

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studium působení pregnenolonsulfátu na
NMDA receptory

Effect of pregnenolone sulphate on NMDA
receptors

Eva Adamusová

Diplomová práce


Externí školitel: MUDr. Ladislav Vyklický Jr., DrSc.

Garant práce: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením externího školitele MUDr. Ladislava Vyklického Jr., DrSc. a garanta práce Doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum: Praha
17.9.2008

Podpis:


Na tomto místě bych ráda poděkovala svému externímu školiteli MUDr. Ladislavu Vyklickému Jr., DrSc. za jeho nekonečnou trpělivost a laskavost, se kterou se věnoval mým vědeckým a často i nevědeckým otázkám.

Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. děkuji za ochotu, s níž se ujal záštity nad touto diplomovou prací.

Dále děkuji všem kolegům z Oddělení buněčné neurofyziologie FGÚ AV ČR, v.v.i. za vytvoření příjemných pracovních podmínek, díky kterým mohla být tato diplomová práce zpracována. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za obrovskou podporu během celého studia.

1. ÚVOD.....	3
Seznam použitých zkratk 4	4
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	6
2.1. Molekulární struktura NMDA receptorů.....	6
2.1.1. Primární struktura NMDA receptorů 6	6
2.1.2. Podjednotkové složení NMDA receptorů 7	7
2.2. Funkční vlastnosti NMDA receptoru.....	9
2.2.1. Aktivace NMDA receptorů, struktura glutamátového a glycinového místa 9	9
2.2.2. Model aktivace NMDA receptoru..... 10	10
2.2.3. Pravděpodobnost otevření NMDA receptorů..... 10	10
2.2.4. Desenzitizace NMDA receptorů 11	11
2.3. Farmakologie NMDA receptorů.....	12
2.3.1. Kompetitivní antagonisté glutamátu 13	13
2.3.2. Kompetitivní antagonisté glycinu 13	13
2.3.3. Akompetitivní antagonisté 14	14
2.3.4. Nekompetitivní antagonisté 15	15
2.3.4.1. Modulace Zn^{2+} , Cu^{2+} a H^{+} ionty 15	15
2.3.4.2. Polyaminy 16	16
2.3.4.3. Ifenprodil..... 17	17
2.3.4.4. Redoxní látky 17	17
2.3.4.5. Neurosteroidy..... 17	17
3. CÍLE PRÁCE	20
4. MATERIÁL A METODY.....	21
4.1. Molekulárně biologické metody	21
4.1.1. Použité geny..... 21	21
4.1.2. Použité roztoky 21	21
4.1.3. Sterilizace..... 21	21
4.1.4. Maxipreparace plazmidu (pomocí „Qiagen® Plasmid Midi Kit“)..... 21	21
4.1.5. Minipreparace plazmidu (pomocí „Qiagen® Plasmid Mini Kit“) 22	22
4.1.6. Příprava bodových mutací pomocí QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit..... 22	22
4.1.7. Skladování bakterií 23	23
4.2. Tkáňové kultury	24
4.2.1. Použité roztoky a média pro přípravu tkáňových kultur 24	24
4.2.2. Pasážování HEK 293 buněk..... 24	24
4.2.3. Transfekce HEK 293 buněk pomocí magnetického činidla MATRa-A 25	25
4.2.4. Příprava tkáňových kultur hipokampálních neuronů 25	25
4.3. Snímání odpovědí NMDA receptorů.....	26
4.3.1. Složení roztoků 26	26
4.3.2. Aplikace roztoků na snímané buňky 27	27
4.3.3. Poměrové měření $[Ca^{2+}]_i$ 27	27
4.3.3.1. Barvení buněk 27	27
4.3.3.2. Snímání fluorescenčního záření 28	28
4.3.3.3. Zpracování naměřených dat a hodnocení výsledků..... 28	28
4.3.3.4. Statistické zpracování výsledků 30	30
4.3.3.5. Rovnice použité k výpočtům..... 30	30

5. VÝSLEDKY	32
5.1. Studium působení PS na NR1-1a/NR2B receptorech	32
5.1.1. Účinky PS na $[Ca^{2+}]_i$	34
5.1.1.1. PS zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ u GFP-pozitivních HEK 293 buněk	34
5.1.1.2. Souvisejí změny v $[Ca^{2+}]_i$ pozorované během aplikace PS s NMDA receptory?	37
5.1.1.3. Mechanismus zvyšování $[Ca^{2+}]_i$ vlivem PS	39
5.1.1.4. PS zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ koncentračně závislým způsobem	41
5.1.1.5. Specifita účinku PS na $[Ca^{2+}]_i$	43
5.1.1.6. Účinek PS na $[Ca^{2+}]_i$ u buněk hipokampálních neuronů	44
5.2. Vazebné místo PS na NMDA receptorech	45
5.2.1. Vliv kyseliny 7-chlorkynurenové na PS vyvolané změny $[Ca^{2+}]_i$	45
5.2.2. Vliv D-APV na účinky PS na NR1-1a/NR2B receptorech	46
5.2.3. Vliv bodových mutací v glutamátovém místě na účinky PS na NR1-1a/NR2B receptorech	47
6. DISKUZE	50
6.1. Aktivace NMDA receptorů působením PS	50
6.2. Modulace NMDA receptorů neurosteroidy	53
6.3. Fyziologické důsledky modulace neuronální excitability PS	55
7. ZÁVĚR	57
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58

1. ÚVOD

Glutamátové receptory zprostředkovávají rychlý excitační přenos mezi neurony centrální nervové soustavy (CNS). Iontropní receptory aktivované glutamátem se vyskytují na většině neuronů i gliích a jejich aktivita je pro normální fungování nervové soustavy jako celku nezbytná.

Jedním z typů ionotropních receptorů jsou N-methyl-D-aspartát (NMDA) receptory, které se významně podílejí na procesu učení a vzniku paměťových stop. Jejich přílišná aktivace však může vést až k smrti neuronu s následnými psychiatrickými a neurologickými symptomy. Porozumění funkci a modulaci NMDA receptorů proto může přispět k terapii některých závažných duševních či neurodegenerativních chorob, a stává se tak významným předmětem studia.

Aktivita NMDA receptoru je ovlivňována celou řadou endogenních látek včetně neurosteroidů - látek, které vznikají v CNS a modulují činnost mnoha dalších iontových kanálů. Jedním z neurosteroidů, který pozitivně působí na aktivitu NMDA receptorů, je 20-oxopregn-5-en-3 β -yl sulfát (PS). Bylo ukázáno, že podání sulfatovaných neurosteroidů pozitivně modulujících NMDA receptory významně zlepšilo kognitivní vlastnosti u pokusných zvířat. Pochopení mechanismu působení neurosteroidů na molekulární úrovni může vést k objasnění jejich vlivu na fyziologické a patologické procesy a přispět tak k jejich případnému klinickému využití. Molekulárním mechanismem působení PS - jednoho z nejrozšířenějších neurosteroidů v CNS - na NMDA receptory se zabývá také tato diplomová práce.

Seznam použitých zkratek

[Ca ²⁺] _i	intracelulární koncentrace vápenatých kationtů
3α5βS	20-oxo-5βpregnan-3α-yl sulfát; pregnanolonsulfát
4Br -A23187	bromovaná forma antibiotika A23187
7-ClK	kyselina 7-chlorkynurenová
AMPA	kyselina α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová
AP7	kyselina D,L-2-amino-7-fosfonoheptanová
CCD	z angl. "Charge-Coupled Device"
CGP 39653	kyselina D,L-(E)-2-amino-4-propyl-5-fosfono-3-pentenová
CGS 19755	kyselina cis-4-(fosfonomethyl)piperidin-2-karboxylová
CNS	centrální nervová soustava
CPP	kyselina 3-(2-karboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-fosfonová
D-APV	kyselina D-2-amino-5-fosfovalerová
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	kyselina 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoová
DTT	(2S,3S)-1,4-bis-sulfanylbutan-2,3-diol; dithiothreitol
EC ₅₀	koncentrace účinné látky, při níž je dosaženo poloviny maximálního účinku
ECR	extracelulární roztok
EGTA	kyselina ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraoctová
F ₃₄₀	intenzita fluorescence vyvolaná excitací vlnovou délkou 340 nm
F ₃₈₀	intenzita fluorescence vyvolaná excitací vlnovou délkou 380 nm
fura-2-AM	fluorescenční sonda; acetomethylester kyseliny 1-[2-(5-karboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylfenoxy)-etan-N,N,N',N'-tetraoctové
GABA _A	kyselina γ-aminomáselná - receptor typ A
HEK 293	buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk
HEPES	N-[2-hydroxyetyl]piperazin-N'-[2-etansulfonová kyselina]
IC ₅₀	koncentrace účinné látky, při níž je dosaženo poloviny maximálního inhibičního účinku

K _d	rovnovážná disociační konstanta
LB médium	Luria-Bertani médium
LTP	dlouhodobá potenciace synaptického přenosu
MATRa-A	z angl. „Magnet-Assisted Transfection for adherent cells“
MK801	(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyklohepten-5,10-imin maleát
NMDA	kyselina N-methyl-D-asparagová
PBS	fosfáty pufovaný solný roztok
PCP	1-(1-fenylcyklohexyl)piperidin; fencyklidin
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. „Polymerase Chain Reaction“)
PMPA	kyselina 2-(fosfonomethyl)-pentandiová
Probenecid	kyselina 4-(dipropylsulfamoyl) benzoová
PS	20-oxopregn-5-en-3β-yl sulfát; pregnenolonsulfát
tetrodotoxin	oktahydro-12-(hydroxymethyl)-2-imino-5,9:7,10a-dimethano-10aH- [1,3]dioxocino[6,5-d]pyrimidin-4,7,10,11,12-pentol

2. Literární přehled

Glutamát je nejrozšířenější excitační neurotransmitter v savčí centrální nervové soustavě (CNS). Na velký význam glutamátových receptorů poukazuje fakt, že jen k udržení chodu excitačních synapsí se spotřebuje 35 % energie šedé kůry mozkové a další 3 % na metabolismus glutamátu {1}. Glutamátové receptory lze na základě mechanismu přenosu signálu rozdělit do následujících dvou skupin: *ionotropní glutamátové receptory* fungují jako ligandem aktivované iontové kanály, které se dále dělí podle svých selektivních agonistů na α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové (AMPA), kainátové a N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory (pro přehled {2}) a *metabotropní glutamátové receptory*, které jsou spřaženy s G-proteiny.

NMDA receptory, propustné pro ionty Ca^{2+} , se podílejí na rychlém synaptickém přenosu na většině excitačních synapsí v CNS a jejich aktivace je též nezbytná pro vznik některých forem synaptické plasticity jako je dlouhodobá potenciace synaptického přenosu (LTP; z angl. „long-term potentiation“), o níž se předpokládá, že je buněčnou podstatou formování paměti a učení. Nadměrnou aktivací NMDA receptorů dochází k nadměrnému zvýšení Ca^{2+} iontů uvnitř nervových buněk, což může vést až k jejich smrti. Tento jev je nazýván excitotoxicitou a existuje řada experimentálních výsledků svědčících o tom, že excitotoxicita je příčinou mnoha patologických stavů CNS – především těch projevujících se neurodegenerací, jako je např. Alzheimerova demence, Huntingtonova choroba, stavy po ischemii a traumatickém poškození mozku {3-8}. Nedávné pokroky v objasnění funkce, genetiky a struktury NMDA receptorů podporují hledání nových látek, které by mohly být terapeuticky využity.

2.1. Molekulární struktura NMDA receptorů

2.1.1. Primární struktura NMDA receptorů

Funkční NMDA receptor se podle dosavadních studií skládá ze čtyř podjednotek. Byly popsány tři rodiny těchto podjednotek a pojmenovány NR1, NR2 a NR3 {9-13}. NR1 podjednotka je kódována jedním genem. Může být exprimována z osmi různých sestřihových variant mRNA, které se liší přítomností či nepřítomností tří krátkých exonů na N-konci (N1) a C-konci (C1 a C2). Podle nepřítomnosti nebo přítomnosti N1 exonu se sestřihové varianty rozdělují na typ „a“ nebo „b“ (Obr.2.1.C, str.8). Jako první byla

klonována potkaní NR1-1a podjednotka, která je tvořena 938 aminokyselinovými zbytky {12}.

Podle dosavadních výzkumů existují čtyři typy podjednotky NR2, označovány písmeny A-D, které jsou kódovány čtyřmi různými geny. U NR2D podjednotky jsou známy dvě sestřihové varianty (NR2D1 a NR2D2), které vznikají sestřihem na C-konci {10}. Podjednotky NR2A-D obsahují 1464, 1482, 1250 a 1323 aminokyselinových zbytků. Celková sekvenční homologie mezi podjednotkou NR1 a podjednotkami NR2 je přibližně 18 %. Jednotlivé podjednotky NR2 jsou pak homologní ze 40-70 %, v hydrofobních oblastech až z 90 %, naopak v úsecích na C-koncích vykazují nízkou homologii {10, 11}.

Jako poslední byly popsány dva typy podjednotky NR3. Podjednotka NR3A, která se vyskytuje ve dvou sestřihových variantách, je tvořena 1115 aminokyselinovými zbytky a vyazuje 27 % homologii s ostatními podjednotkami {13, 14}. Podjednotka NR3B je složena z 1002 aminokyselinových zbytků a je homologní ze 47 % k podjednotce NR3A, ale jen ze 17-21 % k podjednotkám NR1 a NR2 {9}.

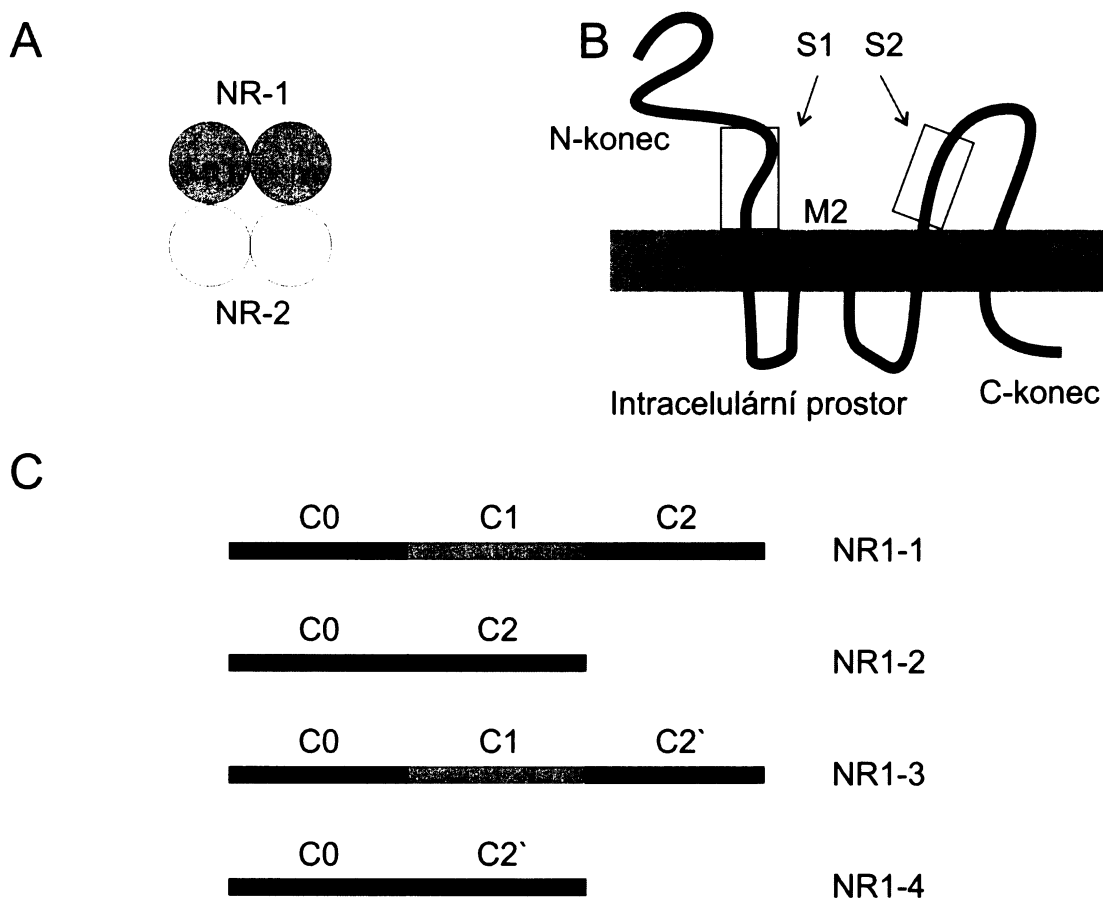
Jednotlivé podjednotky NMDA receptorů jsou tvořeny dlouhým extracelulárním N-koncem, čtyřmi membránovými segmenty (M1-M4) a intracelulárním C-koncem, který slouží jako doména pro kontakt s intracelulárními proteiny (Obr. 2.1.B, str.8). M2 segment, tvořící pouze smyčku zanořenou v membráně, formuje část póru iontového kanálu. Extracelulární část obsahuje dvě domény. Blíže N-konci se nachází doména důležitá pro vazbu různých modulačních látek, blíže membráně pak úseky S1 a S2 formují vazebné místo agonistů {2}.

2.1.2. Podjednotkové složení NMDA receptorů

Vlastnosti NMDA receptoru závisejí na jeho podjednotkovém složení. Funkční heterotetramer je vždy tvořen dvěma podjednotkami NR1, které jsou zpravidla doplněny dvěma NR2 podjednotkami jednoho typu {15, 16}, jejichž orientace je 1-1-2-2 (Obr 2.1.A, str.8) {16}. Bylo však prokázáno, že podjednotky NR1 mohou být také doplněny dvěma různými typy NR2 podjednotek {9, 11, 12, 17, 18}, z nichž jedna nebo obě mohou být nahrazeny podjednotkou NR3 {13, 14}.

Expres NR1 podjednotek v oocytech *Xenopus laevis* naznačovala možnost existence funkčního iontového kanálu složeného pouze z podjednotek NR1. Zde však pravděpodobně docházelo k jejich kombinaci s proteinem přirozeně se vyskytujícím v oocytech, který má podobné vlastnosti jako NR2 podjednotky {12}.

Zatímco podjednotky NR1 jsou exprimovány ve velkém množství v celém mozku, exprese ostatních podjednotek se omezuje jen na některé jeho části a vývojová stadia. NR2A a NR2B jsou hlavní podjednotky exprimované v hipokampu a mozkové kůře dospělých potkanů a podjednotka NR2C je exprimována téměř výhradně v mozečku. Exprese NR2D podjednotky je vázána především na raná postnatální stadia vývoje CNS. NR3A podjednotka je exprimována především během embryonálního vývoje v řadě oblastí CNS. Exprese NR3B podjednotky se v postnatálním vývoji příliš nemění a je omezena pouze na motoneurony v míše a v mozkovém kmeni {9, 13}. Podjednotky NR3 se kombinují s podjednotkami NR1/NR2 za vzniku funkčních NR1/NR2/NR3 receptorů, které však mají menší jednotkovou vodivost {17}. Z pokusů na rekombinantních i na nativních NMDA receptorech je zřejmé, že funkční a farmakologické vlastnosti receptoru jsou podmíněny především typem NR2 podjednotky {10, 11}.



Obrázek 2.1. A. NMDA receptor, je pravděpodobně heterotetramer tvořený dvěma NR1 podjednotkami a dvěma NR2 podjednotkami jejichž orientace je 1-1-2-2 {16}. B. Jednotlivé podjednotky NMDA receptorů jsou tvořeny dlouhým extracelulárním

N-koncem, čtyřmi membránovými segmenty (M1-M4) a intracelulárním C-koncem, který slouží jako doména pro kontakt s intracelulárními proteiny. Smyčka M2 segmentu tvoří část póru iontového kanálu. Úseky S1 na N-konci a S2 na smyčce mezi 3. a 4. transmembránovou doménou (M3-M4) tvoří vazebné místo agonistů (upraveno podle {2}). C. Sestřihové varianty podjednotky NR1 se liší přítomností či nepřítomností krátkých úseků na C-konci proteinu (C1, C2, C2') (upraveno podle {2}).

