Vyklicky L (2012) Neuroactive steroids with perfluorobenzoyl group. *Steroids.* 77:1233-1241. (IF = 2.803, rok 2012)

Kaniakova M, **Krausova B**, Vyklicky V, Korinek M, Lichnerova K, Vyklicky L, Horak M (2012) Key amino acid residues within the third membrane domains of NR1 and NR2 subunits contribute to the regulation of the surface delivery of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of biological chemistry* 287:26423-26434. (IF = 4.651, rok 2012)

9.3 Kapitoly v monografiích:

Vyklicky V, Korinek M, Balik A, Smejkalova T, **Krausova B**, Vyklicky L (2015) Analysis of whole-cell NMDA receptor responses. *Modern iGluR technologies.* Springer (editor Gabriela Popescu).

11 PŘÍLOHY