2.2. Funkční vlastnosti NMDA receptoru

2.2.1. Aktivace NMDA receptorů, struktura glutamátového a glycinového místa

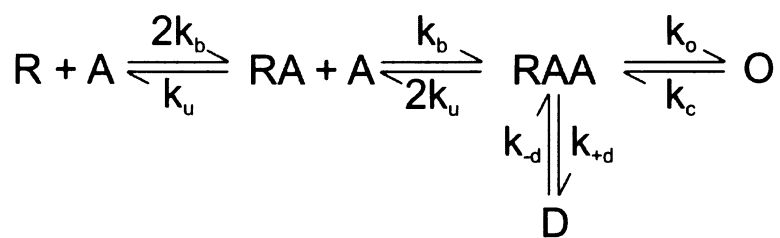
Pro otevření iontového kanálu, který je integrální součástí NMDA receptoru, je nutná současná aktivace vazebných míst pro glutamát a glycin {19-21}. Endogenními agonisty glutamátového místa jsou L-glutamát, L-aspartát a další aminokyseliny nesoucí jednu ω -kyselou skupinu, přičemž její druh, délka řetězce a optický izomer ovlivňují afinitu k vazebnému místu {22}. Exogenním selektivním agonistou glutamátového místa, podle kterého byla celá skupina receptorů pojmenována, je N-methyl-D-aspartát {23}. Afinita glutamátu k NMDA receptorům závisí na jejich podjednotkovém složení. Na rekombinantních NR1-1a/NR2A-D receptorech byly pro glutamát naměřeny tyto hodnoty EC_{50} : 1,7; 0,8; 0,7 a 0,4 μ M {10, 18}. Fyziologickými agonisty glycinového místa, které se nachází na podjednotce NR1, jsou glycin, D-serin a další malé aminokyseliny, ovšem pouze některé z nich se váží s dostatečně vysokou afinitou a mohou sloužit jako fyziologický ligand {19, 20}. Hodnoty EC_{50} pro glycin na rekombinantních NR1-1a/NR2A-D receptorech jsou 2,1; 0,3; 0,2 a 0,1 μ M {10, 18}.

Studie na chimérických a mutantních podjednotkách NMDA receptorů prokázaly, že vazebná místa pro agonisty jsou tvořena oblastí S1 na N-konci a oblastí S2 na smyčce mezi 3. a 4. transmembránovou doménou (M3, M4) (Obr. 2.1.B, str.8) Vazebné místo pro glycin bylo lokalizováno na podjednotce NR1 a studiem odpovídajících aminokyselinových zbytků na NR2 podjednotce bylo identifikováno i glutamátové vazebné místo {24}. Struktura vazebných míst pro oba agonisty byla krystalograficky rozřešena {25, 26}. V oocytech *Xenopus laevis* byly nalezeny NMDA receptory, které jsou překvapivě aktivované pouze glycinem. Jsou tvořeny z podjednotek NR1-1a a NR3A - hodnota EC_{50} pak je 1 μ M - nebo NR1-1a a NR3B, u nichž byla naměřena hodnota EC_{50} pro glycin 5 μ M. Tyto iontové kanály jsou však propustné pouze pro ionty Na^+ , na rozdíl od NR1/NR2 receptorů, které jsou propustné i pro Ca^{2+} ionty {9}.

2.2.2. Model aktivace NMDA receptoru

Po uvolnění glutamátu z presynaptického zakončení během excitačního přenosu se jeho koncentrace v synaptické šterbině krátkodobě (~1 ms) zvýší až na milimolární úroveň (~1 mM) {27}. Tento výlev glutamátu pak aktivuje ionotropní glutamátové receptory a vzniká tak excitační postsynaptický proud (EPSP) skládající se z rychlé AMPA/kainátové komponenty a pomalé komponenty zprostředkované NMDA receptory {28}. Příčiny pomalého průběhu NMDA složky souvisí s aktivační kinetikou NMDA receptoru. K jejímu popisu bylo navrženo několik modelů.

Základní schéma předpokládá dvě identická a nezávislá místa pro vazbu glutamátu a popisuje pět možných konformačních stavů NMDA receptoru: zavřený s nenávanou žádnou (R), jednou (RA) nebo se dvěma (RAA) molekulami glutamátu, otevřený (O) a desenzitizovaný (D) (Obr. 2.2.) {29}. Tento model umožňuje popsat časový průběh makroskopických proudů vyvolaných rychlou aplikací glutamátu, desenzitizaci a aktivaci receptoru agonistou.



Obrázek 2.2. Kinetický model aktivace NMDA receptorů s následujícím značením stavu receptoru: zavřený s nenávanou žádnou (R), jednou (RA) nebo se dvěma (RAA) molekulami agonisty v glutamátovém místě, otevřený (O) a desenzitizovaný (D). k_b a k_u jsou rychlostní konstanty vazby resp. odvazování agonisty, k_o a k_c konstanty otevírání a zavírání NMDA receptoru a k_{+d} a k_{-d} konstanty desenzitizace resp. resenzitizace (upraveno podle {29}).

2.2.3. Pravděpodobnost otevření NMDA receptorů

Většina experimentálních dat se shoduje v tom, že jen malá část receptorů, které jsou aktivovány agonistou, se nachází ve stavu, kdy je iontový kanál otevřený. Předpokládá se, že v přítomnosti saturující koncentrace glutamátu (například 1 mM, což je předpokládaná koncentrace na synapsi během synaptického přenosu) se nachází většina (>99%) receptorů krátce po jejich aktivaci ve stavu RAA nebo O. Přejchod mezi RAA a O je dán

rychlostními konstantami otevírání a zavírání, které určují pravděpodobnost otevření iontového kanálu (P_o ; $P_o = k_1/(k_1+k_2)$) (Obr. 2.2, str. 10). Hodnota P_o byla stanovována různými metodami většinou pomocí napětově závislého blokátoru iontového kanálu farmakologickou látkou (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-iminmalát (MK-801). Měřením nativních NMDA receptorů na tkáňových kulturách hipokampálních neuronů byly zjištěny různé hodnoty P_o pohybující se od 0,02 % do 30 % {30, 31}. Rozdíly jsou pravděpodobně dány nejen odlišnostmi v experimentálním přístupu, ale i vlastnostmi NMDA receptorů, které jsou ovlivněny endogenními faktory. Měření na rekombinantních receptorech ukázala, že hodnota P_o závisí též na podjednotkovém složení receptoru. Pro receptory NR1-1a/NR2A a NR1-1a/NR2B byly zjištěny hodnoty P_o 35 % a 7 % {32}. Hodnoty P_o pro rekombinantní NR1/NR2C-D receptory dosud nebyly spolehlivě určeny.

2.2.4. Desenzitizace NMDA receptorů

Desenzitizace je agonistou navozený stav receptoru, který se stane refrakterní k další aplikaci agonisty. V elektrofyziologických měřeních je tento jev pozorován jako časově závislé snížení odpovědi během aplikace agonisty {33}. Podle tří molekulárních mechanismů, které jej objasňují, rozlišujeme u NMDA receptorů desenzitizaci glycin-citlivou, glycin-nezávislou a Ca^{2+} -závislou (pro přehled {2}).

Ke glycin-citlivé desenzitizaci dochází při nízkých (nesaturujících) koncentracích glycinu {34, 35}. Bylo zjištěno, že mezi vazebnými místy pro glycin a glutamát existuje negativní alosterické spojení {21}. Vazba glutamátu na NMDA receptor snižuje jeho afinitu pro glycin. Vzhledem k tomu, že oba koagonisté tj. glutamát a glycin musí být navázány na receptor, po vazbě glutamátu dojde k uvolnění glycinu a následnému snížení odpovědi. Časový průběh této „desenzitizace“ odpovídá době potřebné k ustavení rovnováhy receptorů s okolní koncentrací glycinu {36}.

Míra glycin-nezávislé desenzitizace NMDA receptorů je ovlivněna řadou různých mechanismů včetně fosforylace nebo protein-proteinových interakcí {37, 38}. Pokusy na rekombinantních NMDA receptorech ukázaly, že receptory složené z podjednotek NR1/NR2A-B, na rozdíl od NR1/2C-D, výrazně desenzitizují v přítomnosti saturujících koncentrací agonistů {39}. Předpokládá se, že hlavní příčinou odlišné míry glycin-nezávislé desenzitizace pozorované u rekombinantních NMDA receptorů jsou rozdíly v aminokyselinovém složení dvou úseků NR2 podjednotky. Jedná se o dvě N-koncové

domény: pre-M1 doménu tvořenou čtyřmi aminokyselinovými zbytky blízko první transmembránové domény a doménu v S1 oblasti tvořenou 190 aminokyselinovými zbytky (Obr. 2.1.B, str.8) {37, 40}. Význam však mohou mít i další místa. Bylo například ukázáno, že zavedení bodové mutace ve vysoce konzervované oblasti transmembránového úseku M3 na podjednotce NR1 také ovlivňuje míru glycin-necitlivé desenzitizace NMDA receptorů {41}.

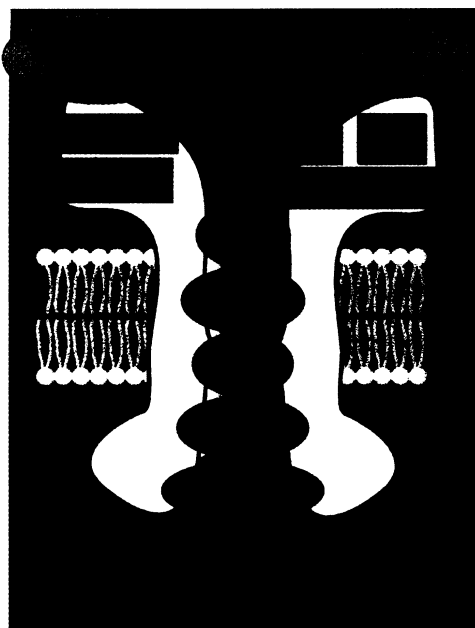
Při zvyšující se intracelulární koncentraci vápníku dochází k postupnému snižování amplitudy proudových odpovědí NMDA receptorů. Pro tento jev byl zaveden pojem „Ca²⁺-závislá desenzitizace“ nebo „inaktivace NMDA receptoru“ {42, 43}. Studie na rekombinantních receptorech ukázala, že NR1/NR2A a NR1/2D receptory vykazovaly vysokou inaktivaci, zatímco receptory NR1/NR2B a NR1/NR2C byly k inaktivaci necitlivé {39}.

2.3. Farmakologie NMDA receptorů

Aktivita NMDA receptorů je modulována velkým množstvím strukturálně odlišných skupin látek. Podle mechanismu jejich působení rozeznáváme tři skupiny těchto látek {2}:

1. kompetitivní antagonisté působící na vazebném místě pro glutamát nebo glycin
2. akompetitivní antagonisté neboli blokátory iontových kanálů, což jsou látky, které se váží dovnitř iontového kanálu: Mg²⁺, MK-801 (dizocilpin), memantin, fencyklidin (PCP), ketamin.
3. nekompetitivní antagonisté vážící se mimo vazebná místa pro glycin, glutamát a mimo iontový kanál: Zn²⁺, Cu²⁺, H⁺, redoxní látky, polyaminy, ifenprodil, neurosteroidy.

Účinek těchto látek je často závislý na podjednotkovém složení NMDA receptoru. Hlavní modulační místa jsou znázorněna na obrázku 2.3 (str. 13).



Obrázek 2.3. Schématické znázornění působení různých modulátorů na NMDA receptory. Zeleně jsou vyznačena vazebná místa pro agonistu (zde glutamát) a koagonistu (zde glycin) a kompetitivní antagonisté těchto rozpoznávacích míst. Blokátory NMDA iontových kanálů jsou znázorněny červeně a další modulační látky modře.

2.3.1. Kompetitivní antagonisté glutamátu

Mezi typické kompetitivní antagonisty glutamátového místa patří fosfonoderiváty aminokyselin s pěti- až sedmiuhlíkatými řetězci jako například kyselina D,L-2-amino-5-fosfonovalerová (D-APV; AP5) či kyselina D,L-2-amino-7-fosfonoheptanová (AP7) {44}. Dále jsou to kyselina 2-(fosfonomethyl)-pentandiová (PMPA) nebo kyselina 3-(2-karboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-fosfonová (CPP) (pro přehled {45}). Účinek těchto látek na NMDA receptor závisí na typu podjednotky NR2, kde je glutamátové místo lokalizováno. Například afinita pro další dva kompetitivní antagonisty, kyselinu cis-4-(fosfonomethyl)piperidin-2-karboxylovou (CGS 19755) a D,L-(E)-2-amino-4-propyl-5-fosfono-3-pentenovou (CGP 39653), klesá v pořadí NR1/NR2A > NR1/NR2B > NR1/NR2D > NR1/NR2C {46}.

2.3.2. Kompetitivní antagonisté glycinu

Přesto, že je vazebné místo pro glycin lokalizováno na NR1 podjednotce, EC_{50} glycinu je ovlivněno také typem NR2 podjednotky. Fyziologickým kompetitivním antagonistou glycinového místa je kyselina kynurenová, která se ovšem s nižší afinitou

váže také do vazebního místa pro glutamát. Mezi selektivní kompetitivní antagonisty glycinového místa na NR1 podjednotce patří halogenované chinoxalindiony a deriváty kyseliny kynurenové, z nichž asi nejznámějším je 5,7-dichlorokynurenát (pro přehled {2}).

2.3.3. Akompetitivní antagonisté

Akompetitivní antagonisté NMDA receptorů jsou nabitě látky, které se mohou vázat do svého vazebního místa uvnitř iontového kanálu pouze po aktivaci receptoru a otevření iontového kanálu. Jejich velikost je větší než velikost póru otevřeného iontového kanálu ($> 0,55$ nm) {47}. Tyto látky nemohou volně procházet do intracelulárního prostoru buňky a “ucpou“ iontový kanál a brání tak toku Ca^{2+} a Na^+ otevřenými iontovými kanály NMDA receptorů. Všechny tyto látky jsou kationty, což vysvětluje, proč se míra blokace receptorů snižuje se zvyšujícím se membránovým potenciálem a proč je návrat z této blokady urychlován přítomností agonisty nebo při kladném membránovém potenciálu. Z tohoto důvodu také nelze pro tyto látky stanovit obecnou hodnotu IC_{50} , protože ta musí být doplněna velikostí membránového potenciálu, při kterém byla naměřena. Dalším faktorem, který charakterizuje působení blokátoru, je relativní hloubka, kde se blokátor váže v iontovém kanále {48}.

Za normálních podmínek jsou NMDA iontové kanály fyziologickou koncentrací iontů Mg^{2+} (1 mM) blokovány napětově závislým způsobem, přičemž depolarizace buňky tento blok odstraňuje. To je důvodem, proč proud- Mg^{2+} závislost není lineární, ale má tvar písmena „J“. Čím je hnací síla vstupu Mg^{2+} iontů do buňky vyšší, tzn. čím vyšší je koncentrace Mg^{2+} a/nebo negativnější membránový potenciál, tím vyšší je i míra blokace iontového kanálu {49, 50}. Tato interakce NMDA receptorů s Mg^{2+} ionty je z fyziologického hlediska velmi významná, protože k ionotropnímu a metabotropnímu vlivu NMDA receptoru dochází až po předcházející účinné depolarizaci vyvolané zpravidla aktivací AMPA/kainátových receptorů. Vazebné místo pro Mg^{2+} je lokalizováno v Q/R/N místě, což je nejužší místo póru iontového kanálu NMDA receptorů {51, 52}. Jak vazba Mg^{2+} k NMDA receptoru, tak i jeho disociace je velmi rychlým procesem, což se při snímání proudů jednotlivých kanálů na hyperpolarizovaných potenciálech projevuje jako změna původně dlouhého vodivého stavu NMDA receptoru na salvy složené z krátkých otevření a zavření, jejichž počet je závislý na extracelulární koncentraci Mg^{2+} {50}. Citlivost NMDA receptorů k Mg^{2+} závisí na jejich podjednotkovém složení. Pro NR1/NR2A-2B receptory je mnohem vyšší než pro receptory NR1/2C-D {11, 18}.

Také NMDA iontové kanály obsahující podjednotku NR3 mají nižší citlivost k blokádě Mg^{2+} {9}.

Kromě Mg^{2+} jsou známy i další látky, které účinně blokují iontové kanály NMDA receptorů. Patří mezi ně *MK-801*, který vyvolává silnou blokádu iontového kanálu a disociuje jen velmi pomalu (tau ~90 minut při membránovém potenciálu -70 mV) {30}. Citlivost NR1/NR2A-2B receptorů k MK-801 je vyšší než k receptorům NR1/2C-D {53}. Další blokátor - *memantin* - inhibuje odpovědi nativních NMDA receptorů na membránovém potenciálu -60 až -70 mV koncentračně závislým způsobem. Hodnota IC_{50} ~2 μM se s podjednotkovým složením receptoru příliš nemění {54}. Memantin je klinicky užíván jako lék pro léčbu Alzheimerovy demence.

I jiné blokátory otevřených iontových kanálů byly studovány za účelem možného využití při léčbě neurodegenerativních chorob. Předpokládalo se, že svou vazbou dovnitř otevřeného iontového kanálu zabrání vstupu Ca^{2+} do buňky, čímž ji uchrání před poškozením, které vzniká právě v důsledku nadměrného zvýšení intracelulární koncentrace tohoto iontu. Ovšem při klinickém testování těchto látek, mezi které patří také fencyklidin a ketamin, bylo zjištěno, že mají silné psychomimetické vedlejší účinky {55}.

2.3.4. Nekompetitivní antagonisté

Nekompetitivní antagonisté jsou látky, které ovlivňují vlastnosti NMDA receptorů prostřednictvím vazby do různých modulačních míst lokalizovaných mimo pór iontového kanálu a mimo glutamátové a glycinové vazebné místo. Mezi tyto extracelulární alosterické modulátory patří Zn^{2+} , Cu^{2+} , H^+ ionty, polyaminy, ifenprodil, redoxní látky a neurosteroidy.

2.3.4.1. Modulace Zn^{2+} , Cu^{2+} a H^+ ionty

Zinek se vyskytuje v synaptických váčcích v mnoha glutamátergních terminálách, odkud je během synaptického přenosu uvolňován a dosahuje koncentrace až 300 μM , která je schopna modulovat aktivitu NMDA receptorů {56}. Zinek inhibuje odpovědi NMDA receptorů jak napětově závislým, tak napětově nezávislým způsobem. Napětově závislá inhibice, která je pozorována při vyšších koncentracích Zn^{2+} , je pravděpodobně způsobena navázáním Zn^{2+} iontů do vazebného místa pro Mg^{2+} uvnitř póru iontového kanálu {34, 57}. Naproti tomu napětově nezávislá inhibice Zn^{2+} ionty souvisí s alosterickou modulací receptoru a je ovlivněna jak sestřihovou variantou podjednotky NR1, tak i typem podjednotky NR2. Vyšší citlivost k inhibici vykazují NMDA receptory obsahující

podjednotku NR2A. NMDA receptory složené z kombinace podjednotek NR2 a sestřihové varianty podjednotky NR1-1b, která zahrnuje exon N1, vykazují nižší citlivost k napětově nezávislé inhibici Zn^{2+} oproti iontovým kanálům obsahujícím podjednotku NR1-1a {57}.

Vazebné místo pro ionty Cu^{2+} je pravděpodobně lokalizováno jinde než vazebné místo pro Zn^{2+} . Při studiu vlivu Cu^{2+} na odpovědi NMDA receptorů na kultivovaných kortikálních a hipokampálních neuronech bylo zjištěno, že jejich účinek je charakteristický pomalou kinetikou a je napětově nezávislý {58}.

Funkce NMDA receptorů je modulována ionty H^+ , jejichž extracelulární koncentrace se vlivem neuronální aktivity mění {59-61}. Fyziologická hodnota pH je blízká hodnotě IC_{50} působení protonů na nejrozšířenější NMDA podjednotce NR2B, z čehož vyplývá, že receptory jsou tonicky inhibovány, přesto jen malá změna pH může významně ovlivnit jejich funkci. Zvýšení koncentrace protonů vede ke snížení frekvence otevírání nativních NMDA receptorů bez ovlivnění jejich vodivosti a průměrné doby otevření. Kompetitivní antagonismus mezi H^+ a NMDA nebo glycinem nebyl prokázán {60-62}. Předpokládá se proto přítomnost specifického vazebného místa pro H^+ ionty, které je lokalizováno na extracelulární straně v oblasti spojující transmembránovou doménu M3 s doménou M4 (Obr. 2.1.B, str. 8), a to na obou podjednotkách NR1 i NR2 {41}. Rozdíly ve struktuře tohoto místa mezi jednotlivými podjednotkami pak také vysvětlují odlišnou citlivost NMDA receptorů k pH v závislosti na jejich podjednotkovém složení. Koncentrace iontů H^+ také významně ovlivňuje působení jiných látek (například zinku, ifenprodilu a polyaminů) na NMDA iontových kanálech (pro přehled {2}).

2.3.4.2. Polyaminy

Endogenní alifatické polyaminy, např. spermin a spermidin, vyskytující se v centrálním nervovém systému, působí na NMDA receptorech alespoň třemi mechanismy: napětově závislou inhibicí, glycin-závislou potenciací a glycin-nezávislou potenciací (pro přehled {2}). Extracelulární aplikace sperminu inhibuje odpovědi NR1/NR2A-B napětově závislým způsobem. Tato inhibice je podobná působení Mg^{2+} a je pravděpodobně také způsobována stejnými aminokyselinovými zbytky uvnitř póru iontového kanálu jako v případě blokády ionty Mg^{2+} {63}. Glycin-závislá potenciace vyvolaná sperminem, ke které dochází pouze při nízkých koncentracích glycinu, je popsána jako přibližně trojnásobné zvýšení afinity ke glycinu u NR1/NR2A-B receptorů. Míra potenciace odpovědi není ovlivněna typem NR1 podjednotky. Naproti tomu

glycin-nezávislá potenciace, pozorovaná pouze u NR1/NR2B receptorů, je přítomností podjednotky NR1-1b v NMDA iontovém kanálu eliminována. Spermin aplikovaný na NMDA receptory z intracelulární strany snižuje pravděpodobnost otevření těchto iontových kanálů. Mechanismus jeho působení je odlišný od mechanismu působení vápenatých iontů při Ca^{2+} -závislé inaktivaci NMDA receptoru {43}, která je s inhibičním působením sperminu aditivní {64}.

2.3.4.3. Ifenprodil

Ifenprodil je látka patřící mezi fenyletanolaminy, která byla původně vyvinuta jako vazodilatační činidlo {65}. Později bylo zjištěno, že inhibuje různé typy receptorů, a vykazuje tudíž neuroprotektivní účinky {66}. Účinek ifenprodilu je závislý na podjednotkovém složení NMDA iontového kanálu. Ifenprodil inhibuje napětově nezávislým způsobem odpovědi NR1/NR2B receptorů s hodnotou IC_{50} 0,34 μM . Na odpovědi NR1/NR2A receptorů ifenprodil působí jen ve vysokých koncentracích, a to napětově závislým způsobem. Afinity tohoto typu receptorů k ifenprodilu je přibližně 400-krát nižší (IC_{50} 146 μM) než afinity NR1/NR2B iontových kanálů. Receptory NR1/NR2C-D jsou k nízkým koncentracím ifenprodilu necitlivé {67}.

2.3.4.4. Redoxní látky

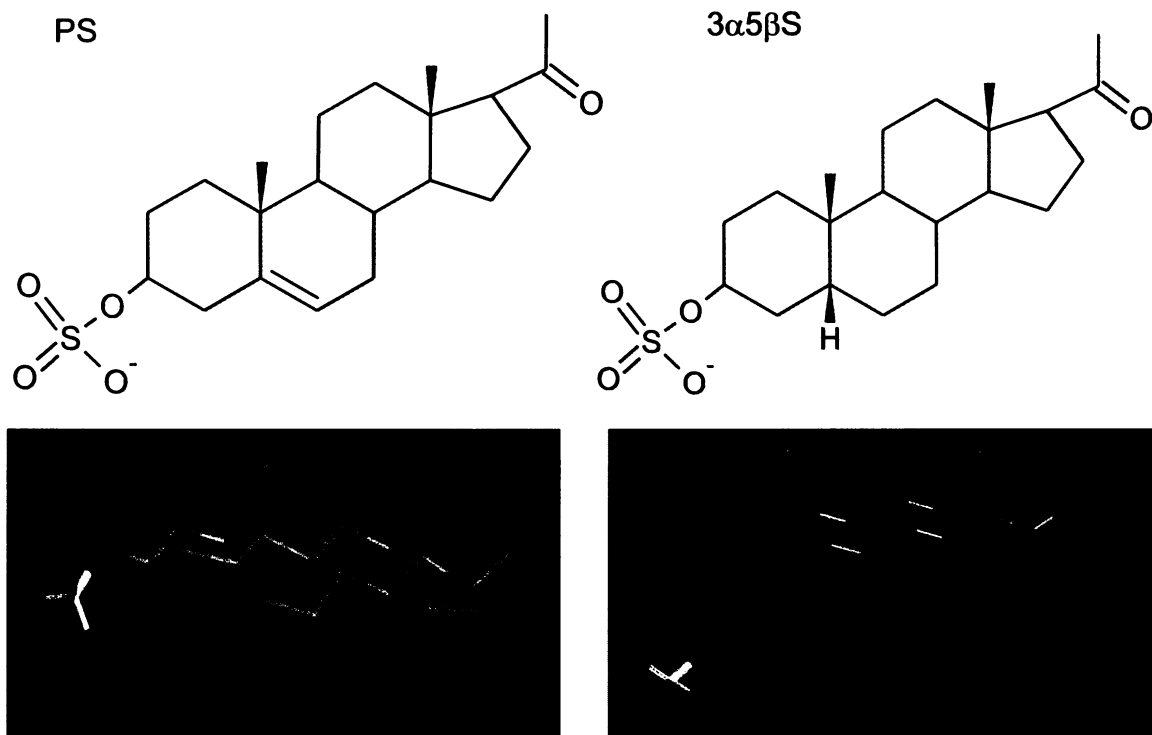
Molekulárně biologické studie ukázaly, že NMDA receptory obsahují sulfhydrylové skupiny, které mohou tvořit disulfidické můstky. Proudové odpovědi nativních NMDA receptorů jsou proto v přítomnosti redoxních látek modulovány {55}. Redukční činidla jako například dithiothreitol (DTT), který redukuje disulfidické můstky, výrazně potencují odpovědi NMDA receptorů, zatímco činidla oxidační jako 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB) proudové odpovědi těchto iontových kanálů inhibují. Předpokládanými fyziologickými modulátory NMDA receptorů jsou glutathion, kyselina askorbová a lipoová, pyrrolochinolin chinon a oxid dusnatý (pro přehled {2}).

2.3.4.5. Neurosteroidy

Již v první polovině minulého století bylo pozorováno, že některé steroidy dokáží velmi rychle, během sekund či dokonce milisekund, ovlivnit neuronální excitabilitu, což vylučuje jejich působení na genomové úrovni {68}. Molekulární mechanismus tohoto působení však zůstával dlouho neznám. Teprve v osmdesátých letech se objevily první studie o účinku steroidních látek nejprve na funkci GABA_A (kyselina γ -aminomáselná,

receptor typu A) receptoru {69} a později i na další ligandem aktivované iontové kanály, jako jsou glutamátové, glycinové či nikotinické acetylcholinové receptory {70-72} (pro přehled {73}). Přibližně v téže době byla prokázána produkce steroidů přímo v nervové tkáni {74}, které jsou obecně nazývány neurosteroidy. Jsou to 3 β -hydroxy- Δ^5 -látky syntetizované z cholesterolu nebo ze steroidních prekurzorů importovaných z periferních zdrojů {75}.

Neurosteroidy mohou modulovat NMDA receptory jak pozitivně – zvětšovat odpovědi, tak mít inhibiční působení {76-79}. Zástupcem neurosteroidů potencujících NMDA receptory je 20-oxopregn-5-en-3 β -yl sulfát (dále jen pregnenolonsulfát; PS), inhibiční neurosteroidy reprezentuje například 20-oxo-5 β pregnan-3 α -yl sulfát (dále jen pregnanolonsulfát; 3 α 5 β S), lišící se od PS absencí jedné dvojně vazby (Obr. 2.4, str. 19). Příčinou odlišného účinku neurosteroidů mohou být stérické rozdíly. Pro přímé působení na NMDA receptory musí neurosteroidy obsahovat v poloze C3 negativní náboj, jehož nositelem je u endogenních neurosteroidů sulfátová skupina. Ta může být bez vlivu na funkci nahrazena sukcinátovým zbytkem, ale ne jeho metylesterem {79}. Tvar celé molekuly určuje konfigurace na uhlíku C5. 5 α -redukované steroidy představují spíše planární strukturu, na rozdíl od 5 β -steroidů, jejichž cholesterolový skelet obsahuje zřetelný „ohyb“. Předpokládá se, že potenciační působení PS a inhibiční účinek 3 α 5 β S jsou zprostředkovány různými vazebnými místy {79}.



Obrázek 2.4. Struktura molekul neurosteroidů PS a 3 α 5 β S. Strukturní vzorce neurosteroidů PS a 3 α 5 β S a ukázka jejich prostorové struktury.

V prvních pokusech této diplomové práce bylo na rekombinantních NMDA receptorech potvrzeno, že 3 α 5 β S inhibuje zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) vyvolané exogenní aplikací glutamátu a PS naopak toto zvýšení potencuje. Pokusy s PS však překvapivě ukázaly dosud nepopsaný účinek tohoto neurosteroidu na NMDA receptorech, když jeho aplikace vedla ke zvýšení [Ca²⁺]_i i v nepřítomnosti agonistů NMDA iontových kanálů. Cílem této diplomové práce bylo analyzovat molekulární mechanismus, jakým PS ovlivňuje [Ca²⁺]_i.

3. Cíle práce

Cílem práce bylo určit:

1. - zda zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} (dále $[\text{Ca}^{2+}]_i$) pozorované během aplikace PS je vyvoláno průnikem Ca^{2+} přes cytoplazmatickou membránu, nebo zda k němu dochází v důsledku uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zdrojů.
2. - zda PS vyvolané zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ souvisí s činností NMDA receptorů.
3. - zda zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je specifické pouze pro PS, nebo zda ho mohou vyvolat i ostatní neurosteroidy.
4. - molekulární mechanismy, jakými PS ovlivňuje NMDA receptory a stanovit, zda tento neurosteroid aktivuje receptory přímo, nebo zda působí nepřímo.
5. - základní farmakologické vlastnosti PS.
6. - zda je účinek PS specifický pouze pro rekombinantní expresní systémy, nebo zda změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vyvolává i u kultivovaných neuronů.
7. - místo, kde se PS na NMDA receptoru váže.

4. Materiál a metody

Použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA) nebo Tocris Cookson Ltd. (Avonmouth, UK). Neurosteroidy pregnenolonsulfát (PS) a pregnanolonsulfát ($3\alpha5\beta$ S) byly syntetizovány v laboratoři RNDr. Hany Chodounské CSc. (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR) podle publikované metody {80} a jejich čistota (>98%) byla testována nukleární magnetickou rezonancí, tenkovrstevnou chromatografií a elementární analýzou. U materiálu dodávaného jiným výrobcem je jeho jméno uvedeno v závorce za názvem chemikálie. K přípravě roztoků byla používána deionizovaná voda, která byla dále upravena přístrojem Simplicity 185 (Millipore, USA).

4.1. Molekulárně biologické metody

4.1.1. Použité geny

NR1-1a podjednotka (GenBank accession no. U08261) {81} v pcDNA I/AMP vektoru (dar od Dr. G. Westbrook; Vollum Institute, Portland, OR, USA);

NR2B podjednotka (GenBank accession no. M91562) {11} v RK7 vektoru (dar od Dr. S. Viciniho, Georgetown University School of Medicine, Washington D.C., USA);

Zelený fluorescenční protein (GFP) v pQBI 25 vektoru (Takara Bio Inc., Shiga, Japonsko);

Pro přípravu DNA byl používán bakteriální kmen *Escherichia coli DH5 α* (supE44, Δ lacU169 (Φ 80 lac Z Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1)

4.1.2. Použité roztoky

Živný agar s ampicilinem: 4% živný agar (Imuna, Šarišské Michaľany, SR), 100 μ g/ml ampicilinu (Krka, Novo Mesto, Slovinsko);

LB médium s ampicilinem: 1 % trypton (Serva, Oxon, VB), 0,5 % kvasničný extrakt (Serva), 1 % NaCl, 100 μ g/ml ampicilinu (Krka).

4.1.3. Sterilizace

Pokud není uvedeno jinak, byly roztoky, špičky k mikropipetám a mikrozkušavky sterilizovány v autoklávu při 121°C po dobu 20 min. Chemické sklo bylo 2 hodiny sterilizováno suchým teplem při teplotě 180°C. Drobné předměty byly sterilizovány žíháním nebo zapálením po namočení do denaturovaného etanolu.

4.1.4. Maxipreparace plazmidu (pomocí „Qiagen® Plasmid Midi Kit“)

Použité roztoky a pufrů byly součástí Qiagen® Plasmid Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA). Bakterie byly zaočkované do 100 ml LB média s ampicilinem a byly aerobně kultivovány 12-16 hod v třepačce při 37°C. Poté byla kultura centrifugována 15 min při 6000 g a 4°C v centrifuze Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed (GMI, Ramsey, USA), pelet byl resuspendován ve 4 ml roztoku I. K suspenzi byly přidány 4 ml roztoku II, roztoky byly důkladně promíchány otáčením zkumavky a inkubovány 5 min při pokojové teplotě. Dále byly přidány 4 ml roztoku III vychlazeného na 4°C. Směs byla promíchána a inkubována 15 min na ledu. Sraženina byla odstraněna 30 min centrifugací při 20 000 g a 4°C. Supernatant byl aplikován na kolonu QIAGEN-tip 100 ekvilibrovanou 4 ml pufru QBT. Poté byla navázaná DNA na QIAGEN-tip 100 2-krát promývána 10 ml pufru QC a následně uvolněna z kolony pomocí 5 ml elučního pufru QF. K DNA v elučním pufru byly přidány 3,5 ml isopropylalkoholu. Po 10 min inkubaci při pokojové teplotě byla směs centrifugována 30 min při 15 000 g a 4°C, pelet byl promyt 2 ml 70 % etanolu, vysušen při laboratorní teplotě a resuspendován v H₂O. Vzorek DNA byl skladován při -80°C. Koncentrace DNA byla měřena na spektrofotometru NanoDrop (NanoDrop Technologies, Delaware, USA) programem dsDNA.

4.1.5. Minipreparace plazmidu (pomocí „Qiagen® Plasmid Mini Kit“)

Použité roztoky a pufrů byly součástí Qiagen® Plasmid Mini Kit (Qiagen). Kultura byla centrifugována 15 min při 6000 g a 4°C v centrifuze Mikro 120 (Hettich, Tuttlingen, Německo). Pelet byl resuspendován v 250 µl roztoku I a přenesen do mikrocentrifugační zkumavky. Ke směsi bylo přidáno 250 µl roztoku II. Po promíchání otáčením zkumavky bylo k suspenzi přidáno 350 µl roztoku III, směs byla opět promíchána otáčením zkumavky a 10 minut centrifugována při 17 900 g ve stolní mikrocentrifuze. Supernatant byl nanesen na QIAprep centrifugační kolonu a 60 s centrifugován při 17 900 g. Kolona byla promyta 0,75 ml pufru PE a centrifugována 2x 60 s. Poté byla přemístěna do čisté mikrozukavky. DNA byla eluována 30 µl deionizované vody, které byly napipetovány doprostřed kolony. Po 1 minutě byla kolona centrifugována a koncentrace získané DNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop (NanoDrop) programem dsDNA.

4.1.6. Příprava bodových mutací pomocí QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit

Byly provedeny 3 bodové mutace v genu pro NR2B podjednotku: E387A, K459E a S664G {24}. Bylo navrženo 6 komplementárních primerů obsahujících bodovou mutaci.

Po jejich syntéze a purifikaci (VBC-Biotech, Vídeň, Rakousko) byla pomocí enzymu PfuTurbo DNA-polymerázy a metody PCR DNA se zavedenou mutací amplifikována. Vzorek pro PCR obsahoval 5 μ l reakčního pufru, 1 μ l směsi dNTP, 3 μ l “QuikSolution“, 55 ng templátu (gen pro NR2B podjednotku), 1 μ l PfuTurbo DNA polymerázy (2,5 U/ μ l), 2x 500 ng komplementárních primerů a příslušné množství H₂O tak, aby celkový objem činil 50 μ l. Amplifikace DNA byla provedena pomocí Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Německo) ve třech krocích: Prvním krokem bylo zvýšení teploty na 95°C po dobu 1 minuty. Druhý krok byl 18x opakován. Nejprve byla teplota zvýšena na 95°C po dobu 55 s, poté následovalo ochlazení na 50°C po dobu 1 minuty a nakonec zvýšení teploty na 68°C po dobu 12 minut. V posledním kroku byla teplota 7 minut udržována na 68°C. Po skončení PCR reakce byla směs ponechána na ledu a po ochlazení na teplotu \leq 37°C byl přidán 1 μ l restrikčního enzymu *Dpn* I (10 U/ μ l) k odstranění templátové DNA. Směs byla pomocí pipety několikrát jemně promíchána, 1 minutu centrifugována v mikrocentrifuze a poté inkubována při 37°C po dobu 1 hodiny.

Do vychlazených plastových centrifugačních zkumavek bylo odpipetováno 45 μ l kompetentních buněk a přidány 2 μ l směsi β -merkapt ethanolu. Obsah zkumavky byl inkubován na ledu po dobu 10 minut a každé 2 minuty byl jemně promíchán. K této směsi byly přidány 2 μ l DNA inkubované s *Dpn* I. Obsah zkumavky byl jemně promíchán a inkubován na ledu po dobu 30 min. Poté byl proveden “heat-shock“ při teplotě 42°C po dobu 30 s a následně znovu inkubováno na ledu po dobu 2 minuty. Po přidání 0,5 ml LB média přehřátého na 42°C byly kompetentní buňky kultivovány 1 hod v třepačce při teplotě 37°C. Poté bylo 250 μ l této směsi nanášeno na 2 agarové plotny s ampicilinem, které byly ponechány v termostatu při teplotě 37°C po dobu 20 hodin. Izolované kolonie byly zaočkovány do LB média. Plazmidová DNA byla pak izolována pomocí „Qiagen® Plasmid Mini Kit“ (postup v kapitole 3.1.5) a následně sekvenována (Středisko sekvenování MBÚ AV ČR) pro kontrolu obsahu bodových mutací. Použité roztoky a pufrы byly součástí QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (La Jolla, USA).

4.1.7. Skladování bakterií

Bakterie na Petriho miskách byly krátkodobě skladovány ve 4°C. Pro dlouhodobé skladování byly čerstvě narostlé bakterie v živném bujónu smíchány se sterilním glycerolem do výsledné koncentrace glycerolu 15 % a skladovány v -80°C.

4.2. Tkáňové kultury

V této práci byly použity dva typy kultivovaných buněk. Pro expresi rekombinantních NMDA receptorů byla používána stabilní buněčná linie lidských embryonálních ledvinných (HEK) 293 buněk (American Type Culture Collection, ATTC No. CRL1573, Rockville, USA) (Obr. 4.1, str. 25). Nativní NMDA receptory byly studovány na potkaních primárních hipokampálních kulturách (Obr. 4.2, str. 26), které byly připravovány laborantkou. Buňky byly kultivovány při teplotě 37°C v atmosféře 5 % CO₂ nasycené vodními parami v inkubátoru MCO-17AIC (SANYO, San Diego, USA).

4.2.1. Použité roztoky a média pro přípravu tkáňových kultur

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,3;

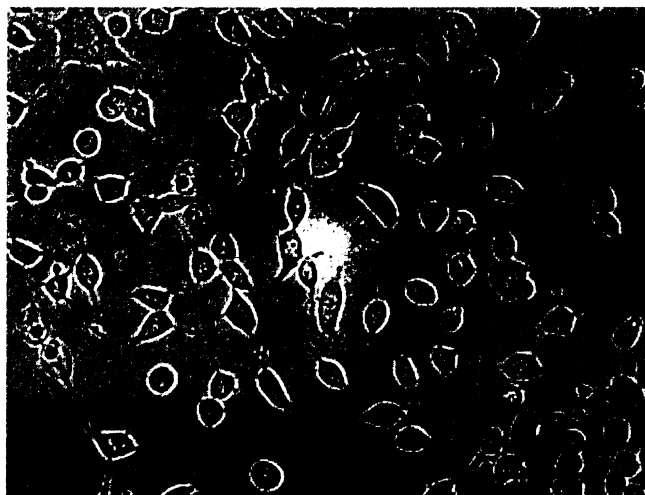
Versenův roztok s trypsinem: 0,2 % trypsin, 10 mg EDTA v 50 ml PBS; pH 7,3;

Kultivační médium pro HEK 293 buňky: 89 % Optimem I (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 5 % fetální telecí sérum (FCS);

Kultivační médium pro přípravu neuronů: NeurobasalTM-A (Invitrogen, Carlsbad, USA), glutamin (0,5 mM), neuronální doplněk B-27 (0,4 ml na 20 ml média) (Gibco).

4.2.2. Pasážování HEK 293 buněk

Z konfluentně narostlé kultury HEK 293 buněk bylo odsáto médium. Buňky byly opláchnuty PBS a poté byly 1 minutu inkubovány s Versenovým roztokem s trypsinem. Po uvolnění z povrchu Petriho misky byly buňky resuspendovány v kultivačním médiu pro HEK 293 buňky a naředěny 1:6 do Petriho misek nebo na 24-jamkovou destičku.



Obrázek 4.1. Mikrosnímek kultivovaných HEK 293 buněk. Úsečka představuje délku 100 μm .

4.2.3. Transfekce HEK 293 buněk pomocí magnetického činidla MATRa-A

Příprava transfekčního média. Do kultivačního média pro HEK 293 buňky byly přidány látky inhibující odpovědi NMDA receptorů o výsledné koncentraci: 1 mM D,L-APV, 3 mM ketamin a 20 μM MgCl_2 . Před aplikací transfekčního média na kultivované buňky byl roztok ohřát na 37°C.

Příprava transfekční směsi. K 50 μl Optimemu I bylo přidáno 0,9 μg DNA (GFP, NR1-1a a NR2B po 0,3 μg) a 0,9 μl činidla MATRa-A (IBA, Göttingen, Germany). Směs byla jemně promíchána a poté inkubována 20 minut při pokojové teplotě.

Transfekce. Transfekční směs MATRa-A s DNA byla přidána ke konfluentním buňkám na 24-jamkové destičce. Poté byla destička umístěna na magnetickou podložku do termostatu (37°C, 5 % CO_2). Po 15 minutách byly buňky pasážovány na 2 Petriho misky (\varnothing 33 mm), do kterých byla předem vložena 3 sklíčka s naneseným kolagenem a poly-L-lyzinem.

Mikrofluorimetrické pokusy byly prováděny 24-48 hod po skončení transfekce na buňkách exprimujících GFP („GFP-pozitivní buňky“).

4.2.4. Příprava tkáňových kultur hipokampálních neuronů

Novorození potkani (1-2 dny) byli usmrceni dekapitací, jejich hipokampy byly sterilně vyjmuty a inkubovány 20 min v 0,2 % trypsinu v PBS při teplotě 37°C. Poté byly

hipokampy mechanicky disociovány na jednotlivé buňky a přeneseny do kultivačního média NeurobasalTM-A (Invitrogen, Carlsbad, USA) s přidavkem glutaminu (0,5 mM) a neuronálního doplňku B-27 (0,4 ml na 20 ml média) (Gibco). Tato suspenze byla nasazena v hustotě 500 000 buněk/cm² na kolagenem a polylysinem pokrytá krycí sklička (průměr 31 mm nebo 12 mm) v kultivačních miskách (Nunclon) a dále inkubována při teplotě 37°C. Médium bylo měněno každé 3 dny. Mikrofluorimetrické pokusy byly prováděny 5-8 dní po nasazení neuronální kultury.



Obrázek 4.2. Mikrosnímek kultivovaných hipokampálních neuronů. Na snímku jsou vidět tři neurony s hustou sítí dendritů a axonů, které leží na velmi plochých gliových buňkách pokrývajících dno kultivační misky. Úsečka představuje délku 10 μ m.

4.3. Snímání odpovědi NMDA receptorů

4.3.1. Složení roztoků

Během snímání odpovědi NMDA receptorů byly buňky oplachovány následujícím *extracelulárním roztokem* (ECR) (v mM): NaCl 160, KCl 2,5, glukóza 10, HEPES 10, CaCl₂ 2, glycin 0,02; pH 7,3 upraveno pomocí NaOH; osmolalita 320 mOs/kg. Do tohoto roztoku byly před začátkem pokusu přidávány neurosteroidy, případně jiné testované látky.

Promývací roztok byl na buňky aplikován v intervalech mezi jednotlivými snímáními odpovědi NMDA receptorů. Jeho složení bylo (v mM): NaCl 160, KCl 2,5, glukóza 10, HEPES 10, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2; pH 7,3 upraveno pomocí NaOH; osmolalita 320 mOs/kg. Oba uvedené roztoky byly sterilizovány filtrací (velikost pórů 0,2 μ m) a skladovány při 4°C. Před zahájením pokusu byl do všech roztoků přidán 20 μ M glycin.

Zásobní roztoky neurosteroidů byly připravovány rozpuštěním PS (30 mM) nebo $3\alpha5\beta S$ (20 mM) v dimethylsulfoxidu (DMSO), vždy čerstvě před pokusem. Do kontrolních roztoků bylo přidáváno stejné množství DMSO, jako bylo v roztocích obsahujících neurosteroidy.

4.3.2. Aplikace roztoků na snímané buňky

Aplikační systém se skládal z 5 trubiček svedených do jedné mikropipety o tloušťce stěny 50 μm a vnitřním průměru 300 μm . Sestava trubiček byla propojena s mechanickým manipulátorem. Jednotlivé trubičky byly spojeny teflonovými hadičkami s nádobkami, které obsahovaly aplikační roztoky. Aplikace roztoků byla ovládána mikroprocesorem, který řídil otevírání solenoidových ventilů (General Valves, Fairfield, USA). Rychlost vytékání roztoků byla 0,1 ml/min. Ústí mikropipety bylo nastavováno ve vzdálenosti ~ 400 μm od měřených buněk.

4.3.3. Poměrové měření $[Ca^{2+}]_i$

Odpovědi nativních a rekombinantních NMDA receptorů byly snímány metodou mikrofluorimetrického zobrazení relativních změn intracelulární koncentrace vápenatých kationtů (poměrové měření $[Ca^{2+}]_i$). Tato metoda využívá vlastnosti fluorescenčního barviva fura-2, které ve své nenabitě formě acetoxy-metylésteru prochází membránou do buněk, kde je endogenními esterázami hydrolyzováno na svou aktivní formu, obsahující dvě vazebná místa pro Ca^{2+} . Vazbou Ca^{2+} do těchto míst dochází k posunu excitačního spektra sondy směrem k nižším vlnovým délkám. Volná forma barviva fura-2 je excitována zářením o vlnové délce 380 nm, zatímco vázaná 340 nm. Intenzita fluorescence vyvolaná excitací vlnovou délkou 380 nm (F_{380}) proto klesá se zvyšující se koncentrací Ca^{2+} a při excitaci zářením o vlnové délce 340 nm intenzita fluorescence (F_{340}) sondy stoupá. Změny poměru těchto dvou intenzit fluorescence (R ; $R = F_{340}/F_{380}$) ukazují na změny v $[Ca^{2+}]_i$. Absolutní hodnoty $[Ca^{2+}]_i$ je možno stanovit provedením kalibrace s roztoky o nízké a vysoké koncentraci Ca^{2+} a po dosažení získaných hodnot do Grynkiewiczovy rovnice (viz níže) {82}.

4.3.3.1. Barvení buněk

Buňky byly nejprve označeny fluorescenční sondou fura-2-AM (Molecular Probes, Eugene, USA), citlivou na Ca^{2+} . 1 ml promývacího roztoku obsahoval 5 μM sondu (přidáno z 1 mM roztoku v DMSO), 0,02 % Pluronic F-127 k usnadnění rozpuštění

hydrofobní sondy ve vodném roztoku a 25 μM Probenecid, který má jako blokátor transportéru pro organické anionty zabránit zpětnému vylučování fluorescenčního barviva ven z buňky. Po šedesátiminutové inkubaci v termostatu při teplotě 37°C byl zbytek fluorescenčního barviva vymyt přenesením buněk do čistého promývacího roztoku. Obarvené buňky byly ponechány v klidu při laboratorní teplotě po dobu 30 minut, během které došlo účinkem endogenních esteráz k rozštěpení sondy na její aktivní formu.

4.3.3.2. Snímání fluorescenčního záření

Změny intenzity fluorescenčního záření byly měřeny invertovaným fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81 (Olympus, Center Valley, USA) vybaveným chlazenou CCD kamerou Orca – ER (Hamamatsu Photonics K.K., Shizuoka, Japonsko). Experimenty byly prováděny v epifluorescenčním uspořádání. Buňky byly pozorovány objektivem UIS2 UPLSAPO (Olympus) při dvacetinásobném zvětšení a numerické apertuře 0,75. Na stolku mikroskopu byla umístěna kultivační miska s transfekovanými HEK 293 buňkami nebo s hipokampálními neurony. Obsah misky byl nepřetržitě promýván roztokem, jehož hladina byla udržována na konstantní výši. Jako zdroj záření byl použit polychromátor Polychrome V (TILL Photonic, Mnichov, Německo). Pomocí sady filtrů pro barvivo fura-2 (excitační filtr SP410, dichroické zrcadlo DCLP410, emisní filtr LP440; Olympus) byl vzorek střídavě excitován zářením o vlnových délkách 340 a 380 nm a CCD kamerou bylo detekováno fluorescenční záření s vlnovou délkou nad 440 nm. Od naměřených intenzit fluorescence při obou vlnových délkách byly odečteny hodnoty intenzity pozadí, získané ze stejného zorného pole z oblasti vzdálené od obarvených buněk. Poměr intenzit záření po excitaci 340 a 380 nm ($R = F_{340}/F_{380}$) byl ihned vyhodnocován a zobrazován programem CellR (Olympus).

4.3.3.3. Zpracování naměřených dat a hodnocení výsledků

Do kvantitativní analýzy byly zahrnuty buňky, jejichž základní klidová hodnota poměru intenzit fluorescence R byla nižší než 0,7. Výsledky jsou uváděny formou ukázky záznamu signálu naměřeného z jedné typicky reagující buňky. Na ose x je vynesena čas v minutách a osa y odpovídá hodnotám R . Stanovené hodnoty poměru intenzit fluorescence R lze pomocí Grynkiewiczovy rovnice převést na absolutní hodnoty $[\text{Ca}^{2+}]_i$:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d Q [(R - R_{\min})/(R - R_{\max})],$$

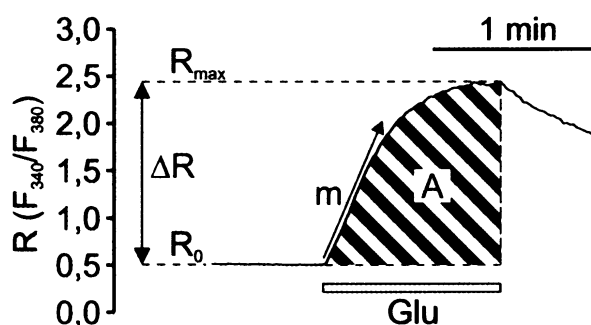
kde R je naměřená hodnota poměru intenzit fluorescence ($R = F_{340}/F_{380}$), pro kterou je $[Ca^{2+}]_i$ počítáno, K_d je disociační konstanta sondy fura-2 (dle výrobce 0,14 μ M), R_{min} a R_{max} je minimální a maximální naměřená hodnota R ($R = F_{340}/F_{380}$), Q odpovídá poměru minimální ku maximální hodnotě intenzity fluorescence při vlnové délce 380 nm ($Q = F_{380min}/F_{380max}$).

Hodnoty maximální a minimální intenzity fluorescence sondy fura-2 dosazené do kalibrační rovnice byly získány měřením fluorescence s roztoky o nízké (zajištěno pomocí 5 mM EGTA) a vysoké (10 mM $CaCl_2$) koncentraci Ca^{2+} po aplikaci 1 μ M ionoforu 4Br-A23187.

Tento výpočet má některá omezení. Při provádění kalibračních pokusů bylo také zjištěno, že koncentrace sondy uvnitř buněk se i v rámci jedné buněčné kultury barvené za stejných podmínek velmi liší. Pro správné určení změny absolutních hodnot $[Ca^{2+}]_i$ by proto každý pokus musel být následován kalibrací. Další odchylka vypočtené a skutečné hodnoty $[Ca^{2+}]_i$ je závislá na dosazené hodnotě K_d barviva fura-2, jejíž přesná hodnota v intracelulárním prostředí není známa. Pohybuje se mezi 135 - 224 nM v závislosti na koncentraci Mg^{2+} a je silně závislá na iontové síle roztoku - při 250 mM dosahuje až 760 nM {82, 83}. Vzhledem k této skutečnosti a obtížnosti kalibračního měření bylo jedním pokusem potvrzeno, že hodnoty změny $[Ca^{2+}]_i$ vyvolané aplikací neurosteroidu nebo glutamátu se pohybují v oblasti citlivosti sondy (tzn. v rozmezí $0,1 K_d - 10 K_d$, tj. 14 nM - 1,4 μ M, dle K_d 0,14 μ M uváděné výrobcem), ale výsledné hodnoty poměru intenzit fluorescence R nejsou dále na absolutní hodnoty $[Ca^{2+}]_i$ převáděny. Zvyšování hodnoty R souvisí se zvyšováním $[Ca^{2+}]_i$, a proto je dále v textu toto spojení používáno, i když absolutní hodnota tohoto zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ není známa.

Naměřená data byla analyzována pomocí programu Clampfit, který je součástí pClamp verze 8.1, a programu Sigma Plot (Systat Software Inc., San Jose, USA). Odpovědi NMDA receptorů byly charakterizovány kvalitativně i kvantitativně. Velikost odpovědi jsme hodnotili třemi parametry: (1) nejvyšší změna poměru intenzit fluorescence R , které bylo dosaženo během aplikace – nejdéle 120 s (ΔR ; ΔR byla vypočítána jako rozdíl počáteční hodnoty R_0 a maximální dosažené hodnoty R_{max} během aplikace); (2) počáteční rychlost změny poměru intenzit fluorescence R (směrnice m ; $R = mt + q$) a (3) plocha pod křivkou, počítána od počátku aplikace po dobu 120 s (A ; $A = \int R(t) - R_0 dt$) (Obr. 4.3, str. 30). Tyto parametry byly zvoleny s ohledem na jistá omezení každého

z nich. V případě, že dojde k saturaci všech vazebných míst pro Ca^{2+} , fluorescenční sonda není citlivá k dalšímu zvyšování $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a získané hodnoty poměru intenzit fluorescence R_{\max} resp. ΔR a plochy pod křivkou A jsou nepřesné. Třetí parametr, směrnice, předpokládá lineární průběh odpovědi, což je v době nástupu signálu pravděpodobně splněno, ale tato hypotéza nebyla ověřena, proto je používána při srovnávání velikostí odpovědi také hodnota plochy pod křivkou A. Všechny tři parametry jsou znázorněny na obrázku 4.3.



Obrázek 4.3. Parametry zvolené pro popis odpovědi NMDA receptorů. Obrázek ukazuje změnu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jedné HEK 293 buňky exprimující NR1-1a/NR2B receptory (černá křivka) vyvolanou aplikací 1 μM glutamátu (bílý obdélník). Změna $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je vyjádřena v jednotkách poměru intenzit fluorescence ($R = F_{340}/F_{380}$). Aplikace agonisty v aplikačním roztoku (bez Mg^{2+}) vede k nárůstu poměru intenzit fluorescence R z počáteční hladiny (R_0) až po dosažení maximální hodnoty (R_{\max}). Velikost odpovědi je charakterizována rozdílem těchto dvou hodnot (ΔR ; $\Delta R = R_{\max} - R_0$). Rychlost nástupu odpovědi byla hodnocena pomocí směrnice (m). Dalším parametrem pro popis odpovědi byla plocha pod křivkou A, počítána od začátku do konce aplikace (120 s).

4.3.3.4. Statistické zpracování výsledků

Výsledky v této diplomové práci jsou ukázány ve formě aritmetických průměrů (\pm střední chyba průměru, pokud není uvedeno jinak) z (n) buněk. Statistická významnost byla hodnocena Mann-Whitney testem (Sigma Plot).

4.3.3.5. Rovnice použité k výpočtům

Koncentračně závislý účinek PS a glutamátu byl charakterizován pomocí rovnice:

$$(I) = 1 + (A_{\max} / (1 + (EC_{50} / [PS])^h))$$

kde hodnota A odpovídá počtu buněk citlivých na PS resp. reagujících na agonistu, A_{\max} je maximální aktivační účinek PS, EC_{50} je koncentrace PS, při které je dosaženo poloviny maximálního aktivačního účinku, h je Hillův koeficient. Hodnoty EC_{50} , A_{\max} a h byly během analýzy ponechány jako volné parametry.

5. Výsledky

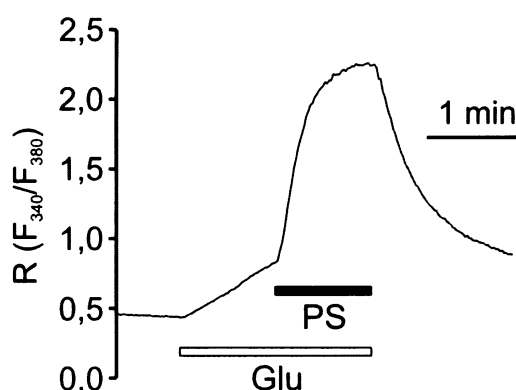
Pokusy byly prováděny na kultivovaných potkaních hipokampálních neuronech a na lidských embryonálních ledvinných buňkách (HEK 293) transfekovaných plazmidovými vektory nesoucími geny pro podjednotky NMDA receptorů: NR1-1a a NR2B a pro GFP. Z buněk exprimujících GFP pak byly metodou mikrofluorimetrického zobrazení relativních změn intracelulární koncentrace vápenatých kationtů (poměrové měření $[Ca^{2+}]_i$) snímány změny intracelulární koncentrace Ca^{2+} vyvolané aplikací glutamátu, neurosteroidů a dalších testovaných látek. Pojem „GFP-pozitivní buňky“ je dále v textu používán pro HEK 293 buňky exprimující GFP a zároveň citlivé na 1 μ M glutamát (není-li uvedeno jinak). Koagonista NMDA receptorů glycin byl přítomen ve všech roztocích v koncentraci 20 μ M.

5.1. Studium působení PS na NR1-1a/NR2B receptorech

Výsledky experimentální práce z řady laboratoří ukazují, že neurosteroid PS potencuje odpovědi NR1-1a/NR2B receptorů vazbou na extracelulární část receptoru [můj přehled]. Míra potenciačního účinku závisí na podmínkách jeho aplikace. Bylo ukázáno, že vazba PS na NMDA receptor se výrazně snižuje po aktivaci receptoru {84}. V důsledku tohoto „disuse-dependentního“ účinku ekvibrace receptoru s PS vede k pětinašobné potenciaci následné odpovědi vyvolané 1 mM glutamátem, zatímco aplikace stejné koncentrace PS současně s 1 mM glutamátem má jen malý účinek. Při nízkých koncentracích glutamátu, používaných v této práci, se tento rozdíl stírá {78}. Cílem prvních pokusů bylo potvrdit potenciační účinek PS metodou poměrového měření $[Ca^{2+}]_i$ a ověřit spolehlivost metody pro další experimentální práci.

Ke studiu potenciace rekombinantních NR1-1a/NR2B receptorů neurosteroidem PS byla zvolena současná aplikace PS a glutamátu na receptory aktivované předchozí aplikací glutamátu. Aplikace *extracelulárního roztoku* neobsahujícího přidané Mg^{2+} (ECR; složení *extracelulárního roztoku* viz kapitola 4.3.1) obsahujícího 0,3 μ M glutamátu na GFP-pozitivní HEK 293 buňky vedla ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R (definice viz kapitola 4.3.3.3) a současná aplikace 0,3 μ M glutamátu a 300 μ M PS pak tento poměr ještě zvýšila. Mezi jednotlivými aplikacemi glutamátu byly buňky oplachovány *promývacím roztokem* obsahujícím 1 mM Mg^{2+} (Složení *promývacího roztoku* viz kapitola 4.3.1). Typická odpověď je ukázána na obrázku 5.1. (str. 33) U této

buňky aplikace 0,3 μM glutamátu vyvolala zvýšení poměru intenzit fluorescence R z hodnoty 0,44 na 0,84. Následně byl na buňku aplikován 0,3 μM glutamát a 300 μM PS, což vedlo k dalšímu nárůstu poměru intenzit fluorescence R na hodnotu 2,26. Potenciační účinek PS byl pozorován u 26 z 30 GFP-pozitivních buněk (87 %). Tyto výsledky získané metodou poměrového měření $[\text{Ca}^{2+}]_i$ naznačují, že PS potencuje odpovědi vyvolané aktivací NMDA receptoru agonistou, což je v souladu s předcházejícími výsledky elektrofyziologických pokusů {76}.



Obrázek 5.1. PS zvyšuje odpovědi NR1-1a/NR2B receptorů aktivovaných glutamátem. Aplikace 0,3 μM glutamátu (doba aplikace je vyznačena bílým obdélníkem) vedla ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R. Po ~ 60 s byl na buňky aplikován 300 μM PS (doba aplikace je vyznačena černým obdélníkem) v přítomnosti 0,3 μM glutamátu, což vedlo k dalšímu zvýšení odpovědi.

Pro vyloučení nepřímého působení PS na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ byly provedeny kontrolní pokusy zaměřené na studium působení PS v nepřítomnosti glutamátu. Tyto pokusy překvapivě ukázaly, že samotná aplikace PS (300 μM) v nepřítomnosti glutamátu vede u části GFP pozitivních HEK 293 buněk ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R (Obr. 5.2, str. 34, Obr. 5.3.B, str. 36). Tyto výsledky naznačují, že je PS sám schopen zvyšovat $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Předmětem této diplomové práce bylo charakterizovat toto působení.



Obrázek 5.2. Aplikace PS v nepřítomnosti glutamátu vede u GFP-pozitivních HEK 293 buněk ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$. Snímky ukazují změnu intenzity fluorescence při excitaci zářením o vlnové délce 340 nm (F_{340} - nepřímo vypovídá o relativních změnách $[Ca^{2+}]_i$) během aplikace PS a glutamátu na HEK 293 buňky v kultuře transfekované NR1-1a/NR2B receptory. Pro zobrazení relativních změn $[Ca^{2+}]_i$ byla zvolena škála barev: modrá-zelená-žlutá-červená, která odráží zvyšování intenzity fluorescence. GFP-pozitivní HEK 293 buňky jsou označeny fialovými ovály - GFP. A. Kultura HEK 293 buněk před aplikací testovaných látek; po 1 min aplikaci 300 μ M PS (B) a po aplikaci 1 μ M glutamátu (C).

5.1.1. Účinky PS na $[Ca^{2+}]_i$

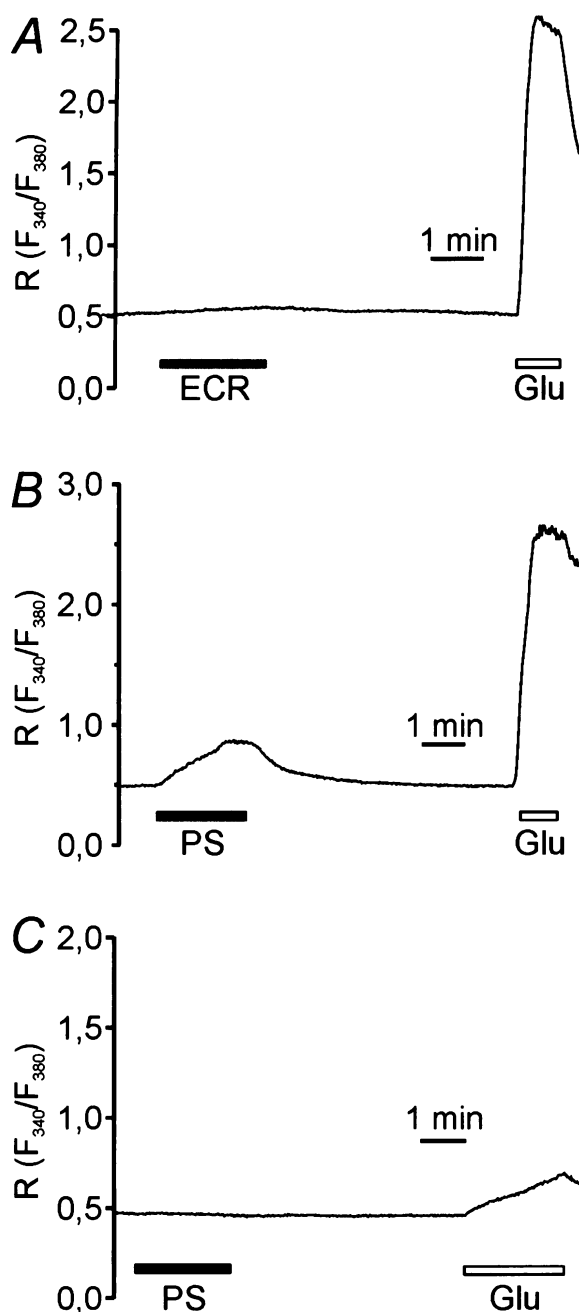
5.1.1.1. PS zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ u GFP-pozitivních HEK 293 buněk

Aplikace samotného *extracelulárního roztoku* (složení viz kapitola 4.3.1) na GFP-pozitivní HEK 293 buňky vedla jen k nepatrnému zvýšení poměru intenzit fluorescence R (Obr. 5.3.A, str. 36). Kvantitativní analýzou těchto odpovědí ($n = 32$) byly zjištěny hodnoty tří kvantitativních parametrů charakterizujících relativní změnu $[Ca^{2+}]_i$: ΔR ($0,06 \pm 0,04$), směrnice m ($0,06 \pm 0,04$ R/min) a plocha pod křivkou (A ; $A = 0,06 \pm 0,04$ r.min) (definice parametrů viz kapitola 4.3.3.3 a Obr. 4.3, str. 30). Tyto parametry (průměr + směrodatná odchylka) sloužily ke kvalitativnímu hodnocení citlivosti buněk na PS: jako buňky „citlivé na PS“ byly definovány ty, jejichž ΔR , směrnice m a A vyvolané tímto neurosteroidem dosáhly vyšších hodnot než 0,1; 0,1 r/min a 0,12 r.min. Buňky, jejichž odpovědi nesplnily tato kritéria, byly považovány za „PS-necitlivé“.

Analýzou působení PS na GFP-pozitivní HEK 293 buňky bylo zjištěno, že PS v koncentraci 300 μ M vyvolává relativní změny $[Ca^{2+}]_i$ u ~ 60 % buněk. U zbývajících buněk (~ 40 %) změny ΔR , směrnice m a A nedosáhly kritických hodnot. Kvantitativní analýza PS-citlivých GFP-pozitivních HEK 293 buněk ukázala, že vlivem PS dochází k průměrnému zvýšení ΔR o $0,50 \pm 0,07$ ($n = 30$). Hodnota směrnice těchto odpovědí byla

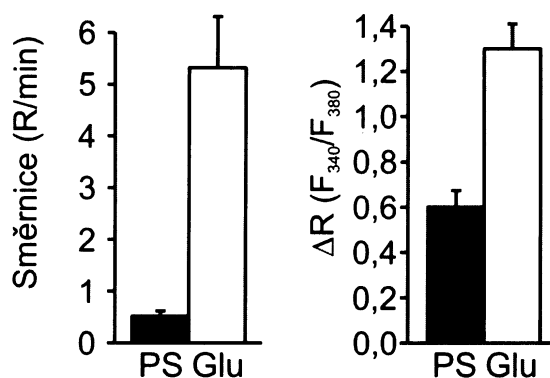
$0,51 \pm 0,10$ r/min ($n = 30$) a plocha pod křivkou A dosahovala hodnot $1,89 \pm 0,11$ r.min ($n = 30$). Aplikace $1 \mu\text{M}$ glutamátu na NR1-1a/2B receptory vyvolává vyšší a rychlejší změnu poměru intenzit fluorescence R než $300 \mu\text{M}$ PS (Obr. 5.3.B, str. 36). Hodnoty parametrů ΔR a směrnice m odpovědí vyvolaných glutamátem a PS se statisticky lišily (Mann-Whitney test; $P < 0,001$). Jejich grafické srovnání je ukázáno na obrázku 5.4 (str. 37)

V kulturách se vždy vyskytovalo $\sim 40\%$ PS-necitlivých GFP-pozitivních HEK 293 buněk. Tyto buňky odpovídaly zvýšením poměru intenzit fluorescence R na $1 \mu\text{M}$ glutamát, ale jejich citlivost byla nízká. U těchto buněk byla hodnota směrnice m odpovědí vyvolaných glutamátem $2,21 \pm 0,54$ r/min ($n = 7$), zatímco u buněk citlivých na PS $5,32 \pm 0,99$ r/min ($n = 23$). Obě hodnoty se statisticky významně lišily (Mann-Whitney test, $P = 0,008$). Typická odpověď PS-necitlivé buňky je ukázána na obrázku 5.3.C (str. 36)



Obrázek 5.3. PS zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ u GFP-pozitivních HEK 293 buněk. **A.** Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po aplikaci *extracelulárního roztoku* (ECR) (doba aplikace je vyznačena šedým obdélníkem) a tohoto roztoku s 1 μ M glutamátem (doba aplikace je vyznačena bílým obdélníkem). Mezi aplikacemi byly buňky oplachovány *promývacím roztokem* (složení roztoků viz kapitola 4.3.1). Aplikace ECR po dobu 120 s vyvolala nepatrné zvýšení poměru intenzit fluorescence R z 0,51 na 0,55 a aktivace 1 μ M glutamátem zvýšení poměru intenzit fluorescence R z 0,52 na 2,59. **B.** Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R u buňky citlivé na PS. Aplikace 300 μ M PS (černý obdélník) po dobu 120 s vedla ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R z 0,49

na 0,87 a aktivace 1 μM glutamátem (bílý obdélník) ke zvýšení R z 0,49 na 2,65. C. Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R u buňky necitlivé na PS. Aplikace 300 μM PS (černý obdélník) nevedla ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R (R bylo 0,49 před i po 120 s aplikaci). Aplikace 1 μM glutamátu (bílý obdélník) vyvolala zvýšení R z 0,46 na 0,69.



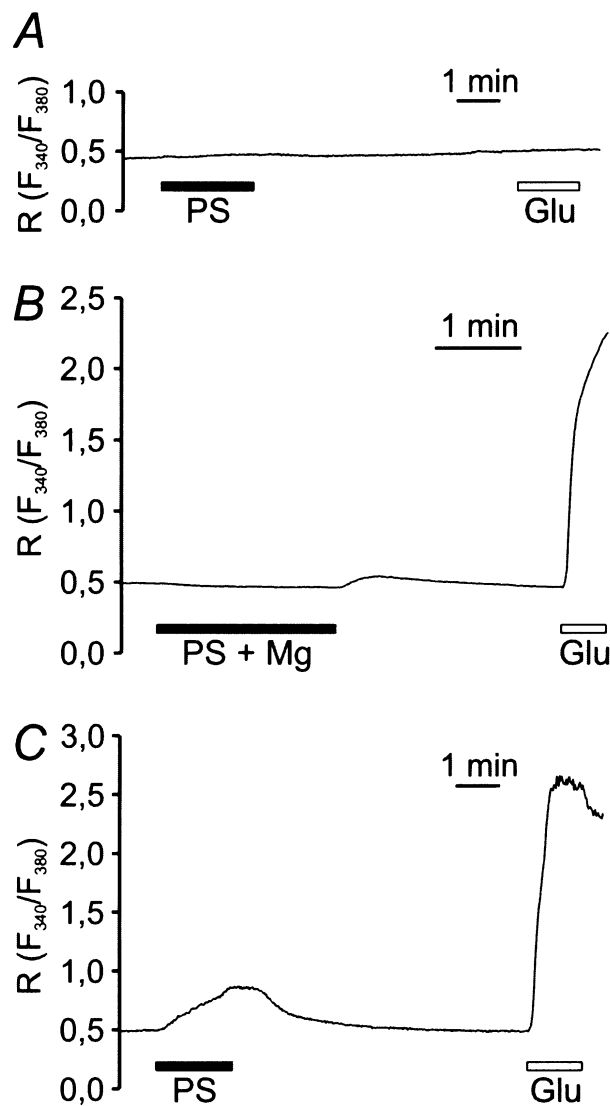
Obrázek 5.4. Srovnání relativních změn $[\text{Ca}^{2+}]_i$ u HEK 293 buněk vyvolaných PS a glutamátem. Sloupcový graf ukazuje relativní změny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vyjádřené směrnicí m a ΔR vyvolané 300 μM PS (n = 36) (černé sloupce) a jejich srovnání s odpověďmi vyvolanými 1 μM glutamátem (n = 36) (bílé sloupce). Míry změn vyvolané PS a glutamátem se v obou případech statisticky významně lišily.

5.1.1.2. Souvisejí změny v $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pozorované během aplikace PS s NMDA receptory?

Cílem dalších pokusů bylo zjistit, zda zvýšení poměru intenzit fluorescence R vyvolané PS souvisí s jeho působením na NMDA receptory. V těchto pokusech byla srovnána citlivost netransfekovaných HEK 293 buněk na PS s těmi, které exprimovaly rekombinantní NMDA receptory, a dále byl zkoumán vliv Mg^{2+} , které za fyziologických podmínek blokují odpovědi NMDA receptorů, na působení PS.

Po aplikaci 300 μM PS na netransfekované kultury HEK 293 buněk nebo GFP-negativní HEK 293 buňky (v transfekovaných kulturách) nebylo pozorováno žádné nebo jen nepatrné zvýšení poměru intenzit fluorescence R. Tyto buňky též neodpovídaly na aplikaci 1 μM glutamátu (Obr. 5.5.A, str. 38). Výsledek naznačuje, že působení PS souvisí s expresí NMDA receptorů. Tato hypotéza byla dále podpořena výsledky pokusů, v nichž byl zkoumán vliv Mg^{2+} na PS vyvolané odpovědi u GFP-positivních buněk. Aplikace 300 μM PS v ECR s 1 mM Mg^{2+} nevedla u 26 z 27 (96 %) k významným

změně poměru intenzit fluorescence R (Obr. 5.5.B), zatímco v nepřítomnosti Mg^{2+} bylo 18 z 28 (64 %) buněk (měřeno na sesterských kulturách) citlivých na PS (Obr. 5.5.C).



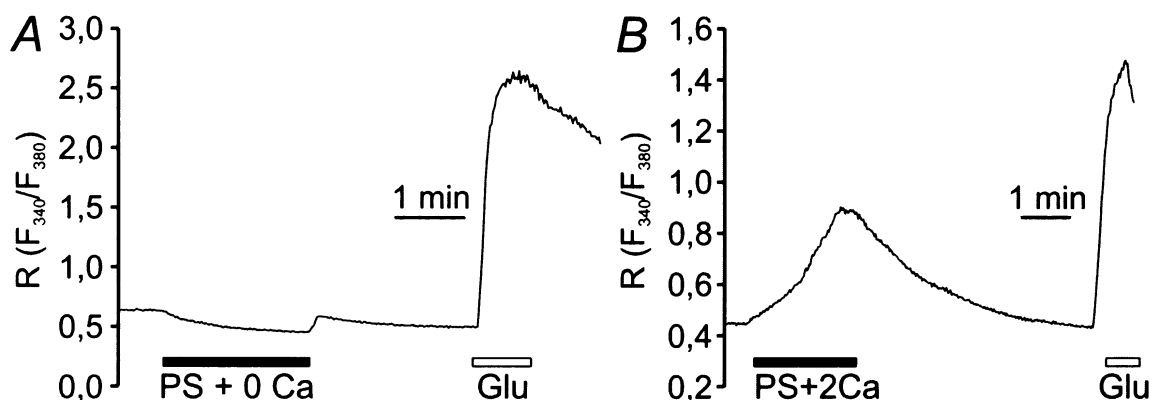
Obrázek 5.5. PS vyvolané změny $[Ca^{2+}]_i$ souvisejí s NMDA receptory. **A.** Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po aplikaci PS na GFP-negativní HEK 293 buňky. Aplikace 300 μM PS (černý obdélník) po dobu 120 s ani aplikace 1 μM glutamátu (bílý obdélník) nevedla u buněk ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R. **B.** Ukázka typické odpovědi u GFP-pozitivní HEK 293 buňky po aplikaci PS v přítomnosti Mg^{2+} . Aplikace 300 μM PS v přítomnosti 1 mM Mg^{2+} (černý obdélník) po dobu 120 s nevedla ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R. Buňka byla citlivá k 1 μM glutamátu (bílý obdélník) aplikovanému v ECR (neobsahujícím přidané Mg^{2+}). **C.** Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po aplikaci PS v nepřítomnosti Mg^{2+} u GFP-pozitivní

HEK 293 buňky. Aplikace 300 μM PS (černý obdélník) v ECR (neobsahující přidané Mg^{2+}) na HEK 293 buňky sesterských kultur vedla ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R. Buňka odpovídala na 1 μM glutamát (bílý obdélník).

5.1.1.3. Mechanismus zvyšování $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vlivem PS

Cílem následujících pokusů, bylo zjistit, zda zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ popsané v předcházející kapitole je vyvoláno průchodem Ca^{2+} z extracelulárního prostoru, nebo zda k jeho uvolnění dochází z intracelulárních zdrojů.

V kapitole 5.1.1.1 bylo ukázáno, že aplikace 300 μM PS v přítomnosti 2 mM extracelulární koncentrace Ca^{2+} vede u GFP-pozitivních HEK 293 buněk ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Aplikace 300 μM PS v ECR bez přidaného Ca^{2+} nevedla u žádné z třiceti buněk ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Obr. 5.6.A). V kontrolních pokusech provedených na sesterských kulturách bylo 27 z 28 (97 %) GFP-pozitivních HEK 293 buněk citlivých na aplikaci 300 μM PS v přítomnosti 2 mM Ca^{2+} (Obr. 5.6.B).

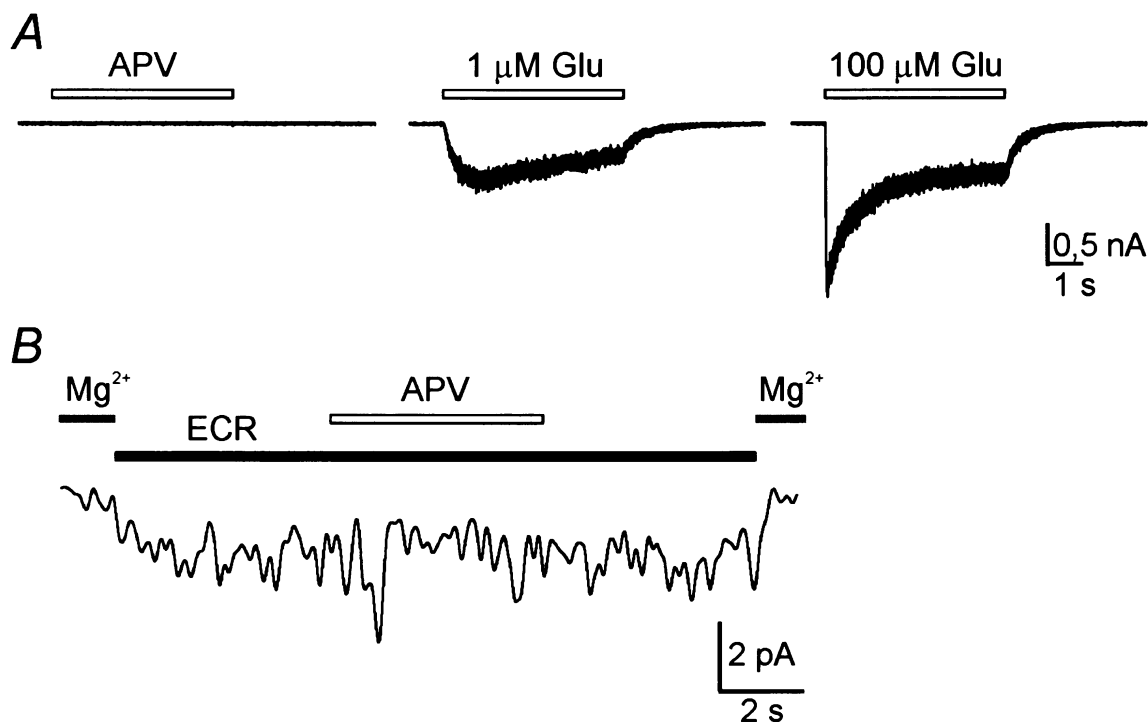


Obrázek 5.6. PS vyvolané zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je způsobeno průnikem Ca^{2+} z extracelulárního prostoru. A. Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po aplikaci PS v nepřítomnosti Ca^{2+} u GFP-pozitivní HEK 293 buňky. Aplikace 300 μM PS (černý obdélník) v ECR bez přídavku Ca^{2+} , nevyvolala zvýšení poměru intenzit fluorescence R. Buňka odpovídala na 1 μM glutamát (bílý obdélník). B. Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po aplikaci PS v ECR obsahujícím 2 mM Ca^{2+} u GFP-pozitivní HEK 293 buňky. Aplikace 300 μM PS (černý obdélník) v ECR vedla ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R, podobně jako aplikace 1 μM glutamátu (bílý obdélník).

Výsledky těchto pokusů ukazují, že účinek PS na $[Ca^{2+}]_i$ závisí na extracelulární koncentraci Ca^{2+} , a naznačují, že k tomuto zvýšení dochází průnikem Ca^{2+} přes iontové kanály NMDA receptorů. Tuto hypotézu potvrzují i výsledky pokusů, ve kterých byl PS aplikován v přítomnosti Mg^{2+} - blokátoru těchto iontových kanálů (viz kapitola 5.1.1.2).

Následně bylo studováno, zda PS zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ pouze známým mechanismem – vazbou do svého potenciačního alosterického místa, což vede ke zvýšení odpovědi vyvolané agonistou - nebo zda aktivuje NMDA iontové kanály i přímo. Agonisté NMDA receptorů nebyli do *extracelulárního roztoku* s neurosteroidem přidáni (složení ECR viz 4.3.1). K vyloučení možnosti znečištění roztoku zbytkovým glutamátem bylo ve spolupráci s Ing. Caisem provedeno elektrofyziologické měření, kdy byl na GFP-pozitivní HEK 293 buňky aplikován ECR v přítomnosti D-APV (kompetitivní antagonist glutamátového místa). Bylo předpokládáno, že v případě přítomnosti glutamátu (nebo jiného agonisty NMDA receptorů) v ECR bude docházet k aktivaci NMDA receptorů, které bude možné pomocí D-APV inhibovat. Obrázek 5.7 (str. 41) ukazuje průběh pokusu. Na udržovaném membránovém potenciálu -60 mV vyvolala změna promývacího roztoku (obsahujícího Mg^{2+}) za aplikační roztok (bez Mg^{2+}) změnu proudu o 2,3 pA. Aplikace ECR s 10 μM D-APV tento proud snížilo o 0,34 pA (Obr. 5.7.B, str. 41). Odpovědi na 1 μM a 100 μM glutamát sloužily po dosazení do rovnice I (viz kapitola 5.3.3.5) pro stanovení závislosti koncentrační závislosti působení glutamátu (Obr. 5.7.A, str. 41). Za předpokladu, že změna proudu vyvolaná D-APV je způsobena pouze inhibicí NMDA receptorů aktivovaných glutamátem, je možné této změny využít pro výpočet znečišťující koncentrace glutamátu. Takto byla v ECR stanovena koncentrace zbytkového glutamátu $12,7 \pm 13,8$ nM ($n = 5$).

Abychom zjistili, zda takováto koncentrace glutamátu může být zodpovědná za zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ pozorované po aplikaci PS, byl dále testován vliv různých koncentrací glutamátu na $[Ca^{2+}]_i$ (viz níže). Výsledky jsou diskutovány v kapitole 6.1.



Obrázek 5.7. Elektrofyziologické stanovení kontaminace ECR glutamátem.

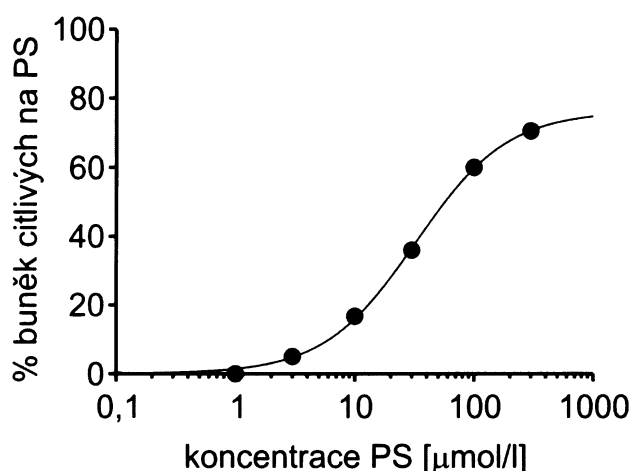
Koncentrace zbytkového glutamátu v aplikačním roztoku byla zkoumána elektrofyziologicky metodou patch-clamp ve spolupráci s Ing. Caisem. A. Ukázka typické proudové odpovědi GFP-pozitivní HEK 293 buňky na aplikaci 10 μM D-APV v ECR (detail viz (B)), 1 μM glutamátu a 100 μM glutamátu. Snížení proudové odpovědi po aplikaci D-APV bylo použito pro výpočet znečišťující koncentrace glutamátu v ECR.

5.1.1.4. PS zvyšuje [Ca²⁺]_i koncentračně závislým způsobem

V kapitole 5.1.1.1 bylo ukázáno, že PS zvyšuje [Ca²⁺]_i. Dále byla analyzována závislost tohoto účinku PS na jeho koncentraci. Hodnotícím parametrem byla citlivost buněk na aplikaci PS v těchto koncentracích: 1, 3, 10, 30, 100 a 300 μM. Měření bylo prováděno ve stejný den na sesterských kulturách GFP-pozitivních HEK 293 buněk. Po aplikaci 1 μM PS nebyla zaznamenána žádná odpověď (n = 19). Pouze 1 z 20 buněk (5 %) byla citlivá na 3 μM PS. Po aplikaci 10 μM PS byla naměřena odpověď u 3 z 18 buněk (17 %), 12 z 33 buněk bylo citlivých na 30 μM PS (36 %) a 9 z 15 buněk na 100 μM PS (60 %). Na aplikaci 300 μM PS - nejvyšší testované koncentrace - bylo citlivých 31 z 44 buněk (71 %).

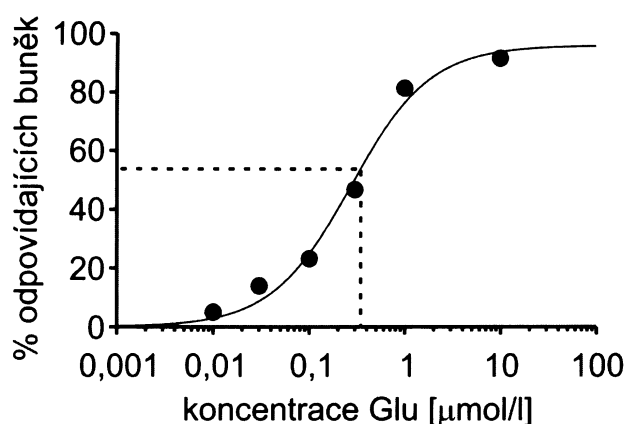
Počet buněk citlivých na PS v procentech byl vyneseno v závislosti na koncentraci neurosteroidu. Data byla proložena křivkou definovanou rovnicí I (viz kapitola 4.3.3.5)

(Obr. 5.8). Zjištěná hodnota EC_{50} byla $32 \mu\text{M}$, Hillův koeficient 1,1 a maximální počet PS-citlivých buněk 76 %.



Obrázek 5.8. Koncentrační závislost účinku PS. Graf znázorňuje počet PS-citlivých GFP-pozitivních HEK 293 buněk v závislosti na koncentraci aplikovaného neurosteroidu. Data byla proložena křivkou definovanou rovnicí I (kapitola 4.3.3.5). Zjištěné hodnoty EC_{50} a Hillova koeficientu jsou $32 \mu\text{M}$ a 1,1. Hodnota 100 % na ose y odpovídá počtu buněk reagujících na aktivaci $1 \mu\text{M}$ glutamátem.

Cílem dalších pokusů bylo srovnat účinek $300 \mu\text{M}$ PS s účinkem glutamátu na GFP-pozitivních HEK 293 buňkách. Pro určení „ne/odpovídající“ buňky na glutamát byla použita stejná kritéria jako pro odpovědi indukované PS (viz kapitola 5.1.1.1). Na aplikaci 10 nM glutamátu odpověděla pouze 1 z 18 buněk (6 %). Po aktivaci 30 nM glutamátu byla zaznamenána odpověď u 5 z 36 buněk (14 %). Na 100 nM , 300 nM a $1 \mu\text{M}$ glutamát odpovědělo 12 z 52 (23 %), 21 z 45 (47 %) a 39 z 48 (81 %) buněk. Aktivace NR1-1a/2B receptorů $10 \mu\text{M}$ glutamátem vyvolala odpověď u 43 z 47 (92 %) buněk (Obr. 5.9, str. 43). Data byla proložena křivkou definovanou rovnicí I (viz kapitola 4.3.3.5). Zjištěná hodnota EC_{50} pro působení glutamátu byla $272 \mu\text{M}$, Hillův koeficient 1,0 a maximální počet buněk odpovídajících na glutamát 96 %. V těchto pokusech bylo 50 z 93 HEK 293 buněk (54 %) citlivých na $300 \mu\text{M}$ PS, což podle zjištěné koncentrační závislosti odpovídá reakci na aplikaci glutamátu o koncentraci 346 nM .



Obrázek 5.9. Koncentrační závislost účinku glutamátu. Graf znázorňuje počet GFP-pozitivních HEK 293 buněk reagujících na glutamát v závislosti na jeho koncentraci. Data byla proložena křivkou definovanou rovnicí I (kapitola 4.3.3.5). Na aplikaci 300 μM PS reagovalo 54 % buněk. Přerušovaná úsečka znázorňuje koncentraci glutamátu, která by vyvolala stejnou odpověď (346 nM).

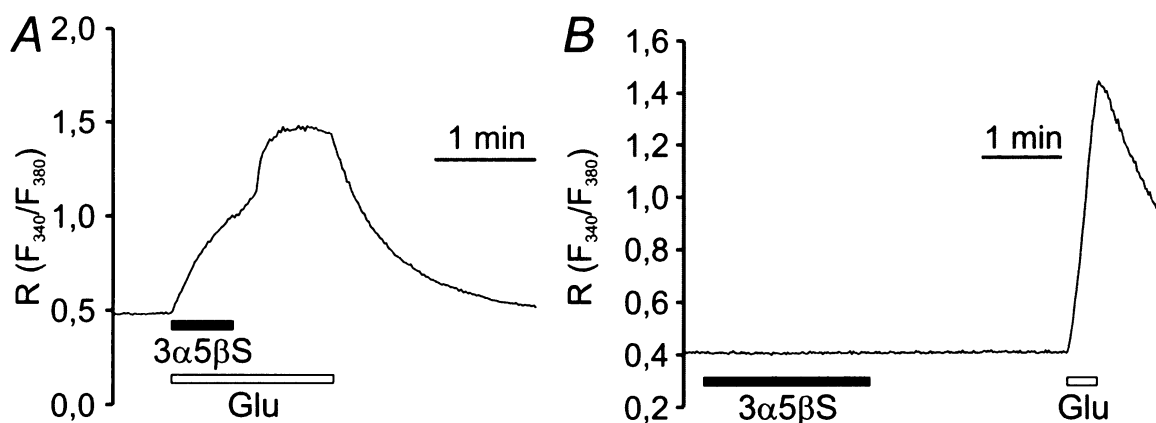
Výsledky uvedené v této kapitole naznačují, že odpovědi vyvolané PS jsou koncentračně závislé, a že účinek vyvolaný aplikací 300 μM PS je srovnatelný s účinkem glutamátu o koncentraci mezi 300 až 400 nM.

5.1.1.5. Specifita účinku PS na $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Zjištění, že PS zvyšuje $[\text{Ca}^{2+}]_i$, vedlo k otázce, zda je tento účinek specifický pro tento neurosteroid, nebo zda jej mohou vyvolávat i jiné látky z této skupiny. Jedním z dalších endogenních neurosteroidů, jehož působení na NMDA receptorech je dobře známo, je $3\alpha5\beta\text{S}$. Elektrofyziologickými technikami bylo zjištěno, že tento neurosteroid (na rozdíl od PS) odpovědi vyvolané agonistou inhibuje {79, 85}. K ověření inhibičního působení $3\alpha5\beta\text{S}$ metodou poměrového měření $[\text{Ca}^{2+}]_i$ byl na HEK 293 buňky aplikován glutamát po předchozí současné aplikaci glutamátu a $3\alpha5\beta\text{S}$. Typická odpověď je ukázána na obrázku 5.10.A (str. 44) U této buňky došlo po současné aplikaci 1 μM glutamátu a 50 μM $3\alpha5\beta\text{S}$ ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R z hodnoty 0,48 na 1,09. Následná aplikace samotného 1 μM glutamátu vedla k dalšímu zvýšení poměru intenzit fluorescence R na hodnotu 1,48. Tento efekt byl pozorován u 22 z 30 GFP-pozitivních HEK 293 buněk (73 %).

Tyto výsledky naznačují, že $3\alpha5\beta S$ inhibuje odpovědi vyvolané aktivací NMDA receptoru agonistou, což je v souladu s předcházejícími výsledky elektrofyziologických pokusů {79, 85}.

Pro studium působení $3\alpha5\beta S$ na $[Ca^{2+}]_i$ byly zvoleny stejné podmínky jako při pokusech s PS. Aplikace $300 \mu M$ $3\alpha5\beta S$ po dobu 120 s nevedla u žádné z 22 GFP-pozitivních HEK 293 buněk ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ (Obr. 5.10.B). Naměřená hodnota ΔR byla pouze $0,005 \pm 0,002$, plocha pod křivkou A $0,009 \pm 0,002$ r/min. Směrnice naměřených odpovědí byla nulová. Tento výsledek ukazuje, že na rozdíl od PS aplikace $3\alpha5\beta S$ v nepřítomnosti agonisty NMDA receptorů $[Ca^{2+}]_i$ nezvyšuje, a naznačuje tak, že působení neurosteroidů vedoucí ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ závisí na jejich struktuře.

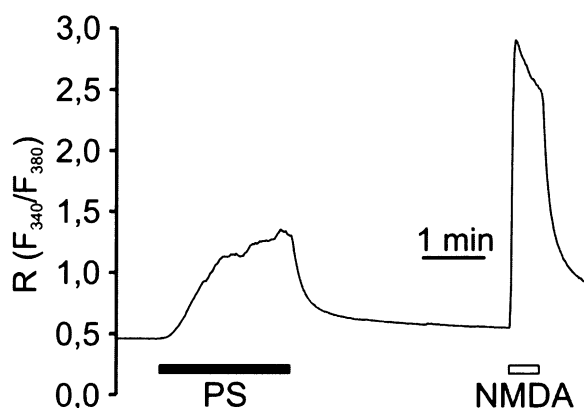


Obrázek 5.10. $3\alpha5\beta S$ inhibuje odpovědi NR1-1a/NR2B receptorů aktivovaných glutamátem. Samotná aplikace $3\alpha5\beta S$ nevede ke změnám $[Ca^{2+}]_i$. **A.** Současná aplikace $1 \mu M$ glutamátu (bílý obdélník) a $50 \mu M$ $3\alpha5\beta S$ (černý obdélník) na GFP-pozitivní HEK 293 buňky vedla ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R o 0,61. Po ~ 60 s byly buňky dále aktivovány pouze $1 \mu M$ glutamátem, což vedlo k dalšímu vzrůstu R. **B.** Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po aplikaci $3\alpha5\beta S$ u GFP-pozitivní HEK 293 buňky. Aplikace $300 \mu M$ $3\alpha5\beta S$ (černý obdélník) nevyvolala žádnou odpověď, na rozdíl od $1 \mu M$ glutamátu (bílý obdélník).

5.1.1.6. Účinek PS na $[Ca^{2+}]_i$ u buněk hipokampálních neuronů

V předcházející části bylo ukázáno, že PS u GFP-pozitivních HEK 293 buněk zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$. Účinky neurosteroidu pozorované na rekombinantních systémech se však mohou lišit od výsledků získaných studiem nativních receptorů, a proto bylo působení PS

na $[Ca^{2+}]_i$ ověřeno na kulturách hipokampálních neuronů. Aplikace 300 μ M PS v přítomnosti 0,5 μ M tetrodotoxinu (inhibitor napěťově závislých Na^+ kanálů) vedla ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ (Obr. 5.11). Tento jev byl pozorován u 69 z 69 studovaných neuronů (100 %)



Obrázek 5.11. PS zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ u kultivovaných hipokampálních neuronů. Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po aplikaci PS. Aplikace 300 μ M PS (černý obdélník) v přítomnosti 0,5 μ M tetrodotoxinu vyvolala zvýšení poměru intenzit fluorescence R z 0,46 na 1,36. Buňka odpovídala na 100 μ M NMDA (bílý obdélník).

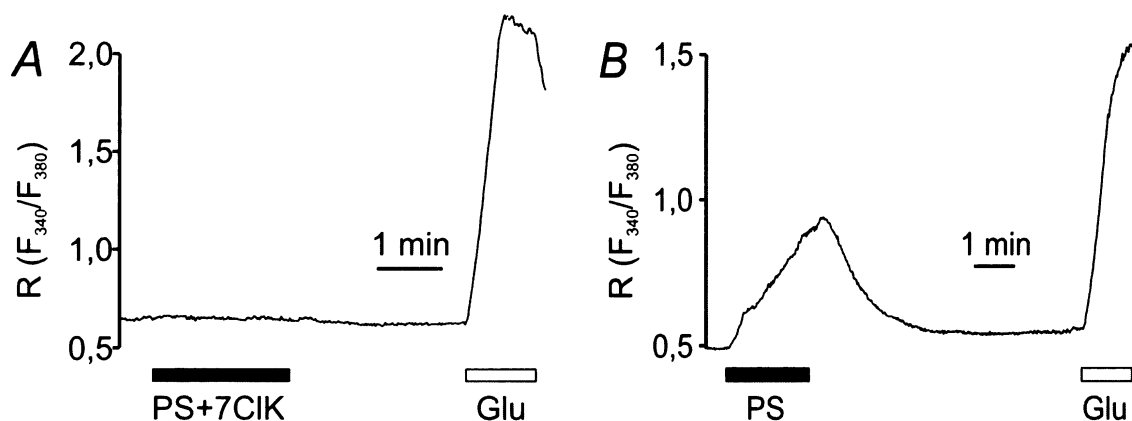
5.2. Vazebné místo PS na NMDA receptorech

Studiem vlivu PS na rekombinantní i nativní NMDA receptory bylo zjištěno, že tento neurosteroid zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ (viz kapitola 5.1.1.1 a 5.1.1.6). Následující pokusy byly zaměřeny na charakterizaci vazebného místa, kde PS na NMDA receptoru působí. Cílem bylo zjistit, zda se neurosteroid váže do stejného vazebného místa jako přirozený agonista NMDA receptorů glutamát nebo koagonista glycin, nebo zda je toto místo specifické pouze pro tento steroid. Pro tento účel byli využiti jednak kompetitivní antagonisté NMDA receptorů, jednak receptory s bodovými mutacemi glutamátového vazebného místa.

5.2.1. Vliv kyseliny 7-chlorkynurenové na PS vyvolané změny $[Ca^{2+}]_i$

Obrázek 5.12 (str. 46) ukazuje výsledky pokusů, v nichž byl zkoumán vliv kyseliny 7-chlorkynurenové (kompetitivního antagonisty vážícího se do glycinového vazebného místa) na zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ vyvolané PS. Po současné aplikaci 300 μ M PS a 20 μ M kyseliny 7-chlorkynurenové v ECR bez přídavku glycinu byly pouze 2 z 41 GFP-pozitivních HEK 293 buněk citlivé na PS (5 %), zatímco aplikace 300 μ M PS na buňky sesterských

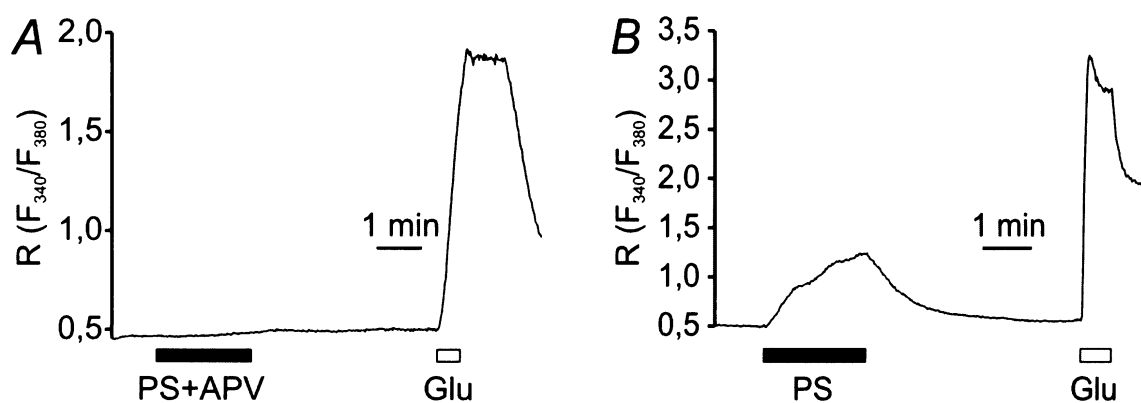
kultur vedla k odpovědi u 16 z 26 buněk (62 %). Tento výsledek naznačuje, že k aktivaci NMDA receptorů neurosteroidem PS je zapotřebí současná aktivace NMDA receptoru glycinem.



Obrázek 5.12. Vliv kyseliny 7-chlorkynurenové na odpovědi vyvolané PS. **A.** Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po současné aplikaci PS a kyseliny 7-chlorkynurenové (v obr. 7-CIK) u GFP-pozitivní HEK 293 buňky. Aplikace 300 μ M a 20 μ M kyseliny 7-chlorkynurenové je vyznačena černým obdélníkem a 1 μ M glutamátu bílým obdélníkem. **B.** Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po aplikaci PS u GFP-pozitivní HEK 293 buňky v sesterské kultuře. Aplikace 300 μ M PS (černý obdélník) vedla ke zvýšení R. Buňka byla citlivá k 1 μ M glutamátu (bílý obdélník).

5.2.2. Vliv D-APV na účinky PS na NR1-1a/NR2B receptorech

Cílem dalších pokusů bylo charakterizovat působení D-APV, kompetitivního antagonisty vázícího se do glutamátového vazebného místa, na změny $[Ca^{2+}]_i$ vyvolané PS. Současná aplikace 300 μ M PS a 50 μ M D-APV nevyvolala u žádné z 35 GFP-pozitivních HEK 293 buněk zvýšení poměru intenzit fluorescence R. V kontrolních pokusech provedených na sesterských kulturách bylo po aplikaci 300 μ M PS zaznamenáno 18 z 30 buněk citlivých na PS (60 %). Typický záznam odpovědi je ukázán na obrázku 5.13 (str. 47). Tyto výsledky ukazují, že v přítomnosti D-APV k aktivaci NMDA receptorů neurosteroidem PS nedochází.



Obrázek 5.13. Vliv D-APV na odpovědi vyvolané PS. A. Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po současné aplikaci PS a D-APV (v obr. APV) u GFP-pozitivní HEK 293 buňky. Současná aplikace 300 μM PS a 50 μM D-APV (černý obdélník) nevyvolala zvýšení poměru intenzit fluorescence R. Aplikace 1 μM glutamátu je vyznačena bílým obdélníkem. **B.** Ukázka typické změny poměru intenzit fluorescence R po aplikaci PS u GFP-pozitivní HEK 293 buňky v sesterské kultuře. Aplikace 300 μM PS (černý obdélník) vedla ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R. Aplikace 1 μM glutamátu je vyznačena bílým obdélníkem.

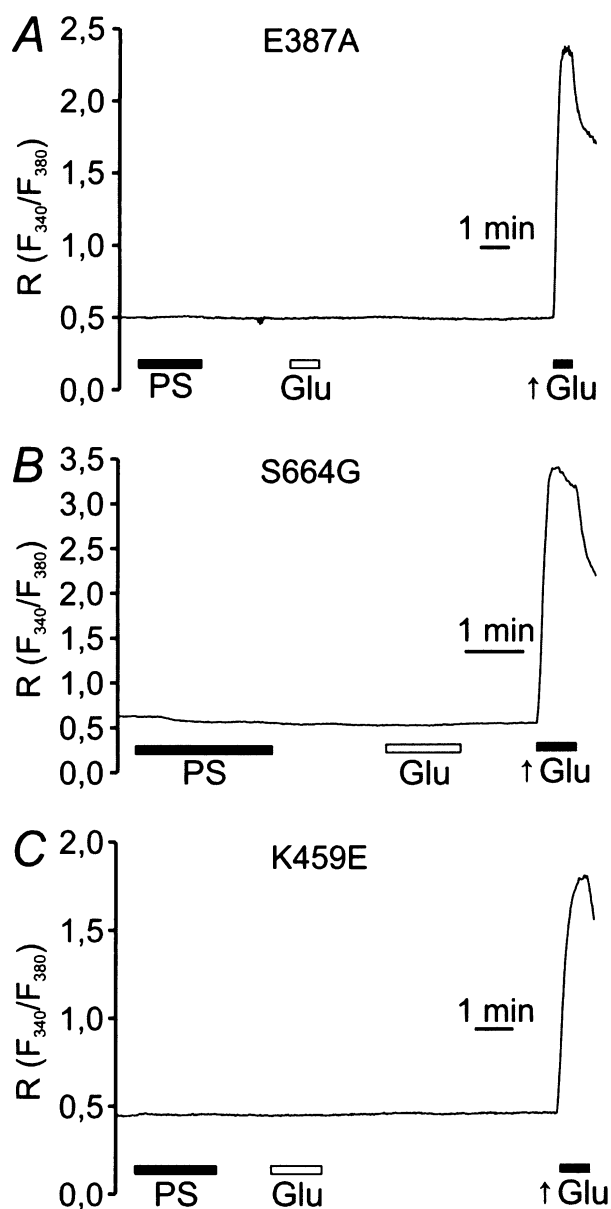
5.2.3. Vliv bodových mutací v glutamátovém místě na účinky PS na NR1-1a/NR2B receptorech

Cílem dalších pokusů bylo zjistit, jaký vliv mají bodové mutace aminokyselinových zbytků vytvářejících vazebné místo pro glutamát na působení PS. Byly provedeny tři bodové mutace v genu pro NR2B podjednotku, které různou měrou ovlivňují afinitu ke glutamátu: E387A, S664G a K459E {24}. Po transfekci HEK 293 buněk NR1-1a podjednotkou a NR2B podjednotkou s jednou bodovou mutací byla studována citlivost na PS u GFP-pozitivních buněk.

Aplikace 300 μM PS na rekombinantní NR1-1a/NR2B receptory s bodovou mutací glutamátu 387 za alanin v genu pro NR2B podjednotku nevedla u žádné z 27 GFP-pozitivních HEK 293 buněk ke zvýšení poměru intenzit fluorescence R. Tato mutace snižuje afinitu ke glutamátu přibližně 350 x {24}, což bylo ověřeno aplikací 1 μM ($\sim\text{EC}_{50}$ pro NR1-1a/2B) a 350 μM glutamátu. Nízká koncentrace agonisty podle očekávání u žádné z buněk odpověď nevyvolala, zatímco následná aplikace zvýšené koncentrace glutamátu již vedla k aktivaci NMDA receptorů (Obr. 5.14.A, str. 49).

Bodová mutace serinu 664 za glycin v genu pro NR2B podjednotku, která snižuje afinitu ke glutamátu přibližně 270 x {24}, také zabránila u všech 43 GFP-pozitivních HEK 293 buněk zvýšení poměru intenzit fluorescence R jak po aplikaci 300 μM PS, tak po aplikaci 1 μM glutamátu. Receptory byly následně aktivovány 270 μM glutamátu (Obr. 5.14.B, str. 49).

Pouze u 2 z 61 GFP-pozitivních HEK 293 buněk, jejichž NR1-1a/NR2B receptory obsahovaly bodovou mutaci lysinu 459 za glutamát v genu pro NR2B podjednotku, bylo zaznamenáno zvýšení poměru intenzit fluorescence R po aplikaci 300 μM PS. Bodová mutace v tomto místě snižuje afinitu ke glutamátu přibližně 177 x {24}, proto byla exprese funkčních NMDA receptorů následně ověřena jejich aktivací 180 μM glutamátem. Aplikace 1 μM glutamátu odpověď nevyvolala (Obr 5.14.C, str. 49).



Obrázek 5.14. Vliv bodových mutací v glutamátovém vazebném místě na zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ vyvolané PS. Ukázky typických změn poměru intenzit fluorescence R po aplikaci PS u GFP-pozitivních HEK 293 buněk transfekovaných NR1-1a/NR2B receptory s jednou bodovou mutací v glutamátovém vazebném místě: **A.** E387A **B.** S664G **C.** K459E. Aplikace 300 μ M PS (černý obdélník) ani 1 μ M glutamátu (bílý obdélník) nevyvolala u žádné z buněk zvýšení poměru intenzit fluorescence R. Buňky byly citlivé k aplikaci zvýšené koncentraci glutamátu (\uparrow Glu; šedý obdélník): **A.** 350 μ M **B.** 270 μ M **C.** 180 μ M.

6. Diskuze

V této diplomové práci byl studován vliv PS, jednoho z nejrozšířenějších neurosteroidů v mozku {86-88}, na nativní a rekombinantní NMDA receptory metodou poměrového měření $[Ca^{2+}]_i$. V souladu s dřívějšími studiemi bylo ukázáno, že po aplikaci agonisty s PS dochází k většímu zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ než po aplikaci samotného agonisty. Zajímavé bylo zjištění, že PS vyvolává zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ i v nepřítomnosti agonisty NMDA receptorů, a to jak na kulturách hipokampálních neuronů, tak u HEK 293 buněk exprimujících rekombinantní NMDA receptory. Na základě farmakologických a molekulárně biologických pokusů bylo navrženo, že ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ dochází v důsledku přímé aktivace NMDA receptorů tímto neurosteroidem.

6.1. Aktivace NMDA receptorů působením PS

Bylo ukázáno, že PS zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ i v nepřítomnosti agonisty NMDA receptorů (Obr. 5.3.B, str. 36). Tento jev byl pozorován jak u HEK 293 buněk exprimujících NR1-1a/NR2B receptory, tak na kulturách hipokampálních neuronů. Výsledky kontrolních pokusů prováděných na netransfekovaných buňkách, na buňkách neexprimujících GFP v kulturách transfekovaných NR1-1a/NR2B receptory (Obr.5.5.A, str. 38) a pokusů, v nichž byl studován vliv Mg^{2+} (Obr. 5.5.B, str. 38), naznačují, že zvyšování $[Ca^{2+}]_i$ souvisí s aktivitou NMDA receptorů. V případě, že byl PS aplikován v roztoku se sníženou koncentrací Ca^{2+} nebo v přítomnosti Mg^{2+} , ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ nedošlo (Obr. 5.6.A, str. 39; Obr. 5.5.B, str. 38), což potvrzuje skutečnost, že vlivem PS je aktivován NMDA iontový kanál, jímž procházejí Ca^{2+} z extracelulárního prostředí a zvyšují tak koncentraci Ca^{2+} v buňce.

Pro tento účinek působení PS na NMDA receptorech byly studovány 2 modely: nepřímý a přímý. Hypotéza nepřímého působení je založena na předpokladu, že účinek PS je zprostředkován potenciačním vlivem neurosteroidu na odpovědi zbytkového glutamátu (nebo glutamátu podobného agonisty) přítomného v extracelulárním roztoku. Odpovědi NMDA receptorů na tento zbytkový glutamát jsou tak malé, že nemohou být detekovány, ale v přítomnosti PS jsou potencovány a dané zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ je již používanou mikrofluorimetrickou metodou poměrového měření $[Ca^{2+}]_i$ možno zaznamenat.

Aplikace D-APV – vysoce účinného selektivního kompetitivního antagonisty glutamátu – měla výrazné inhibiční působení na odpovědi vyvolané PS (Obr. 5.13, str. 47)

a stejný účinek byl pozorován v pokusech s bodovými mutacemi aminokyselin (Obr. 5.14, str. 49), které se podílejí na vazbě glutamátu {24}. Ačkoliv tyto výsledky podporují uvedenou hypotézu, je zde argument, který ji vylučuje.

Výsledky elektrofyziologických pokusů ukazují, že koncentrace zbytkového glutamátu v aplikačním roztoku neurosteroidu byla maximálně ~ 27 (stanovena $12,7 \pm 13,8$) nM (viz Obr. 5.7, str. 41). Za předpokladu, že 300 μ M PS potencuje odpovědi NR1-1a/2B receptorů $\sim 2x$ {84}, takto zvýšená odpověď by měla odpovídat odpovědi vyvolané ~ 54 nM glutamátu. Výsledky pokusů s různými koncentracemi glutamátu (Obr. 5.9, str. 43) ovšem ukazují, že odpovědi vyvolané PS jsou srovnatelné s odpovědí na vyšší koncentraci glutamátu (~ 300 nM). Kromě toho aplikace glutamátu v koncentraci 30 nM vyvolává odpověď u ~ 14 % buněk (Obr. 5.9, str. 43), aplikace samotného extracelulárního roztoku však u žádné z buněk zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ nevyvolala (Obr. 5.3.A, str. 36). Tyto výsledky nasvědčují tomu, že zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ po aplikaci PS je vyvoláno jiným mechanismem než potenciací odpovědí NMDA receptorů vyvolaných zbytkovým glutamátem.

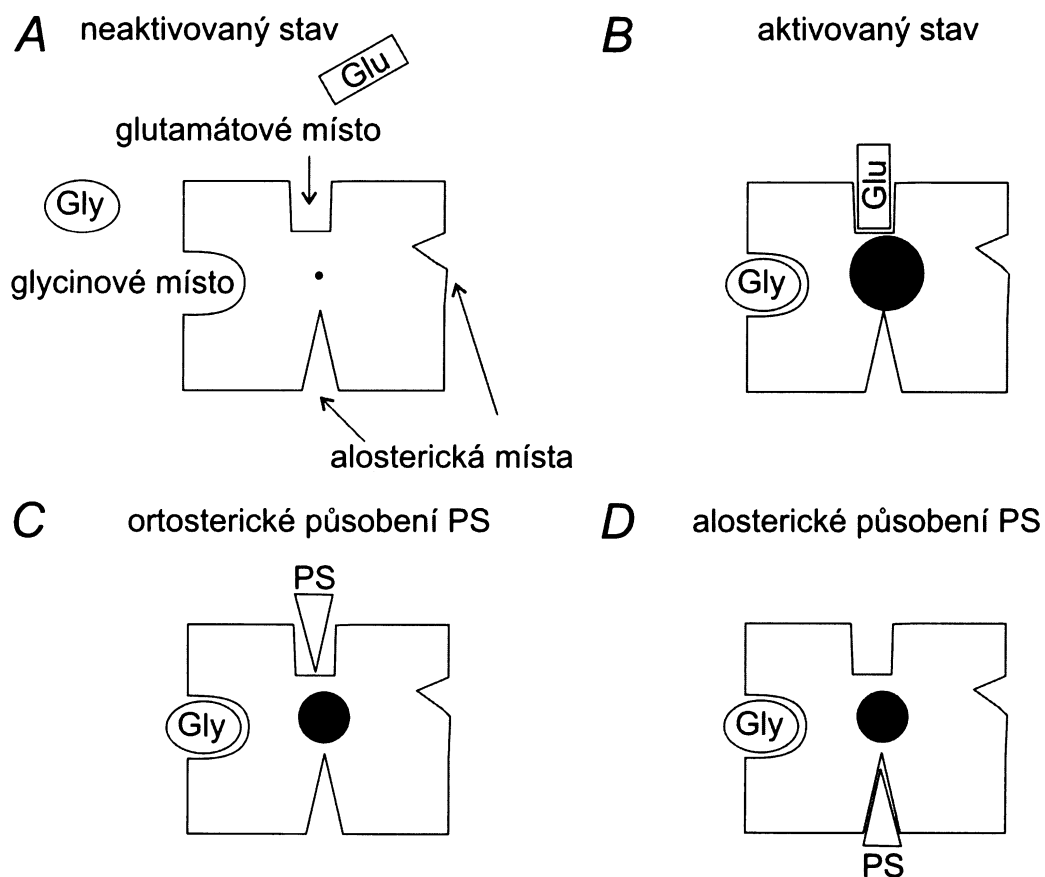
Mechanismus přímé aktivace NMDA receptorů neurosteroidem předpokládá, že vazba PS do vazebného místa pro glutamát (ortosterického místa - z angl. „orthosteric site“) nebo jiného (alosterického) místa vyvolá konformační změny NMDA receptoru vedoucí k otevření iontového kanálu (Obr. 6.1, str. 53). Výsledky obsažené v této diplomové práci neposkytují dostatek důkazů pro potvrzení či vyloučení některé z těchto hypotéz. Z výsledků pokusů, ve kterých je použito D-APV (Obr. 5.13, str. 47), lze usuzovat na ortosterický mechanismus působení PS na NMDA receptorech (D-APV kompetuje s PS o vazbu do glutamátového vazebného místa). Kompetitivní mechanismus působení byl navržen pro inhibici odpovědí glycinových receptorů vyvolanou PS {89}. Přímá aktivace NMDA receptoru by tedy mohla být zprostředkována vazbou PS do glutamátového vazebného místa. Struktura PS se však od struktury agonistů působících ve vazebném místě pro glutamát liší. Zatímco agonisté NMDA receptorů mají dvě záporně nabitě skupiny (α - a ω -karboxylovou skupinu nebo jejich sulfonové či sulfinové ekvivalenty), které se musí vyskytovat v určité vzdálenosti a prostorovém uspořádání, aby došlo k vazbě na receptor {22, 23, 90}, PS má pouze jednu sulfátovou skupinu. Kromě toho homologní modelování a krystalové struktury ukazují, že ligand vázající doména na NR2A podjednotce {26} je příliš malá pro vazbu tak velké a rigidní molekuly, jakou je

PS. Vazebné studie na NR1/NR2B a na AMPA receptorech pak také potvrzují, že vazebné místo pro PS není shodné s rozpoznávacím místem pro glutamát {91, 92}.

Alosterický mechanismus působení PS předpokládá, že NMDA receptor může být aktivován z jiného místa, než je vazebné místo pro glutamát. Jelikož D-APV snižuje schopnost PS aktivovat NMDA receptor (Obr. 5.13, str. 47), lze předpokládat, že aktivace iontového kanálu neurosteroidem a glutamátové vazebné místo jsou alostericky svázané. Výsledky některých studií toto alosterické propojení vazebných míst pro PS a agonistu naznačují. Bylo ukázáno, že vazba glutamátu na NMDA receptor snižuje pozitivní modulační účinek PS na vazbu ifenprodilu {91}. Také studium potenciace odpovědi NMDA receptorů vlivem PS prokázalo závislost jeho účinku na aktivaci receptoru glutamátem {84}.

Alosterický mechanismus aktivace byl popsán pro několik ligandem aktivovaných iontových kanálů. V případě nikotinových acetylcholinových receptorů bylo ukázáno, že mnoho strukturně odlišných sloučenin působí jako alosterické ligandy, které zvyšují pravděpodobnost otevírání iontového kanálu vyvolaného acetylcholinem, a kromě tohoto potenciačního účinku bylo zjištěno, že v nepřítomnosti acetylcholinu působí jako agonisté s nízkou účinností {93}. Podobně GABA_A receptory mohou být aktivovány neurosteroidy a jejich syntetickými analogy {94, 95}. Na tomto receptoru jsou vazebná místa pro agonistu a neurosteroid odlišná, přesto však bikukulin - kompetitivní antagonist kyseliny γ -aminomáselné - proudy vyvolané neurosteroidem snižuje {96-98}.

V pokusech s antagonistou glycinového místa kyselinou 7-chlorkynurenovou došlo k inhibici odpovědi vyvolaných PS (Obr. 5.12, str. 46), což naznačuje, že ať tento neurosteroid aktivuje NMDA receptory ortosterickým či alosterickým mechanismem, pro otevření iontového kanálu je nezbytná vazba jejich přirozeného koagonisty glycinu.



Obrázek 6.1. Schématické znázornění vazebných míst na NMDA receptoru. A. Schématické znázornění NMDA receptoru s jeho vazebnými místy pro agonistu glutamát (Glu), koagonistu glycin (Gly) a alosterické ligandy. Aktivita iontového kanálu je vyjádřena velikostí černého kruhu. **B.** Vazba agonisty (zde glutamát; Glu) a koagonisty (zde glycin; Gly) do příslušných vazebných míst na NMDA receptoru je nezbytná k aktivaci iontového kanálu. **C.** Schématické znázornění ortosterického mechanismu účinku PS na NMDA receptory. Tento model předpokládá, že PS v nepřítomnosti agonisty aktivuje NMDA receptory prostřednictvím vazby do glutamátového vazebného místa. **D.** Schématické znázornění alosterického mechanismu účinku PS na NMDA receptory. Tento model předpokládá, že PS v nepřítomnosti agonisty aktivuje NMDA receptory navázáním mimo vazebné místo agonisty.

6.2. Modulace NMDA receptorů neurosteroidy

Elektrofyzilogická měření a výsledky mikrofluorimetrických pokusů ukazují, že interakce neurosteroidů s NMDA receptorem může vést ke dvěma různým účinkům: potenciaci (Obr. 5.1, str. 33) a inhibici (Obr. 5.10, str. 44) {76, 99, 100}. Potenciační účinek neurosteroidů (např. PS) je závislý na podjednotkovém složení NMDA receptorů

(s preferencí pro receptory obsahující podjednotky NR2A/B) a dále na konformačním stavu NMDA iontového kanálu, neboť jeho afinita k PS je po aktivaci receptoru agonistou snížena {76-79, 84, 101, 102}. PS má kromě svého potenciačního účinku také účinek inhibiční {78, 84}. Inhibiční účinek sulfatovaných neurosteroidů (např. $3\alpha5\beta\text{S}$) je také závislý na podjednotkovém složení receptorů, ale na rozdíl od účinku potenciačního je výraznější u podjednotek NR2C/D a po aktivaci receptorů se zvyšuje {85, 100}. Farmakologické i vazebné studie s neurosteroidy PS a $3\alpha5\beta\text{S}$ na NMDA receptorech naznačují, že potenciační a inhibiční působení je zprostředkováno rozdílným vazebným místem {79}. Afinita NMDA receptoru k PS a $3\alpha5\beta\text{S}$ je závislá na jeho podjednotkovém složení a stavu (aktivovaný/neaktivovaný) a naměřené hodnoty EC_{50} a IC_{50} se pohybují v desítkách μM {76-78, 84, 85}. Nedávné studie však ukazují, že již nanomolární koncentrace neurosteroidů PS a $3\alpha5\beta\text{S}$ ovlivňuje funkci rekombinantních receptorů. Ačkoliv neurosteroidy v této koncentraci nemění odpověď na glutamát, ovlivňují inhibici NR1/NR2B receptoru ifenprodilem (specifickým inhibitorem NMDA receptorů obsahujících NR2B podjednotku): PS zvyšuje a $3\alpha5\beta\text{S}$ snižuje jeho účinek {91}. Výsledky této studie naznačují, že na NMDA receptoru existují další vazebná místa pro PS a $3\alpha5\beta\text{S}$, která se navzájem liší svou afinitou.

Tato data ukazují, že na NMDA receptoru se vyskytuje několik vazebných míst pro neurosteroidy. Výsledky pokusů v této diplomové práci naznačují, že PS aktivuje NMDA receptory s EC_{50} 32 μM (Obr. 5.8, str. 42) Tato hodnota je blízká zjištěným hodnotám EC_{50} pro potenciační působení PS na glutamátové a NMDA vyvolané odpovědi {76, 78, 84}, což naznačuje, že potenciační účinek a přímá aktivace vlivem PS na NMDA receptorech mohou být zprostředkovány stejným vazebným místem. Podle dosavadních studií je toto místo lokalizováno extracelulárně {77, 79, 102} a pokusy s chimérickými receptory poukázaly na klíčový význam extracelulární smyčky mezi třetí a čtvrtou transmembránovou doménou (Horák) a úsek na čtvrté transmembránové doméně {102}. Toto vazebné místo je odlišné od vazebných míst pro glycin, spermin, polyaminy, kyselinu arachidonovou, redoxní látky a Mg^{2+} a liší se i od inhibičního vazebného místa pro $3\alpha5\beta\text{S}$ {79}, což je v souladu se zjištěním, že $3\alpha5\beta\text{S}$ nevyvolává zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Obr. 5.10.B, str. 44).

Aplikace PS v koncentraci $\geq 3 \mu\text{M}$ vedla jak u HEK 293 buněk exprimujících rekombinantní NMDA receptory, tak u kultivovaných hipokampálních neuronů ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Je otázkou, zda se PS vyskytuje v CNS v koncentraci, které by vedlo k biologicky

významné aktivaci iontových kanálů NMDA receptorů. Podle výsledků několika studií se koncentrace neurosteroidů v mozku mění v závislosti na různých faktorech, jako je například stáří, stres, sexuální aktivita a agresivita {103, 104}. V současné době není k dispozici metoda, která by spolehlivě určila koncentraci neurosteroidů *in vivo* {88}. Stanovené hodnoty koncentrace PS v potkaním mozku a plazmě jsou nízké (0,1 – 0,3 ng/g tkáně) {105, 106}, předpokládá se však, že v místě synapse se při synaptické aktivitě může hladina PS dočasně několikanásobně zvýšit. Tato hypotéza ovšem dosud nebyla experimentálně prokázána {88}.

6.3. Fyziologické důsledky modulace neuronální excitability PS

Bylo ukázáno, že přirozeně se vyskytující neurosteroid PS moduluje aktivitu mnoha různých ligandem aktivovaných iontových kanálů (pro přehled {73}), jako jsou GABA_A {107}, glycinové {71}, NMDA, AMPA a kainátové receptory {72}. PS ovlivňuje také činnost napětově závislých vápníkových kanálů typu L {108} a sigma-1 receptorů {109}. Tyto popsané neuromodulační účinky nejsou omezeny pouze na *in vitro* systémy, ale mohou být pozorovány také na úrovni celého organismu. Behaviorální studie na zvířecích modelech prokázaly vliv PS na zlepšení paměťových schopností {110-112}. Dále byla popsána souvislost mezi sníženou hladinou PS v hipokampu starších potkanů s jejich horšími výkony v paměťových testech, u nichž intraperitoneální či intrahipokampální injekce PS výsledky přechodně zlepšila {104}. Účinky PS na paměťové procesy byly také pozorovány na buněčné úrovni studiem jeho vlivu na vznik dlouhodobých změn v excitačním synaptickém přenosu, jakou je například dlouhodobá potenciace (LTP; z angl. “Long Term Potentiation“), která je pokládána za mechanismus účastnící se procesu učení a paměti a závisí na činnosti NMDA receptorů {113}. Za předpokladu, že PS potencuje odpovědi NMDA receptorů (jak je diskutováno výše), není překvapujícím zjištěním, že prostřednictvím tohoto působení na NMDA iontové kanály také zvyšuje LTP {114}. Jak však bylo ukázáno v další studii, účinek PS na synaptickou plasticitu v hipokampu je komplikovanější, neboť zvyšuje také NMDA receptor-nezávislou LTP v CA1 synapsích, která je zprostředkována napětově závislými vápníkovými kanály typu L a sigma-1 receptory. Za určitých podmínek může PS dokonce snižovat NMDA receptor-závislou LTP, což naznačuje mnohem komplexnější mechanismus modulace synaptické plasticity tímto neurosteroidem {115}.

Kromě pozitivních účinků na synaptickou plasticitu, může PS svou schopností pozitivně modulovat odpovědi NMDA receptorů vyvolaných glutamátem přispívat k tzv. excitotoxicitě, tj. zvyšování $[Ca^{2+}]_i$ vedoucímu až k smrti neuronu {116, 117}. Tento jev, zprostředkovávaný právě NMDA receptory, je pokládán za příčinu vzniku některých neurodegenerativních a psychiatrických poruch {3-8}.

Z uvedeného vyplývá, že PS prostřednictvím svého modulačního vlivu na receptory pro neuropřenašeče v centrální nervové soustavě ovlivňuje důležité kognitivní procesy a může se podílet i na vzniku některých neurodegenerativních chorob. Výsledky této diplomové práce naznačují, že kromě alosterického potenciačního působení PS na NMDA receptorech může tento sulfatovaný neurosteroid přímo aktivovat NMDA iontové kanály. Poznání molekulárního mechanismu tohoto působení přispěje k lepšímu pochopení funkce, příp. farmakologie NMDA receptorů a objasnění podmínek, za kterých endogenní neurosteroidy modulují neuronální excitabilitu. Testování neurosteroidů jako sond pro chování receptoru také může přispět k nalezení látek s pozdějším klinickým využitím.

7. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na charakterizaci vlivu PS na nativní a rekombinantní NMDA receptory mikrofluorimetrickou metodou poměrového měření intracelulární koncentrace Ca^{2+} (dále $[\text{Ca}^{2+}]_i$).

Bylo zjištěno, že PS zvyšuje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ průchodem Ca^{2+} z extracelulárního prostoru přes cytoplazmatickou membránu mechanismem, který souvisí s přítomností NMDA receptorů. Zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vlivem PS bylo pozorováno jak u HEK 293 buněk exprimujících rekombinantní NR1-1a/2B receptory, tak v kulturách hipokampálních neuronů. Neurosteroid $3\alpha5\beta\text{S}$, inhibující odpovědi NMDA receptorů, zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nevyvolává, což nasvědčuje specifickému působení PS. Na základě farmakologických a molekulárně biologických pokusů prováděných na rekombinantních NR1-1a/2B receptorech bylo navrženo, že ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dochází v důsledku přímé aktivace NMDA iontového kanálu neurosteroidem PS, pravděpodobně jeho vazbou do alosterického místa na NMDA receptoru. Účinek PS vedoucí k aktivaci NMDA receptorů je koncentračně závislý s EC_{50} $32 \mu\text{M}$ a v dávce $300 \mu\text{M}$ aktivuje NMDA receptory stejně jako glutamát v koncentraci 345 nM .

Určení vazebného místa a popis molekulárního mechanismu, jímž PS aktivuje NMDA iontové kanály, může pomoci k objasnění funkce neurosteroidů v centrální nervové soustavě a být důležitým podnětem při návrhu farmakologicky účinných látek.

8. Seznam použité literatury

1. Attwell, D., Laughlin, S. B.: *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 1133-1145 (2001)
2. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F.: *Pharmacol Rev* 51, 7-61 (1999)
3. Doble, A.: *Pharmacol Ther* 81, 163-221 (1999)
4. Doraiswamy, P. M.: *Psychopharmacol Bull* 37, 41-49 (2003)
5. Lipton, P.: *Physiol Rev* 79, 1431-1568 (1999)
6. Rothstein, J. D.: *Clin Neurosci* 3, 348-359 (1995)
7. Walton, H. S., Dodd, P. R.: *Neurochem Int* 50, 1052-1066 (2007)
8. Zeron, M. M., Chen, N., Moshaver, A., Lee, A. T., Wellington, C. L., Hayden, M. R., Raymond, L. A.: *Mol Cell Neurosci* 17, 41-53 (2001)
9. Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., Zhang, D.: *Nature* 415, 793-798 (2002)
10. Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M., Nakanishi, S.: *J Biol Chem* 268, 2836-2843. (1993)
11. Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P. H.: *Science* 256, 1217-1221 (1992)
12. Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S.: *Nature* 354, 31-37. (1991)
13. Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., Wu, M. K., Yuan, J. P., Jones, E. G., Lipton, S. A.: *J Neurosci* 15, 6509-6520 (1995)
14. Ciabarra, A. M., Sullivan, J. M., Gahn, L. G., Pecht, G., Heinemann, S., Sevarino, K. A.: *J Neurosci* 15, 6498-6508 (1995)
15. Laube, B., Kuhse, J., Betz, H.: *J Neurosci* 18, 2954-2961 (1998)
16. Schorge, S., Colquhoun, D.: *J Neurosci* 23, 1151-1158 (2003)
17. Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., Dikkes, P., Conner, D. A., Rayudu, P. V., Cheung, W., Chen, H. S., Lipton, S. A., Nakanishi, N.: *Nature* 393, 377-381 (1998)

18. Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., Mishina, M.: *Nature* 358, 36-41 (1992)
19. Johnson, J. W., Ascher, P.: *Nature* 325, 529-531 (1987)
20. Kleckner, N. W., Dingledine, R.: *Science* 241, 835-837 (1988)
21. Mayer, M. L., Vyklicky, L., Jr., Clements, J.: *Nature* 338, 425-427 (1989)
22. Patneau, D. K., Mayer, M. L.: *J Neurosci* 10, 2385-2399 (1990)
23. Watkins, J. C., Evans, R. H.: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21, 165-204 (1981)
24. Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., Kuhse, J.: *Neuron* 18, 493-503 (1997)
25. Furukawa, H., Gouaux, E.: *Embo J* 22, 2873-2885 (2003)
26. Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., Gouaux, E.: *Nature* 438, 185-192 (2005)
27. Clements, J. D., Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E., Westbrook, G. L.: *Science* 258, 1498-1501 (1992)
28. Forsythe, I. D., Westbrook, G. L.: *J Physiol* 396, 515-533 (1988)
29. Lester, R. A., Jahr, C. E.: *J Neurosci* 12, 635-643 (1992)
30. Huettner, J. E., Bean, B. P.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1307-1311 (1988)
31. Jahr, C. E.: *Science* 255, 470-472 (1992)
32. Chen, B.-S., Roche, K. W.: *Neuropharmacology* 53, 362-368 (2007)
33. Katz, B., Thesleff, S.: *J Physiol* 138, 63-80 (1957)
34. Mayer, M. L., Vyklicky, L., Jr., Westbrook, G. L.: *J Physiol Lond* 415, 329-350 (1989)
35. Vyklicky, L., Jr., Benveniste, M., Mayer, M. L.: *J Physiol Lond* 428, 313-331 (1990)
36. Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E.: *J Neurosci* 13, 1088-1096 (1993)
37. Thomas, C. G., Krupp, J. J., Bagley, E. E., Bauzon, R., Heinemann, S. F., Vissel, B., Westbrook, G. L.: *Mol Pharmacol* 69, 1296-1303 (2006)
38. Tong, G., Jahr, C. E.: *J Neurophysiol* 72, 754-761 (1994)
39. Krupp, J. J., Vissel, B., Heinemann, S. F., Westbrook, G. L.: *Mol Pharmacol* 50, 1680-1688 (1996)

40. Krupp, J. J., Vissel, B., Heinemann, S. F., Westbrook, G. L.: *Neuron* 20, 317-327 (1998)
41. Kohda, K., Wang, Y., Yuzaki, M.: *Nat Neurosci* 3, 315-322 (2000)
42. Legendre, P., Rosenmund, C., Westbrook, G. L.: *J Neurosci* 13, 674-684 (1993)
43. Vyklicky, L., Jr.: *J Physiol Lond* 470, 575-600 (1993)
44. Clements, J. D., Westbrook, G. L.: *J Neurophysiol* 71, 2566-2569 (1994)
45. Paoletti, P., Neyton, J.: *Curr Opin Pharmacol* 7, 39-47 (2007)
46. Laurie, D. J., Seeburg, P. H.: *Eur J Pharmacol* 268, 335-345 (1994)
47. Vyklicky, L., Jr., Krusek, J., Edwards, C.: *Neurosci Lett* 89, 313-318 (1988)
48. Woodhull, A. M.: *J Gen Physiol* 61, 687-708 (1973)
49. Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Guthrie, P. B.: *Nature* 309, 261-263 (1984)
50. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A.: *Nature* 307, 462-465 (1984)
51. Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J. P., Gunther, W., Seeburg, P. H., Sakmann, B.: *Science* 257, 1415-1419 (1992)
52. Mori, H., Masaki, H., Yamakura, T., Mishina, M.: *Nature* 358, 673-675 (1992)
53. Yamakura, T., Mori, H., Masaki, H., Shimoji, K., Mishina, M.: *Neuroreport* 4, 687-690 (1993)
54. Chen, H. S., Lipton, S. A.: *J Physiol* 499 (Pt 1), 27-46 (1997)
55. Lipton, S. A.: *Trends Neurosci* 16, 527-532 (1993)
56. Assaf, S. Y., Chung, S. H.: *Nature* 308, 734-736 (1984)
57. Paoletti, P., Ascher, P., Neyton, J.: *J Neurosci* 17, 5711-5725 (1997)
58. Vlachova, V., Zemkova, H., Vyklicky, L., Jr.: *Eur J Neurosci* 8, 2257-2264 (1996)
59. Krishtal, O. A., Osipchuk, Y. V., Shelest, T. N., Smirnoff, S. V.: *Brain Res* 436, 352-356 (1987)
60. Traynelis, S. F., Cull Candy, S. G.: *Nature* 345, 347-350 (1990)
61. Vyklicky, L., Jr., Vlachova, V., Krusek, J.: *J Physiol Lond* 430, 497-517 (1990)

62. Tang, C. M., Dichter, M., Morad, M.: Proc Natl Acad Sci U S A 87, 6445-6449 (1990)
63. Kashiwagi, K., Pahk, A. J., Masuko, T., Igarashi, K., Williams, K.: Mol Pharmacol 52, 701-713 (1997)
64. Turecek, R., Vlcek, K., Petrovic, M., Horak, M., Vlachova, V., Vyklicky, L., Jr.: Neuroscience 125, 879-887 (2004)
65. Adeagbo, A. S., Magbagbeola, A. O.: J Pharm Pharmacol 37, 833-835 (1985)
66. Tamura, Y., Sato, Y., Yokota, T., Akaike, A., Sasa, M., Takaori, S.: J Pharmacol Exp Ther 265, 1017-1025 (1993)
67. Williams, K.: Mol Pharmacol 44, 851-859 (1993)
68. Selye, H.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 46, 116-121 (1941)
69. Harrison, N. L., Simmonds, M. A.: Brain Res 323, 287-292 (1984)
70. Bullock, A. E., Clark, A. L., Grady, S. R., Robinson, S. F., Slobe, B. S., Marks, M. J., Collins, A. C.: J Neurochem 68, 2412-2423 (1997)
71. Wu, F. S., Gibbs, T. T., Farb, D. H.: Mol Pharmacol 37, 597-602 (1990)
72. Wu, F. S., Gibbs, T. T., Farb, D. H.: Mol Pharmacol 40, 333-336 (1991)
73. Rupprecht, R., Holsboer, F.: Trends Neurosci 22, 410-416 (1999)
74. Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjoval, J., Baulieu, E. E.: Proc Natl Acad Sci U S A 78, 4704-4707. (1981)
75. Baulieu, E. E.: Psychoneuroendocrinology 23, 963-987 (1998)
76. Bowlby, M. R.: Mol Pharmacol 43, 813-819 (1993)
77. Horak, M., Vlcek, K., Chodounska, H., Vyklicky, L., Jr.: Neuroscience 137, 93-102 (2006)
78. Malayev, A., Gibbs, T. T., Farb, D. H.: Br J Pharmacol 135, 901-909. (2002)
79. Park-Chung, M., Wu, F. S., Purdy, R. H., Malayev, A. A., Gibbs, T. T., Farb, D. H.: Mol Pharmacol 52, 1113-1123 (1997)
80. Arnostova, L. M., Pouzar, V., Drasar, P.: Steroids 57, 233-235 (1992)
81. Hollmann, M., Boulter, J., Maron, C., Beasley, L., Sullivan, J., Pecht, G., Heinemann, S.: Neuron 10, 943-954 (1993)
82. Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y.: J Biol Chem 260, 3440-3450 (1985)

83. Neher, E., Augustine, G. J.: *J Physiol* 450, 273-301 (1992)
84. Horak, M., Vlcek, K., Petrovic, M., Chodounska, H., Vyklicky, L., Jr.: *J Neurosci* 24, 10318-10325 (2004)
85. Petrovic, M., Sedlacek, M., Horak, M., Chodounska, H., Vyklicky, L., Jr.: *J Neurosci* 25, 8439-8450 (2005)
86. Baulieu, E. E., Robel, P.: *J Steroid Biochem Mol Biol* 37, 395-403 (1990)
87. Corpechot, C., Synguelakis, M., Talha, S., Axelson, M., Sjoval, J., Vihko, R., Baulieu, E. E., Robel, P.: *Brain Res* 270, 119-125 (1983)
88. Schumacher, M., Liere, P., Akwa, Y., Rajkowski, K., Griffiths, W., Bodin, K., Sjoval, J., Baulieu, E. E.: *Neurochem Int* 52, 522-540 (2008)
89. Wu, F. S., Chen, S. C., Tsai, J. J.: *Brain Res* 750, 318-320. (1997)
90. Erreger, K., Geballe, M. T., Kristensen, A., Chen, P. E., Hansen, K. B., Lee, C. J., Yuan, H., Le, P., Lyuboslavsky, P. N., Micale, N., Jorgensen, L., Clausen, R. P., Wyllie, D. J., Snyder, J. P., Traynelis, S. F.: *Mol Pharmacol* 72, 907-920 (2007)
91. Johansson, T., Frandberg, P. A., Nyberg, F., Le Greves, P.: *J Pharmacol Exp Ther* (2007)
92. Spivak, V., Lin, A., Beebe, P., Stoll, L., Gentile, L.: *Lipids* 39, 811-819 (2004)
93. Romanelli, M. N., Gualtieri, F.: *Med Res Rev* 23, 393-426 (2003)
94. Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L., Paul, S. M.: *Science* 232, 1004-1007 (1986)
95. Barker, J. L., Harrison, N. L., Lange, G. D., Owen, D. G.: *J Physiol* 386, 485-501 (1987)
96. Ueno, S., Bracamontes, J., Zorumski, C., Weiss, D. S., Steinbach, J. H.: *J Neurosci* 17, 625-634 (1997)
97. Shu, H. J., Eisenman, L. N., Jinadasa, D., Covey, D. F., Zorumski, C. F., Mennerick, S.: *J Neurosci* 24, 6667-6675 (2004)
98. Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M., Smart, T. G.: *Nature* 444, 486-489 (2006)
99. Mukai, H., Uchino, S., Kawato, S.: *Neurosci Lett* 282, 93-96 (2000)
100. Park-Chung, M., Wu, F. S., Farb, D. H.: *Mol Pharmacol* 46, 146-150 (1994)

101. Ceccon, M., Rumbaugh, G., Vicini, S.: *Neuropharmacology* 40, 491-500. (2001)
102. Jang, M. K., Mierke, D. F., Russek, S. J., Farb, D. H.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8198-8203 (2004)
103. Schumacher, M., Guennoun, R., Robel, P., Baulieu, E. E.: *Stress* 2, 65-78 (1997)
104. Vallee, M., Mayo, W., Darnaudery, M., Corpechot, C., Young, J., Koehl, M., Le Moal, M., Baulieu, E. E., Robel, P., Simon, H.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14865-14870 (1997)
105. Liere, P., Pianos, A., Eychenne, B., Cambourg, A., Liu, S., Griffiths, W., Schumacher, M., Sjovall, J., Baulieu, E. E.: *J Lipid Res* 45, 2287-2302 (2004)
106. Liu, S., Sjovall, J., Griffiths, W. J.: *Anal Chem* 75, 5835-5846 (2003)
107. Majewska, M. D., Mienville, J. M., Vicini, S.: *Neurosci Lett* 90, 279-284. (1988)
108. French-Mullen, J. M., Danks, P., Spence, K. T.: *J Neurosci* 14, 1963-1977. (1994)
109. Su, T. P., London, E. D., Jaffe, J. H.: *Science* 240, 219-221 (1988)
110. Flood, J. F., Morley, J. E., Roberts, E.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1567-1571 (1992)
111. Isaacson, R. L., Varner, J. A., Baars, J. M., De Wied, D.: *Brain Res* 689, 79-84 (1995)
112. Mayo, W., Dellu, F., Robel, P., Cherkaoui, J., Le Moal, M., Baulieu, E. E., Simon, H.: *Brain Res* 607, 324-328 (1993)
113. Lynch, M. A.: *Physiol Rev* 84, 87-136 (2004)
114. Sliwinski, A., Monnet, F. P., Schumacher, M., Morin-Surun, M. P.: *J Neurosci Res* 78, 691-701 (2004)
115. Sabeti, J., Nelson, T. E., Purdy, R. H., Gruol, D. L.: *Hippocampus* 17, 349-369 (2007)
116. Muir, J. K., Lobner, D., Monyer, H., Choi, D. W.: *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 1211-1218 (1996)
117. Weaver, C. E., Jr., Marek, P., Park-Chung, M., Tam, S. W., Farb, D. H.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10450-10454 (1997)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka