

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Disertační práce

Ing. Pavla Hubálková

Studium funkčních a farmakologických vlastností NMDA receptorů

Study of functional and pharmacological properties of NMDA receptors

Školitel: prof. MUDr. Ladislav Vyklický, DrSc.

Prohlášení:

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

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

V Praze, 17. 05. 2021

Pavla Hubálková

Identifikační záznam:

HUBÁLKOVÁ, Pavla. *Studium funkčních a farmakologických vlastností NMDA receptorů*. [Study of functional and pharmacological properties of NMDA receptors]. Praha, 2021. 109 stran, 5 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Fyziologický ústav Akademie věd ČR. Školitel Ladislav Vyklický.

Klíčová slova: NMDA receptory, neurosteroidy, vápník, palmitoylace

Key words: NMDA receptors, neurosteroids, calcium, palmitoylation

Ráda bych poděkovala svému školiteli panu profesoru Ladislavu Vyklickému za podmínky, cenné rady a podněty k profesnímu i osobnímu růstu, které mi poskytoval během celého studia. Mé poděkování patří i všem členům oddělení Buněčné neurofyziologie na Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR, kteří tvořili velmi přátelské, vstřícné a nápomocné prostředí. Děkuji i komisi J. Williama Fulbrighta, díky jejímuž stipendiu jsem mohla strávit jeden akademický rok na Northwestern University v Chicagu. V neposlední řadě mé poděkování patří všem, kteří mě po celou dobu studia podporovali a umožnili mi dokončení této práce.

ABSTRAKT

N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory patří mezi ionotropní glutamátové receptory, které jsou klíčové pro synaptický přenos a procesy učení a paměti. Po aktivaci a otevření iontového kanálu jsou propustné pro vápenaté ionty (Ca^{2+}) zprostředkovávající další signalizaci. Nedostatečná nebo naopak nadměrná aktivita NMDA receptorů vede ke vzniku závažných neurologických a psychiatrických onemocnění. NMDA receptory jsou modulovány řadou endogenních a exogenních látek. Mezi tyto látky patří i neurosteroidy – steroidní látky syntetizované *de novo* v centrální nervové soustavě a jejich syntetické analogy, které v závislosti na své struktuře mohou mít potenciační či inhibiční účinek.

Za využití elektrofyziologických a molekulárně-biologických technik byl v této práci objasněn molekulární mechanismus zvýšené citlivosti NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům po přechodném zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Nárůst inhibičního působení neurosteroidů na NMDA receptory souvisí s Ca^{2+} -indukovanou depalmitoylací tří cysteinů (C849, C854, C871) v intracelulární části GluN2B podjednotky, která současně vede ke změně kinetických parametrů receptoru ve prospěch zavřeného stavu. Práce dále přináší nové poznatky o vztahu mezi strukturou a účinkem neurosteroidů na NMDA receptory, což je důležité pro hledání nových potenciálních léčiv, ale i pro pochopení funkce těchto receptorů. Strukturální analogy bez steroidního D-kruhu odvozené od pregnanolon sulfátu (PAS) si zachovávají inhibiční působení, ale nedochází ke zlepšení účinku oproti PAS. Naopak C3-amidový substituent zvyšuje inhibiční účinek i biologickou dostupnost látek, čímž byly identifikovány vhodné výchozí struktury pro další studie s cílem nalézt potenciální léčiva pro nadměrnou aktivaci NMDA receptorů. V první systematické studii zabývající se vztahem mezi strukturou a účinkem potenciačních neurosteroidů na NMDA receptory byly charakterizovány strukturální analogy odvozené od endogenního neurosteroidu pregnenolon sulfátu s modifikacemi na C3 a C17 steroidního jádra. Potenciační účinek je závislý na délce C3-hemiesterového zbytku v kombinaci s typem substituentu na C17.

Disertační práce přináší důležité poznatky pro další studie vztahu mezi strukturou a účinkem neurosteroidů na NMDA receptory s cílem nalézt potenciální léčiva, a především objasňuje možný neuroprotektivní efekt zvýšeného inhibičního působení neurosteroidů za patologických podmínek souvisejících se zvýšenou intracelulární koncentrací Ca^{2+} .

ABSTRACT

N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are a subtype of ionotropic glutamate receptors crucial for synaptic transmission and learning and memory processes. After activation and opening of the ion channel, they are permeable to calcium ions (Ca^{2+}) that mediate further signaling. Hypo- or hyperfunction of NMDA receptors leads to the development of severe neurological and psychiatric diseases. NMDA receptors are modulated by many endogenous and exogenous substances. These include neurosteroids – steroids synthesised *de novo* in the central nervous system and their synthetic analogues, which, depending on their structure, can have positive or negative modulatory effects.

Using electrophysiological and molecular-biological techniques, we have clarified the molecular mechanism of increased sensitivity of NMDA receptors to inhibitory neurosteroids following a transient increase in intracellular Ca^{2+} concentration. The increase in neurosteroid inhibitory activity at NMDA receptors is related to Ca^{2+} -induced depalmitoylation of three cysteines (C849, C854, C871) in the intracellular part of the GluN2B subunit. This simultaneously leads to a change in the receptor's kinetic parameters in favor of the closed state. Furthermore, this work provides new insights into the relationship between the structure and activity of neurosteroids at NMDA receptors, which is important for finding potential new drugs, but also for understanding the function of these receptors. Structural analogues of pregnanolone sulphate (PAS) without the steroid D-ring maintain inhibitory activity, but there is no improvement in effect over PAS. In contrast, the C3-amide substituent increases the inhibitory effect as well as the bioavailability of the substances, leading to the identification of appropriate baseline structures for further studies to find potential drugs for over-activation of NMDA receptors. In the first systematic study investigating the structure-function relationship of neurosteroids with a positive effect on NMDA receptors, we characterized structural analogues derived from the endogenous neurosteroid pregnenolone sulphate with modifications to carbons C3 and C17 in the steroidal ring structure. The potentiating effect is dependent on the length of the C3-hemiester residue in combination with the type of substituent on C17.

This work provides important insights for further studies of the relationship between the structure and effect of neurosteroids on NMDA receptors with the goal of finding potential drugs, and in particular, it clarifies the possible neuroprotective effect of increased neurosteroid inhibitory action under pathological conditions related to increased intracellular Ca^{2+} concentration.

OBSAH

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	6
OBSAH.....	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	10
1 ÚVOD.....	12
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	13
2.1 Struktura a podjednotkové složení NMDA receptorů	13
2.2 Vlastnosti závislé na podjednotkovém složení NMDA receptorů.....	16
2.3 Fyziologie NMDA receptorů.....	18
2.3.1 Kinetické schéma aktivace NMDA receptorů	18
2.3.2 Synaptická aktivace NMDA receptorů a Ca ²⁺ signalizace	20
2.4 Patologie NMDA receptorů.....	22
2.4.1 Nadměrná aktivita NMDA receptorů	22
2.4.2 Snížená aktivita NMDA receptorů	25
2.5 Farmakologie NMDA receptorů.....	27
2.5.1 Agonisté.....	28
2.5.2 Kompetitivní antagonisté.....	29
2.5.3 Blokátory otevřeného kanálu.....	30
2.5.4 Alosterické modulátory	31
3 CÍLE PRÁCE	38
3.1 Vztah mezi strukturou inhibičních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory	38
3.2 Vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory	39
3.3 Vliv Ca ²⁺ na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory	39
4 MATERIÁL A METODY.....	40
4.1 Chemikálie a roztoky	40
4.2 cDNA klony.....	42

4.3 Cílená mutageneze.....	43
4.4 Tkáňové kultury a transfekce	43
4.5 Příprava primárních hipokampálních neuronů	44
4.6 Elektrofyziologická měření metodou terčíkového zámku.....	44
4.7 Měření volných Ca^{2+} pomocí barviva Fura	47
4.8 Měření excitotoxické buněčné smrti	47
4.9 Statistické zpracování dat	48
5 VÝSLEDKY	49
5.1 Vztah mezi strukturou inhibičních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory	49
5.1.1 Perhydrofenantreny odvozené od pregnanolon sulfátu	49
5.1.2 Amidové neurosteroidy odvozené od pregnanolon sulfátu a pregnanolon glutamátu	53
5.2 Vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory	56
5.3 Vliv Ca^{2+} na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory	61
5.3.1 Zvýšená citlivost NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům po Ca-stimulaci.....	62
5.3.2 Nárůst citlivosti NMDA receptorů k neurosteroidům souvisí s depalmitoylací GluN2B podjednotky.....	67
5.3.3 Neuroprotektivní účinek neurosteroidů	74
6 DISKUZE	77
6.1 Vztah mezi strukturou inhibičních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory	77
6.2 Vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory	80
6.3 Vliv Ca^{2+} na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory	82
7 SOUHRN.....	88
7.1 Vztah mezi strukturou inhibičních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory	88
7.2 Vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory	89
7.3 Vliv Ca^{2+} na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory	89

8 SUMMARY	90
8.1 Relationship between the structure of inhibitory neurosteroids and their ability to modulate NMDA receptors	90
8.2 The structure-activity relationship of neurosteroids with a potentiating effect on NMDA receptors.....	91
8.3 The influence of Ca ²⁺ on NMDA receptor sensitivity to inhibitory neurosteroids	91
9 ZÁVĚR.....	92
10 SEZNAM PUBLIKACÍ	93
11 LITERATURA	95
12 PŘÍLOHY	109

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátová kyselina
AndrAsp	androstan aspartát
ATD	amino-terminální doména
BAPTA	1,2-bis(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
C3, C17	atd. číslo uhlíku steroidního jádra
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CAMKII	Ca ²⁺ -calmodulin-závislá kináza II (Ca ²⁺ -calmodulin-dependent kinase II)
CIQ	3-chlorofenyl-(6,7-dimethoxy-1-((4-metoxyfenoxy)metyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H-yl)methanon
CTD	C-terminální doména
D-APV	D-2-amino-5-fosfovalerová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
<i>E_{max}</i>	maximální hodnota potenciace
<i>EC₅₀</i>	poloviční účinná koncentrace
ECS	extracelulární roztok
EDTA	ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykol-bis(2-aminoethyl ether)- N,N,N',N -tetraoctová kyselina
GABA	kyselina γ -amino-máselná
Glu	glutamát
GluA	podjednotka AMPA receptoru
GluK	podjednotka kainátového receptoru
GluN	podjednotka NMDA receptoru
Gly	glycin
<i>h</i>	Hillův koeficient
HEK293	lidské embryonální ledvinné buňky HEK293
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
<i>I_{kontrola}</i>	míra inhibice steroidu před Ca-stimulací
<i>I_{test}</i>	míra inhibice steroidu po Ca-stimulaci
<i>IC₅₀</i>	koncentrace steroidu, která inhibuje 50 % proudové odpovědi vyvolané agonistou

ICS	intracelulární roztok
LBD	ligand vázající doména (Ligand Binding Domain)
LTD	dlouhodobá deprese (Long Term Depression)
LTP	dlouhodobá potenciace (Long Term Potentiation)
MCT	průměrný čas zavření (Mean Close Time)
MK-801	dizocilpin
MOT	průměrný čas otevření (Mean Open Time)
<i>n</i>	počet buněk
NMDA	N-methyl-D-aspartátová kyselina
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého
PAG	pregnanolon glutamát (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl glutamát)
PAhPim	pregnanolon hemipimelát (5 β -pregnan-20-on 3 α -yl-hemipimelát)
PAS	pregnanolon sulfát (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl sulfát)
PES	pregnenolon sulfát (20-oxo-5 β -pregnen-3 α -yl sulfát)
P_o	pravděpodobnost otevření
PSD-95	postsynaptický protein 95 (postsynaptic density protein 95)
QNZ46	(E)-4-(6-metoxy-2-(3-nitrostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)-benzoová kyselina
SAR	vztah mezi strukturou a aktivitou (Structure Activity Relationship)
SD	směrodatná odchylka
SEM	střední chyba průměru
TCN-201	3-chloro-4-fluoro-N-[(4-[(2-(fenylcarbonyl)hydrazino)-carbonyl]fenyl)metyl]-benzensulfonamid
TMD	transmembránová doména
TTX	tetrodotoxin
WT	přirozený typ receptoru

1 ÚVOD

L-glutamát je neesenciální aminokyselina, která má specifickou úlohu v centrální nervové soustavě obratlovců jako hlavní excitační neuropřenašeč. L-glutamát objevil v roce 1866 německý chemik Karl Heinrich Ritthausen, trvalo ale téměř sto let, než byla rozpoznána a akceptována úloha L-glutamátu jako neuropřenašeče (Watkins, 2000). Vysoká koncentrace glutamátu v mozku byla popsána již ve třicátých letech minulého století, což vedlo k prvním spekulacím o možném neurofyziologickém vlivu. V roce 1952 Takashi Hyashi provedl první experimenty, kdy pozoroval, že injekční aplikace glutamátu přímo do mozkové kůry psa či opice vede ke křečím (Hyashi, 1952). Trvalo ale téměř dalších třicet let, než byla popsána existence specifických receptorů pro glutamát (Watkins a Evans, 1981) a role glutamátu jako neuropřenašeče byla akceptována (pro přehled Watkins, 2000).

Glutamát aktivuje dvě rodiny receptorů – metabotropní a ionotropní. Metabotropní glutamátové receptory zprostředkovávají signalizaci prostřednictvím G-proteinů a dalších signálních molekul (pro přehled Dore *et al.*, 2016). Iotropní glutamátové receptory jsou transmembránové proteiny spřažené s iontovým kanálem, podle preferovaného agonisty rozlišujeme receptory (v závorce): N-methyl-D-aspartát (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina (AMPA) a kyselina kainová (kainátové) (Watkins a Evans, 1981; Traynelis *et al.*, 2010).

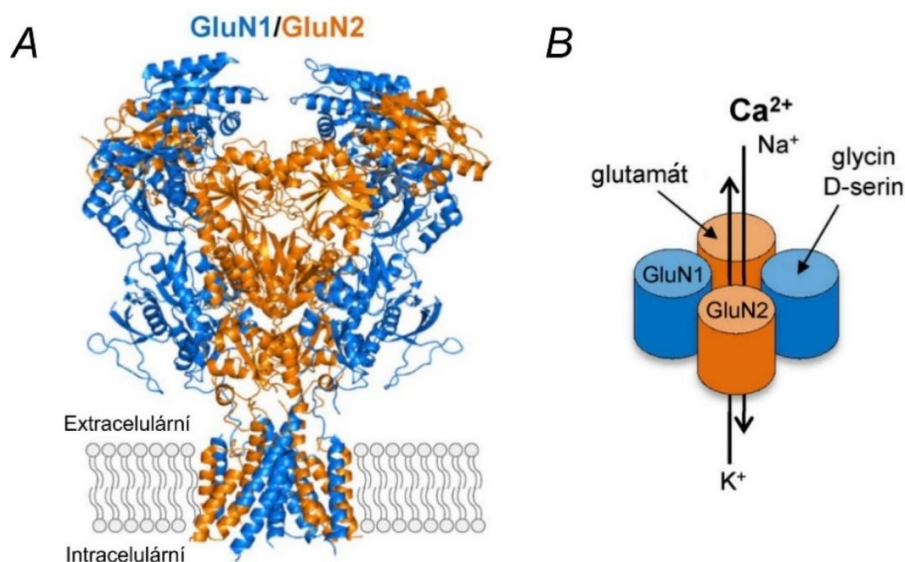
Tato disertační práce je zaměřena na studium funkčních a farmakologických vlastností NMDA receptorů a účinku neurosteroidů – alosterických modulátorů, které v závislosti na struktuře mohou mít potenciační či inhibiční účinek na NMDA receptory. Pomocí elektrofyzilogických a molekulárně-biologických technik byla studována citlivost NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům za fyziologických i patologických podmínek. Dále byly charakterizovány vztahy mezi strukturou syntetických analogů neurosteroidů a jejich inhibičním a potenciačním účinkem na NMDA receptorech.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

NMDA receptory patří mezi ionotropní glutamátové receptory, které zprostředkovávají rychlý synaptický přenos v centrální nervové soustavě savců a mají klíčovou roli v synaptické plasticitě a procesech učení a paměti. Jejich nadměrná nebo nedostatečná aktivita může vést ke vzniku řady patologických stavů (Traynelis *et al.*, 2010; Warnet *et al.*, 2020). V centrální nervové soustavě se vyskytují na neuronálních i gliových buňkách (Dzamba *et al.*, 2013), v rámci neuronu se nacházejí především v postsynaptické membráně excitačních synapsí, ale i extrasynapticky a presynapticky (Hardingham a Bading, 2010; Bouvier *et al.*, 2015).

2.1 Struktura a podjednotkové složení NMDA receptorů

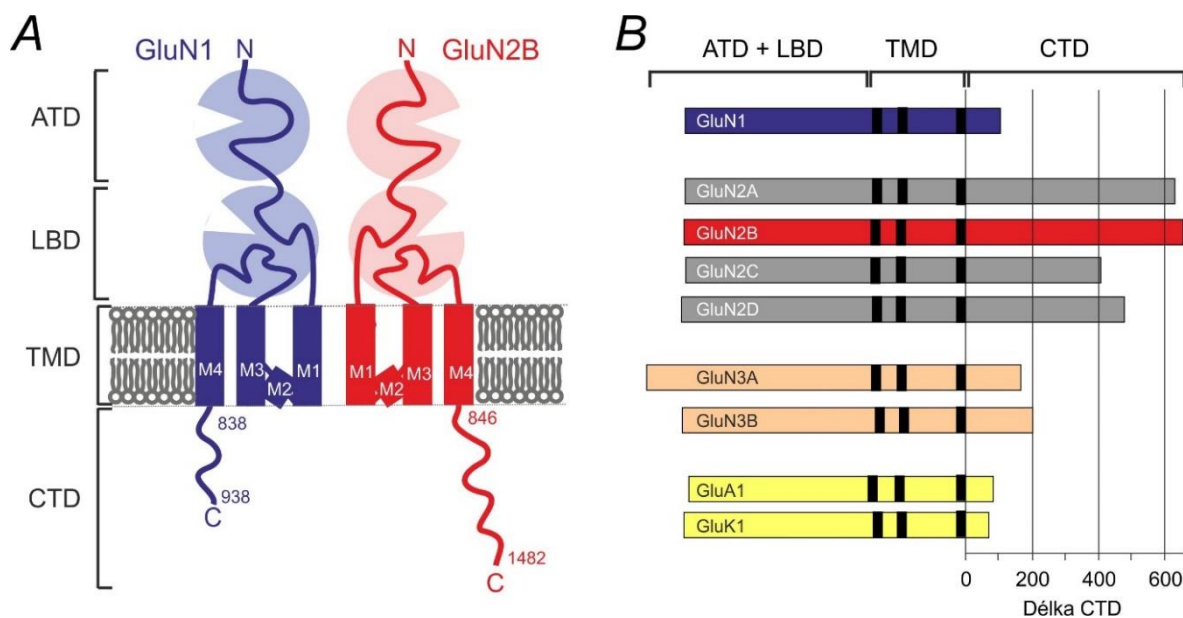
NMDA receptory jsou transmembránové heterotetramerní proteiny, které jsou složeny vždy ze dvou GluN1 a dvou GluN2 a/nebo GluN3 podjednotek (Moriyoshi *et al.*, 1991; Meguro *et al.*, 1992; Monyer *et al.*, 1992). Na základě krystalické struktury bylo potvrzeno střídavé uspořádání podjednotek tvořících NMDA receptor v pořadí například GluN1-GluN2B-GluN1-GluN2B (Karakas a Furukawa, 2014) (Obrázek 2.1). Podjednotka GluN1 je kódována jedním genem *GRIN1*, který se vyskytuje v osmi sestřihových variantách. Podjednotky GluN2 jsou kódovány čtyřmi různými geny *GRIN2A*, *GRIN2B*, *GRIN2C* a *GRIN2D*, které dávají vzniknout jednotlivým podjednotkám GluN2A, GluN2B, GluN2C a GluN2D. Podjednotky GluN3A a GluN3B jsou pak kódovány dvěma geny *GRIN3A* a *GRIN3B*.



Obrázek 2.1 Struktura a podjednotkové složení heterotetramerního NMDA receptoru. **A)** Krystalická struktura NMDA receptoru pro extracelulární a transmembránovou část (Karakas a Furukawa, 2014). Krystalická struktura pro intracelulární část není známa a na obrázku není znázorněna. **B)** Střídavé podjednotkové uspořádání NMDA receptoru tvořících iontový kanál propustný po spádu elektrochemického gradientu pro Ca²⁺, Na⁺ a K⁺ ionty (upraveno z Hansen *et al.*, 2018).

Všechny podjednotky NMDA receptoru sdílí stejnou strukturní architekturu, která je tvořena ze čtyř domén. Na extracelulární části receptoru rozlišujeme amino-terminální doménu (ATD) a ligand-vázající doménu (LBD) (Obrázek 2.2), jež obsahuje vazebná místa pro agonisty glutamát (na GluN2) a glycin či D-serin (na GluN1 a GluN3 podjednotkách). Na LBD navazuje transmembránová doména (TMD), která tvoří pór iontového kanálu, a intracelulární C-terminální doména (CTD) (Karakas a Furukawa, 2014; Lee *et al.*, 2014; Lu *et al.* 2017).

Domény ATD a LBD jsou tvořeny vždy dvěma segmenty (R1 a R2 u ATD či S1 a S2 u LBD), které svým tvarem připomínají rozevřenou škebli (anglicky clamshell) (Karakas *et al.*, 2009; Furukawa, 2012). Doména ATD má především regulační funkci, kdy ovlivňuje farmakologické a kinetické vlastnosti, ale není zásadní pro funkční vlastnosti NMDA receptoru, protože i mutované receptory bez ATD si zachovávají svoji funkci (Furukawa, 2012). Doména LBD s vazebnými místy pro agonistu či koagonistu vykazuje vysokou homologii mezi glutamátovými receptory.



Obrázek 2.2 Doménová organizace NMDA receptorů. **A)** Na NMDA receptorech rozlišujeme čtyři domény: extracelulární N-terminální doménu (ATD) a ligand-vázající doménu (LBD), kde se nachází místo pro vazbu agonistů (glycinu na GluN1 a GluN3 a glutamátu na GluN2), dále transmembránovou doménou procházející membránou (TMD) a intracelulární C-terminální doménu (CTD). Obrázek zobrazuje zjednodušený náčrt podjednotky GluN1 a GluN2B, funkční NMDA receptor je tvořen jako heterotetramer obsahující vždy dvě GluN1 a dvě GluN2 či/a GluN3 podjednotky. **B)** Porovnání rozdílné délky CTD glutamátových receptorů (zarovnání podle M4 segmentu TMD). Délka CTD NMDA receptorů se liší v rozmezí od 100 (GluN1) až po 660 (GluN2B) aminokyselinových zbytků. Pro srovnání je uvedena i GluA1 podjednotka AMPA receptoru a GluK1 kainátového receptorů, které mají nejkratší CTD (upraveno z Warnet *et al.*, 2020).

TMD je tvořena třemi transmembránovými α -helixy M1, M3 a M4 a jednou krátkou vratnou smyčkou M2, která funguje jako selektivní filtr iontů. Segment S1 LBD navazuje na M1 helix TMD, segment S2 LBD je tvořen zpětnovazebnou kličkou mezi M3 a M4 helixy TMD (Obrázek 2.2). Vrátkování NMDA receptorů probíhá ve třech krocích: 1) vazba ligandů mezi segmenty S1 a S2 na LBD; 2) konformační změna LBD vedoucí k „uzavření škeble“ a 3) šíření konformační změny způsobí otevření iontového kanálu (Mayer a Armstrong, 2004; Mayer, 2006). Samotný iontový kanál je tvořen helixy M3 a smyčkami M2 všech čtyř podjednotek. M3 helix obsahuje mezi ionotropními glutamátovými receptory vysoce konzervovanou oblast SYTANLAAF, která výrazně ovlivňuje vrátkování (Chang a Kuo, 2008; Vyklicky *et al.*, 2015). Vrchol M2 smyčky obsahuje QRN místo, které ovlivňuje propustnost iontového kanálu pro Ca^{2+} (Burnashev *et al.*, 1992). Intracelulární CTD je nejvíce variabilní doménou NMDA receptorů, protože jednotlivé

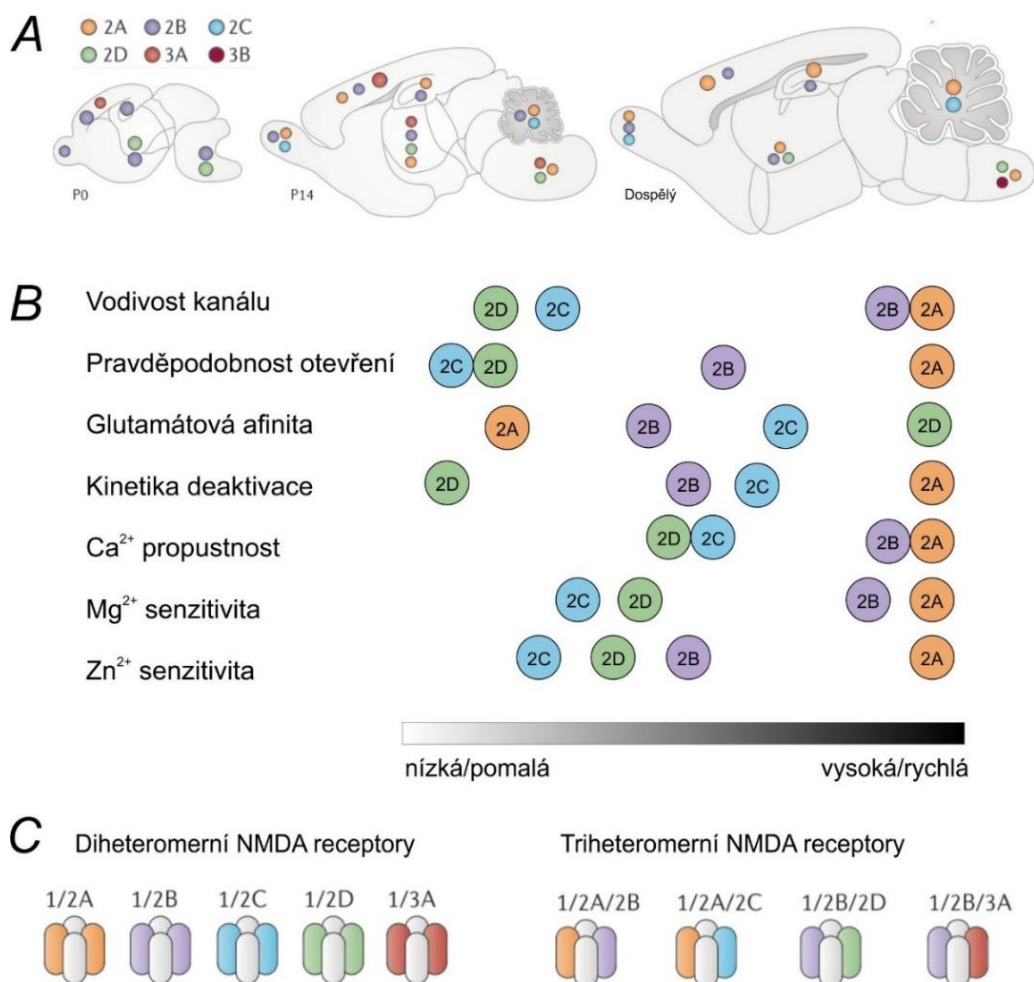
podjednotky se výrazně liší aminokyselinou sekvencí i délkou (Obrázek 2.2B). CTD NMDA receptorů obsahuje mnoho regulačních a posttranslačních míst, která ovlivňují synaptickou plasticitu, určují lokalizaci a membránovou stabilizaci i biofyzikální vlastnosti NMDA receptorů. Doména CTD ale, podobně jako ATD, není zásadní pro funkci NMDA receptorů (Paoletti *et al.*, 2013; Hardingham, 2019; Warnet *et al.*, 2020).

2.2 Vlastnosti závislé na podjednotkovém složení NMDA receptorů

Kombinací podjednotek vzniká v různých částech centrální nervové soustavy mnoho diheteromerních či triheteromerních variant NMDA receptorů s odlišnými molekulárně farmakologickými vlastnostmi (Obrázek 2.3) (Kutsuwada *et al.*, 1992; Sucher *et al.*, 1995; Paoletti *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2018). Podjednotka GluN1 je součástí všech funkčních NMDA receptorů a je zodpovědná za transport a lokalizaci receptorů na povrch neuronu. Jednotlivé podjednotky GluN2A–D a GluN3A–B tvořící spolu s GluN1 heterotetramer určují biofyzikální vlastnosti receptoru, jako například rozdílnou afinitu k agonistům, pravděpodobnost otevření, propustnost pro ionty i kinetiku deaktivace, čímž ovlivňují chování NMDA receptorů a následnou signalizaci (Iacobucci a Popescu, 2017; Hansen *et al.*, 2018).

Exprese GluN2 a GluN3 podjednotek je specifická pro různá vývojová období i oblasti v mozku (Obrázek 2.3) (Akazawa *et al.*, 1994; Monyer *et al.*, 1994; Pachernegg *et al.*, 2012). Podjednotky GluN2A a GluN2B jsou hojně exprimované v mozkové kůře a hipokampu a hrají zásadní roli v synaptické plasticitě, v procesu učení a paměti. GluN2B je převládající podjednotkou během embryonálního vývoje, kdy je zásadní pro vývoj mozku a tvorbu synapsí. Význam GluN2B podjednotky dokládá i to, že knock-out genu *GRIN2B* je letální (Kutsuwada *et al.*, 1996). Během prvních dvou týdnů po narození dochází k takzvanému GluN2B-GluN2A přesmyku, kdy se dominantní podjednotkou stane GluN2A. Rozdílná je i lokalizace v rámci neuronu – v dospělosti je na synapsích dominantní exprese diheteromerních GluN1/GluN2A a triheteromerních GluN1/GluN2A/GluN2B receptorů. Naopak v extrasynaptické oblasti převládají receptory s podjednotkou GluN2B (Hardingham a Bading, 2010). NMDA receptory obsahující GluN2B vykazují na povrchové membráně neuronů vyšší mobilitu než GluN2A a v synapsích jsou lokalizovány po kratší dobu (Groc *et al.*, 2006). Podjednotka GluN2C je nejvíce zastoupena v mozečku a GluN2D ve středním mozku, obě podjednotky vykazují nízkou vodivost a pravděpodobnost otevření iontového kanálu (Obrázek 2.3) (Paoletti

et al., 2013; Sanz-Clemente *et al.*, 2013). O podjednotkách GluN3 je známo zatím nejméně informací. GluN3A podjednotka je nejvíce exprimována brzy po narození, poté její exprese opět klesá. GluN3A tak pravděpodobně hraje důležitou roli během synaptogeneze a dozrávání synapsí. GluN3B se vyskytuje i v dospělém mozku, především v mozkovém kmeni a míše (Pachernegg *et al.*, 2012). Receptory GluN1/GluN3 jsou aktivovány pouze glycinem (Chatterton *et al.*, 2002) a odlišují se i velmi nízkou propustností pro Ca^{2+} (Nakanishi *et al.*, 2009).



Obrázek 2.3 Jednotlivé podjednotky NMDA receptorů mají různou expresi i biofyzikální vlastnosti, čímž ovlivňují signalizaci prostřednictvím NMDA receptorů. **A)** Obrázek myšího mozku shrnuje změny v expresi jednotlivých podjednotek během vývoje – od narození (P0), dva týdny po narození (P14) a v dospělosti. **B)** Jednotlivé podjednotky se liší funkčními biofyzikálními vlastnostmi a jejich kombinací vznikají NMDA receptory s rozdílnou signalizací. **C)** Funkční NMDA receptory se v mozku vyskytují jako di- či triheteromery vždy obsahující dvě GluN1 podjednotky a dvě GluN2 či/a GluN3 podjednotky (upraveno z Paoletti *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2020).

2.3 Fyziologie NMDA receptorů

NMDA receptory se od ostatních ionotropních glutamátových receptorů odlišují několika vlastnostmi a budou více popsány v následujících kapitolách: 1) iontový kanál je propustný pro Ca^{2+} , které mají intracelulárně významnou signalizační úlohu; 2) pro aktivaci je potřeba kromě agonisty glutamátu i koagonista glycin či D-serin; 3) iontový kanál je napětově-závislým způsobem blokován Mg^{2+} ; 4) oproti AMPA/kainátovým receptorům s rychlejší kinetikou se podílí na pomalé komponentě excitačního postsynaptického potenciálu; 5) interagují s řadou endogenních i exogenních látek, které modulují jejich aktivitu 6) mají dlouhou intracelulární část, která zprostředkovává další signalizaci (Traynelis *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2018).

2.3.1 Kinetické schéma aktivace NMDA receptorů

NMDA receptor po vazbě agonistů prochází několika konformačními stavy, které ve výsledku vedou k otevření iontového kanálu. Tento přechod lze popsat pomocí zjednodušeného kinetického schématu aktivace GluN1/GluN2 receptoru (Obrázek 2.4) (Lester a Jahr, 1992). Schéma bere v potaz pouze vazbu agonisty glutamátu, protože agonisté glycinového místa se v centrální nervové soustavě vyskytují ve stabilní koncentraci dostatečné pro aktivaci NMDA receptoru (koncentrace glycinu v mozkomíšním moku je $4,2 \pm 1,6 \mu\text{M}$ (Iijima *et al.*, 1978), EC_{50} glycinu pro aktivaci GluN1/GluN2 je pro jednotlivé podjednotky v rozmezí od 0,13 do 1,31 μM (Chen *et al.*, 2008). Na NMDA receptor (R) se tak postupně váže nejdříve první molekula agonisty glutamátu (RA) a poté druhá (RAA). Ze stavu RAA může receptor přejít do otevřeného (O), desenzitizovaného (D) či inaktivovaného (I) stavu. Přechod mezi jednotlivými stavy je dán rychlostními konstantami (k) a koncentrací agonisty $[A]$. Z rychlostních konstant otvírání (k_o) a zavírání (k_z) se určuje pravděpodobnost otevření (P_o) iontového kanálu podle rovnice $P_o = k_o/(k_o + k_z)$, která udává rovnovážný poměr receptorů v otevřeném stavu (O) a stavu (RAA) v přítomnosti saturující koncentrace agonisty. Hodnota P_o závisí na mnoha faktorech, například na pH, koncentraci Ca^{2+} či na podjednotkovém složení NMDA receptorů, kdy pro GluN1/GluN2A je P_o přibližně 40 %, pro GluN1/GluN2B kolem 10 % a pro GluN1/GluN2C–D pouze 1–2 % (Vyklícký *et al.*, 1990; Traynelis *et al.*, 2010; Maki a Popescu, 2014).

Zjednodušené kinetické schéma na obrázku 2.4 popisuje kinetiku aktivace NMDA receptoru při elektrofyziologickém snímání metodou terčíkového zámku v konfiguraci snímání z celé buňky (whole-cell patch clamp). Při detailnějším snímání na úrovni jednotlivých kanálů (single-channel recordings) je ale toto schéma nedostatečné, protože při analýze záznamů ze snímání na úrovni jednotlivých kanálů, lze mezi konformačním stavem RAA a O rozlišit několik různých stavů zavření a otevření (Banke a Traynelis, 2003; Popescu a Auerbach, 2003; Amico-Ruvio a Popescu, 2010).

2.3.2 Synaptická aktivace NMDA receptorů a Ca^{2+} signalizace

Během synaptického přenosu dochází k fazickému uvolnění glutamátu z presynaptických zakončení neuronů, které vyvolá krátkodobé (~ 1 ms) zvýšení koncentrace glutamátu až na koncentraci ~ 1 mM (Clements *et al.*, 1992; Bergles *et al.*, 1999). Přečasně zvýšená koncentrace glutamátu vede k synaptické aktivaci NMDA receptoru a otevření s ním spřaženého iontového kanálu, což umožní vstup Na^+ a Ca^{2+} do buňky (Mayer a Westbrook, 1987). Synaptická aktivace NMDA receptorů je klíčová pro synaptogenezi, synaptickou plasticitu, učení a paměť (Malenka, 1999, Lynch, 2004). Za fyziologických podmínek je extracelulární koncentrace glutamátu po přechodném a krátkodobém zvýšení udržována v nízkých koncentracích (od 25 nM až po 1–4 μM) především prostřednictvím zpětnovazebného vychytávání (Herman a Jahr, 2007; Herman *et al.*, 2011).

Synaptická aktivace NMDA receptorů se podílí na dlouhodobé potenciaci (LTP – long term potentiation) i dlouhodobé depresi (LTD – long term depression), které posilují, respektive oslabují, synaptický přenos (Malenka a Bear, 2004). Vysokofrekvenční stimulace NMDA receptorů a s tím související zvýšený vtok Ca^{2+} do buňky vede k LTP, naopak nízkofrekvenční aktivace NMDA receptorů vede k LTD (Luscher a Malenka, 2012). Vyšší koncentrace Ca^{2+} aktivuje calmodulin-závislou kinázu CAMKII (Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinase II), která mj. fosforyluje AMPA receptory. Fosforylované GluA1 AMPA receptory se přesouvají do synapsí, kde posilují synaptický přenos (LTP). Naopak nižší koncentrace Ca^{2+} při nízkofrekvenční aktivaci NMDA receptorů aktivuje fosfatázu calcineurin, která dále aktivuje protein-fosfatázu 1 (PP1 – protein phosphatase 1), a naopak signalizují snížení počtu synaptických AMPA receptorů, čímž dochází k LTD (Lynch, 2004; Malenka a Bear, 2004; Bayer a Schulman, 2019).

Ca^{2+} vstupující do buňky otevřeným iontovým kanálem NMDA receptoru se kromě LTP a LTD podílí i na řadě dalších signalizačních kaskád, které podporují proliferaci a přežívání buněk (Papadia *et al.*, 2008). Za patologických podmínek nadměrná aktivace NMDA receptorů a s ní související zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} spouští signální dráhy vedoucí k excitotoxicitě (viz kapitola 2.4) (Hardingham a Bading, 2010). Podobně jako extracelulární koncentrace glutamátu je i intracelulární koncentrace Ca^{2+} po přechodném zvýšení udržována za fyziologických podmínek na nízké koncentraci (~100 nM), a to především zpětným transportem přes plasmatickou membránu a činností mitochondrií a endoplasmatického retikula (Clapham, 2007). Vstup Ca^{2+} přes NMDA receptory je také zpětnovazebně regulován mechanismy snižujícími aktivitu NMDA receptorů (Clark *et al.*, 1990; Rosenmund a Westbrook, 1993; Vyklícky, 1993), mezi které patří například již dříve popsaná Ca-inaktivace.

V Ca^{2+} signalizaci prostřednictvím NMDA receptorů hraje významnou roli intracelulární CTD, která je nejvíce variabilní a pro jednotlivé podjednotky se liší délkou i aminokyselinovou sekvencí. CTD NMDA receptoru je místem četných intracelulárních interakcí a posttranslačních modifikací, mezi které patří fosforylace, glykosylace, palmitoylace či ubiquitinace (Traynelis *et al.*, 2010; Lussier *et al.*, 2015). Tyto Ca-indukované intracelulární interakce a modifikace dále ovlivňují biofyzikální vlastnosti NMDA receptorů (jako například desenzitizaci, inaktivaci či sníženou pravděpodobnost otevření) (Iacobucci a Popescu, 2020), interakce s dalšími proteiny a signalizačními dráhami (Vieira *et al.*, 2020), ale i povrchovou expresi jednotlivých podtypů NMDA receptoru (Warnet *et al.*, 2020). Ta závisí mj. na laterální difuzi mezi synaptickou a extrasynaptickou membránou (membránová mobilita GluN1/GluN2B receptorů), endo- a exocytóze receptorů na povrch neuronu či na samotné intracelulární syntéze a vzniku funkčních NMDA receptorů především v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Mnoho z těchto signalizačních a regulačních procesů ale stále zůstává neobjasněno a není znám jejich přesný molekulární mechanismus (Traynelis *et al.*, 2010; Lussier *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2020, Warnet *et al.*, 2020).

2.4 Patologie NMDA receptorů

Signalizace pomocí NMDA receptorů je velmi přísně regulována, a i malá odchylka v aktivitě, expresi, lokalizaci a membránovém transportu NMDA receptorů může mít závažné patofyziologické důsledky. Nadměrná (hyper-) stejně jako nedostatečná (hypo-) funkce NMDA receptorů vede ke vzniku řady psychologických a neurologických onemocnění. V současnosti se intenzivně hledají pozitivní (potenciační) i negativní (inhibiční) modulátory, které by selektivně kompenzovaly patologické projevy bez vedlejších účinků na synaptickou aktivaci a signalizaci prostřednictvím NMDA receptorů (viz kapitola 2.5).

2.4.1 Nadměrná aktivita NMDA receptorů

Narušení glutamátové homeostázy vede ke zvýšení extracelulární koncentrace glutamátu, nadměrné aktivaci NMDA receptorů a s tím souvisejícímu nadměrnému vstupu Ca^{2+} do buňky, což může vést až k excitotoxické buněčné smrti doprovázející patologické stavy jako například mozkovou mrtvici či traumatické poškození mozku (Choi 1987; Choi, 1992). Zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} dlouhodobou (tonickou) aktivací či vlivem mutací nadměrnou aktivací NMDA receptorů může přispívat i ke vzniku chronických neurodegenerativních onemocnění jako Alzheimerova, Parkinsonova či Huntingtonova choroba (Hardingham a Bading, 2010; Warnet *et al.*, 2020). S rozvojem sekvenačních metod dochází k popisu dalších *de novo* mutací v genech *GRIN*, které vedou ke zvýšení aktivity NMDA receptorů (takzvané gain of function mutations). Tyto mutace se nacházejí především v LBD a TMD GluN2A a GluN2B podjednotek, kde ovlivňují kinetické parametry receptoru (například zvyšují citlivosti k agonistům, snižují blokádu iontového kanálu Mg^{2+} či snižují inhibici extracelulárními protony) (XiangWei *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2021). Tabulka 2.1 shrnuje nejčastější onemocnění spojovaná s hyperfunkcí NMDA receptorů i možná terapeutická řešení.

Tabulka 2.1 Patologické stavy způsobené nadměrnou aktivitou NMDA receptorů.

Onemocnění	Narušení signalizace	Terapeutické řešení
Mozková mrtvice a traumatické poškození mozku	Nadměrná aktivace především extrasynaptických NMDA receptorů zvýšenou hladinou glutamátu – excitotoxicita.	Selektivní antagonisté GluN1/GluN2B či peptidy narušující interakci CTD GluN2B s nNOS (viz text)
Alzheimerova choroba	Aktivace GluN1/GluN2B receptorů podporuje vznik beta-amyloid plaků, což vede k narušení synaptického přenosu, excitotoxicitě a zániku synapsí.	Obecný antagonist NMDA receptorů (memantin) či antagonist selektivní pro podjednotku GluN1/GluN2B.
Huntingtonova choroba	Aktivace extrasynaptických GluN1/GluN2B receptorů vede k excitotoxicitě vyvolané mutovaným proteinem.	Obecný antagonist NMDA receptorů či selektivní pro GluN1/GluN2B podjednotku.
Parkinsonova choroba (dyskineze)	Nadměrná synaptická exprese GluN1/GluN2A a redistribuce GluN1/GluN2B receptorů ze synaptické do extrasynaptické lokalizace.	Selektivní antagonisté GluN1/GluN2B receptorů či selektivní GluN1/GluN2A modulátor.
Deprese	Inhibice NMDA receptorů (specificky GluN1/GluN2B) vede k rychlému (v řádu hodin) a dlouhotrvajícímu (v řádu dnů) snížení depresivních symptomů.	Antagonisté NMDA receptoru (ketamin) či selektivní antagonisté GluN1/GluN2B receptorů.
Bolest	Nadměrná exprese GluN1/GluN2B receptorů, pozměněná fosforylace GluN2B. Na patologii se ale mohou podílet i GluN1/GluN2A receptory.	Selektivní antagonisté GluN1/GluN2B receptorů.
Epilepsie a poruchy autistického spektra	Patologie vlivem mutací zahrnuje nadměrnou i nedostatečnou aktivitu NMDA receptorů – přesný mechanismus zatím není znám.	Pozitivní i negativní modulátory NMDA receptorů.

Upraveno z (Paoletti *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2019; Ge *et al.*, 2020; Viera *et al.*, 2021).

Pro vznik excitotoxické buněčné smrti není dostačující pouze vzestup intracelulární koncentrace Ca^{2+} , ale jsou zapojeny i další signální dráhy související s aktivitou NMDA receptorů. Zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} jinou cestou, například vstupem přes napěťové řízené Ca^{2+} kanály nebo uvolněním Ca^{2+} z intracelulárních zdrojů, působí méně excitotoxicky než nadměrná aktivace NMDA receptorů (Tymianski *et al.*; 1993; Szydlowska a Tymianski, 2010).

Dříve se předpokládalo, že na neuroprotektivní či neurotoxický typ Ca^{2+} signalizace má hlavní vliv lokalizace receptorů v rámci neuronu – kdy aktivace synaptických receptorů, tvořených převážně GluN1/GluN2A podjednotkami, se účastní drah podporujících proliferaci buňky tím, že dochází k aktivaci genové exprese transkripčního faktoru CAMP-response element-binding protein (CREB), který zvyšuje expresi brain derived neurotrophic factor (BDNF) a následně podporuje přežívání neuronů. Naopak aktivace extrasynaptických GluN1/GluN2B receptorů vede k excitotoxické buněčné smrti potlačením CREB aktivity a inhibicí exprese BDNF (Hardingham a Bading, 2010).

V současné době se ukazuje, že role extrasynaptických receptorů v excitotoxické smrti nervových buněk není tak jednoznačná a excitotoxický efekt zahrnuje aktivaci synaptických i extrasynaptických NMDA receptorů, přičemž rozsah buněčné smrti závisí na síle a trvání této koaktivace (Zhou *et al.*, 2013; Ge *et al.*, 2020). Přesný mechanismus zapojení NMDA receptorů v excitotoxické signalizaci není znám. Na excitotoxické signalizaci se může podílet: 1) typ podjednotky NMDA receptoru, kdy signalizace prostřednictvím GluN1/GluN2A receptorů je spojována s neuroprotektivní signalizací a naopak GluN1/GluN2B s neurotoxickou; 2) lokalizace receptorů v rámci neuronu, kdy aktivace extrasynaptických (převážně GluN1/GluN2B) spouští excitotoxické dráhy, a naopak aktivace synaptických receptorů (především GluN1/GluN2A) zprostředkovává neuroprotektivní a proliferační signalizaci; 3) záleží na intracelulární signalizaci, která je ovlivněna délkou a způsobem aktivace, kdy k excitotoxicitě vede nadměrná a dlouhodobá aktivace NMDA receptorů (Liu *et al.*, 2007; Hardingham a Bading, 2010; Parsons a Raymond, 2014; Ge *et al.*, 2020). Z toho vyplývá, že excitotoxická signalizace prostřednictvím NMDA receptorů je velmi komplexní a vzájemně provázaná. To potvrzují i dřívější snahy o klinické využití nedostatečně selektivních antagonistů NMDA receptorů, jejichž použití doprovázely závažné vedlejší účinky (Lipton, 1993). V klinické praxi se využívají zatím pouze dvě látky – anestetikum ketamin a memantin, jež

vykazuje preferenční působení na tonicky aktivované receptory oproti fazicky aktivovaným synaptickým receptorům (viz kapitola 2.5 a Parsons *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2010).

Jako možný neuroprotektivní přístup při mozkové mrtvici se intenzivně zkoumá narušení interakce Ca-dependentní neuronální syntázy oxidu dusnatého (nNOS) s GluN2B podjednotkou prostřednictvím postsynaptického proteinu 95 (PSD-95, postsynaptic density protein 95) (Sattler *et al.*, 1999; Ge *et al.*, 2020). V této souvislosti se studují kompetující peptidy NA-1, které znemožňují vazbu mezi nNOS a NMDA receptory, čímž zabraňují vzniku excitotoxicity. Neuroprotektivní účinky NA-1 při mozkových mrtvicích se již testují v rámci klinických studií (Ballarin a Tymiansky, 2018; Ge *et al.*, 2020). Oproti dříve pro léčbu mrtvice testovaným obecným antagonistům NMDA receptorů, které vykazují závažné vedlejší účinky či tlumí neuroprotektivní signalizaci (Muir, 2006), jsou do NA-1 vkládány veliké naděje. Podle prvních výsledků NA-1 neovlivňuje synaptickou funkci NMDA receptorů a ani nenarušuje neuroprotektivní a proliferační dráhy (Aarts *et al.*, 2002; Martel *et al.*, 2009). Je ale potřeba další výzkum, protože v jiné studii bylo popsáno snížení povrchové exprese GluN1/GluN2B receptorů po podání NA-1 (Milani *et al.*, 2017). Hledání látek s inhibičním působením, které by specificky působily pouze na patologicky aktivované NMDA receptory bez vlivu na excitační synaptický přenos, tak stále intenzivně pokračuje (viz kapitola 2.5).

2.4.2 Snížená aktivita NMDA receptorů

Nedostatečná aktivita NMDA receptorů je spojována s mentální retardací, poruchami učení a paměti, ale i poruchami autistického spektra či schizofrenie. Tabulka 2.2 shrnuje nejčastější onemocnění spojovaná s hypofunkcí NMDA receptorů i možná terapeutická řešení. S rozvojem sekvenačních metod v posledních letech byly u těchto pacientů popsány mutace v genech *GRIN* kódující podjednotky NMDA receptorů, kdy některé z nich přímo souvisí s hypofunkcí NMDA receptorů (Tarabeux *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2016; Vyklicky *et al.*, 2018; XiangWei *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2021). Nejvíce *de novo* mutací u pacientů s vývojovými a psychiatrickými onemocněními bylo identifikováno v genu *GRIN2B* kódujícím podjednotku GluN2B. *De novo* mutace v genech *GRIN2A* a *GRIN1* byly u nich méně časté. Překvapivě v genech *GRIN2C*, *GRIN3A* a *GRIN3B* byly popsány mutace vedoucí ke zkrácení podjednotek, které se vyskytovaly jak u pacientů, tak v kontrolní skupině (Tarabeux *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2014).

U pacientů byly mutace v genu *GRIN2B* nalezeny ve všech doménách: ATD, LBD, TMD i v CTD GluN2B podjednotky NMDA receptoru. V kontrolní skupině byly identifikovány vzácné *de novo* mutace v ATD a CTD, ale ne v LBD a TMD (Lek *et al.*, 2016), z čehož vyplývá, že mutace v LBD a TMD mohou mít významnější dopad na aktivitu NMDA receptoru a vést ke vzniku vývojových a psychiatrických onemocnění. Tuto hypotézu potvrzují výsledky funkčních charakterizací patientských mutací v LBD (Adams *et al.*, 2014; Lemke *et al.*, 2014; Swanger *et al.*, 2016) a TMD (Vyklícky *et al.*, 2018) podjednotky GluN2B, kdy například mutace v TMD vedou ke snížení pravděpodobnosti otevření iontového kanálu a snížené povrchové expresi mutovaných receptorů (Vyklícky *et al.*, 2018). Tuto hypofunkci mutovaných NMDA receptorů bylo možné kompenzovat aplikací neurosteroidů s potenciačním účinkem (Vyklícky *et al.*, 2018), což otvírá cestu k možné farmakologické kompenzaci nedostatečné aktivity NMDA receptorů (viz kapitola 2.5).

Tabulka 2.2 Patologické stavy způsobené nedostatečnou aktivitou NMDA receptorů.

Onemocnění	Narušení signalizace	Terapeutické řešení
Poruchy paměti a intelektu	Snížená exprese NMDA receptorů (specificky GluN1/GluN2B).	Pozitivní modulátory NMDA receptorů.
Schizofrenie	Snížená exprese či aktivita NMDA receptorů vedoucí k narušení neuronální aktivity.	Pozitivní modulátory NMDA receptorů (s preferencí pro GluN1/GluN2A).
Epilepsie a Poruchy autistického spektra	Patologie vlivem mutací zahrnuje jak nadměrnou, tak nedostatečnou aktivitu NMDA receptorů – přesný mechanismus zatím není znám.	Pozitivní i negativní modulátory NMDA receptorů.

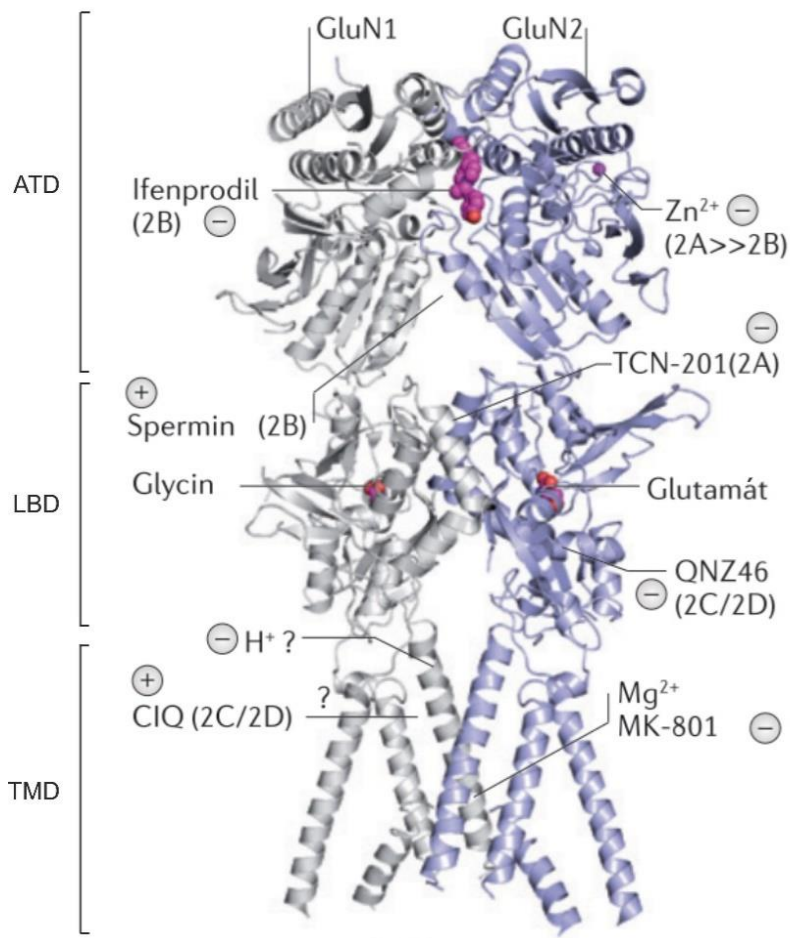
Upraveno z (Paoletti *et al.*, 2013; Warnet *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2021).

2.5 Farmakologie NMDA receptorů

Aktivita NMDA receptorů je modulována řadou endogenních i exogenních látek, které mohou mít pozitivní (potenciační) či negativní (inhibiční) účinky na NMDA receptory. Podle vazebného místa dále rozlišujeme látky vážící se do glycinového či glutamátového místa na LBD, látky vážící se do póru iontového kanálu a alosterické modulátory, jejichž vazebné místo se nachází v jiné části receptoru (Obrázek 2.5) (Dingledine *et al.*, 1999; Burnell *et al.*, 2018).

Nedostatečná nebo naopak nadměrná aktivita NMDA receptorů je spojována se vznikem řady patologických stavů (viz kapitola 2.4), proto se hledají potenciační či inhibiční modulátory NMDA receptorů. Jejich využití v klinické praxi je ale zatím limitované závažnými vedlejšími účinky a narušením fyziologické signalizace plynoucím především z jejich neselektivního působení (Burnell *et al.*, 2018). V posledních letech jsou vyvíjeny veliké snahy nalézt specifické modulátory NMDA receptorů, které by ovlivňovaly pouze patologické stavy bez vlivu na synaptický (fazický) přenos, který je nezbytný pro správné fungování centrální nervové soustavy. Snahy se zaměřují na nalezení modulátorů selektivních nejen pro NMDA receptory, ale i pro jednotlivé podjednotky NMDA receptorů či dokonce selektivní jen pro fazický či tonický typ aktivace NMDA receptorů, což by z nich dělalo vhodné kandidáty pro terapeutické využití při řešení patologických stavů nadměrné či nedostatečné aktivace NMDA receptorů. Pozornost je soustředěna především na hledání specifických modulátorů GluN2B podjednotek NMDA receptorů, protože se ukazuje jejich zásadní význam při excitačním synaptickém přenosu a zároveň se přímo podílí na vzniku řady patologických stavů. Výzkum se ale soustředí i na hledání selektivních modulátorů i dalších podjednotek – kvůli rozdílným biofyzikálním vlastnostem a rozdílné expresi jednotlivých podjednotek NMDA receptorů napříč mozkem i vývojovým obdobím by se pomocí specifických modulátorů mohlo dosáhnout terapeuticky úzce cílené léčby bez vedlejších účinků (Mony *et al.*, 2009; Ogden a Traynelis, 2011; Vyklicky *et al.*, 2016).

Studium látek s modulačním účinkem na NMDA receptory je kromě hledání vhodných kandidátů pro možné klinické využití významné i pro hlubší pochopení funkce a signalizace prostřednictvím těchto receptorů (Hansen *et al.*, 2018). Za využití selektivních modulátorů pro jednotlivé podjednotky či typy receptorů lze v experimentech rozlišit jejich zapojení v (pato)fyziologických procesech (Neyton a Paoletti, 2006; Papouin *et al.*, 2012).



Obrázek 2.5 Schéma naznačující místa působení různých pozitivních (+) a negativních (-) modulátorů NMDA receptorů. U selektivních modulátorů je v závorce uvedena preferenční podjednotka působení. Otazník značí nejistotu ohledně přesného místa působení. ATD: amino-terminální doména, LBD: ligand vázající doména, TMD: transmembránová doména. (Upraveno z Paoletti *et al.*, 2013).

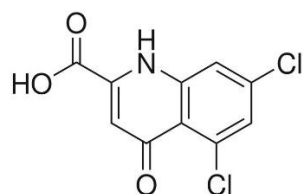
2.5.1 Agonisté

Agonisté jsou látky, které po vazbě do specifického místa na LBD vyvolají aktivaci receptoru. NMDA receptory složené z podjednotek GluN1/GluN2 k aktivaci potřebují navázání dvou molekul glutamátu a dvou molekul glycinu (Dingledine *et al.*, 1999). Do glutamátového vazebného místa v LBD na GluN2B podjednotce se může s klesající afinitou (rostoucí hodnoty

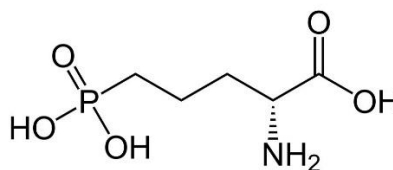
EC_{50} uvedeny v závorce) vázat: L-glutamát (2,9 μM), D-aspartát (10 μM), L-aspartát (14 μM), NMDA (30 μM), D-glutamát (156 μM) a řada dalších látek (Erreger *et al.*, 2007). Do glycinového místa na GluN1 podjednotce se váže (uvedené hodnoty EC_{50} pro GluN1/GluN2B): glycin (0,72 μM), D-serin (0,65 μM), D-alanin (0,89 μM), L-alanin (36 μM), L-serin (77 μM) (Chen *et al.*, 2008). Navzdory zažitému názvu „glycinové vazebné místo“, jako hlavní agonista synaptických NMDA receptorů byl popsán D-serin, zatímco glycin je agonistou extrasynaptických NMDA receptorů (Papouin *et al.*, 2012).

2.5.2 Kompetitivní antagonisté

Kompetitivní antagonisté NMDA receptoru se váží do stejného místa jako agonisté, ale jejich vazba nevyvolá aktivaci receptoru a zároveň brání vazbě agonistů. Typickým kompetitivním antagonistou glycinového místa na GluN1 podjednotce je derivát kyseliny kynurenové – 5,7-dichlorokynurenová kyselina (Obrázek 2.6) (McNamara *et al.*, 1990). Kompetitivním antagonistou glutamátu (vazebné místo na GluN2 podjednotce) je například D-2-amino-5-fosfovalerová kyselina (D-APV) (Obrázek 2.6) (Davies *et al.*, 1981), která vykazuje vysokou selektivitu pro NMDA receptory oproti AMPA a kainátovým receptorům, což v minulosti umožnilo experimentálně objasnit řadu biologických otázek ohledně zapojení NMDA receptorů v biologických procesech či při vzniku onemocnění (Morris *et al.*, 1986; Ogden a Traynelis, 2011). Selektivita D-APV pro jednotlivé podjednotky NMDA receptorů je ale malá – přibližně desetinásobný rozdíl v selektivitě mezi GluN2A a GluN2D (Feng *et al.*, 2005), což je obecný problém kompetitivních antagonistů, protože LBD jsou si mezi jednotlivými podjednotkami velmi podobné (Ogden a Traynelis, 2011). Pro působení kompetitivních antagonistů je dále charakteristické, že klesá jejich účinnost s rostoucí koncentrací agonisty. Počítačová simulace vlivu kompetitivního agonisty na fazickou a tonickou aktivaci NMDA receptorů ukázala, že fazicky aktivované receptory budou kompetitivním antagonistou inhibovány více než receptory aktivované tonicky (Vyklícky *et al.*, 2014).



5,7-dichlorokynurenová kyselina



D-APV

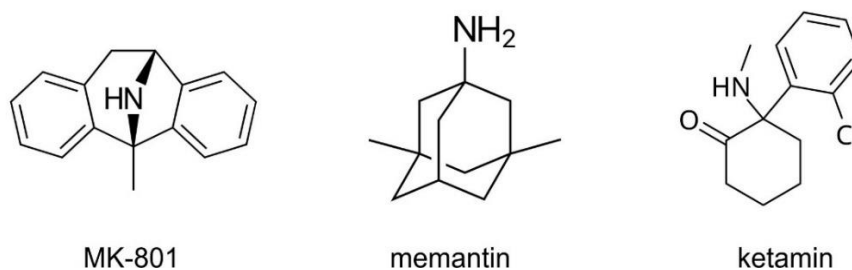
Obrázek 2.6 Struktury kompetitivních antagonistů NMDA receptorů: 5,7-dichlorokynurenová kyselina a D-2-amino-5-fosfovalerová kyselina (D-APV).

2.5.3 Blokátory otevřeného kanálu

Blokátory otevřeného kanálu jsou látky, které se váží přímo do póru iontového kanálu, kde brání průchodu iontů do buňky. Jsou napětově závislé a akompetitivní („use-dependentní“), to znamená, že se váží pouze na aktivovaný receptor. Dále rozlišujeme blokátory typu: „trapping“ – uvězněné v póru a „foot in the door“ – vázané v ústí póru, kde brání zavření. Blokátory otevřeného kanálu typu „trapping“ jsou menší a váží se hluboko v póru iontového kanálu, kde mohou zůstat „uvězněny“ i při zavření receptoru. Pro jejich odvázní je potřeba, aby byl receptor aktivován. Typickým příkladem „trapping“ blokátoru iontového kanálu jsou Mg^{2+} , již patří mezi fyziologicky nejdůležitější blokátory otevřeného kanálu a při klidovém membránovém potenciálu brání aktivaci NMDA receptorů. K uvolnění blokády Mg^{2+} (a tedy umožnění vtoku Na^+ a Ca^{2+} do buňky) dochází depolarizací membrány prostřednictvím aktivace AMPA receptorů (Dingledine *et al.*, 1999). Existuje ale i mnoho dalších syntetických blokátorů otevřeného kanálu NMDA receptoru, například ketamin, memantin, dizocilpin (MK-801) či fencyklidin (Obrázek 2.7) (Ogden a Traynelis, 2011). Blokátory „foot in the door“, například 9-aminoakridin, jsou větší a váží se v ústí póru, kdy fyzicky brání zavření iontového kanálu a odvázní agonistů, jejich odvázní je nezávislé na aktivaci receptoru (tzv. use-independentní) (Bolshakov *et al.*, 2003).

V počátku se o akompetitivních blokátorech otevřeného kanálu uvažovalo jako o nadějných neuroprotektivních látkách, které by mohly bránit nadměrné aktivaci NMDA receptorů během patologických stavů. Brzy se ale ukázalo, že blokátory typu fencyklidin či MK-801 mají vážné vedlejší neurotoxické a psychomimetické účinky (Lipton, 1993). Jediné blokátory, které našly

v klinické praxi využití, jsou anestetikum ketamin, které se začíná využívat i pro jeho antidepresivní účinky (Abdallah *et al.*, 2015), a memantin, jenž je schválený pro léčbu Alzheimerovy choroby (Parsons *et al.*, 2007). U memantinu bylo popsáno preferenční působení na tonicky aktivované extrasynaptické NMDA receptory než na synapticky aktivované receptory (přibližně dvojnásobný rozdíl v koncentraci steroidu, která inhibuje 50 % proudové odpovědi vyvolané agonistou (IC_{50}) pro synapticky a tonicky aktivované receptory (Xia *et al.*, 2010), v jiné studii byl ale popsán menší rozdíl (Emnett *et al.*, 2013)).



Obrázek 2.7 Struktury blokátorů otevřeného kanálu NMDA receptoru: dizocilpin (MK-801), memantin a ketamin.

2.5.4 Alosterické modulátory

Alosterické modulátory představují velkou skupinou endogenních a exogenních látek, které modulují NMDA receptory, ale jejich vazebné místo se nenachází ve vazebném místě pro glutamát či glycin, ani v póru iontového kanálu. Alosterické modulátory mohou mít na NMDA receptory pozitivní (potenciační), negativní (inhibiční) či kombinovaný efekt (Traynelis *et al.* 2010).

2.5.4.1 Pozitivní alosterické modulátory

Mezi alosterické modulátory s pozitivním (potenciačním) účinkem patří například polyaminy jako spermin a spermidin, tetrahydroisoquinoliny jako například 3-chlorofenyl-(6,7-dimethoxy-1-((4-metoxyfenoxy)methyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)methanon (CIQ) (Obrázek 2.8) či neurosteroidy odvozené od pregnenolon sulfátu (PES, 20-oxo-5 β -pregnen-3 α -yl sulfát) viz

kapitola 2.5.4.3. Endogenní polyamin spermin má na NMDA receptory tři typy účinku: selektivně potencuje GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptory glycin-závislým způsobem, kdy až trojnásobně zvyšuje afinitu receptorů ke glycinu (snižuje disociaci glycinu z vazebného místa na GluN1). Při nízkých koncentracích glycinu polyaminy potencují NMDA receptory více než při saturující koncentraci glycinu (Benveniste a Mayer, 1993; Mony *et al.*, 2009). Za druhé spermin může potencovat specificky pouze GluN1/GluN2B podjednotky na napětí a na glycinu nezávislou potenciací. To je dáno tím, že polyaminy snižují inhibici extracelulárními protony (viz kapitola 2.5.4.2) (Traynelis *et al.*, 1995). Do třetice spermin může způsobovat na napětí závislou inhibici, která je velmi podobná blokádě Mg^{2+} (Benveniste a Mayer 1993).

Dalším podjednotkově selektivním pozitivním alosterickým modulátorem je CIQ, který dvojnásobně potencuje odpovědi GluN1/GluN2C a GluN1/GluN2D receptorů. Zároveň CIQ nemá účinek na AMPA a kainátové receptory či GluN2A a GluN2B podjednotky NMDA receptorů. Potenciační účinek CIQ je způsoben zvýšením frekvence otevírání iontového kanálu a nemá vliv na afinitu receptorů ke glutamátu či glycinu (Mullasseril *et al.*, 2010).



Obrázek 2.8 Struktury pozitivních alosterických modulátorů NMDA receptorů: spermin a 3-chlorofenyl-(6,7-dimethoxy-1-((4-metoxyfenoxy)metyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)methanon (CIQ).

2.5.4.2 Negativní alosterické modulátory

Mezi alosterické modulátory s inhibičním účinkem patří například jedno a dvojmocné ionty, neurosteroidy odvozené od pregnanolon sulfátu (viz kapitola 2.5.4.3) a řada dalších synteticky připravených látek, které se liší svým mechanismem působení i podjednotkovou specificitou (Traynelis *et al.* 2010).

Extracelulární protony (H^+) jsou účinné nekompetitivní a na napětí nezávislé (tedy odlišné od blokátorů otevřeného iontového kanálu) inhibitory NMDA receptorů (Tang *et al.*, 1990; Traynelis a Cull-Candy, 1990; Vyklicky *et al.*, 1990). Z tohoto důvodu i mírná acidóza, která doprovází zvýšenou synaptickou aktivitu vedoucí ke glutamát-indukované neurotoxicitě během patologických stavů, tlumí aktivitu NMDA receptorů snížením pravděpodobnosti jejich otevření (Giffard *et al.*, 1990; Dingledine *et al.*, 1999). Citlivost ke změnám pH záleží na podjednotkovém složení NMDA receptorů: nejméně citlivé jsou GluN1/GluN2C receptory ($IC_{50} \sim pH\ 6.5$; Traynelis *et al.*, 1995). Pro GluN1/GluN2A byla stanovena $IC_{50} \sim pH\ 6.9$ (Low *et al.*, 2000). Naopak k protonům nejvíce citlivé jsou GluN1/GluN2B a GluN1/GluN2D receptory s $IC_{50} \sim pH\ 7.4$ (Traynelis *et al.*, 1995). Z čehož vyplývá, že za normálních podmínek je kolem poloviny GluN1/GluN2B receptorů tonicky inhibováno protony, a i malá změna v extracelulárním pH může mít vliv na aktivaci NMDA receptorů. Také bylo zjištěno, že hodnota extracelulárního pH ovlivňuje účinek i dalších modulátorů NMDA receptorů, jako například Zn^{2+} , polyaminů či neurosteroidů (Dingledine *et al.* 1999).

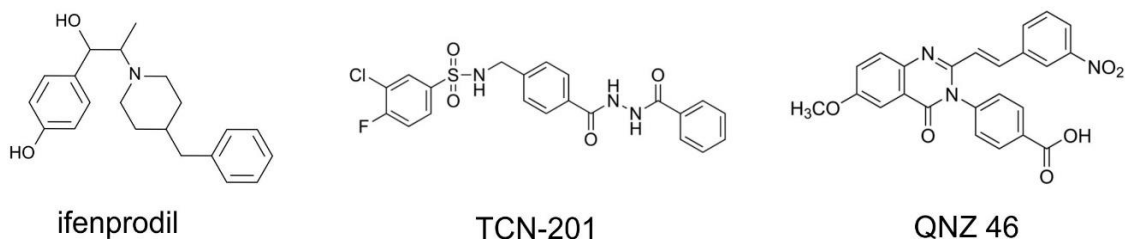
Zinečnaté kationty uvolňované během synaptického přenosu modulují aktivitu NMDA receptorů napěťově nezávislým způsobem. Zn^{2+} se s vysokou afinitou (IC_{50} v nanomolárních koncentracích) váží do ATD na GluN1/GluN2A receptorech (Mayer a Vyklicky, 1989; Paoletti *et al.*, 1997, Traynelis *et al.*, 1998), Na GluN1/GluN2B receptory působí až od nízkých mikromolárních koncentrací (Rachline *et al.*, 2005).

Nejlépe charakterizovanou látkou specificky rozpoznávající GluN2B podjednotku NMDA receptoru je ifenprodil (Obrázek 2.9) a jeho deriváty, například Ro25-6981, vážící se do ATD (Perin-Dureau *et al.*, 2002; Karakas *et al.*, 2011). Afinita ifenprodilu je až 400krát vyšší pro GluN2B ($IC_{50} = 0,34\ \mu M$) než pro GluN2A podjednotku ($IC_{50} = 146\ \mu M$) (Williams, 1993).

Selektivních účinků Zn^{2+} a ifenprodilu pro GluN2A a GluN2B podjednotky se často využívalo experimentálně (Papouin *et al.*, 2012). Přítomnost triheteromerních NMDA receptorů obsahujících GluN1/GluN2A/GluN2B ale komplikuje interpretaci dat, protože tyto receptory váží Zn^{2+} i ifenprodil s vysokou afinitou, ale výsledná inhibice je slabá ($\sim 20\ %$). Nízká senzitivita k ifenprodilu nemusí v experimentech znamenat jen nepřítomnost GluN2B podjednotek, ale může naznačovat přítomnost triheteromerních NMDA receptorů (Hatton a Paoletti, 2005).

V posledních letech byla syntetizována řada dalších alosterických modulátorů selektivních pro jednotlivé podjednotky NMDA receptorů. Například TCN-201 (3-chloro-4-fluoro-N-[(4-[(2-(fenylcarbonyl)hydrazino)-carbonyl]fenyl)metyl]-benzensulfonamid) (Obrázek 2.9) vykazuje vysokou selektivitu pro GluN1/GluN2A (Bettini *et al.*, 2010), kdy se váže na rozhraní LBD GluN1 a GluN2A a působí jako negativní alosterický modulátor vazby glycinu (Hansen *et al.*, 2012).

Pro GluN2C a GluN2B byl identifikován selektivní inhibitor QNZ46 ((*E*)-4-(6-metoxy-2-(3-nitrostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)-benzoová kyselina) (Obrázek 2.9), jenž má přibližně padesátinásobný rozdíl v účinku na GluN2C a GluN2D ($IC_{50} = 6$ a $3 \mu\text{M}$) oproti GluN2A a GluN2B ($IC_{50} = 229$ a $>300 \mu\text{M}$) podjednotkám (Mosley *et al.*, 2010). Vykazuje ale netypické akompetitivní („use-dependentní“) působení, kdy se jeho inhibiční účinek zvyšuje (až dvacetkrát nižší IC_{50}) po vazbě glutamátu (ale ne glycinu), což značí že vazebné místo pro QNZ46 je přístupné až po vazbě glutamátu Hansen a Traynelis, 2011).



Obrázek 2.9 Struktury inhibičních alosterických modulátorů NMDA receptorů: ifenprodil, 3-chloro-4-fluoro-N-[(4-[(2-(fenylcarbonyl)hydrazino)-carbonyl]fenyl)metyl]-benzensulfonamid (TCN-201) a (*E*)-4-(6-metoxy-2-(3-nitrostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)-benzoová kyselina (QNZ46).

2.5.4.3 Neurosteroidy – pozitivní a negativní alosterické modulátory

Neurosteroidy jsou skupinou přirozeně se vyskytujících steroidů syntetizovaných *de novo* v centrální nervové soustavě s účinkem na řadu ligandem-řízených receptorů, například GABA, glycinových, nikotinových, acetylcholinových a glutamátových receptorů (Baulieu, 1998; Sedlacek *et al.*, 2008). V závislosti na struktuře mohou mít neurosteroidy potenciační (pozitivní) nebo inhibiční (negativní) efekt. Pregnenolon sulfát (PES, 20-oxo-5 β -pregnen-3 α -yl sulfát) je zástupcem přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu s převládajícím potenciačním účinkem na NMDA receptory, naopak pregnanolon sulfát (PAS, 20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl sulfát) lišící se

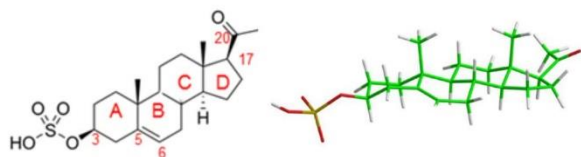
pouze chybějící dvojnou vazbou mezi uhlíky C5 a C6 steroidního jádra má na NMDA receptory inhibiční účinky (Obrázek 2.10) (Korinek *et al.*, 2011). Tento rozdílný účinek neurosteroidů PAS a PES je dán výsledným prostorovým tvarem molekuly – chybějící dvojná vazba v molekule PAS „ohne“ molekulu, čímž umožní vazbu do inhibičního vazebného místa na NMDA receptoru. Naopak molekula PES je díky dvojně vazbě více planární (Irwin *et al.*, 1994; Park-Chung *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2000).

Neurosteroid PES má na NMDA receptory kombinovaný potenciačně-inhibiční efekt, který je podjednotkově specifický – PAS potencuje čtyřnásobně podjednotky GluN2A a GluN2B, zatímco podjednotky GluN2 a GluN2D pouze jeden a půl násobně (Horak *et al.*, 2004). PES tak má ve výsledku na podjednotky GluN2A a GluN2B potenciační účinek, ale na podjednotky GluN2C a GluN2D inhibiční, což je mj. výsledkem rozdílné afinity PES k inhibičním a potenciačním vazebným místům na jednotlivých podjednotkách NMDA receptorů (Wu *et al.*, 1991; Horak *et al.*, 2004; Horak *et al.*, 2006).

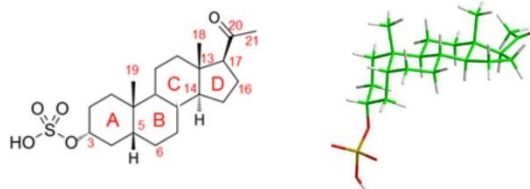
Potenciační účinek PES závisí na fosforylaci NMDA receptoru (Petrovic *et al.*, 2009) a je dán zvýšením pravděpodobnosti otevření (P_o) iontového kanálu a tzv. disuse-dependentním mechanismem účinku, kdy má PES vyšší afinitu pro receptory v klidovém stavu než pro již aktivované (Horak *et al.*, 2004). Potenciační účinek PES je také závislý na koncentraci glutamátu, kdy při saturující koncentraci glutamátu má PES na NMDA receptory nižší účinek. Tyto vlastnosti by mohly být výhodné pro terapeutické využití, kdy by účinek potenciačních neurosteroidů klesal v závislosti na kompenzaci hypofunkce NMDA receptorů, čímž by nedocházelo k nadměrné aktivaci NMDA receptorů. U PES byl po *in vivo* podání popsán efekt na zlepšení paměti (Flood *et al.*, 1992).

Neurosteroid PAS inhibuje všechny podjednotky NMDA receptorů. Inhibiční účinek PAS má pomalý nástup účinku, je napětově nezávislý a akompetitivní („use-dependentní“), to znamená, že se váže pouze na aktivovaný receptor. Odvazování PAS z receptoru je naopak use-independentní (bez nutnosti aktivace receptoru). Tím je předurčeno preferenční působení PAS na tonicky aktivované NMDA receptory oproti receptorům aktivovaným fazicky (Petrovic *et al.*, 2005; Vyklícky *et al.*, 2016).

PES pregnenolon sulfát



PAS pregnanolon sulfát



Obrázek 2.10 Struktury přirozeně se vyskytujících se neurosteroidů. Pregnenolon sulfát (PES) s potenciačním účinkem na NMDA receptory se od inhibičního pregnanolon sulfátu (PAS) liší pouze jednou dvojnou vazbou mezi uhlíky C5 a C6 steroidního jádra. Prostorové struktury převzaty z (Korinek *et al.*, 2011).

Studie vztahu mezi strukturou a aktivitou neurosteroidů na NMDA receptory (SAR, Structure-Activity Relationship) přispívají k pochopení funkce NMDA receptoru. Studie SAR také systematicky objasňují mechanismus působení jednotlivých strukturních analogů neurosteroidů na NMDA receptory, a na základě získaných výsledků lze zpětně pozměnit strukturu neurosteroidů pro nalezení účinnějších a specifických modulátorů NMDA receptorů.

Z dřívějších SAR studií tak víme, že pro potenciační účinek neurosteroidů na NMDA receptory je důležitá 3β -stereochemie negativně nabitého substituentu na uhlíku C3 a dvojná vazba mezi C5 a C6 steroidního jádra (Obrázek 2.10) (Park-Chung *et al.*, 1997). Vliv dalších strukturních modifikací na účinek potenciačních neurosteroidů není znám. Naopak o vlivu strukturních modifikací na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory je známo mnohem více; pro inhibiční působení je důležitá α -stereochemie na C3 a β -stereochemie na C5, která „ohne“ steroidní jádro. Dále zbytek na C3 musí nést negativní, pozitivní či obojetný náboj, protože neurosteroid s C3 substituentem bez náboje nemá na NMDA receptory modulační účinek ((Irwin *et al.*, 1994; Park-Chung *et al.*, 1997; Borovska *et al.*, 2012; Weaver *et al.*, 2000). Modifikace steroidního D-kruhu na C17 výrazně zlepšily inhibiční účinky strukturních analogů PAS (Kudová *et al.*, 2015). Míra inhibice neurosteroidů závisí na koncentraci glutamátu – při vyšší koncentraci glutamátu dochází i k vyšší inhibici (Vyklícky *et al.*, 2014).

Syntetický strukturní analog PAS – pregnanolon glutamát (PAG) má *in vivo* testech neuroprotektivní účinky – nezpůsobuje vedlejší psychomimetické symptomy a snižuje excitotoxické poškození mozku (Rambousek *et al.*, 2011), v behaviorální testech má

anxiolytické a antidepressivní účinky (Holubova *et al.*, 2014) a u modelu fokální cerebrální ischemie vykazuje neuroprotektivní účinky (Kleteckova *et al.*, 2014). Oproti PAS je ale PAG dvakrát méně účinný inhibitor NMDA receptorů (Borovska *et al.*, 2012).

Další ze syntetických neurosteroidů pregnanolon hemipimelát (PAhPim) – s hemiesterovým zbytkem na C3, je účinným inhibítoem tonicky aktivovaných NMDA receptorů bez vlivu na fazicky aktivované receptory. V *in vivo* behaviorálních testech vykazoval PAhPim neuroprotektivní účinky bez vedlejších psychomimetických účinků (Vyklícky *et al.*, 2016). Pro terapeutické využití ale může být problematické připojení C3-zbytku esterovou vazbou, která v organismu může být hydrolyzována prostřednictvím esteráz, proto je důležité nalézt strukturní modifikace, které by vykazovaly větší stabilitu v organismu.

3 CÍLE PRÁCE

3.1 Vztah mezi strukturou inhibičních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

Hypotéza:

Aktivace NMDA receptorů je zásadní pro excitační synaptický přenos a synaptickou plasticitu. Jejich nadměrná aktivace ale vede k excitotoxické buněčné smrti a patologickým stavům (Dingledine *et al.*, 1999). Proto se hledají způsoby, jak selektivně inhibovat nadměrnou aktivaci NMDA receptorů při zachování excitačního přenosu. Jedním ze způsobů jsou inhibiční neurosteroidy odvozené od PAS, kdy některé strukturální modifikace výrazně zlepšují jejich účinky ((Irwin *et al.*, 1994; Park-Chung *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2000). Například modifikace D-kruhu výrazně zvyšují inhibiční účinek (Kudova *et al.*, 2015). Nevíme ale, jaký je význam samotného D-kruhu, zda je nutný pro inhibiční působení, či zda by jeho další strukturální modifikace nevedly ke zvýšení účinku či selektivity působení. Jiné strukturální analogy PAS, například pregnanolon glutamát (PAG) vykazuje neuroprotektivní účinky *in vivo* (Rambousek *et al.*, 2011); pregnanolon hemipimelát (PAhPim) s hemisterovým zbytkem na C3 preferenčně inhibuje tonicky aktivované receptory bez vlivu na fazicky aktivované receptory a v behaviorálních testech vykazoval neuroprotektivní účinky bez vedlejších psychomimetických účinků (Vyklícky *et al.*, 2016). PAG je ale dvakrát horší inhibitor než PAS a u PAhPim hrozí v organismu hydrolýza esterové vazby, proto je nutné hledat a charakterizovat další strukturální modifikace. Náhrada C3-esterové vazby amidovou by mohla zvýšit rozpustnost a biologickou stabilitu při zachování inhibičního účinku a při vhodné kombinaci substituentů by mohlo dojít i ke zvýšení inhibičního působení.

Cíl:

Cílem práce bylo pomocí elektrofyziologických měření objasnit vliv strukturálních modifikací na C3 a chybějícího D-kruhu steroidního jádra u strukturálních analogů odvozených od PAS na inhibiční působení na NMDA receptory za účelem hledání účinnějších, selektivních a biologicky stabilních inhibitorů NMDA receptorů, které by mohly nalézt terapeutické uplatnění.

3.2 Vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

Hypotéza:

Stejně jako nadměrná aktivace i hypofunkce NMDA receptorů vede k řadě patologických stavů. Zástupcem přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu s potenciačním účinkem je PES, u něhož byl po *in vivo* podání popsán efekt na zlepšení paměti (Flood *et al.*, 1992), jeho účinek ale není příliš vysoký. Účinnější strukturní analogy PES by mohly nalézt terapeutické využití při kompenzaci nedostatečné aktivity NMDA receptorů. Pro potenciační účinek neurosteroidů je důležitý záporně nabitý substituent v β -stereochemii na C3 a dvojná vazba mezi C5 a C6 steroidního jádra (Park-Chung *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2000). Více informací o vztahu mezi strukturou a účinkem potenciačních neurosteroidů ale chybí. Nevíme, zda podobně jako u analogů PAS existuje závislost mezi délkou substituentu na C3 a různými modifikacemi na C17 steroidního kruhu či zda je některá část zásadní pro zachování potenciačního účinku.

Cíl:

Cílem práce bylo pomocí elektrofyziologických měření objasnit vliv strukturních modifikací na C3 a C17 steroidního jádra na účinek strukturních analogů odvozených od PES na NMDA receptory s cílem objasnit význam modifikací ve vztahu k účinku a nalézt strukturní determinanty zlepšující účinek potenciačních neurosteroidů pro možné terapeutické uplatnění.

3.3 Vliv Ca^{2+} na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory

Hypotéza:

V našich SAR experimentech byl pozorován rozdílný efekt inhibičního působení neurosteroidů na NMDA receptory (pro 50 μM PAS se míra inhibice GluN1/GluN2B lišila od 37 až do 74 %), často i při opakované aplikaci na jedné buňce, což vedlo k myšlence, že citlivost NMDA receptorů k neurosteroidům může být ovlivněna vnitřními mechanismy. Jelikož po aktivaci NMDA receptorů dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} , které mají významnou signalizační a regulační úlohu, je možné, že Ca^{2+} ovlivňují i modulační účinek neurosteroidů na NMDA receptory.

Cíl:

Cílem práce bylo pomocí elektrofyziologických, optických, farmakologických a molekulárně biologických metod objasnit vliv Ca^{2+} na modulační účinek neurosteroidů na NMDA receptory.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie a roztoky

Pro všechny experimenty byla používána deionizovaná voda, která byla dále pročištěna přístrojem Simplicity 185 (Merck Millipore, Darmstadt, Německo) na konečnou hodnotu rezistivity 18,2 M Ω x cm. Pokud není uvedeno jinak, ostatní chemikálie byly pořízeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louise, USA).

LB médium

LB médium pro kultivaci bakterií bylo připraveno smícháním 1% pepton, 0,5% kvasničný extrakt (obojí Serva, Heidelberg, Německo) a 1% NaCl a poté sterilizováno 20 min při 121 °C.

Agarové plotny

Pro přípravu agarových ploten bylo ve vodě rozpuštěno 40 g/l Nutrient agar N°2 (Biolife, Miláno, Itálie). Roztok agaru byl sterilizován (15 min, 121 °C) a následně ochlazen na 50 °C. Těsně před nalitím do Petriho misek bylo do agaru přidáno antibiotikum pro selekci transformovaných bakterií.

PBS – solný fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)

PBS bylo připraveno jako roztok obsahující 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 4,3 mM Na₂HPO₄. pH bylo upraveno pomocí 1M NaOH na hodnotu 7,3.

Roztok versene-trypsin

Versenův roztok obsahoval 0,2% trypsin a 0,02% kyselinu ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraoctovou (EDTA) rozpuštěnou v PBS. pH bylo upraveno na hodnotu 7,3.

Médium pro transfekci

Do kultivačního média Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bylo přidáno: 1% fetální bovinní sérum (PANBiotech, Aidenbach, Německo), 1 mM D,L-2-amino-5-fosfovalerová kyselina, 3 mM kynurenová kyselina, 4,2 μ M ketamin a 20 mM MgCl₂.

MEM médium

Neuronální minimální esenciální médium (MEM) obsahovalo: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ a bylo doplněno o MEM aminokyseliny, MEM vitamíny (Gibco), 10 mM glukózu a 30 μM glycin.

Roztoky pro elektrofyziologická měření

Následující roztoky byly připraveny dle daného složení a poté přefiltrovány 0,22 μm filtrem (Merck Millipore, Darmstadt, Německo). Jednotlivé roztoky byly uchovávány v alikvotech při -20 °C.

Intracelulární roztok (ICS)

Intracelulární roztok obsahoval 125 mM roztok Cs-glukonátu, 15 mM CsCl, 5 mM ethylenglykol-bis(2-aminoethyl ether)- N,N,N',N'-tetraoctovou kyselinu (EGTA), 10 mM kyselinu N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonovou (HEPES), 3 mM MgCl₂, 500 μM CaCl₂ a 2 mM ATP-Mg²⁺. Hodnota pH = 7,2 byla upravena s pomocí 50% CsOH. U roztoku byla kontrolována jeho osmolarita, která se pohybovala kolem 290 mOsm/l.

Extracelulární promývací (hořečnatý) roztok (ECS-Mg²⁺)

Roztok ECS-Mg²⁺ obsahoval 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM glukózu, a 10 mM HEPES. Jeho pH bylo upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnotu 7,3. Dále byla zkontrolována osmolarita roztoku, která se pohybovala kolem 320 mOsm/l.

Extracelulární aplikační (bezhořečnatý) roztok (ECS)

Roztok ECS 0,2 mM Ca obsahoval 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 300 μM CaCl₂, 100 μM EDTA, 10 mM glukózu a 10 mM HEPES a pH bylo upraveno pomocí 1M NaOH na hodnotu 7,3. Výsledný roztok měl osmolaritu kolem 320 mOsm/l. Pro snímání z lidských embryonálních ledvinových buněk HEK293 (HEK293) bylo před pokusem do roztoku přidáno požadované množství glycinu a glutamátu (10 μM a 1 μM, pokud není uvedeno jinak). Aplikační roztok pro Ca-stimulaci obsahoval 1 mM Glu v ECS, do kterého bylo přidáno CaCl₂ do finální koncentrace 2 mM Ca²⁺.

Extracelulární aplikační roztok pro snímání nativních NMDA receptorů v neuronálních kulturách navíc obsahoval 1 μM NMDA (či 100 μM při Ca-stimulaci) a 10 μM CNQX (antagonista AMPA/kainátových receptorů), 10 μM bicuculin (antagonista GABA receptorů), 0,5 μM tetrodotoxin (TTX, blokáce napěťově závislých sodíkových kanálů). ECS pro snímání nativních AMPA receptorů obsahoval 100 μM AMPA a 10 μM cyclothiazid (blokuje desenzitizaci AMPA receptorů), 50 μM D-APV (antagonista NMDA receptorů), 10 μM bicuculin a 0,5 μM TTX. ECS pro snímání nativních GABA receptorů obsahoval 5 μM GABA a 50 μM D-APV, 10 μM CNQX a 0,5 μM TTX.

Neurosteroidy

Všechny použité neurosteroidy byly syntetizovány na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR pod vedením dr. Evy Kudové. Pro elektrofyziologická měření byly steroidní látky rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), čímž byl připraven jejich (5–20 mM) zásobní roztok, který byl dále ředěn do aplikačních roztoků, přičemž všechny aplikační elektrofyziologické roztoky obsahovaly stejné množství DMSO (1 %).

Zásobní roztok Tunicamycinu byl připraven rozpuštěním jeho 10 mg v ml DMSO a byl skladován v lednici při 4 °C. Buňky HEK293 byly inkubovány s Tunicamycinem ve finální koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ (1,2 μM) v kultivačním médiu bez séra při 37 °C 1–2 h před elektrofyziologickým měřením.

4.2 cDNA klony

GluN1-1a (GenBank accession no. U08261) v pcDNA I/AMP vektoru.

GluN2A (GenBank accession no. D13211) v RK7 vektoru.

GluN2B (GenBank accession no. M91562) v RK7 vektoru. Tato podjednotka byla použita pro cílenou mutagenezi všech variant GluN2B podjednotky použitých v této práci.

GluN2C (GenBank accession no. M91563) v RK7 vektoru.

GluN2D (GenBank accession no. L31611) v RK7 vektoru.

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

4.3 Cílená mutageneze

Cílená mutageneze NMDA receptorů byla provedena pomocí QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Navržené primery byly syntetizovány u firmy Sigma-Aldrich (St. Louise, USA). Polymerázová řetězová reakce byla provedena podle příloženého návodu v Thermo-cycleru (Eppendorf, Hamburg, Německo). Templátová DNA byla po skončení reakce štěpena DpnI (1 h při 37 °C). Následně bylo 5 µl vzniklé směsi transformováno do ultrakompetentních bakterií *E. Coli* XL10-Gold za použití metody teplotního šoku (1 h inkubace směsi na ledu, 45 s při 42 °C a poté opět 2 min na ledu). Transformované bakterie a 0,5 ml LB média bez antibiotika byly inkubovány v třepačce (1 h, 37 °C, 200 rpm). Bakteriální směs byla poté nanášena na Petriho misky s agarem obsahujícím ampicilin (100 µg/ml) a ponechány přes noc v inkubátoru při 37 °C. Narostlé kolonie byly zaočkovány do 10 ml LB média s ampicilinem a byly inkubovány dalších 16–21 h při 37 °C a za stálého třepání o 200 rpm. Plasmidová DNA byla izolována pomocí soupravy High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid Biotech, New Taipei City, Taiwan). Koncentrace izolované DNA byla měřena na přístroji Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Vložení mutací bylo ověřeno sekvenováním (SEQme, Dobříš, ČR).

4.4 Tkáňové kultury a transfekce

Pro expresi rekombinantních NMDA receptorů byly použity lidské embryonální ledvinové buňky HEK293 (ATCC, Manassa, USA). Buňky byly kultivovány při teplotě 37 °C, v atmosféře 5% CO₂, v kultivačním médiu Opti-MEM, které bylo obohaceno o 5% fetální bovinní sérum. Pro transfekci byly buňky nasazeny do 24-jamkových destiček pokrytých kolagenem (SERVA, Heidelberg, Německo) v koncentraci 2x10⁵ buněk/cm², aby v den transfekce dosáhly konfluency 80–90 %.

Transfekce byla provedena pomocí činidla MATra (IBA GmbH Göttingen, Německo). Transfekční směs obsahovala 50 µl Opti-MEME, 0,9 µl MATra a DNA o celkové koncentraci 0,9 µg (cDNA kódující GluN1 a GluN2B podjednotky NMDA receptorů a cDNA kódující GFP pro identifikaci transfekovaných buněk). Směs byla inkubována 20 min při pokojové teplotě a poté přidána k buňkám. Destička byla na 15 min umístěna na magnet v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Po transfekci byly buňky opláchnuty PBS a z povrchu uvolněny roztokem versene-

trypsin. Suspenze buněk v transfekčním kultivačním médiu byla přenesena na krycí sklíčka o průměru 24 mm pokrytá kolagenem a poly-L-lysinem umístěných v plastových miskách o průměru 35 mm. Elektrofyziologická měření probíhala 24–48 h po transfekci.

4.5 Příprava primárních hipokampálních neuronů

Primární hipokampální neuronální kultury byly připravovány kolegy na oddělení z 1-denních krysích mláďat Wistar podle dříve publikovaného protokolu (Borovska *et al.*, 2012; Vyklicky *et al.*, 2016). Ve zkratce; skleněná krycí sklíčka byla před kultivací neuronů ošetřena vrstvou 0,1 mg/ml poly-D-lysinu a 0,2 mg/ml kolagenu (Serva). Následně byla na sklíčka nasazena astrocytární kultura z 1-denních krysích mláďat Wistar v Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) médiu s GlutaMax (Invitrogen), 10% fetálním bovinním sérem a antibiotiky Pen/Strep v koncentraci ~6 000 buněk/cm², která byla ponechána růst 1–2 týdny při 37 °C. Poté byly na vrstvu astrocytárních neuronů nasazeny hipokampální neurony izolované z 1-denních krysích mláďat Wistar v koncentraci ~50 000 buněk/cm² v médiu Neurobasal A se suplementem B27 (Invitrogen), GlutaMax a antibiotiky Pen/Strep. Pro elektrofyziologická měření byly použity neuronální kultury DIV 8–13.

4.6 Elektrofyziologická měření metodou terčíkového zámku

Pro měření proudových odpovědí rekombinantních NMDA receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách i nativních NMDA, AMPA a GABA receptorů v primárních neuronálních kulturách byla použita technika terčíkového zámku („patch clamp“) v konfiguraci snímání z celé buňky („whole cell“) (Hamil *et al.*, 1981). Snímání probíhalo pomocí zesilovače Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) v režimu napěťového zámku, kdy je membránový potenciál zpětnovazebně udržován na konstantní hodnotě. Pomocí Besselova filtru byly z analogového signálu odfiltrovány frekvence vyšší než 2 kHz a tento signál byl dále převeden na digitální signál se vzorkovací frekvencí 5 kHz a to pomocí A/D převodníku Digidata 1140A (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Záznam byl uchován a analyzován pomocí programu pClamp 10.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). K aplikaci roztoků byl použit rychlý aplikační systém, který umožňuje mikroprocesorem kontrolovanou aplikaci až 10 různých roztoků s časovou konstantou ~10 ms (Vyklicky *et al.*, 1990). Skleněná mikropipeta

byla vytažená z borosilikátových kapilár (BioMedical Instruments, Zöllnitz, Německo) na tahači P-1000 (Sutter Instrument, Novato, USA). Mikropipeta naplněná ICS měla výsledný odpor 3–5 MΩ. Veškeré pokusy byly prováděny při pokojové teplotě (23–25 °C) a buňky byly udržovány na membránovém potenciálu -60 mV (pokud není uvedeno jinak). Chyby způsobené sériovým odporem <10 MΩ byly kompenzovány z 80–90 %.

Naměřená data byla analyzována v programu Clampfit 10.5, který je součástí pClamp 10.5 (Molecular Devices).

Relativní míra inhibice I (%) byla počítána podle vzorce:

$$I = \left(1 - \frac{I_i}{I_{ss}}\right) \times 100 \quad (\text{Rovnice 1}),$$

kde I_{ss} je amplituda proudové odpovědi vyvolaná agonistou a I_i je amplituda odpovědi vyvolané agonistou v přítomnosti steroidu (Obrázek 4.1).

Závislost relativní inhibice (I) na koncentraci steroidu byla získána proložení následující logistické rovnice, kdy hodnota IC_{50} byla dopočítána minimálně ze čtyř různých koncentrací steroidu:

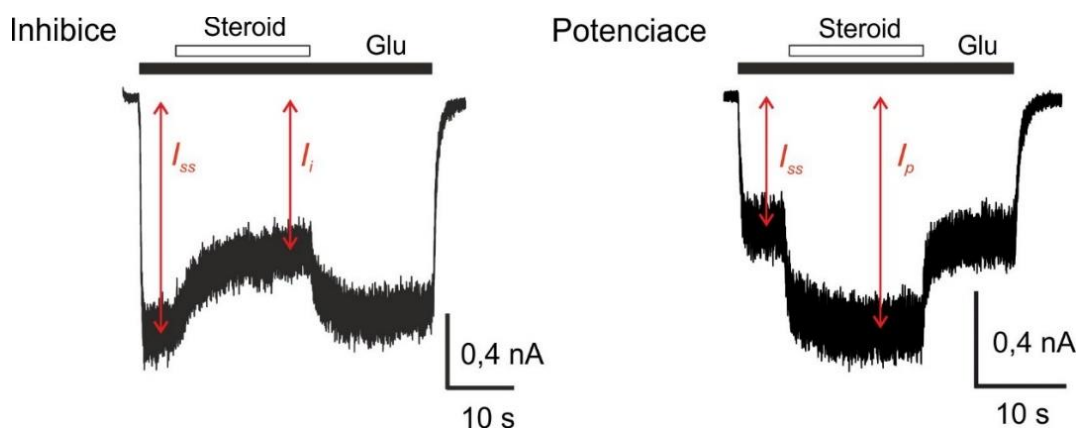
$$I = 1 / \left(1 + \left(\frac{[\text{steroid}]}{IC_{50}}\right)^h\right) \quad (\text{Rovnice 2}),$$

kde $[\text{steroid}]$ je koncentrace steroidu, IC_{50} je koncentrace steroidu, která inhibuje 50 % proudové odpovědi vyvolané agonistou a h je Hillův koeficient.

V případě jedné koncentrace steroidu byla IC_{50} vypočítána podle vzorce:

$$IC_{50} = [\text{steroid}] \times \sqrt{\frac{h(1-I)}{I}} \quad (\text{Rovnice 3}),$$

kde $[\text{steroid}]$ je koncentrace steroidu, h je zdánlivý Hillův koeficient (fixován na hodnotu 1,2) a I je relativní míra inhibice. Hodnota IC_{50} byla stanovena minimálně pro dvě koncentrace steroidu lišící se o tři řády (viz Slavikova *et al.*, 2016; Adla *et al.*, 2018).



Obrázek 4.1 Ukázka analýzy inhibičního a potenciačního účinku steroidů na NMDA receptorech. Proudová amplituda I_{SS} odpovídá ustálenému stavu proudové odpovědi vyvolané agonistou (glutamátem-Glu, aplikace vyznačena černým obdélníkem). Amplituda I_i vyjadřuje ustálený stav proudové odpovědi po nástupu inhibice, vyvolané koaplikací agonisty a inhibičního steroidu (bílý obdélník) a amplituda I_p označuje potenciaci vyvolanou koaplikací agonisty a potenciačního neurosteroidu (bílý obdélník).

Rozdíl inhibice (ΔI) před a po Ca-stimulaci byl počítán jako:

$$\Delta I = I_{test} - I_{kontrola} \quad (\text{Rovnice 4}),$$

kdy I_{test} je míra inhibice steroidu po Ca-stimulaci a $I_{kontrola}$ je míra inhibice steroidu před Ca-stimulací.

Inaktivace (A) byla počítána jako:

$$A = \left(1 - (I_{SS\ test}/I_{SS\ kontrola})\right) \times 100 \quad (\text{Rovnice 5}),$$

kde $I_{SS\ test}$ je amplituda vyvolaná samotným agonistou v testované odpovědi (po Ca-stimulaci)

a $I_{SS\ kontrola}$ je amplituda vyvolaná agonistou v kontrolní odpovědi (před Ca-stimulací).

Relativní míra potenciace (E) v % byla počítána podle vzorce:

$$E = \frac{(I_p - I_{SS})}{I_{SS}} \times 100 \quad (\text{Rovnice 6}),$$

kde I_p je míra proudové odpovědi během koaplikace steroidu s agonistou a I_{SS} je hodnota proudové odpovědi při aplikaci agonisty (viz Obrázek 4.1).

Relativní míra potenciace (E) vyvolaná pro různé koncentrace steroidu byla získána proložení experimentálních dat následující logistickou rovnicí:

$$E = E_{max} / \left(1 + \left(\frac{EC_{50}}{[\text{steroid}]} \right)^h \right) \quad (\text{Rovnice 7}),$$

kde E_{max} je maximální hodnota potenciace, EC_{50} je koncentrace steroidu, která potencuje z 50 % maximální hodnoty potenciace, $[\text{steroid}]$ je koncentrace sloučeniny a h je Hillův koeficient.

4.7 Měření volných Ca^{2+} pomocí barviva Fura

Měření volných Ca^{2+} pomocí barviva Fura probíhalo současně s elektrofyziologickým snímáním proudů NMDA receptorů v konfiguraci snímání z celé buňky (viz výše). Borosilikátová skleněná pipeta s odporem 3–5 M Ω byla naplněna ICS, který navíc obsahoval 100 μM FURA2 (Molecular Probes). Pro mikrospektrofluorometrická měření změn koncentrace Ca^{2+} byl použit zobrazovací systém Cell[^]R (Olympus), který byl součástí mikroskopu IX81 (Olympus, Tokyo, Japan) a iluminátoru Polychrome V (Till Photonics, Gräfelfing, Germany). Změny fluorescence byly detekovány kamerou Orca-ER (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). Fluorescence byla měřena při vlnových délkách 340 nm a 380 nm, a následně byl počítán poměr F340/380.

4.8 Měření excitotoxické buněčné smrti

Primární hipokampální neuronální kultury (DIV 12) byly inkubovány s rozdílnou koncentrací NMDA (3, 10, 30 μM) s PAhPim (30 μM , přidáváno jako 6 μl 5 mM zásobního roztoku steroidu v DMSO) nebo se stejným objemem DMSO v případě kontrolního vzorku a to po dobu 2 hod při 37 °C v kompletním MEM médiu. Po inkubaci byly neurony opláchnuty neurobazálním médiem, ve kterém byly původně kultivovány, a které bylo odebráno před inkubací. V tomto médiu byly ponechány při 37 °C 16–20 h. Další den bylo do média přidáno 5 μM Hoechst 33342 barvivo (H) a 6 μM propidium jodid (PI). Po inkubaci (30 min při 37 °C) byly neurony opláchnuty standardním ECS. Fluorescence H (excitace při 380 nm) a PI (excitace při 540 nm) byla měřena na přístroji Cell[^]R imaging system (Olympus) v ECS a při teplotě 24 °C. Vyhodnocení probíhalo pomocí programu ImageJ 1.52 (NIH, USA). V každém zorném poli byl

spočítán počet neuronů (H_N) na základě intenzivnějšího H značení jader neuronů oproti gliovým buňkám. Počet mrtvých neuronů (PI_N) byl spočítán na základě signálu PI. Procento mrtvých neuronů (D) bylo počítáno jako:

$$D = (PI_N/H_N) \times 100 \quad (\text{Rovnice 8}).$$

4.9 Statistické zpracování dat

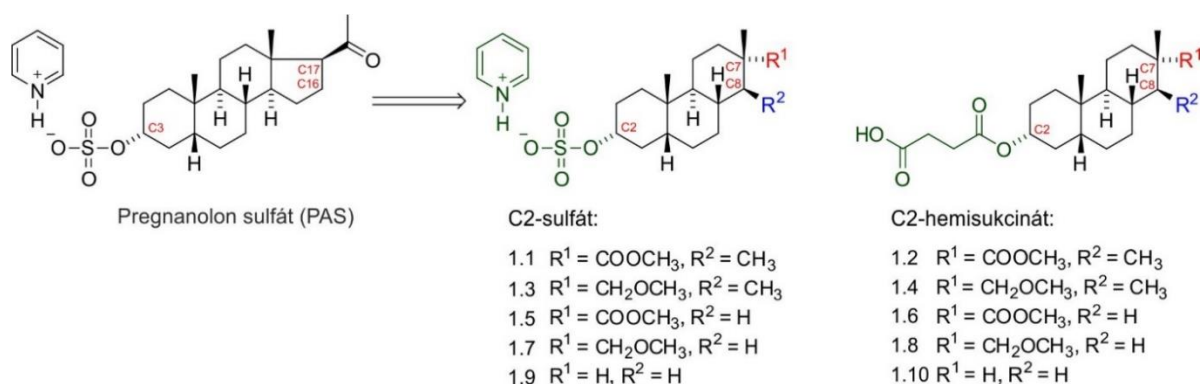
Výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (SEM) z počtu n buněk. Ke statistickému zpracování byly použity programy Sigma Plot 10 a Sigma Stat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, USA). Pro statistické porovnání dvojic hodnot byl použit t-test, pro statistické vyhodnocení skupin mutací oproti přirozenému typu receptoru (WT) byla použita jednofaktorová ANOVA a vícečetné srovnání vůči kontrole metodou Holm-Šidák s hladinou významnosti $p < 0,05$.

5 VÝSLEDKY

5.1 Vztah mezi strukturou inhibičních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

5.1.1 Perhydrofenantreny odvozené od pregnanolon sulfátu

V dřívější SAR studii (Kudova *et al.*, 2015) byl objasněn význam substituentů na pozicích, C16 a C17 PAS, neboli modifikace D-kruhu, kdy došlo k významnému zlepšení inhibičních účinků nově syntetizovaných neurosteroidů oproti PAS. V naší další studii bylo cílem objasnit význam samotného steroidního D-kruhu. Testována byla nová série perhydrofenantrenů (látek 1.1–1.10), neurosteroidů odvozených od PAS s modifikací na C2, C7 a C8 perhydrofenantrenového kruhu (Obrázek 5.1). Získané výsledky byly publikovány v časopise *Journal of Medicinal Chemistry* (Slavikova *et al.*, 2016).



Obrázek 5.1 Struktury C2-sulfátových a C2-hemisukcinátových perhydrofenantrenů – strukturálních analogů odvozených od pregnanolon sulfátu, kterým zcela chybí D-kruh steroidního jádra.

U všech látek (1.1–1.10, Obrázek 5.1) byla měřena míra inhibice glutamátové odpovědi rekombinantních GluN1/GluN2B NMDA receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách (Tabulka 5.1). Všechny testované látky si zachovaly inhibiční působení, ale pouze látky 1.9 a 1.10 – bez dalších substituentů na C7 a C8 perhydrofenantrenového kruhu – mají nižší IC_{50} než přirozeně se vyskytující PAS ($IC_{50} = 24,6 \pm 2,4 \mu\text{M}$); (Kudova *et al.*, 2015).

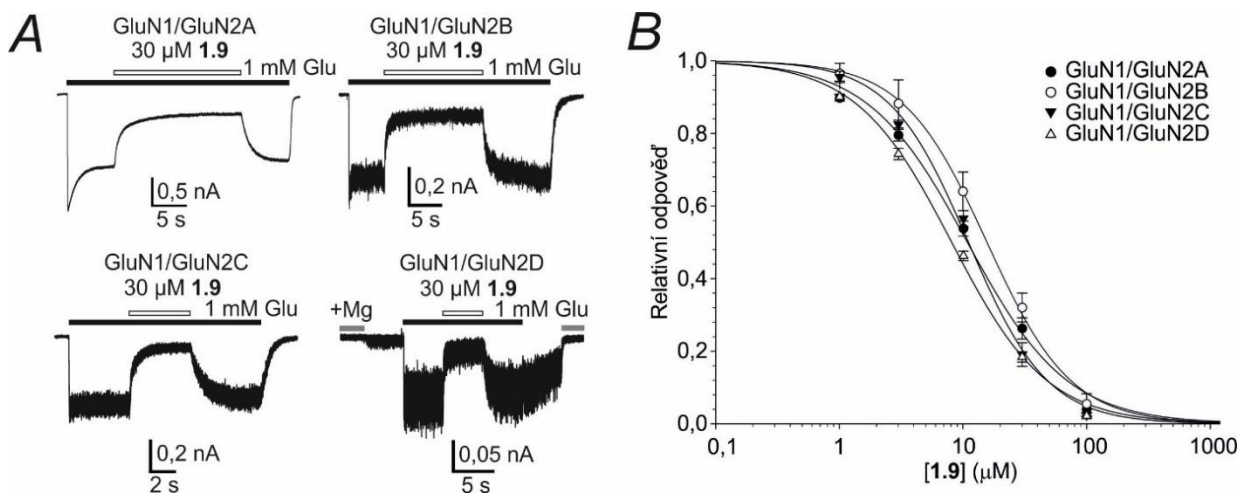
Tabulka 5.1 Účinek perhydrofenantrenů, neurosteroidů odvozených od pregnanolon sulfátu, na proudové odpovědi GluN1/GluN2B receptorů v HEK293 buňkách.

Látka	$IC_{50} \pm SEM$ (μM)	<i>n</i>	Koncentrace látky (μM)	Látka	$IC_{50} \pm SEM$ (μM)	<i>n</i>	Koncentrace látky (μM)
1.1	74,6 \pm 9,1	5	50	1.2	63,4 \pm 3,2	3	10
1.3	33,0 \pm 2,8	5	50	1.4	29,2 \pm 0,4	3	10
1.5	224,0 \pm 14,0	4	50	1.6	87,6 \pm 23,5	4	10
1.7	77,0 \pm 4,1	6	50	1.8	33,3 \pm 4,1	7	10
1.9	15,6 \pm 1,5	4	10	1.10	23,2 \pm 2,9	5	10

Data prezentována jako průměr \pm SEM. IC_{50} : koncentrace steroidu, která inhibuje 50 % proudové odpovědi vyvolané agonistou; SEM: střední chyba průměru; *n*: počet buněk.

Látka 1.9 (C2-sulfátový analog bez dalších substituentů na C7 a C8) byla vyhodnocena jako nejúčinnější inhibitor NMDA receptorů z celé série testovaných látek ($IC_{50} = 15,6 \pm 1,5 \mu M$). Ostatní C2-sulfátové látky se substituenty na C7 a C8 (látky 1.1, 1.3., 1.5 a 1.7) mají v porovnání s jejich C2-hemisukcinátovými analogy (látky 1.2, 1.4, 1.6, 1.8) vyšší hodnoty IC_{50} , a tedy jsou méně účinné při inhibici GluN1/GluN2B receptorů. Dále bylo zjištěno, že látky s methylesterem na C7 mají vyšší hodnoty IC_{50} oproti jejich methyletherovým analogům (látka 1.1 vs. 1.3 a 1.2 vs. 1.4), kdy látky 1.3 a 1.4 mají přibližně dvakrát nižší IC_{50} . Při obdobném porovnání látek 1.5 vs. 1.7 a 1.6 vs. 1.8, mají látky 1.7 a 1.8 téměř třikrát nižší IC_{50} . Nejméně účinná byla látka 1.5, jež je 15x horším inhibitorem oproti nejúčinnější látce 1.9, od které se liší pouze methylesterovým substituentem na C7.

U látky 1.9 byla dále měřena míra inhibičního působení na jednotlivých podjednotkách GluN2A–GluN2D NMDA receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách (Obrázek 5.2; Tabulka 5.2) a také na nativních NMDA, AMPA a GABA receptorech v primárních hipokampálních kulturách (Obrázek 5.3; Tabulka 5.3). Látka 1.9 vykazuje mírnou podjednotkovou specifitu pro GluN2B oproti GluN2A, GluN2C a GluN2D (Obrázek 5.2; Tabulka 5.2). Účinek látky 1.9 na rekombinantních NMDA receptorech nebyl signifikantně odlišný od účinku na nativních NMDA receptorech v hipokampálních neuronech. Látka 1.9 je ale šestkrát účinnější inhibitor NMDA receptorů než nativních AMPA receptorů. Nejúčinnější je látka 1.9 na inhibici nativních GABA receptorů s $IC_{50} = 3,1 \pm 0,1 \mu M$ (Obrázek 5.3; Tabulka 5.3).



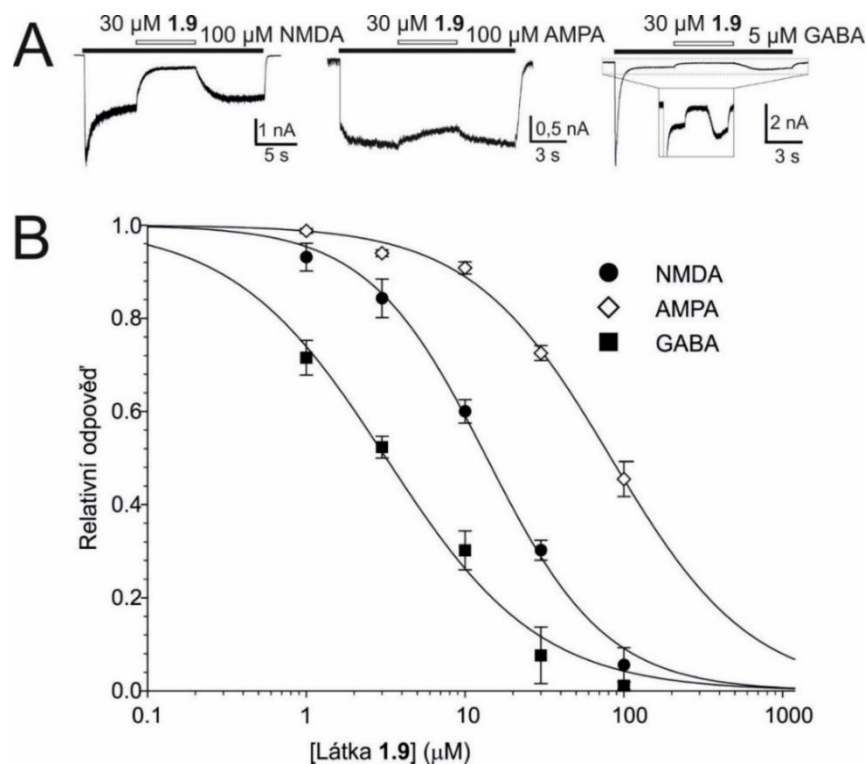
Obrázek 5.2 Účinek látky 1.9 na proudové odpovědi GluN1/GluN2A–D receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách. **A)** Ukázky elektrofyziologických záznamů inhibičního působení látky 1.9 (30 μM , aplikace vyznačena bílým obdélníkem) na GluN1/GluN2A–D receptory aktivované 1 mM glutamátem (vyznačeno černým obdélníkem). Šedý obdélník vyznačuje aplikaci ECS-Mg²⁺. **B)** Závislost míry inhibice GluN1/GluN2A–D na koncentraci látky 1.9, normalizováno na proudové odpovědi bez testované látky 1.9. Jednotlivé body značí průměr inhibice \pm SD, které byly proloženy křivkou dle rovnice: $I = 1 / \left(1 + \left(\frac{[\text{steroid}]}{IC_{50}} \right)^h \right)$.

Tabulka 5.2 Účinek látky 1.9 na GluN1/GluN2A–2D receptory exprimované v HEK293 buňkách.

Receptor	$IC_{50} \pm \text{SEM}$ (μM)	$h \pm \text{SEM}$	n
GluN1/GluN2A	10,9 \pm 0,4	1,1 \pm 0,1	6
GluN1/GluN2B	15,6 \pm 0,4*	1,3 \pm 0,1	5
GluN1/GluN2C	11,1 \pm 0,4	1,4 \pm 0,1	4
GluN1/GluN2D	8,1 \pm 0,3	1,1 \pm 0,1	4

Data prezentována jako průměr \pm SEM. *Jednofaktorová ANOVA $p = 0,007$.

IC_{50} : koncentrace steroidu, která inhibuje 50 % proudové odpovědi vyvolané agonistou; SEM: střední chyba průměru; h : Hillův koeficient; n : počet buněk.



Obrázek 5.3 Účinek látky 1.9 na proudové odpovědi nativních NMDA, AMPA a GABA receptorů v primárních hipokampálních neuronech. **A)** Ukázka elektrofyziologických záznamů inhibičního působení látky 1.9 (30 μM, aplikace vyznačena bílým obdélníkem) na receptory aktivované 100 μM NMDA, 100 μM AMPA či 5 μM GABA (vyznačeno černým obdélníkem). **B)** Závislost míry inhibice nativních NMDA, AMPA a GABA receptorů na koncentraci látky 1.9, normalizováno na proudové odpovědi bez testované látky 1.9. Jednotlivé body značí průměr inhibice ± SD, které byly proloženy křivkou dle rovnice: $I = 1 / \left(1 + \left(\frac{[\text{steroid}]}{IC_{50}} \right)^h \right)$.

Tabulka 5.3 Inhibiční účinek látky 1.9 na nativní NMDA, AMPA a GABA receptory v hipokampálních neuronech.

Receptor	$IC_{50} \pm SEM$ (μM)	$h \pm SEM$	n
NMDA	13,7 ± 0,4	1,2 ± 0,1	5
AMPA	83,0 ± 2,1	1,0 ± 0,1	6
GABA	3,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	6

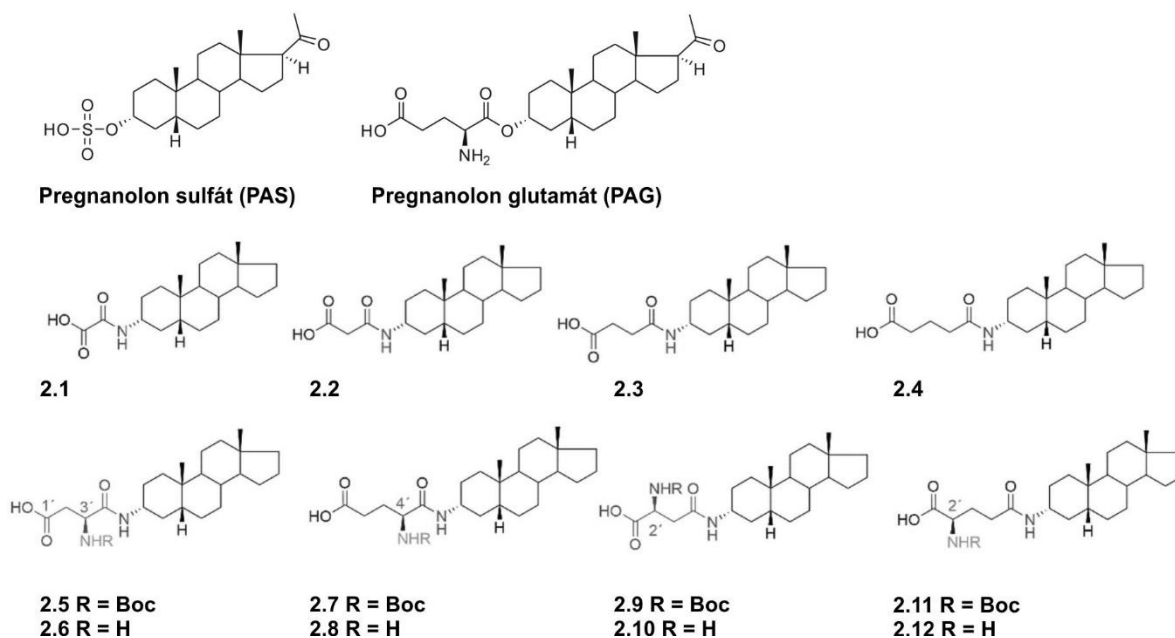
Data prezentována jako průměr ± SEM.

IC_{50} : koncentrace steroidu, která inhibuje 50 % proudové odpovědi vyvolané agonistou; SEM: střední chyba průměru; h : Hillův koeficient; n : počet buněk.

5.1.2 Amidové neurosteroidy odvozené od pregnanolon sulfátu a pregnanolon glutamátu

V druhé SAR studii byla testována série strukturních analogů PAS a PAG s amidovou vazbou na C3 (Obrázek 5.4). Od této náhrady kyslíku za dusík na C3 byla očekávána lepší rozpustnost, propustnost před hematoencefalickou bariérou a lepší biologická stabilita při zachování inhibičního působení látek. Výsledky studie jsou uvedeny v časopise *Steroids* (Adla *et al.*, 2017) a *Frontiers in Pharmacology* (Adla *et al.*, 2018).

V první části studie (Adla *et al.*, 2017) byly testovány deriváty PAS a PAG bez substituentů na D-kruhu a s amidovým zbytkem na C3 (látky 2.1, 2.2, 2.6, 2.8; Obrázek 5.4). Všechny nově syntetizované látky vykazovaly vyšší inhibiční působení na rekombinantní GluN1/GluN2B NMDA receptory exprimované v HEK293 buňkách než PAS a PAG (Tabulka 5.4). Látky 2.6 a 2.8 jsou až dvacetkrát lepší inhibitory NMDA receptorů než PAS a PAG. Tento výsledek byl podnětem k doplnění testované skupiny amidových neurosteroidů odvozených od PAS a PAG o dalších osm strukturních analogů (látky 2.3–2.5, 2.7, 2.9–2.12; Obrázek 5.4), (Adla *et al.*, 2018).



Obrázek 5.4 Struktury amidových neurosteroidů (látky 2.1–2.12) odvozených od pregnanolon sulfátu (PAS) a pregnanolon glutamátu (PAG).

Všech dvanáct amidových neurosteroidů má nižší IC_{50} než PAS a PAG (Tabulka 5.4), na základě čehož by bylo možné tvrdit, že amidové zbytky na C3 zlepšují inhibiční působení látek. Látky 2.1–2.4 nesoucí na C3 karboxylový substituent vykazují vyšší IC_{50} než látky 2.5–2.12 s C3-glutamátovým a C3-aspartátovým zbytkem. Látky 2.5, 2.7, 2.9, 2.11 měly navíc na C3-amidovém zbytku ochrannou tercbutyloxykarbonylovou (Boc) skupinu, kdy bylo testováno, zda nedojde ke zlepšení inhibičního účinku, což se ale nepotvrdilo. Účinek látek nebyl signifikantně odlišný od analogů bez Boc skupiny (Obrázek 5.4; Tabulka 5.4).

Tabulka 5.4 Účinek amidových neurosteroidů odvozených od pregnanolon sulfátu a pregnanolon glutamátu na proudové odpovědi GluN1/GluN2B receptorů v HEK293 buňkách.

Látka	$IC_{50} \pm SEM$ (μM)	Koncentrace (μM)	<i>n</i>
PAS ^a	24,6 ± 2,4	100	5
PAG ^a	51,7 ± 3,3	200	7
2.1	21,7 ± 1,8	10	7
2.2	15,4 ± 1,4	10	6
2.3	11,2 ± 4,2	1	3
2.4	8,9 ± 0,6	1	3
2.5	5,4 ± 0,9	1	6
2.6	1,0 ± 0,1	3	6
2.7	5,4 ± 1,0	1	6
2.8	1,4 ± 0,1	3	6
2.9	4,5 ± 0,2	1	6
2.10	4,9 ± 0,7	3	6
2.11	3,4 ± 0,1	1	5
2.12	N/A	N/A	N/A

^aPro srovnání hodnoty z (Borovská *et al.*, 2012). Data prezentována jako průměr ± SEM.

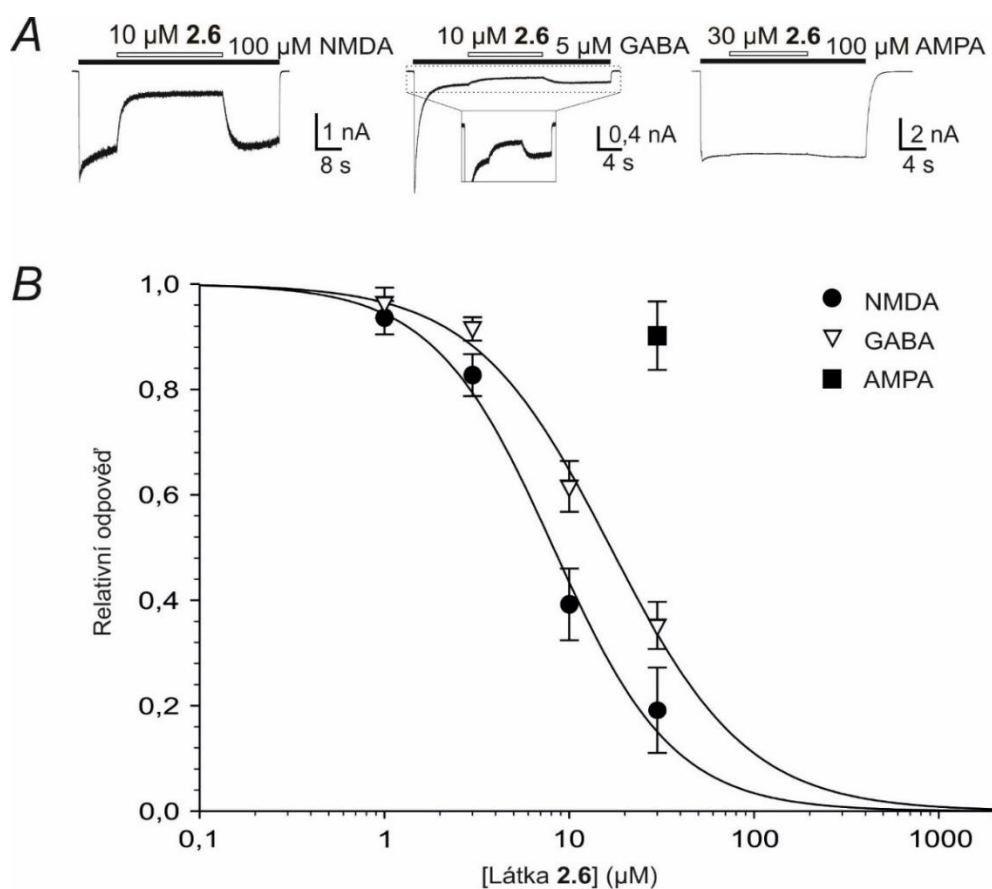
IC_{50} : koncentrace steroidu, která inhibuje 50 % proudové odpovědi vyvolané agonistou; SEM: střední chyba průměru; *n*: počet buněk; PAS: pregnanolon sulfát; PAG: pregnanolon glutamát; N/A značí nerozpustnou látku v 2,5 či 5 mM DMSO.

Pro další charakterizaci byla vybrána látka 2.6, která měla nejnižší $IC_{50} = 1,0 \pm 0,1 \mu M$. Při měření proudových odpovědí indukovaných glutamátem na jednotlivých podjednotkách GluN1/GluN2A–D látka 2.6 nevykazovala podjednotkovou specifitu (Tabulka 5.5). Naopak vykazovala signifikantně vyšší inhibiční působení na nativní NMDA receptory než na GABA a AMPA receptory v hipokampálních neuronálních kulturách (Obrázek 5.5, Tabulka 5.6).

Tabulka 5.5 Inhibiční účinek látky 2.6 na GluN1/GluN2A–D receptory exprimované v HEK293 buňkách aktivovaných 1 mM glutamátem.

Receptor	$IC_{50} \pm SEM$ (μM)	$h \pm SEM$	n
GluN1/GluN2A	$6,5 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	8
GluN1/GluN2B	$7,4 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,1$	5
GluN1/GluN2C	$7,3 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,2$	4
GluN1/GluN2D	$8,4 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,2$	4
Jednofaktorová ANOVA	$p = 0,598$	$p = 0,066$	

Data prezentována jako průměr \pm SEM. IC_{50} : koncentrace steroidu, která inhibuje 50 % proudové odpovědi vyvolané agonistou; SEM: střední chyba průměru; h : Hillův koeficient; n : počet buněk.



Obrázek 5.5 Účinek látky 2.6 na proudové odpovědi nativních NMDA, AMPA a GABA receptorů v primárních hipokampálních neuronech. **A)** Ukázka elektrofyziologických záznamů inhibičního působení látky 2.6 (10 či 30 μM , aplikace vyznačena bílým obdélníkem) na receptory aktivované 100 μM NMDA, 5 μM GABA či 100 μM AMPA (vyznačeno černým obdélníkem). **B)** Závislost míry inhibice nativních NMDA a GABA receptorů na koncentraci látky 2.6. Jednotlivé body značí průměr inhibice \pm SD, které byly proloženy křivkou dle rovnice: $I = 1 / \left(1 + \left(\frac{[\text{steroid}]}{IC_{50}} \right)^h \right)$. Z důvodu nízké inhibice AMPA receptorů látkou 2.6 nebylo možné sestavit křivku koncentrační závislosti a je vyznačena pouze jednobodová míra inhibice pro koncentraci 30 μM .

Tabulka 5.6 Inhibiční účinek látky 2.6 na nativní NMDA, AMPA a GABA receptory v hipokampálních neuronech.

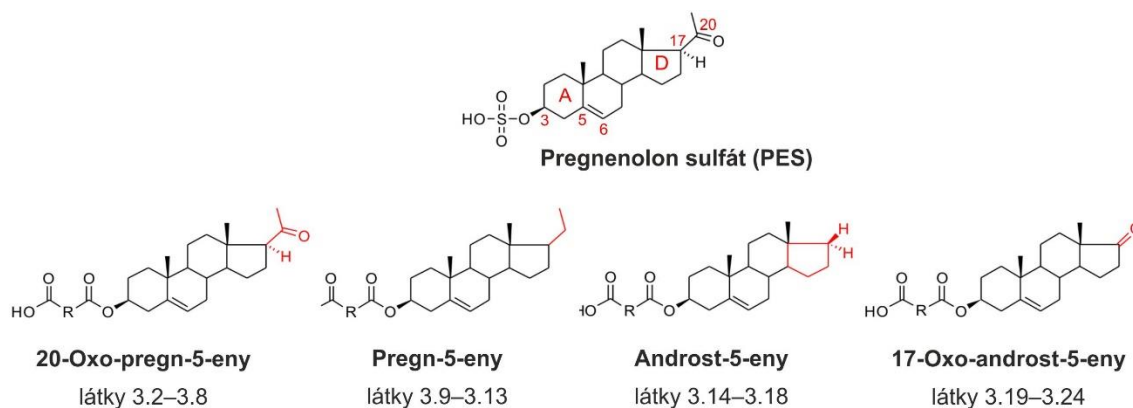
Receptor	$IC_{50} \pm SEM$ (μM)	$h \pm SEM$	n
NMDA	$8,3 \pm 2,1$	$1,3 \pm 0,2$	6
AMPA	$276,4 \pm 178,7^a$	fix. $1,2^a$	6
GABA	$17,0 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	6

^a Hodnota vypočítaná z 30 μM koncentrace. Data prezentována jako průměr \pm SEM.

IC_{50} : koncentrace steroidu, která inhibuje 50 % proudové odpovědi vyvolané agonistou; SEM: střední chyba průměru; h : Hillův koeficient; n : počet buněk.

5.2 Vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

Další práce byla zaměřena na studii SAR nových C3-hemiesterových látek s modifikací na C17 odvozených od potenciačního neurosteroidu PES. Přirozeně se vyskytující neurosteroidy PES a PAS se od sebe liší pouze jednou dvojnou vazbou mezi uhlíky C5 a C6 steroidního jádra, jejich účinek na NMDA receptory je ale přesně opačný – PES má na NMDA receptory potenciační účinky, zatímco PAS inhibiční. Bylo zkoumáno, zda pro PES platí podobné strukturní závislosti jako pro dříve popsané strukturní analogy PAS (Kudova *et al.*, 2015; Vyklicky *et al.*, 2016). Nově připravená série strukturních analogů (látky 3.2–3.24, Obrázek 5.6; Tabulka 5.7) byla zaměřena na látky s rozdílnou délkou hemiesterového zbytku na C3 a na modifikace D-kruhu na C17 s cílem popsat souvislost mezi strukturou a účinkem neurosteroidů na NMDA receptory. Výsledky studie jsou publikované v časopise *Journal of Medicinal Chemistry* (Krausova *et al.*, 2018).



Obrázek 5.6 Struktury potenciačních látek (látky 3.2–3.24) odvozených od pregnenolon sulfátu (PES).

Díky lepšímu pochopení vztahu mezi strukturou a funkcí syntetických analogů PES by bylo možné připravit účinnější pozitivní alosterické modulátory NMDA receptorů. Tyto modulátory by mohly nalézt uplatnění při léčbě onemocnění spjatých s hypofunkcí NMDA receptorů, mezi které patří například schizofrenie, poruchy autistického spektra či mentální retardace (Warnet *et al.*, 2020).

U všech nově syntetizovaných látek (3.2–3.24, Tabulka 5.7) byla měřena závislost účinku látky na její dávce, a to v rozmezí koncentrací daných jejich rozpustností v DMSO: 0,3–30 μM pro látky 3.9–3.18; 1–100 μM pro látky 3.2–3.8 a 3.21–3.24 a 1–300 μM pro látky 3.19 a 3.20. Všechny testované látky potencují GluN1/GluN2B receptory v rozmezí E_{max} 48 až 452 % (EC_{50} od 1,8 do 151,4 μM). Celkem deset látek je účinnější pozitivní modulátor rekombinantních GluN1/GluN2B receptorů než PES ($EC_{50} = 21,7 \mu\text{M}$). Při měření závislosti účinku na dávce byly u látek 3.2–3.8 pozorovány podobné hodnoty E_{max} (od 93 do 191 %), ale signifikantně odlišné hodnoty EC_{50} – látka 3.6 má šestinásobně větší zdánlivou afinitu (nižší EC_{50}) než látka 3.2. Dále u látek 3.4–3.7 dochází při koncentraci 100 μM ke skokovému nárůstu potenciace, což neodpovídá očekávanému účinku z analýzy míry potenciace pro koncentrace 1–30 μM . U jiných látek k podobnému chování nedocházelo a tento efekt nebyl dále zkoumán.

Tabulka 5.7 Účinek potenciačních látek 3.2–3.24 na proudové odpovědi GluN1/GluN2B receptorů v HEK293 buňkách aktivovaných 1 μ M glutamátem.

Látka	$E_{max} \pm SEM^a$ (%)	$EC_{50} \pm SEM^a$ (μ M)	$h \pm SEM^a$	n
PES	116 \pm 10	21,7 \pm 1,6	1,5 \pm 0,1	8
20-oxo-pregn-5-eny				
3.2 – 20-oxo-PE-hemiOxalát (R = žádný)	93 \pm 25	48,6 \pm 12,4*	1,3 \pm 0,0	5
3.3 – 20-oxo-PE-hemiMalonát (R = CH ₂)	108 \pm 15	39,8 \pm 10,3	1,3 \pm 0,1	5
3.4 – 20-oxo-PE-hemiSukcinát (R = (CH ₂) ₂)	177 \pm 46*	27,6 \pm 12,1	1,5 \pm 0,2	4
3.5 – 20-oxo-PE-hemiGlutarát (R = (CH ₂) ₃)	183 \pm 25*	19,0 \pm 3,4	1,4 \pm 0,1	4
3.6 – 20-oxo-PE-hemiAdipát (R = (CH ₂) ₄)	151 \pm 16	8,5 \pm 1,0**	1,6 \pm 0,1	10
3.7 – 20-oxo-PE-hemiPimelát (R = (CH ₂) ₅)	191 \pm 63	18,0 \pm 7,9	1,4 \pm 0,2	5
3.8 – 20-oxo-PE-hemiSuberát (R = (CH ₂) ₆)	156 \pm 30	19,3 \pm 1,7	1,5 \pm 0,1	5
Jednofaktorová ANOVA	$p = 0,346$	$p < 0,001$	$p = 0,494$	
Pregn-5-eny				
3.9 – PE-hemiMalonát (R = CH ₂)	71 \pm 7*	10,7 \pm 0,8**	1,5 \pm 0,2	7
3.10 – PE-hemiSukcinát (R = (CH ₂) ₂)	133 \pm 19	9,9 \pm 5,2*	1,4 \pm 0,2	6
3.11 – PE-hemiGlutarát (R = (CH ₂) ₃)	209 \pm 22*	9,9 \pm 3,7*	1,8 \pm 0,3	5
3.12 – PE-hemiAdipát (R = (CH ₂) ₄)	60 \pm 12*	17,2 \pm 4,5	1,5 \pm 0,4	4
3.13 – PE-hemiPimelát (R = (CH ₂) ₅)	48 \pm 11*	26,2 \pm 8,1	1,4 \pm 0,4	4
Jednofaktorová ANOVA	$p = 0,002$	$p = 0,080$	$p = 0,820$	
Androst-5-eny				
3.14 – AE-hemiMalonát (R = CH ₂)	236 \pm 27**	4,7 \pm 1,0**	1,4 \pm 0,2	4
3.15 – AE-hemiSukcinát (R = (CH ₂) ₂)	452 \pm 46*	7,4 \pm 0,4**	1,5 \pm 0,1	5
3.16 – AE-hemiGlutarát (R = (CH ₂) ₃)	348 \pm 32**	5,2 \pm 1,2**	1,7 \pm 0,2	7
3.17 – AE-hemiAdipát (R = (CH ₂) ₄)	191 \pm 10**	2,8 \pm 0,5**	1,7 \pm 0,5	5
3.18 – AE-hemiPimelát (R = (CH ₂) ₅)	109 \pm 13	1,8 \pm 0,3**	1,8 \pm 0,3	4
Jednofaktorová ANOVA	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,892$	
17-oxo-androst-5-eny				
3.19 – 17-oxo-AE-hemiGlutarát (R = (CH ₂) ₃)	154 \pm 34	151,4 \pm 32,7**	1,2 \pm 0,1	4
3.20 – 17-oxo-AE-hemiAdipát (R = (CH ₂) ₄)	180 \pm 17*	108,9 \pm 20,2**	1,4 \pm 0,1	7
3.21 – 17-oxo-AE-hemiPimelát (R = (CH ₂) ₅)	187 \pm 27*	82,4 \pm 16,9**	1,2 \pm 0,1	7
3.22 – 17-oxo-AE-hemiSuberát (R = (CH ₂) ₆)	189 \pm 35*	49,1 \pm 13,7**	1,4 \pm 0,2	5
3.23 – 17-oxo-AE-hemiAzelaát (R = (CH ₂) ₇)	226 \pm 45*	38,2 \pm 14,5	1,3 \pm 0,2	5
3.24 – 17-oxo-AE-hemiSebakát (R = (CH ₂) ₈)	165 \pm 11*	16,1 \pm 0,9*	1,6 \pm 0,2	5
Jednofaktorová ANOVA	$p = 0,654$	$p < 0,001$	$p = 0,661$	

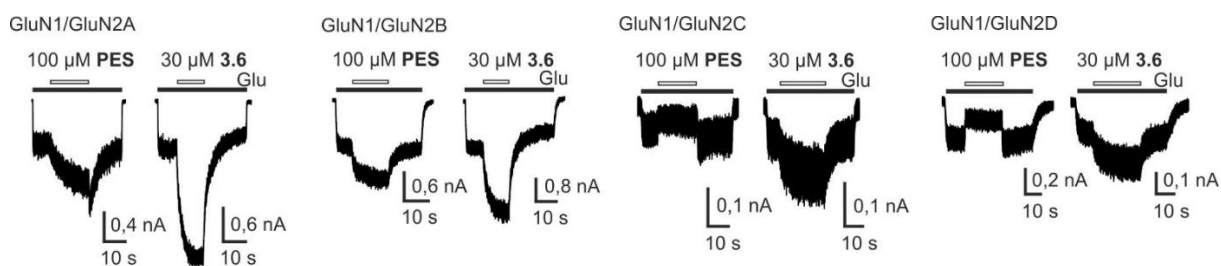
Vliv dávky na účinek byl měřen v koncentracích: 0,3–30 μM pro látky 3.9–3.18; 1–100 μM pro látky 3.2–3.8 a 3.21–3.24; 1–300 μM pro látky 3.19 a 3.20. Data prezentována jako průměr \pm SEM. p -hodnoty porovnávají statistickou významnost v rámci skupin (Jednofaktorová ANOVA, s hladinou významnosti $p \leq 0,05$). * účinek testované látky oproti PES (nepárový t-test, $*p = 0,001$ – $0,050$; $**p < 0,001$).

E_{max} : maximální hodnota potenciace; SEM: střední chyba průměru; EC_{50} : koncentrace steroidu, která potencuje z 50 % maximální hodnoty potenciace, h : Hillův koeficient; n : počet buněk; PES: pregnenolon sulfát.

Jako nejúčinnější strukturní modifikace na C17 se jeví androst-5-eny – neurosteroidy bez substituentu na C17 (EC_{50} od 1,8 až 7,4 μM). Naopak nejméně účinné jsou látky 3.19 a 3.20 se 17-oxo skupinou. Zároveň skupina 17-oxo-androst-5-enů (látky 3.19–3.24) vykazuje největší variabilitu účinku EC_{50} od 16,1 až po 151,4 μM , při relativně podobné E_{max} .

Pro maximální potenciační efekt se jako vhodná zdá délka C3-hemiesterového zbytku od čtyřuhlíkatého hemisukcinátového až po devítiuhlíkatý hemiazelátový zbytek v závislosti na C17-substituentu. Pokud z látky 3.6 – nejúčinnější modulátor 20-oxo-pregn-5-enů s šestiuhlíkatým C3 zbytkem – odstraníme 20-oxo skupinu nejúčinnějším modulátorem je C3-pětiuhlíkatá látka 3.11, pokud odstraníme celý C17-substituent nejúčinnější látkou je C3-čtyřuhlíkatá látka 3.15.

Pro další charakterizaci byla vybrána látka 3.6 (20-oxo-pregnenolon hemiadipát), která potencuje všechny rekombinantní podjednotky GluN2A–D bez signifikantního rozdílu (Obrázek 5.7; Tabulka 5.8). Oproti tomu PES potencuje pouze GluN2A a GluN2B a na GluN2C a GluN2D má inhibiční účinek (Horak *et al.*, 2006).



Obrázek 5.7 Porovnání účinku pregnenolon suflátu (PES) a látky 3.6 na rekombinantní GluN1/GluN2A–D receptory exprimovaných v HEK293 buňkách. Ukázky elektrofyziologických záznamů působení PES (100 μM) a látky 3.6 (30 μM , aplikace vyznačena bílým obdélníkem) na GluN1/GluN2A–D receptory aktivované 1 μM glutamátem (vyznačeno černým obdélníkem). Viz Tabulka 5.8.

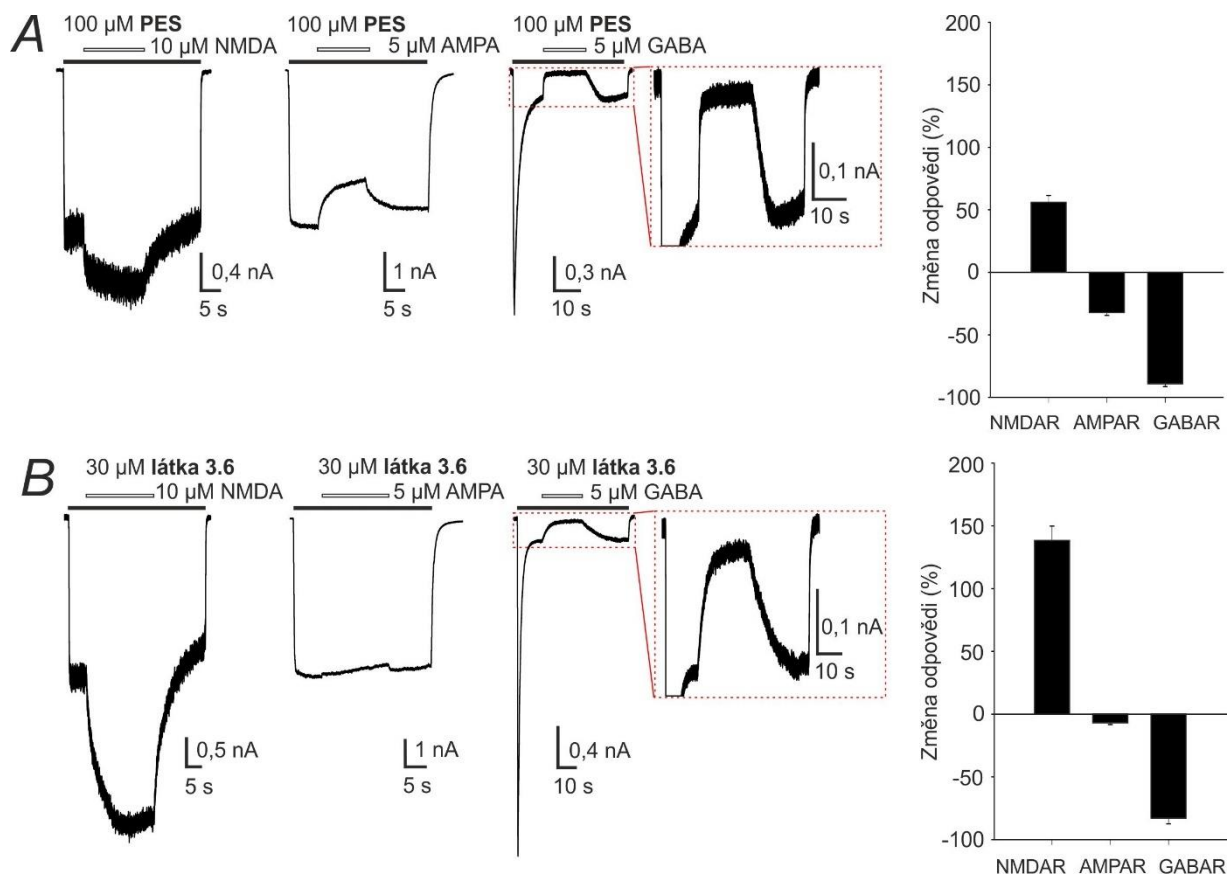
Tabulka 5.8 Účinek látky 3.6 na proudové odpovědi GluN1/GluN2A–GluN2D receptorů v HEK293 buňkách aktivovaných 1 μM glutamátem.

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

Hodnoty EC_{50} a h byly získány měřením koncentrační závislosti (1–30 μM) a pro výpočet byla použita rovnice $E = E_{max} / \left(1 + \left(\frac{EC_{50}}{[\text{steroid}]} \right)^h \right)$. Data prezentována jako průměr ± SEM. p -hodnoty porovnávají statistickou významnost.

E_{max} : maximální hodnota potenciace; SEM: střední chyba průměru; EC_{50} : koncentrace steroidu, která potencuje z 50 % maximální hodnoty potenciace, h : Hillův koeficient; n : počet buněk.

Na nativních receptorech v hipokampálních kulturách mají látka 3.6 a PES typově stejné účinky – potencují NMDA receptory a inhibují AMPA a GABA receptory, liší se ale mírou účinku (Obrázek 5.8). Látka 3.6 má již při 30 μM koncentraci přibližně dvakrát větší pozitivní účinek na NMDA receptory (+138 ± 11 %, $n = 6$) než 100 μM PES (+56 ± 6 %, $n = 11$). Zároveň látka 3.6 (30 μM) má minimální efekt na nativní AMPA receptory (inhibice -7 ± 2 %, $n = 6$), zatímco PES (100 μM) inhibuje AMPA receptory z -32 ± 2 % ($n = 6$). Látka 3.6 je také účinnější inhibitor nativních GABA receptorů, protože již při třetinové koncentraci (30 μM) dosahuje stejného účinku jako 100 μM PES (-90 ± 2 % vs. -90 ± 3 %; $n = 5$).



Obrázek 5.8 Účinek PES a látky 3.6 na proudové odpovědi nativních NMDA, AMPA a GABA receptorů v primárních hipokampálních neuronech. Ukázky elektrofyziologických záznamů působení **A)** 100 μM pregnenolonu sulfátu (PES) a **B)** 30 μM látky 3.6 (aplikace vyznačena bílým obdélníkem) na receptory aktivované 10 μM NMDA, 5 μM AMPA či 5 μM GABA (vyznačeno černým obdélníkem). Grafy reprezentují změnu oproti proudové odpovědi bez přítomnosti testované látky, kdy pozitivní hodnoty značí potenciaci a záporné inhibici.

5.3 Vliv Ca^{2+} na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory

V rámci předchozích SAR studií byla u 50 μM PAS pozorována rozdílná míra inhibice GluN1/GluN2B (od 36,7 % do 73,6 %; $n = 81$), což vedlo k hypotéze, že na citlivost NMDA receptorů k neurosteroidům mohou mít vliv i endogenní faktory a jelikož NMDA receptory jsou propustné pro Ca^{2+} , byl testován vliv Ca^{2+} na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory. Výsledky uvedené v této kapitole jsou publikované v *Journal of Neuroscience* (Hubalkova *et al.*, 2021).

5.3.1 Zvýšená citlivost NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům po Ca-stimulaci

Srovnávána byla míra inhibičního působení neurosteroidů na rekombinantních i nativních NMDA receptorech před (*kontrola*) a po Ca-stimulaci (*test*). Kontrolní a testovaná odpověď vyvolaná 1 μM glutamátem byla snímána technikou terčíkového zámku v konfiguraci snímání z celé buňky v přítomnosti 0,2 mM Ca^{2+} ECS. Ca-stimulace probíhala jako 50 s aktivace NMDA receptorů 1 mM glutamátem v přítomnosti 2 mM Ca^{2+} ECS. Tento protokol simuluje podmínky nadměrné aktivace NMDA receptorů, což má za následek zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} (MacDermott *et al.*, 1986). Obrázek 5.9 a Tabulka 5.9 shrnují inhibiční působení třech vybraných neurosteroidů na rekombinantní i nativní NMDA receptory.

Endogenní neurosteroid PAS (100 μM) inhiboval již kontrolní odpověď snímanou na rekombinantních GluN1/GluN2B receptorech ($58,5 \pm 2,1 \%$; $n = 5$), po Ca-stimulaci došlo k dalšímu nárůstu inhibice na $74,1 \pm 3,3 \%$, $n = 5$, nárůst inhibice byl o $\Delta I = 15,7 \pm 2,5 \%$. Nárůst inhibice byl pozorován i u dalších neurosteroidů; u látky androstan aspartát (AndrAsp – látka 2.6 testovaná v SAR studii viz kapitola 5.1.2 (Adla *et al.*, 2017)) byl nárůst inhibice mezi kontrolní a testovanou odpovědí 14 % u rekombinantních a 40 % u nativních NMDA receptorů.

Nejvýraznější nárůst inhibice po Ca-stimulaci byl pozorován u látky pregnanolon hemipimelát (PAhPim) ($\Delta I = 52 \%$ u rekombinantních a 64 % u nativních NMDA receptorů), a proto byl PAhPim studován v dalších pokusech. V předchozí studii byl PAhPim navíc popsán jako účinný inhibitor tonicky aktivovaných receptorů bez vlivu na fazicky aktivované receptory a v behaviorálních testech vykazoval neuroprotektivní účinky bez vedlejších psychomimetických účinků (Vyklícky *et al.*, 2016). Nárůst míry inhibice nebyl pozorován u nativních AMPA receptorů (Obrázek 5.9; Tabulka 5.9).

Pro PAhPim byla měřena i křivka koncentrační závislosti (3–30 μM) před a po Ca-stimulaci. Hodnota IC_{50} v kontrolních odpovědích (před Ca-stimulací) měřená na rekombinantních GluN1/GluN2B NMDA receptorech byla téměř čtyřikrát vyšší ($IC_{50 \text{ kontrola}} = 44,6 \pm 4,9 \mu\text{M}$; $n = 8$) než po Ca-stimulaci ($IC_{50 \text{ test}} = 12,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$; $n = 8$). Tento rozdíl byl ještě více patrný na nativních NMDA receptorech, kdy v kontrolních odpovědích ani nejvyšší dobře rozpustná koncentrace PAhPim (30 μM) neměla téměř žádný efekt, ale po Ca-stimulaci byla testovaná hodnota $IC_{50} = 25,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$; $n = 6$ (Obrázek 5.9).

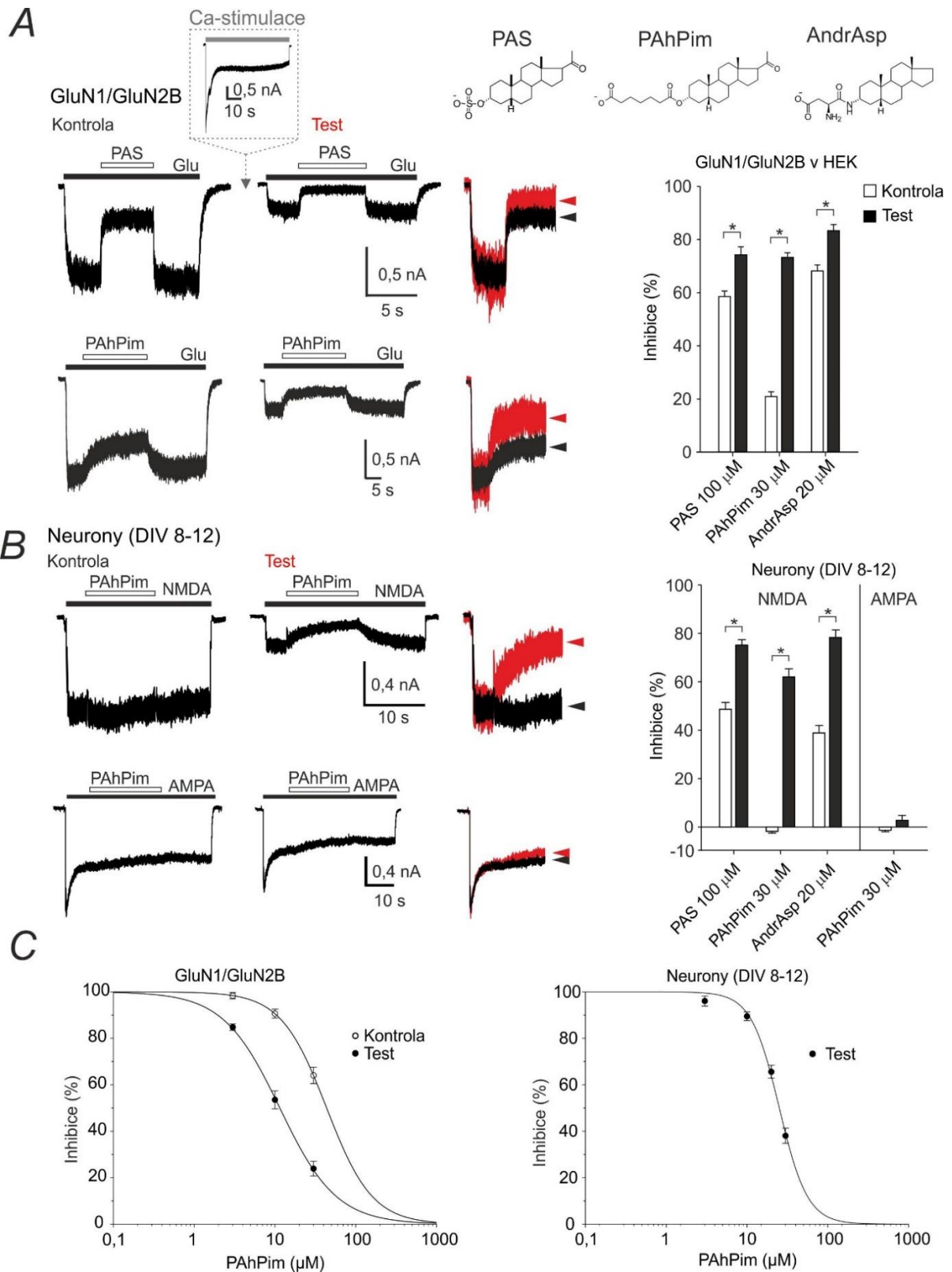
U testované odpovědi po Ca-stimulaci bylo pozorováno také snížení amplitudy proudové odpovědi vyvolané 1 μ M glutamátem ($0,306 \pm 1,7\%$; $n = 60$) oproti amplitudě v kontrolní odpovědi (Obrázek 5.9 A, B), což je v souladu s dříve popsanou Ca-indukovanou inaktivací NMDA receptorů po jejich aktivaci (Rosenmund a Westbrook, 1993; Vyklický, 1993).

Tabulka 5.9 Účinek vybraných neurosteroidů na rekombinantní GluN1/GluN2B NMDA receptory exprimované v HEK293 buňkách a na nativní NMDA a AMPA receptory v hipokampálních neuronálních kulturách před (*kontrola*) a po (*test*) Ca-stimulaci.

Neurosteroid	Inhibice (%)			<i>n</i>	[*] <i>p</i>
	<i>I</i> _{kontrola}	<i>I</i> _{test}	ΔI		
Rekombinantní GluN1/GluN2B v HEK293 buňkách					
PAS (100 μ M)	58,5 \pm 2,1	74,1 \pm 3,3	15,7 \pm 2,5	5	0,003
PAhPim (30 μ M)	21,1 \pm 1,9	73,0 \pm 1,8	51,9 \pm 1,8	60	<0,001
AndrAsp (20 μ M)	69,3 \pm 2,2	83,2 \pm 2,2	13,9 \pm 1,6	5	<0,001
Nativní NMDA receptory v hipokampálních neuronech					
PAS (100 μ M)	48,6 \pm 3,1	75,1 \pm 2,4	26,5 \pm 3,1	6	<0,001
PAhPim (30 μ M)	-1,9 \pm 0,7	61,9 \pm 3,3	63,8 \pm 3,5	6	<0,001
AndrAsp (20 μ M)	38,8 \pm 3,2	78,3 \pm 3,2	39,4 \pm 2,8	5	<0,001
Nativní AMPA receptory v hipokampálních neuronech					
PAhPim (30 μ M)	-1,8 \pm 0,6	2,1 \pm 2,1	3,9 \pm 2,6	5	0,204

Data prezentována jako průměr \pm SEM. ^{*}*p*-hodnoty porovnávací statistickou významnost mezi inhibicí v kontrolní a testované odpovědi (párový t-test).

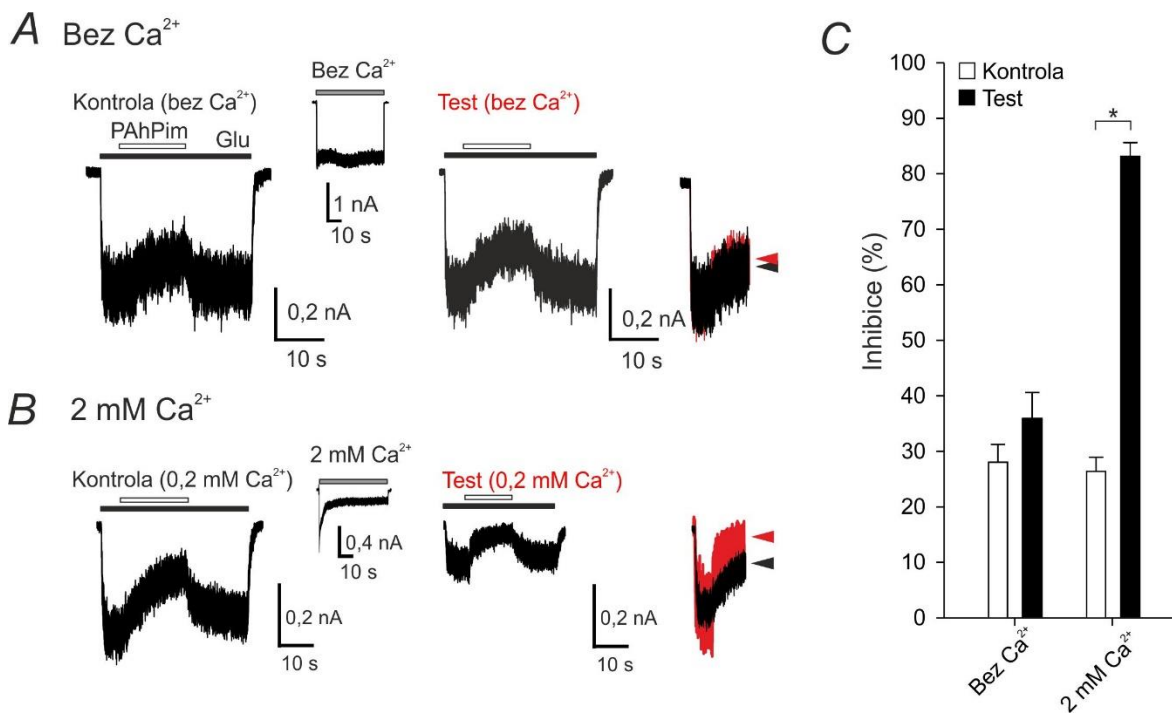
SEM: střední chyba průměru; *I*: relativní míra inhibice; ΔI : nárůst inhibice; *n*: počet buněk; PAS: pregnanolon sulfát; PAhPim: pregnanolon hemipimelát; AndrAsp: androstan aspartát.



Obrázek 5.9 Vliv Ca^{2+} na inhibiční působení vybraných neurosteroidů na rekombinantní a nativní receptory. *A*) Ukázky elektrofyziologických záznamů inhibičního působení PAS (100 μM) a PAhPim

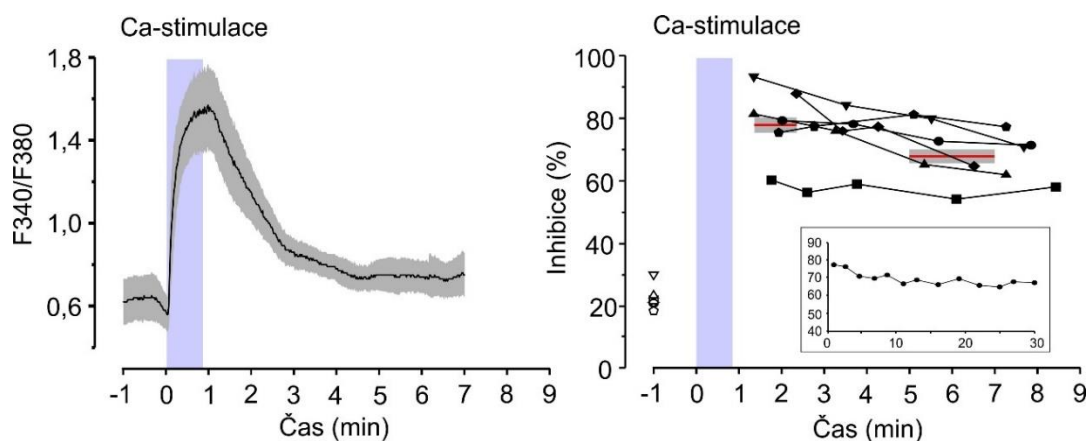
(30 μM , aplikace vyznačena bílým obdélníkem) na GluN1/GluN2B receptory exprimované v HEK293 buňkách, které byly aktivované 1 μM glutamátem (bílý obdélník) v 0,2 mM Ca^{2+} ECS před (*kontrola*) a po (*test*) Ca-stimulací (aktivace 1 mM glutamátem v přítomnosti 2 mM Ca^{2+} po dobu 50 s). Překryv záznamů kontrolní (černé) a testované (červené) odpovědi zobrazuje nárůst inhibice PAS a PAhPim po Ca-stimulaci (normalizováno na velikost proudu před aplikací PAS a PAhPim). Graf reprezentuje průměr inhibice \pm SEM pro PAS (100 μM), PAhPim (30 μM) a AndrAsp (20 μM) před (*kontrola*) a po (*test*) Ca-stimulací. Viz Tabulka 5.9. **B)** Ukázky elektrofyziologických záznamů inhibičního působení PAhPim (30 μM , aplikace vyznačena bílým obdélníkem) na nativní NMDA receptory aktivované 10 μM NMDA a AMPA receptory aktivované 5 μM AMPA před a po Ca-stimulaci (aktivace 100 μM NMDA v přítomnosti 2 mM Ca^{2+} ESC po dobu 50 s). Graf reprezentuje průměr inhibice \pm SEM pro PAS (100 μM), PAhPim (30 μM) a AndrAsp (20 μM) před a po Ca-stimulaci na nativních NMDA a AMPA receptorů. Viz Tabulka 5.9. **C)** Závislost míry inhibice GluN1/GluN2B a nativních NMDA receptorů na koncentraci PAhPim před (*kontrola*) a po (*test*) Ca-stimulací. Míra inhibice byla normalizována na proudové odpovědi bez PAhPim. Jednotlivé body značí průměr inhibice \pm SEM, které byly proloženy křivkou dle $I = 1 / \left(1 + \left(\frac{[\text{steroid}]}{IC_{50}} \right)^h \right)$. PAS: pregnanolon sulfát; PAhPim: pregnanolon hemipimelát; AndrAsp: androstan aspartát.

Pro ověření, že nárůst inhibice neurosteroidů skutečně souvisí se zvýšenou intracelulární koncentrací Ca^{2+} , které proniknou do buňky z extracelulárního prostředí během Ca-stimulace, a ne například s dlouhou stimulací, byla změřena též míra inhibice PAhPim na GluN1/GluN2B před a po 50 s aktivaci NMDA receptorů 1 mM glutamátem v ECS bez Ca^{2+} ($I_{kontrola} = 28,0 \pm 3,2 \%$; $I_{test} = 36,0 \pm 4,7 \%$; $n = 5$), kdy za těchto podmínek nedošlo k signifikantnímu nárůstu inhibice (Obrázek 5.10 A). Zatímco po aktivaci 1 mM glutamátem v 2 mM Ca^{2+} ECS (Ca-stimulace) došlo k signifikantnímu nárůstu míry inhibice ($I_{test} = 73,0 \pm 1,8 \%$; $n = 60$; $p < 0,001$, nepárový t-test) (Obrázek 5.10 B).



Obrázek 5.10 Porovnání míry inhibice PAhPim po stimulaci bez vápníku a Ca-stimulaci v přítomnosti 2 mM Ca^{2+} . **A)** Ukázky elektrofyziologických záznamů inhibičního působení PAhPim (30 μM , aplikace vyznačena bílým obdélníkem) na GluN1/GluN2B receptory exprimované v HEK293 buňkách aktivované 1 μM glutamátem (černý obdélník) v ECS bez Ca^{2+} před (*kontrola*) a po (*test*) aktivaci receptorů 1 mM glutamátem v ECS bez Ca^{2+} po dobu 50 s. **B)** Ukázky elektrofyziologických záznamů inhibičního působení PAhPim (30 μM , aplikace vyznačena bílým obdélníkem) na GluN1/GluN2B receptory exprimované v HEK293 buňkách aktivované 1 μM glutamátem (černý obdélník) v 0,2 mM ECS před (*kontrola*) a po (*test*) Ca-stimulaci (aktivace receptorů 1 mM glutamátem v 2 mM Ca^{2+} ECS po dobu 50 s). Překryv záznamů kontrolní (černé) a testované (červené) odpovědi zobrazuje nárůst inhibice PAhPim po Ca-stimulaci (normalizováno na velikost proudu před aplikací PAhPim). **C)** Graf reprezentuje průměr inhibice \pm SEM pro PAhPim (30 μM) před a po aktivaci receptorů v ECS bez Ca^{2+} a 2 mM Ca^{2+} .

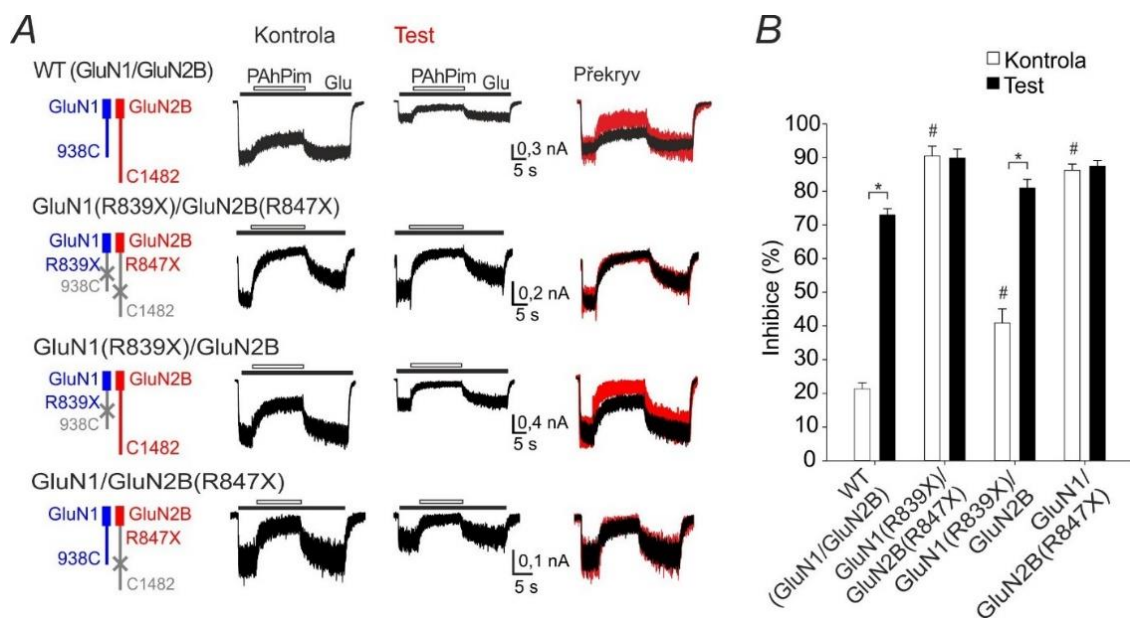
Dalším cílem bylo zjistit, zda nárůst míry inhibice neurosteroidů závisí přímo na zvýšené intracelulární koncentraci Ca^{2+} či spíše souvisí s následnou Ca-dependentní signalizací, která změní citlivost NMDA receptorů k neurosteroidům. Při současném elektrofyziologickém snímání a měření intracelulární koncentrace Ca^{2+} pomocí barviva Fura (Obrázek 5.11) bylo zjištěno, že po Ca-stimulaci dochází pouze k přechodnému zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} bezprostředně po Ca-stimulaci a během ~2 min dojde k návratu na původní hodnotu fluorescence (F340/380). Přechodně zvýšená hladina Ca^{2+} tak má pouze signalizační funkci, protože zvýšená míra inhibičního působení neurosteroidů přetrvává i 30 minut po Ca-stimulaci, nezávisle na aktuální intracelulární koncentraci Ca^{2+} (Obrázek 5.11).



Obrázek 5.11 Po Ca-stimulaci dochází k nárůstu intracelulární koncentrace Ca^{2+} a míry inhibice PAhPim, která ale přetrvává nezávisle na aktuální koncentraci Ca^{2+} . Grafy zobrazují současné měření intracelulární koncentrace Ca^{2+} pomocí barviva Fura (vlevo) a elektrofyziologické snímání (vpravo) na GluN1/GluN2B receptorech v HEK293 buňkách, na kterých byla měřena míra inhibice 30 μM PAhPim před (bílé symboly) a po (černé symboly propojené křivkou značící měření na jedné buňce) Ca-stimulaci (vyznačena fialovým obdélníkem). Červená čára značí průměr inhibice PAhPim v čase 1,3–2,3 minut (kdy fluorescence F340/380 dosahovala vrcholu, $I_{1-2} = 77,8 \pm 4,7 \%$) a v čase 5–7 min (po poklesu fluorescence F340/F80, $I_{5-7} = 67,9 \pm 4,2 \%$; $n = 6$; párový t-test, $p = 0,059$). Vložený graf (vpravo) zobrazuje vývoj míry inhibice po Ca-stimulaci v čase po dobu 30 min na jedné buňce.

5.3.2 Nárůst citlivosti NMDA receptorů k neurosteroidům souvisí s depalmitoylací GluN2B podjednotky

Další experimenty byly zaměřeny na lokalizaci místa zodpovědného za zvýšené inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory po Ca-stimulaci. Protože při Ca-stimulaci dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} , byla v prvním kroku studována intracelulární CTD GluN1/GluN2B NMDA receptorů. Měřeno bylo inhibiční působení PAhPim před a po Ca-stimulaci u mutovaných NMDA receptorů bez CTD (Obrázek 5.12, Tabulka 5.10). U receptorů s deletovanou CTD GluN1 podjednotky (GluN1(R839X)/GluN2B) je již inhibice 30 μM PAhPim v kontrolní odpovědi signifikantně vyšší oproti WT. Po Ca-stimulaci ale dochází k dalšímu nárůstu inhibice a mutované receptory tak vykazují podobné chování jako WT. Ale v případě delece CTD u obou podjednotek GluN1(R839X)/GluN2B(R847X) nebo pouze delece CTD GluN2B (GluN1/GluN2B(R847X)) je míra inhibice PAhPim maximálně zvýšená již v kontrolní odpovědi a po Ca-stimulaci nedochází k dalšímu nárůstu míry inhibice (Obrázek 5.12). Z toho lze usuzovat, že místo zodpovědné za regulaci citlivosti NMDA receptorů k neurosteroidům leží na GluN2B podjednotce.



Obrázek 5.12 Nárůst citlivosti NMDA receptorů k inhibičnímu působení PAhPim souvisí s CTD GluN2B podjednotky. **A)** Ukázky elektrofyziologických záznamů inhibičního působení PAhPim na receptory WT (GluN1/GluN2B) a receptory s delecemi CTD: GluN1(R839X)/GluN2B(R847X), GluN1(R839X)/GluN2B a GluN1/GluN2B(R847X) před a po Ca-stimulaci. Náčrty vlevo naznačují místa mutací. Aplikace PAhPim (30 μ M) a 1 μ M glutamátu je vyznačena bílým (respektive černým) obdélníkem. Překryv záznamů kontrolní (černé) a testované (červené) odpovědi zobrazuje nárůst inhibice PAhPim po Ca-stimulaci (normalizováno na velikost proudu před aplikací PAhPim). **B)** Graf reprezentuje průměr inhibice \pm SEM pro PAhPim (30 μ M) před a po Ca-stimulaci na receptorech s delecemi CTD Viz Tabulka 5.10. WT: přirozený typ receptoru, CTD: C-terminální doména, PAhPim: pregnanolon hemipimelát.

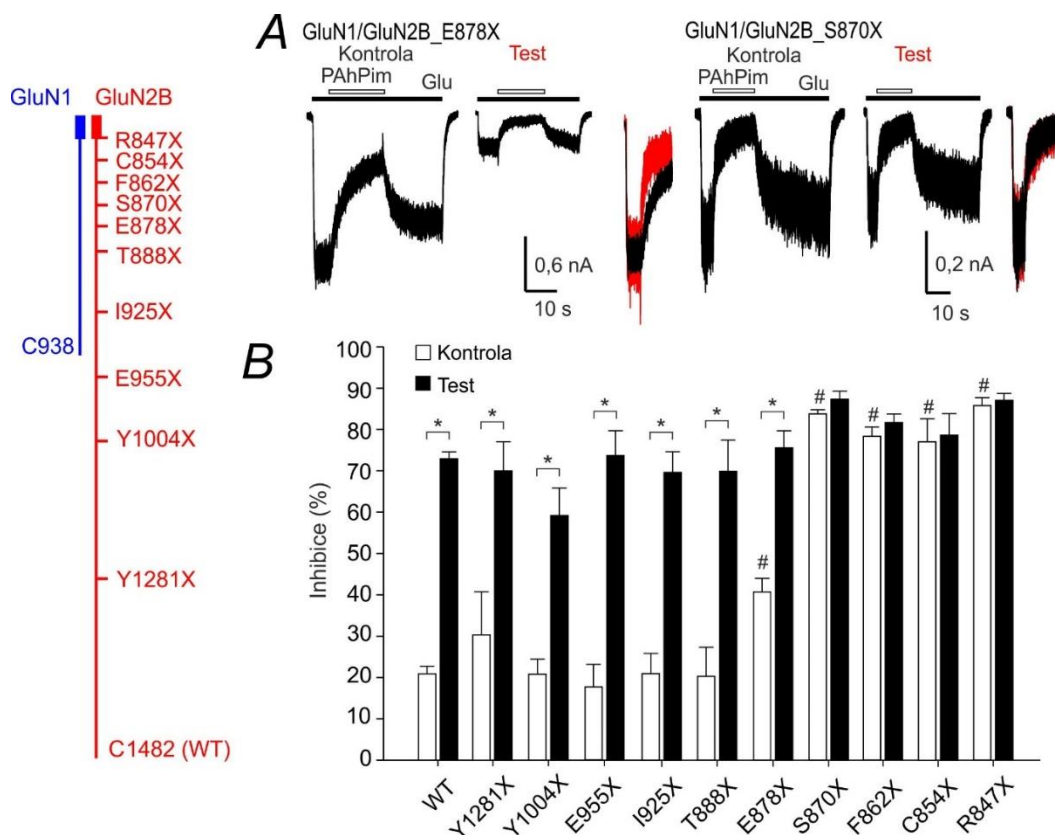
Tabulka 5.10 Inhibiční účinek PAhPim (30 μ M) na GluN1/GluN2B (WT) a mutované receptory s delecemi CTD exprimované v HEK293 buňkách před ($I_{kontrola}$) a po Ca-stimulaci (I_{test}).

	Inhibice PAhPim (%)			<i>n</i>	[*] <i>p</i>	[#] <i>p</i>	^Δ <i>p</i>
	$I_{kontrola}$	I_{test}	ΔI				
WT	21,1 \pm 1,9	73,0 \pm 1,8	51,9 \pm 1,8	60	<0,001	-	-
GluN1(R839X)/GluN2B(R847X)	90,4 \pm 2,9	89,8 \pm 2,7	-0,2 \pm 2,4	5	0,938	<0,001	<0,001
GluN1(R839X)/GluN2B	40,7 \pm 4,3	80,7 \pm 2,7	40,0 \pm 3,3	7	<0,001	<0,001	0,023
GluN1/GluN2B(R847X)	86,1 \pm 1,9	87,4 \pm 1,7	2,3 \pm 0,3	5	0,295	<0,001	<0,001

Data prezentována jako průměr \pm SEM. ^{*}*p*-hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi inhibicí v kontrolní ($I_{kontrola}$) a testované (I_{test}) odpovědi (párový t-test); [#]*p*-hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi inhibicí v kontrolní ($I_{kontrola}$) odpovědi mutovaných receptorů oproti WT (jednofaktorová ANOVA a vícečetné srovnání vůči kontrole metodou Holm-Šidák); ^Δ*p*-hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi rozdílem inhibice ΔI u mutovaných receptorů oproti WT (jednofaktorová ANOVA a vícečetné srovnání vůči kontrole metodou Holm-Šidák).

PAhPim: pregnanolon hemipimelát; WT: přirozený typ receptoru; CTD: C-terminální doména; *I*: relativní míra inhibice; ΔI : nárůst inhibice; *n*: počet buněk; SEM: střední chyba průměru.

Další experimenty byly proto zaměřeny na CTD GluN2B podjednotky NMDA receptorů, která je interakčním partnerem řady molekul a také cílem posttranslačních modifikací (Warnet *et al.*, 2020). Cílenou mutagenézí a postupným zkracováním CTD GluN2B podjednotky byla identifikována oblast E847X–E878X, která je klíčová pro nárůst inhibice již před Ca-stimulací oproti WT (Obrázek 5.13; Tabulka 5.11). Míra inhibice PAhPim (30 μ M) v kontrolní odpovědi měřené na mutovaném receptoru GluN1/GluN2B(E878X) je svojí hodnotou mezi inhibicí kontrolní odpovědi měřené na WT a receptorech s plně deletovanou CTD GluN2B podjednotky (GluN1/GluN2B(R827X)).



Obrázek 5.13 Za nárůst citlivosti NMDA receptorů k inhibičnímu působení PAhPim je zodpovědná oblast na CTD GluN2B v blízkosti membrány. Nákres vlevo naznačuje místa mutací – postupného zkracování CTD GluN2B podjednotky **A**) Ukázky elektrofyziologických záznamů inhibičního působení PAhPim na GluN1/GluN2B(E878X) a GluN1/GluN2B(S870X) receptory před a po Ca-stimulaci. Aplikace PAhPim (30 μ M) a 1 μ M glutamátu je vyznačena bílým (respektive černým) obdélníkem. Překryv záznamů kontrolní (černé) a testované (červené) odpovědi zobrazuje nárůst inhibice PAhPim po Ca-stimulaci (normalizováno na velikost proudu před aplikací PAhPim). **B**) Graf reprezentuje průměr inhibice \pm SEM pro PAhPim (30 μ M) před a po Ca-stimulaci na mutovaných receptorech, kdy byla postupně zkracována CTD GluN2B podjednotky. Viz Tabulka 5.11. PAhPim: pregnanolon hemipimelát; WT: přirozený typ receptoru, CTD: C-terminální doména.

Tabulka 5.11 Inhibiční účinek PAhPim (30 μ M) na GluN1/GluN2B (WT) a mutované receptory s postupně zkracovanou CTD GluN2B podjednotky exprimované v HEK293 buňkách před ($I_{kontrola}$) a po Ca-stimulaci (I_{test}).

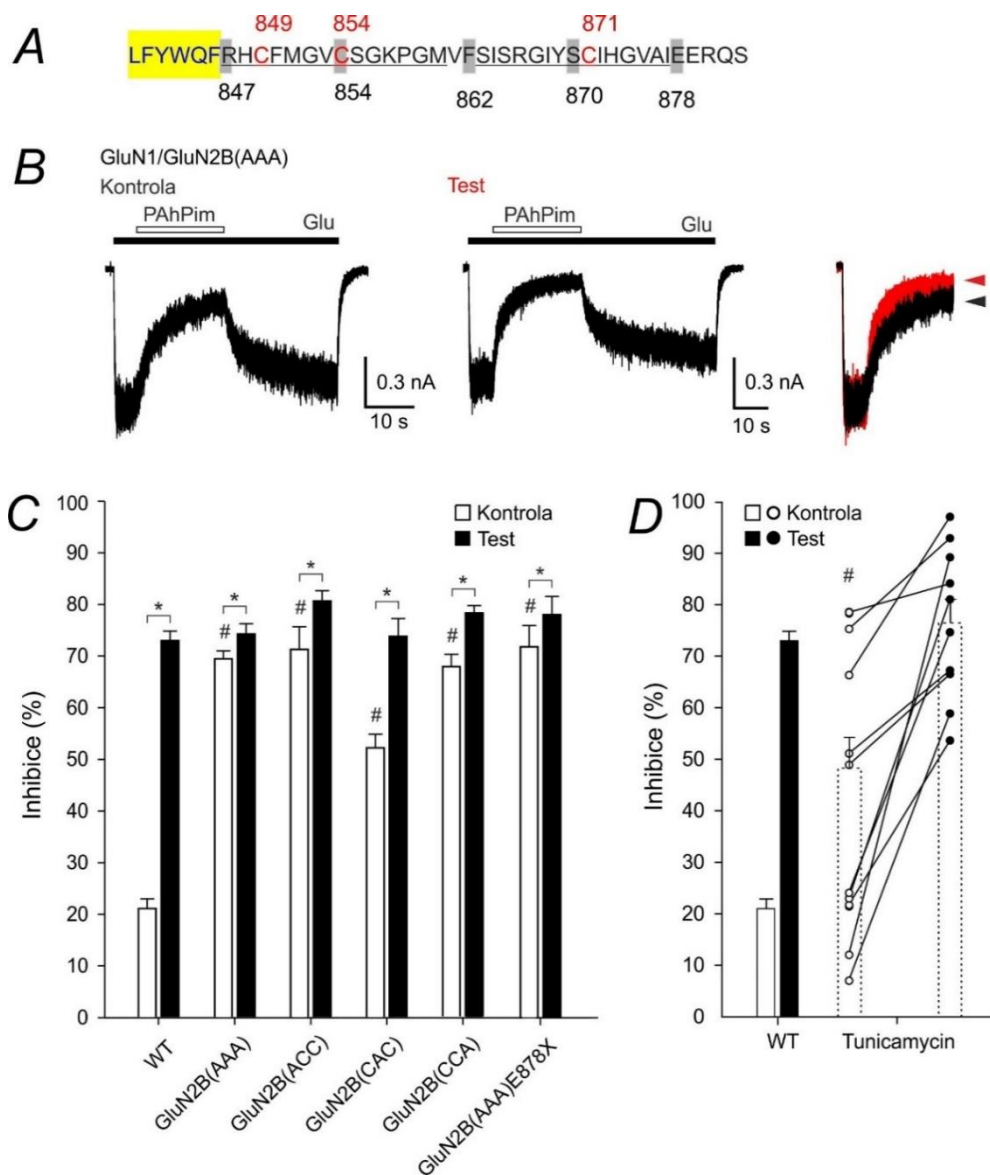
Inhibice PAhPim (%)							
	$I_{kontrola}$	I_{test}	ΔI	n	* p	# p	Δp
WT	21,1 \pm 1,9	73,0 \pm 1,8	51,9 \pm 1,8	60	<0,001	-	-
Y1281X	30,3 \pm 10,4	69,9 \pm 7,1	39,6 \pm 4,4	5	<0,001	0,535	0,15
Y1004X	22,4 \pm 4,8	64,1 \pm 7,9	41,8 \pm 3,9	6	<0,001	0,997	0,198
E955X	17,8 \pm 5,5	74,2 \pm 6,0	56,3 \pm 6,9	5	0,001	0,974	0,816
I925X	21,2 \pm 4,9	70,2 \pm 5,1	48,9 \pm 4,0	5	<0,001	0,984	0,840
T888X	20,5 \pm 7,1	70,4 \pm 7,5	49,9 \pm 5,3	4	0,003	0,934	0,754
E878X	39,4 \pm 4,1	76,1 \pm 4,2	36,8 \pm 4,0	7	<0,001	0,005	0,014
S870X	84,1 \pm 1,0	87,7 \pm 2,0	5,0 \pm 1,5	5	0,174	<0,001	<0,001
F862X	78,6 \pm 2,3	82,0 \pm 2,0	3,6 \pm 1,0	5	0,048	<0,001	<0,001
C854X	77,4 \pm 5,6	79,0 \pm 5,2	5,1 \pm 1,3	4	0,632	<0,001	<0,001
R847X	86,1 \pm 1,9	87,4 \pm 1,7	2,3 \pm 0,3	5	0,295	<0,001	<0,001

Data prezentována jako průměr \pm SEM. * p -hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi inhibicí v kontrolní ($I_{kontrola}$) a testované (I_{test}) odpovědi (párový t-test); # p -hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi inhibicí v kontrolní ($I_{kontrola}$) odpovědi mutovaných receptorů oproti WT (jednofaktorová ANOVA a vícečetné srovnání vůči kontrole metodou Holm-Šidák); Δp -hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi rozdílem inhibice ΔI u mutovaných receptorů oproti WT (jednofaktorová ANOVA a vícečetné srovnání vůči kontrole metodou Holm-Šidák).

PAhPim: pregnanolon hemipimelát; WT: přirozený typ receptoru; CTD: C-terminální doména; I : relativní míra inhibice; ΔI : nárůst inhibice; n : počet buněk; SEM: střední chyba průměru.

Pomocí online predikčního programu CSS-Palm 2.0 (Ren *et al.*, 2008) a poznatků z literatury (Hayashi *et al.*, 2009) byly v této oblasti (R847–E878) predikovány tři cysteiny C849, C854 a C871, které mohou být posttranslačně palmitoylovány. Pomocí cílené mutagenese byly připraveny mutantní formy NMDA receptorů s náhradou těchto Cys za Ala, který znemožňuje palmitoylaci (neobsahuje –SH skupinu, na kterou by se mohl vázat zbytek kyseliny palmitové) a takto mutovaný receptor se chová jako depalmitoylovaný (Obrázek 5.14).

V případě náhrady všech tří cysteinů za alanin GluN2B(AAA) byla již míra inhibice 30 μ M PAhPim v kontrolní odpovědi výrazně zvýšená oproti WT a po Ca-stimulaci došlo již jen k mírnému navýšení (Obrázek 5.14, Tabulka 5.12). Rozdílně oproti WT se chovaly i mutantní formy receptoru, kdy byl zaměněn vždy pouze jeden cystein za alanin: C849A (GluN2B(ACC)), C854A (GluN2B(CAC)) či C871A (GluN2B(CCA)) nebo kdy byly nahrazeny všechny tři cysteiny na zkrácené podjednotce GluN2B(AAA)E787X (Obrázek 5.14, Tabulka 5.12).



Obrázek 5.14 GluN2B receptory s mutovanými plamitoylačními místy mají zvýšenou citlivost k PAhPim. **A)** Aminokyselinová sekvence CTD oblasti GluN2B podjednotky blízko membrány (membránový úsek je vyznačen žlutě). Šedě jsou označena místa zkracování CTD receptoru, predikovaná palmitoylační místa jsou označena červeně. **B)** Ukázka kontrolní a testované odpovědi na mutovaném receptoru GluN1/GluN2B(AAA), který má všechny tři cysteiny C849, C854, C871 zaměněny za alanin. Aplikace PAhPim (30 μ M) a 1 μ M glutamátu je vyznačena bílým (respektive černým) obdélníkem. Překryv záznamů kontrolní (černé) a testované (červené) odpovědi zobrazuje pouze mírný nárůst inhibice PAhPim po Ca-stimulaci (normalizováno na velikost proudu před aplikací PAhPim). **C)** Graf reprezentuje průměr inhibice \pm SEM pro PAhPim (30 μ M) před a po Ca-stimulaci na WT a mutovaných receptorech, kdy byly všechny či jednotlivé cysteiny zaměněny za alanin. Testována byla i záměna všech tří cysteinů na zkrácené podjednotce GluN2B(E787X). Viz Tabulka 5.12. **D)** Graf reprezentující míru inhibice PAhPim (30 μ M) na HEK293 buňkách inkubovaných s Tunicamycinem v kontrolní a testované odpovědi – body reprezentují jednotlivé buňky, sloupcový graf jejich průměr (WT pro srovnání). WT: přirozený typ receptoru; CTD: C-terminální doména, PAhPim: pregnanolon hemipimelát.

Tabulka 5.12 Inhibiční účinek PAhPim (30 μ M) na GluN1/GluN2B (WT), mutované receptory s mutacemi palmitoylačních míst na CTD GluN2B podjednotky a WT receptorů po inkubaci s Tunicamycinem exprimované v HEK293 buňkách před ($I_{kontrola}$) a po Ca-stimulaci (I_{test}).

	Inhibice PAhPim (%)				n	*p	$^{\#}p$	$^{\Delta}p$
	$I_{kontrola}$	I_{test}	ΔI					
WT	21,1 \pm 1,9	73,0 \pm 1,8	51,9 \pm 1,8	60	<0,001	-	-	
GluN2B(AAA)	69,5 \pm 1,5	74,3 \pm 2,0	4,8 \pm 1,6	9	0,018	<0,001	<0,0001	
GluN2B(ACC)	71,3 \pm 4,4	80,7 \pm 2,0	9,4 \pm 2,5	5	0,020	<0,001	<0,0001	
GluN2B(CAC)	52,2 \pm 2,6	73,8 \pm 3,4	21,6 \pm 2,4	9	<0,001	<0,001	<0,0001	
GluN2B(CCA)	67,9 \pm 2,4	78,3 \pm 1,4	10,4 \pm 2,7	7	0,008	<0,001	<0,0001	
GluN2B(AAA)E878X	72,1 \pm 4,1	78,3 \pm 3,5	6,2 \pm 2,3	7	0,038	<0,001	<0,0001	
Tunicamycin (WT)	48,3 \pm 5,9	76,5 \pm 4,7	38,0 \pm 7,4	10	<0,001	<0,001	0,002	

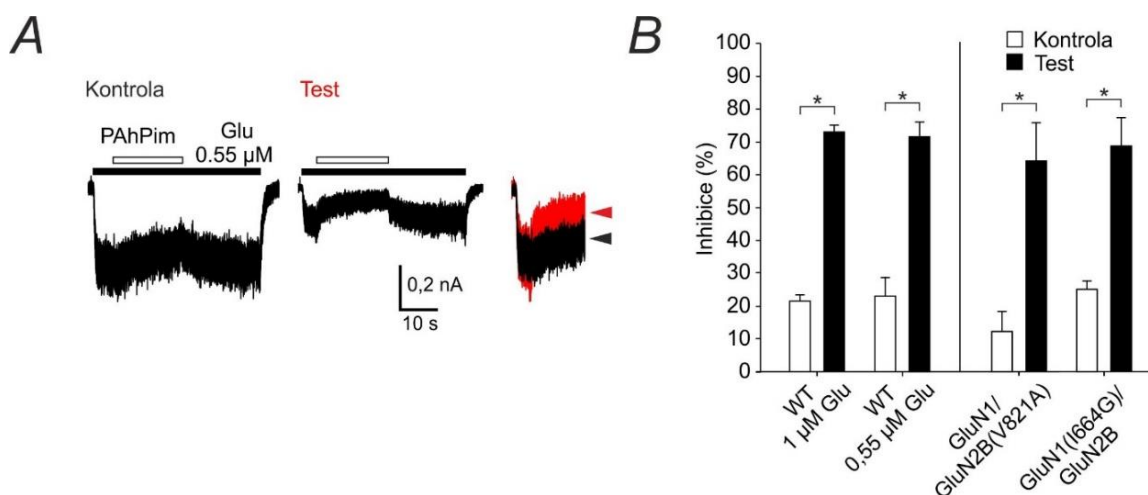
Data prezentována jako průměr \pm SEM. *p -hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi inhibicí v kontrolní ($I_{kontrola}$) a testované (I_{test}) odpovědi (párový t-test); $^{\#}p$ -hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi inhibicí v kontrolní ($I_{kontrola}$) odpovědi mutovaných receptorů oproti WT (jednofaktorová ANOVA a vícečetné srovnání vůči kontrole metodou Holm-Šidák); $^{\Delta}p$ -hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi rozdílem inhibice ΔI u mutovaných receptorů oproti WT (jednofaktorová ANOVA a vícečetné srovnání vůči kontrole metodou Holm-Šidák).

PAhPim: pregnanolon hemipimelát; WT: přirozený typ receptoru; CTD: C-terminální doména; I : relativní míra inhibice; ΔI : nárůst inhibice; n : počet buněk; SEM: střední chyba průměru.

Pro další potvrzení, že pozorovaný efekt skutečně souvisí s (de)palmitoylací bylo provedeno měření s antibiotikem tunicamycinem, které brání palmitoylaci (Patterson a Skene, 1995). Buňky HEK293 exprimující GluN1/GluN2B (WT) receptory byly inkubovány 1–2 hodiny před elektrofyziologickým snímáním v 1,2 μ M tunicamycinu. Inhibice kontrolních odpovědí vyvolaná PAhPim byla signifikantně větší (48,3 \pm 5,9 %; n = 10) než u buněk bez tunicamycinové inkubace (21,1 \pm 1,9 %; n = 60). To potvrzuje, že palmitoylace ovlivňuje citlivost NMDA receptorů na inhibiční působení neurosteroidů. V kontrolní odpovědi buněk inkubovaných s tunicamycinem byly pozorovány dvě populace buněk, což se dá vysvětlit tím, že (de)palmitoylace je dynamický proces a u některých buněk během 1–2 h inkubace nedošlo k depalmitoylaci.

Z těchto výsledků vyplývá, že zvýšená citlivost NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům po Ca-stimulaci souvisí s depalmitoylací cysteinových zbytků C849, C854 a C871 na CTD GluN2B v blízkosti membrány. Pro nárůst inhibice PAhPim již v kontrolní odpovědi stačí mutace (depalmitoylace) jediného cysteinu.

Jelikož neurosteroidy jsou akompetitivní („use-dependentní“) inhibitory NMDA receptorů (Petrovic *et al.*, 2005; Vyklicky *et al.*, 2014) bylo cílem ověřit, zda změna jeho inhibičního působení na NMDA receptory není způsobena nepřímo – Ca-indukovanou změnou pravděpodobnosti otevření (P_o) nebo inaktivací NMDA receptorů. Z toho důvodu byla měřena míra inhibice 30 μ M PAhPim na WT receptorech aktivovaných 0,55 μ M (oproti 1 μ M), což odpovídá přibližně 50% aktivaci GluN1/GluN2B NMDA receptorů. Jako druhý přístup byly použity mutované receptory, které mají oproti GluN1/GluN2B (WT) receptorům s $P_o = 9,7 \pm 2,8 \%$ ($n = 24$) nižší P_o : (GluN1(I664G)/GluN2B) s mutací v oblasti linkeru ($P_o = 3,5 \pm 0,6 \%$; $n = 4$) a (GluN1/GluN2B(V821A)) s mutací v TMD ($P_o = 6,5 \pm 0,3 \%$; $n = 4$) (Hrcka Krausova *et al.*, 2020) (Obrázek 5.15, Tabulka 5.13). Testovaná a kontrolní odpověď PAhPim vyvolaná nižší koncentrací glutamátu či měřená na mutovaných receptorech se nelišila od WT odpovědi vyvolaných 1 μ M glutamátem. Z toho vyplývá, že nárůst inhibičního působení PAhPim souvisí s Ca-indukovanou depalmitoylací NMDA receptorů a ne s pouhou změnou funkčních parametrů receptoru.



Obrázek 5.15 Nárůst inhibice PAhPim není způsoben inaktivací NMDA receptorů či nižší pravděpodobností otevření. **A)** Ukázka elektrofyziologického záznamu inhibičního působení PAhPim na GluN1/GluN2B (WT) receptory aktivované 0,55 μ M glutamátem, který odpovídá míře inaktivace NMDA receptorů po Ca-stimulaci. Aplikace PAhPim (30 μ M) a 0,55 μ M glutamátu je vyznačena bílým

(respektive černým) obdélníkem. Překryv záznamů kontrolní (černé) a testované (červené) odpovědi zobrazuje nárůst inhibice PAhPim po Ca-stimulaci (normalizováno na velikost proudu před aplikací PAhPim). **B)** Graf reprezentuje průměr inhibice \pm SEM pro PAhPim (30 μ M) před a po Ca-stimulaci na odpovědi vyvolané 0,55 μ M glutamátem a pro mutace s nižší pravděpodobností otevření. Viz Tabulka 5.13. WT: přirozený typ receptoru; PAhPim: pregnanolon hemipimelát.

Tabulka 5.13 Inhibiční účinek PAhPim (30 μ M) na GluN1/GluN2B (WT) a mutované receptory se sníženou pravděpodobností otevření a WT receptory aktivované 0,55 μ M glutamátem exprimované v HEK293 buňkách před ($I_{kontrola}$) a po Ca-stimulaci (I_{test}).

	<i>Inhibice PAhPim (%)</i>				
	$I_{kontrola}$	I_{test}	ΔI	<i>n</i>	[*] <i>p</i>
WT	21,1 \pm 1,9	73,0 \pm 1,8	51,9 \pm 1,8	60	<0,001
GluN1/GluN2B (0,55 μM Glu)	23,5 \pm 6,1	71,9 \pm 4,6	48,4 \pm 6,0	8	<0,001
GluN1(I664G)/GluN2B	24,9 \pm 2,8	68,5 \pm 8,2	43,6 \pm 8,5	4	0,014
GluN1/GluN2B(V821A)	12,0 \pm 6,4	63,8 \pm 11,8	51,8 \pm 9,1	4	0,001

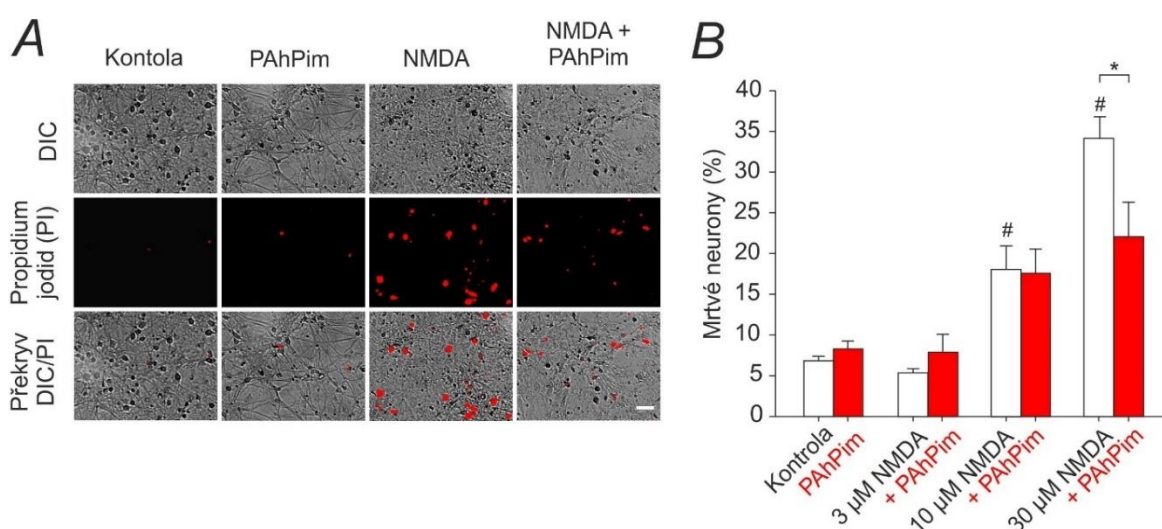
Data prezentována jako průměr \pm SEM. ^{*}*p*-hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi inhibicí v kontrolní ($I_{kontrola}$) a testované (I_{test}) odpovědi (párový t-test); Další porovnání nebyla statisticky významná a nejsou uvedena v tabulce: [#]*p* – porovnání statistické významnosti mezi inhibicí v kontrolní ($I_{kontrola}$) odpovědi receptorů aktivovaných 0,55 μ M glutamátem či mutovaných receptorů oproti WT (jednofaktorová ANOVA, [#]*p* = 0,556); ^T*p* – porovnání statistické významnosti mezi inhibicí v testované (I_{test}) odpovědi receptorů aktivovaných 0,55 μ M glutamátem či mutovaných receptorů oproti WT (jednofaktorová ANOVA, ^T*p* = 0,619); ⁴*p* – porovnání statistické významnosti mezi rozdílem inhibice (ΔI) u receptorů aktivovaných 0,55 μ M glutamátem či mutovaných receptorů oproti WT (jednofaktorová ANOVA, ⁴*p* = 0,678).

PAhPim: pregnanolon hemipimelát; WT: přirozený typ receptoru; *I*: relativní míra inhibice; ΔI : nárůst inhibice; *n*: počet buněk; SEM: střední chyba průměru.

5.3.3 Neuroprotektivní účinek neurosteroidů

V testech akutní toxicity na primárních hipokampálních neuronálních kulturách bylo cílem zjistit, zda Ca-indukované zvýšení inhibičního působení neurosteroidů na NMDA receptory může mít neuroprotektivní účinky. Inkubace neuronů s NMDA vede k jejich nadměrné aktivaci, nárůstu intracelulární koncentrace Ca^{2+} a k buněčné smrti (Choi *et al.*, 1988), kterou lze kvantifikovat jako buňky pozitivní na PI – marker buněčné smrti (váže se na DNA mrtvých buněk, u zdravých neprojde membránou). Neurony inkubované dvě hodiny s NMDA vykazují nárůst mrtvých neuronů v závislosti na koncentraci NMDA (3, 10, 30 μ M). Pokud ale byly

neurony inkubovány s 30 μ M NMDA spolu s neurosteroidem PAhPim (30 μ M), je pozorováno signifikantní snížení PI-pozitivních neuronů, a tedy neuroprotektivní účinek PAhPim, který koreluje s výsledky elektrofyzilogických experimentů, kdy je pozorován nárůst inhibičního působení PAhPim po Ca-stimulaci (Obrázek 5.16, Tabulka 5.14). Z toho dále vyplývá, že Ca-indukovaný nárůst inhibičního působení PAhPim na NMDA receptory probíhá za patologických podmínek, čímž by nemuselo docházet k nežádoucím vedlejším efektům na synaptický přenos.



Obrázek 5.16 Neuroprotektivní účinek pregnanolon hemipimelátu (PAhPim) v testu akutní toxicity. **A)** Ukázky hipokampálních neuronů značených PI v kontrole, po inkubaci 30 μ M PAhPim (PAhPim), 30 μ M NMDA (NMDA) a 30 μ M PAhPim a 30 μ M NMDA (NMDA + PAhPim). Měřítka značí 50 μ m. **B)** Graf vyjadřující procento mrtvých neuronů počítaný jako počet PI-značených neuronů vztážený na celkový počet neuronů. # značí signifikantní nárůst počtu mrtvých neuronů oproti kontrole, * značí signifikantní rozdíl v % mrtvých neuronů mezi inkubací neuronů s NMDA a NMDA+PAhPim (viz Tabulka 5.14).

Tabulka 5.14 Neuroprotektivní účinek PAhPim (30 μ M) v testu akutní toxicity na neuronálních hipokampálních kulturách.

	Látka	Mrtvé neurony (%)	<i>n</i>	*<i>p</i>	#<i>p</i>
A	Kontrola	6,8 \pm 0,6	11	A versus B	-
B	PAhPim	8,3 \pm 1,0	10	0,212	
C	3 μM NMDA	5,3 \pm 0,5	4	C versus D	A versus C
D	3 μM NMDA + PAhPim	7,9 \pm 2,2	4	0,303	0,667
E	10 μM NMDA	18,1 \pm 2,9	7	E versus F	A versus E
F	10 μM NMDA + PAhPim	17,6 \pm 3,0	7	0,910	<0,001
G	30 μM NMDA	34,1 \pm 2,7	9	G versus H	A versus G
H	30 μM NMDA + PAhPim	22,1 \pm 4,3	9	0,029	<0,001

Data prezentována jako průměr \pm SEM. **p*-hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi procentem mrtvých neuronů v kulturách inkubovaných bez a s PAhPim (nepárový t-test); #*p*-hodnoty porovnávají statistickou významnost mezi procentem mrtvých neuronů v kontrole a kulturách inkubovaných s různou koncentrací NMDA (jednofaktorová ANOVA a vícečetné srovnání vůči kontrole metodou Holm-Šidák).

PAhPim: pregnanolon hemipimelát; NMDA: N-methyl-D-aspartátová kyselina; *n*: počet nezávislých opakování; SEM: střední chyba průměru.

6 DISKUZE

6.1 Vztah mezi strukturou inhibičních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

NMDA receptory jsou zásadní pro excitační přenos a synaptickou plasticitu, ale jejich nadměrná aktivace vede k excitotoxické buněčné smrti a patologickým stavům, které doprovází například traumatické poškození mozku, mrtvici či neurodegenerativní onemocnění jako Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba (Dingledine *et al.*, 1999). I proto se hledají způsoby, jak selektivně inhibovat nadměrnou aktivaci NMDA receptorů při zachování excitačního přenosu. Jedním ze způsobů jsou inhibiční neurosteroidy odvozené od PAS.

Z řady předchozích SAR studií vyplývá, že pro zachování inhibičního působení strukturálních analogů PAS na NMDA receptory je důležitý záporně nabitý substituent v α -stereochemii na C3 a β -stereochemie na C5 steroidního jádra (Irwin *et al.*, 1994; Park-Chung *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2000). Následně se ukázalo, že záporně nabitý substituent na C3 steroidního jádra PAS může být nahrazen substituentem s pozitivním či obojetným nábojem (amfiont) při zachování inhibičního účinku C3-substituentu (Borovská *et al.*, 2012).

V další SAR studii (Kudova *et al.*, 2015) byl objasněn význam substituentů na pozicích, C16 a C17 PAS neboli modifikace D-kruhu, kdy došlo k významnému zlepšení inhibičních účinků nově syntetizovaných neurosteroidů (IC_{50} od 90 nM do 5,4 μ M) oproti PAS ($IC_{50} = 24,6 \pm 2,4 \mu$ M). V této navazující studii byl objasněn význam samotného steroidního D-kruhu, kdy byla testována nová série látek 1.1–1.10 odvozených od PAS s modifikací na C2, C7 a C8 perhydrofenantrenového kruhu. Všechny testované látky 1.1–1.10, kterým zcela chybí D-kruh steroidního jádra, si zachovaly inhibiční působení na NMDA receptory. Jejich hodnoty IC_{50} jsou ale až na látky 1.9 a 1.10, které na C7 a C8 nenesou žádné substituenty, vyšší než pro přirozeně se vyskytující PAS, a tedy tyto strukturální modifikace nevedou ke zlepšení účinků. Jedním z možných vysvětlení je, že chybějící D-kruh zvyšuje lipofilitu látek, a tedy zvyšuje hodnotu IC_{50} (Kudova *et al.*, 2015; Slavikova *et al.*, 2016).

Pro případné klinické využití je důležitá specifita účinku, proto bylo naším cílem zjistit, zda chybějící D-kruh steroidního jádra ovlivňuje podjednotkovou specifitu. U nejúčinnějšího inhibitoru z testované série, látky 1.9, byla měřena podjednotková specifita

na rekombinantních GluN1/GluN2A–D a nativních NMDA, AMPA a GABA receptorech. Látka 1.9, vykazuje mírnou podjednotkovou specifitu pro GluN2B oproti GluN2A, GluN2C a GluN2D, kdy je pro GluN2B signifikantně méně účinným inhibítoem (Obrázek 5.2; Tabulka 5.2). Tím se odlišuje od PAS, který je přibližně dvakrát účinnější inhibítoem podjednotek GluN2C a GluN2D ($IC_{50} = 26$ a $30 \mu\text{M}$) než GluN2A a GluN2B ($IC_{50} = 50$ a $44 \mu\text{M}$) (Petrovic *et al.* 2005).

Chybějící D-kruh u látky 1.9 ale hraje roli v selektivitě účinku mezi nativními NMDA a GABA receptory. Látka 1.9 je 4,4x účinnější inhibítoem GABA než NMDA receptorů (Obrázek 5.3; Tabulka 5.3). V porovnání 17 β -methyl-5 β -androstan-3 α -yl 3-sulfát – strukturní analog PAS s methylovým substituentem na C17, který byl nejúčinnějším inhibítoem z testované série modifikací D-kruhu (Kudová *et al.*, 2015) – nemá signifikantně odlišné působení na nativních GABA a NMDA receptorech (Kudová *et al.*, 2015). Objasnění významu D-kruhu pro receptorovou selektivitu je důležitá informace pro další SAR studie. Nicméně i kombinovaný účinek neurosteroidů na NMDA a GABA receptory vykazuje neuroprotektivní účinky bez vedlejších psychomimetických účinků (Rambousek *et al.*, 2011; Kleteckova *et al.*, 2014; Holubova *et al.*, 2014; Vyklicky *et al.*, 2016). Látka 1.9 je zároveň šestkrát účinnější inhibítoem nativních NMDA receptorů než AMPA receptorů, což je obdobné jako u 17 β -methyl-5 β -androstan-3 α -yl 3-sulfátu (Kudová *et al.*, 2015), jenž je desetkrát účinnější inhibítoem nativních NMDA receptorů než AMPA receptorů.

Druhou testovanou skupinou látek byly amidové neurosteroidy odvozené od PAS a PAG. Neurosteroid PAG, syntetický analog PAS (Borovská *et al.*, 2012), který prochází hematoencefalickou bariérou, v předchozích *in vivo* studiích vykazoval neuroprotektivní účinky, kdy PAG nezpůsobuje vedlejší psychomimetické symptomy a snižuje excitotoxické poškození mozku (Rambousek *et al.*, 2011), v behaviorálních testech má anxiolytické a antidepresivní účinky (Holubova *et al.*, 2014) a v modelu fokální cerebrální ischemie vykazuje neuroprotektivní účinky (Kleteckova *et al.*, 2014).

Inhibiční účinky PAG jsou ale dvakrát horší ($IC_{50} = 52 \mu\text{M}$) než pro nativní PAS ($IC_{50} = 25 \mu\text{M}$), proto byla připravena nová série látek 2.2–2.12 – C3-amidových analogů PAS s modifikacemi na C17 – s cílem nalézt účinnější inhibitory NMDA receptorů. Druhou motivací pro SAR studie C3-amidových neurosteroidů byl fakt, že C3-hemiesterová vazba je *in vivo* náchylná k hydrolyze pomocí esteráz. To vedlo k syntéze skupiny látek, kde různé negativně

nabité substituenty jsou na C3 steroidního jádra připojeny pomocí amidové vazby s cílem zlepšit účinek, rozpustnost, propustnost a náchylnost k degradaci v organismu. Tato strukturní C3-amidová modifikace se ukázala jako úspěšná, protože všechny nově připravené analogy mají nižší hodnoty IC_{50} (od 1,4 do 21,7 μM) a jsou tak účinnějšími inhibitory GluN1/GluN2B receptorů než výchozí PAS a PAG ($IC_{50} = 25$ a 52 μM).

Pro další charakterizaci byla vybrána látka 2.6 – C3-amidový analog PAS bez substituentu na C17. Na rekombinantních GluN1/GluN2A–D receptorech nevykazuje podjednotkovou specifitu (Tabulka 5.5). Z toho lze usuzovat, že za podjednotkovou specifitu je zodpovědná kombinace substituentů na C3 a C17, protože látky 2.6 (C3-amid, C17-bez substituentu), 1.9 (C3-sulfát, bez D-kruhu) či 17 β -methyl-5 β -androstan-3 α -yl 3-sulfát (C3-sulfát, C17 methyl) (Kudova *et al.*, 2015) nejsou na rozdíl od PAS (Petrovic *et al.*, 2005) specifické pro rekombinantní podjednotky NMDA receptorů.

Při měření na nativních receptorech v hipokampálních neuronálních kulturách (Obrázek 5.5; Tabulka 5.6) je ale látka 2.6 přibližně dvakrát účinnějším inhibitorem nativních NMDA receptorů než GABA receptorů ($IC_{50} = 8,3$ vs. 17,0 μM), což je odlišné od dříve studovaných strukturních analogů (Kudova *et al.*, 2015; Slavikova *et al.*, 2016), jejichž účinek se na NMDA a GABA receptory nelišil či byl vyšší pro GABA receptory. Zároveň látka 2.6 má minimální účinek na AMPA receptory ($IC_{50} = 276$ μM), což je opět výrazně vyšší hodnota IC_{50} než pro PAS a dříve studované analogy (Kudova *et al.*, 2015; Vyklicky *et al.*, 2016; Slavikova *et al.*, 2016).

Kromě toho se ukázalo, že PAS a jeho syntetické analogy, především pregnanolon hemipimelát (PAhPim) (Vyklicky *et al.*, 2016), preferenčně inhibují tonicky aktivované receptory bez vlivu na fazicky aktivované receptory, což je další důležitá vlastnost pro případné terapeutické využití neurosteroidu jako neuroprotektivní látky bez vedlejších psychomimetických účinků. I látka 2.6 vykazuje vyšší inhibiční působení na tonicky aktivované NMDA a GABA receptory (Adla *et al.*, 2018).

V rámci dalších doporučených testů pro brzké fáze vývoje nových léčiv (Geret *et al.*, 2009) bylo stanoveno, že látka 2.6 není mitotoxická ani hepatotoxická, nezpůsobuje indukci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a má vyšší stabilitu v krevní plasmě než PAG, což z látky 2.6 dělá výchozí látku pro další testování a navazující SAR studie s cílem optimalizovat farmakologické a farmakokinetické parametry (Adla *et al.*, 2018).

6.2 Vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

Nadměrná aktivace NMDA receptorů stejně jako jejich hypofunkce vede k řadě patologických stavů. Nedostatečná aktivita NMDA receptorů je spojována s mentálním postižením a s věkem podmíněnou ztrátou paměti, ale i s poruchami autistického spektra a schizofrenií. S rozvojem sekvenačních metod v posledních letech byly objeveny mutace v genech *GRIN* kódující podjednotky NMDA receptorů, které přímo souvisí s hypofunkcí NMDA receptorů (Hu *et al.*, 2016; Vyklicky *et al.*, 2018). Jednou z možností, jak kompenzovat hypofunkci NMDA receptorů, jsou neurosteroidy s potenciačním účinkem. U přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu PES již byl popsán efekt na zlepšení paměti po *in vivo* podání (Flood *et al.*, 1992).

Většina studií vztahu mezi strukturou a účinkem neurosteroidů se zaměřuje na inhibiční syntetické analogy odvozené od PAS, a tak o vztahu mezi strukturou a účinkem pozitivních alosterických modulátorů NMDA receptorů stále nebylo příliš informací. V této pilotní studii byl po vzoru strukturálních analogů PAS testován vztah mezi délkou substituentu na C3 a různými modifikacemi na C17 steroidního kruhu PES.

Všechny testované látky 3.2–3.24 vykazovaly potenciační efekt, z toho vyplývá, že modifikace ani kompletní odstranění substituentu na C17 nezpůsobí ztrátu potenciačního účinku analogů PES. Nejúčinnější byly strukturální analogy androst-5-enu (látky 3.14–3.18) – neurosteroidy bez substituentu na C17. Nejúčinnější neurosteroid z celé testované série, látka 3.15, potencoval odpovědi GluN1/GluN2B receptorů více než čtyři a půl krát. To je ve shodě s výsledky SAR studie inhibičních neurosteroidů, kdy neurosteroidy bez substituentu na C17 jsou účinnější modulátory NMDA receptorů než přirozeně vyskytující se PAS (Kudova *et al.*, 2015; Slavikova *et al.*, 2016; Adla *et al.* 2018).

Substituent na C17 také ovlivňuje optimální délku C3-hemiesterového zbytku pro maximální potenciační účinek. Ze skupiny 20-oxo-pregn-5-enů byla nejúčinnější látka 3.6 s šestiuhlíkatým C3 zbytkem, po odstranění 20-oxo skupiny (skupina pregn-5-enů) se nejúčinnější stala látka 3.11 s pětiuhlíkatým C3 zbytkem a pokud byl C17 zcela bez substituentu (skupina androst-5-enů) nejúčinnější byla látka 3.15 se čtyřuhlíkatým C3 zbytkem. U 17-oxo substituentu byla naopak nejúčinnější látka 3.24 s devítiuhlíkatým C3-zbytkem. Z výsledků dále vyplývá, že do vazebného místa pro potenciační neurosteroidy se při zachování potenciačního

účinku na GluN1/GluN2B mohou vázat neurosteroidy s variabilní délkou C3-substituentu – od krátkých dvouuhlíkatých (látka 3.2) až po dlouhé desetiuhlíkaté (látka 3.24) hemiesterové zbytky.

U C3-hemiesterových analogů PAS byl nejúčinnější inhibitor pregnanolon hemipimelát – látka s hemiesterovým (sedmiuhlíkatým) substituentem, nejdelším z testované série (Vyklícky *et al.* 2016). C3-hemiesterový analog PES (látka 3.7), měl z testované skupiny 20-oxo-pregn-5-enů (látky 3.2–3.8) nejvyšší E_{max} , největší relativní afinitu (nejnižší EC_{50}) ale měla látka 3.6 s šestiuhlíkatým hemiadipátovým C3-zbytkem. Hodnota EC_{50} se v rámci skupiny 20-oxo-pregn-5-enů šestinásobně lišila – od EC_{50} 8,5 μ M (látka 3.6) až po $EC_{50} = 48,6$ μ M (látka 3.2). U látek 3.2, 3.4 a 3.5 byl již dříve popsán potenciační efekt na NMDA měřený jako akumulace Ca^{2+} v hipokampálních neuronech (Weaver *et al.*, 2000).

Látka 3.6 má přibližně stejný účinek na jednotlivé podjednotky NMDA receptorů, čímž se liší od PES, který má na NMDA receptory kombinovaný potenciačně-inhibiční efekt. Výsledný potenciační účinek PES na GluN2A a GluN2B a inhibiční na GluN2C a GluN2D je výsledkem jeho rozdílné efektivity než zdánlivé afinity, jež je naopak vyšší pro podjednotky GluN2C a GluN2D než pro GluN2A a GluN2B (Horak *et al.*, 2004; Horak *et al.*, 2006). Pro látku 3.6 kombinovaný efekt nebyl pozorován (Obrázek 5.7) (Krausova *et al.*, 2018). Teprve v loňském roce bylo identifikováno vazebné potenciační místo PES nacházející se v transmembránové doméně na M1 a M4 helixech GluN2B a M3 helixu GluN1, kdy potenciační účinek PES je způsobem stabilizací otevřeného stavu M3 helixu GluN1 podjednotky (Hrcka Krausova *et al.*, 2020).

Na nativních receptorech v hipokampálních kulturách má látka 3.6 a PES typově stejné účinky – obě potencují NMDA receptory a inhibují AMPA a GABA receptory, liší se ale mírou účinku (Obrázek 5.8). Látka 3.6 je více selektivní, protože má jen minimální účinek na AMPA receptory a je účinnější modulátor nativních NMDA receptorů (potenciace) a GABA (inhibice) receptorů než PES.

6.3 Vliv Ca^{2+} na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory

Během našich SAR experimentů byl u inhibičních neurosteroidů pozorován rozptyl účinku na NMDA receptory i o více než 30 procent, často i při opakované aplikaci neurosteroidu během delšího měření na jedné buňce. To nás vedlo k myšlence, že by citlivost NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům mohla být ovlivněna vnitřními mechanismy buněk. A jelikož NMDA receptory jsou po aktivaci propustné pro Ca^{2+} (MacDermott *et al.*, 1986) a tím se podílí na řadě signalizačních procesů, naším cílem bylo objasnit možný vliv Ca^{2+} na účinek neurosteroidů na NMDA receptory.

V prvním kroku byl optimalizován protokol Ca-stimulace. Intracelulární koncentrace Ca^{2+} byla zvyšována prostřednictvím dialýzy intracelulárního prostoru pomocí ICS obsahující Ca^{2+} či různě dlouhou aktivací NMDA receptorů v přítomnosti Ca^{2+} . Testováno bylo také použití různých chelatačních činidel – BAPTA s rychlou kinetikou či EGTA s pomalejší kinetikou vazby (Stern, 1992), kdy ale nebyl pozorován žádný rozdíl v účinku na míru inhibice, protože pravděpodobně u obou činidel byla Ca-stimulací překročena jejich pufrovací kapacita.

Všechny způsoby zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} vedly ke zvýšení inhibičního působení neurosteroidů. V dalších experimentech byl k Ca-stimulaci využíván protokol aktivace NMDA receptorů 1 mM glutamátem v prostředí 2 mM Ca^{2+} ECS po dobu 50 s, který nejvíce připomíná přirozenou aktivaci NMDA receptorů. Tato Ca-stimulace nebyla pro buňky příliš toxická a umožnila další měření elektrofyziologických odpovědí (testovaná odpověď), zároveň ale bylo dosaženo stabilního efektu. Při opakované Ca-stimulaci byla míra inhibice PAhPim v testované odpovědi podobná jako již po první Ca-stimulaci. U některých buněk došlo při opakované Ca-stimulaci k mírnému nárůstu (o 6–18 %) míry inhibice PAhPim na hodnoty podobné míře inhibice PAhPim na mutovaných receptorech GluN1(R839X)/GluN2B(R847X), kterým chybí obě CTD. Z toho lze usuzovat, že míra inhibice PAhPim na mutovaných receptorech bez CTD dosahuje svého maxima.

To, že pozorovaný efekt skutečně souvisí s nárůstem intracelulární koncentrace Ca^{2+} bylo potvrzeno i měřením po stimulaci v ECS bez Ca^{2+} (Obrázek 5.10), kdy nedošlo k signifikantnímu nárůstu míry inhibice oproti stimulaci v 2 mM Ca^{2+} ECS (Ca-stimulace). Měření volné koncentrace Ca^{2+} pomocí FURA a současné elektrofyziologické snímání potvrdilo, že zvýšená citlivost NMDA receptorů k neurosteroidům přetrvává i 30 minut

po Ca-stimulaci, nezávisle na aktuální intracelulární koncentraci Ca^{2+} (Obrázek 5.11) a Ca^{2+} tak mají spíše signalizační roli.

Postupnou mutací NMDA receptorů byl objasněn molekulární mechanismus zvýšeného inhibičního působení neurosteroidů na NMDA receptory. Protože aktivací NMDA receptorů dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} , byla studie v prvním kroku zaměřena na CTD podjednotek GluN1/GluN2B NMDA receptorů (Obrázek 5.12). Při delecii CTD GluN1 docházelo k nárůstu inhibice po Ca-stimulaci podobně jako u WT receptorů. Pokud ale byla mutací odstraněna CTD obou podjednotek (GluN1(R839X)/GluN2B(R847X) nebo pouze CTD GluN2B, nárůst inhibice byl pozorován již v kontrolních odpovědích a po Ca-stimulaci nedocházelo k dalším změnám, což vedlo k předpokladu, že místo zodpovědné za regulaci zvýšené citlivosti NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům leží na CTD GluN2B podjednotky. CTD GluN2B podjednotky je interakčním místem řady proteinů, například postsynaptického PSD-95 (postsynaptic density protein-95) (Kornau *et al.*, 1995), α -actininu (Wyszynski *et al.*, 1997), a místem, kde probíhají posttranslační modifikace jako například fosforylace (Chen a Roche, 2007), palmitoylace (Hayashi *et al.*, 2021) či ubiquitinace (Jurd *et al.*, 2008).

V dalším kroku byla systematickou mutací NMDA receptorů identifikována oblast na CTD GluN2B podjednotky v těsné blízkosti membrány (R847–E878), která se významně podílí na zvýšené citlivosti NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům (Obrázek 5.13). V této oblasti byly identifikovány tři cysteiny, které mohou být palmitoylovány (Hayashi *et al.*, 2009) (Obrázek 5.14). Palmitoylace je vratná posttranslační modifikace, kdy dochází k připojení šestnáctiuhlíkového acylového zbytku kyseliny palmitové na cystein činností palmitoyltransferáz. Naopak depalmitoylace probíhá prostřednictvím palmitoylthioesteráz (Conibear a Davis, 2010). Palmitoylace se prostřednictvím protein-protein interakcí a interakcí proteinů s membránou podílí na signalizaci, sbalování proteinů, transportu, lokalizaci i orientaci v membráně (Charollais a Van Der Goot, 2009; Matt *et al.*, 2019). Palmitoylace byla popsána pro mnoho proteinů lokalizovaných blízko buněčné membrány nebo v cytoplasmě, včetně iontových kanálů – NMDA (Hayashi, 2021), AMPA (Hayashi *et al.*, 2005), GABA_A (Rathenberg *et al.*, 2004), kainátových (Pickering *et al.*, 1995) či purinergních P2X7 receptorů (Gonnord *et al.*, 2009).

Podjednotka GluN1, která je součástí všech funkčních NMDA receptorů, není palmitoylována (Hayashi, 2021). Podjednotky GluN2A a GluN2B NMDA receptorů mají na CTD dvě palmitoylační místa. Palmitoylace první oblasti v blízkosti membrány (C848, C853, C870 na GluN2A; C849, C854, C871 na GluN2B) stabilizuje NMDA receptory na povrchu, a tím zvyšuje povrchovou expresi. Naopak palmitoylace v druhé oblasti (C1214, C1217, C1236, C1239 na GluN2A; C1215, C1218, C1239, C1242, C1245 na GluN2B) snižuje povrchovou expresi NMDA receptorů, protože dochází k zadržování receptorů v Golgiho komplexu (Hayashi *et al.*, 2009; Hayashi, 2021).

Podobně GluA podjednotka AMPA receptorů má dvě známá palmitoylační místa, první v M2 membránové doméně, jehož palmitoylace zvyšuje povrchovou expresi receptorů, a druhé na CTD, které naopak, pokud je palmitoylované, snižuje povrchovou expresi a PKC fosforylaci serinů 816 a 818 na CTD GluA1 AMPA receptorů (Lin *et al.*, 2009; Hayashi, 2021). Na CTD homomerních GluK2 kainátových receptorů byla popsána dvě palmitoylační místa (C827, C840), která snižují PKC fosforylaci (Pickering *et al.*, 1995).

Porovnání sekvencí CTD v blízkosti membrány i u dalších glutamátových receptorů (Obrázek 6.1) naznačuje, že interakce CTD podjednotek GluN2A–D, GluA1 a GluK1–2 s membránou, by mohla být ovlivňována (de)palmitoylací v podobném duchu, jako v našem případě popsaná interakce CTD GluN2B. Na podjednotkách GluN1, GluN3A, GluA2–3 v CTD oblasti blízké membráně se cysteinové zbytky, které by mohly být palmitoylovány, nevyskytují. Při pilotním experimentu vlivu Ca-stimulace na GluN1/GluN2A receptory byl obdobně jako u GluN1/GluN2B pozorován nárůst inhibice v testované odpovědi po Ca-stimulaci, ale vzhledem k jiným biofyzikálním parametrům jednotlivých podjednotek by pro GluN1/GluN2A bylo potřeba optimalizovat protokol Ca-stimulace.

```

GluN1 (828) EIA Y-----K-RHKDARRKQMQLAFAAVNVWR-----K-----NLQDRKSGRAEPDP
GluN2A (837) EHLFYW K LRF-CFTGVCSDRPGLLFSISRGIY-----S-----CIHGVHIEEKKK--
GluN2B (838) EHLFYW QFRH-CFMGVCSGKPGMVFSISRGIY-----S-----CIHGVAIEERQ SVM
GluN2C (846) EHLVYW KLRH-SVPN--SSQLDFLLAFSRGIY-----S-----CFNGVQSLPSPARP
GluN2D (860) EHLVYW RLRH-CLGP--THRMDFLLAFSRGM Y-----S-----CCSAEAAPP-PAKP
GluN3A (949) EHIVHR LLLP-RIKNKS--KLQYWLHTSQRFH-----R-----ALNTSFVEEKQPRS
GluA1 (827) EFCYKS RSESKRMKGFCLIP-QQSINEAIRTSTLPRNSGAGASGGGGSGENGRVVS-QDFPK
GluA2 (834) EFCYKS RAEAKRMKVAKNPQ---NINPSSSQN--SQNFATYKEGYNVYGIESVKI-----
GluA3 (839) EFCYKS RAESKRMKLTKN TQ---NFKPAPATN--TQNYATYREGYNVYGTESVKI-----
GluK1 (856) EFLYKS RKNN DVEQKGKSSRLRFYFRNK-----VRFHGSKKESLGV EKCLSFN
GluK2 (841) EFLYKS KKNAQLEKRSFCSA-----

```

Obrázek 6.1 Porovnání aminokyselinových sekvencí části C-terminální domény (CTD) v těsné blízkosti membrány jednotlivých podjednotek NMDA, AMPA a kainátových receptorů potkana obecného (*Rattus norvegicus*). Na membránovou část M4 domény (vyznačena žlutě) navazuje aminokyselinová sekvence části CTD, cysteiny jsou vyznačeny červeně, číslování odpovídá finálnímu proteinu.

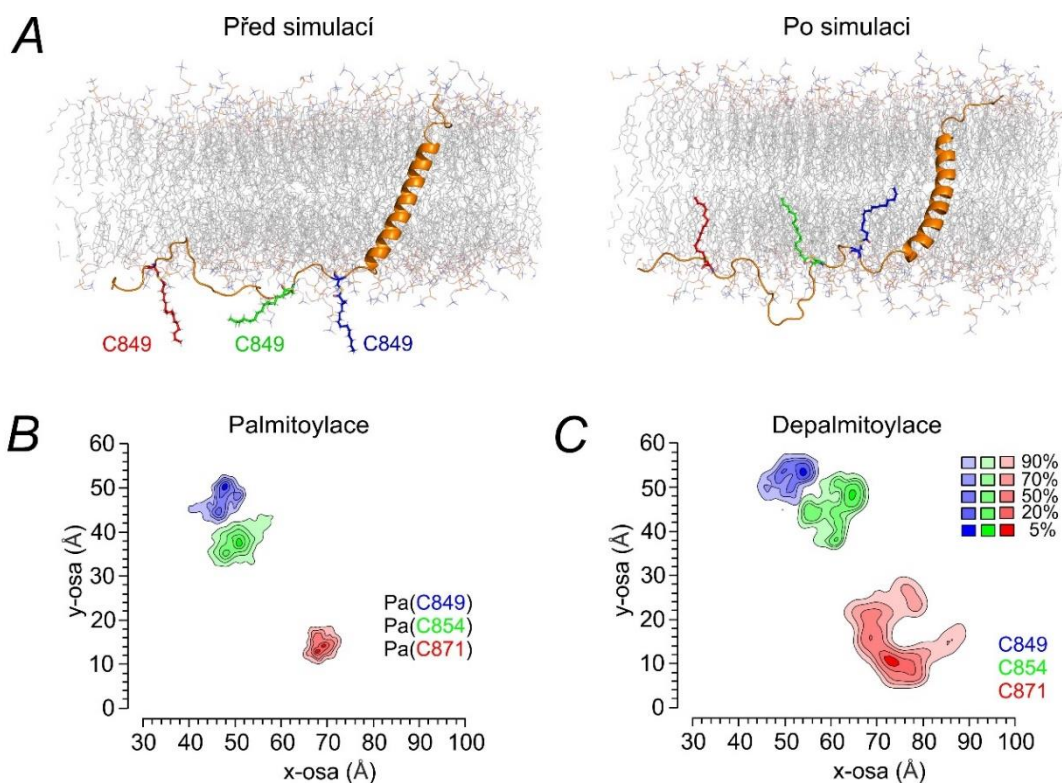
Ačkoliv se řada studií zaměřuje na souvislost mezi palmitoylací a povrchovou expresí či prostorovou orientací receptorů (Shipston, 2011; Lussier *et al.*, 2015), relativně málo informací máme o vlivu palmitoylace na funkční a kinetické parametry receptorů. Palmitoylace napětově řízených draselných kanálů (Kv-1.1) zvyšuje napětovou senzitivitu (Gubitosi-Klug *et al.*, 2005), zatímco palmitoylace β 2a podjednotky N-typu vápníkových kanálů ovlivňuje napětově-závislou inaktivaci (Qin *et al.*, 1998). Alaninová záměna tří cysteinů (C848, C853, C870) na GluN2A podjednotce NMDA receptoru vedla ke snížení potenciačního účinku kyseliny dokosahexaenové (DHA) na NMDA receptory (Wilding *et al.*, 2016).

V rámci studie (Hubalkova *et al.*, 2021) byl kromě vlivu palmitoylace na citlivost NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům zkoumán i vliv palmitoylace na funkční kinetické vlastnosti NMDA receptorů, kdy bylo provedeno snímání jednotlivých kanálů (single-channel recordings) v HEK293 buňkách exprimujících GluN1/GluN2B (WT) nebo GluN1/GluN2B(AAA) receptory. Na základě snímání spontánní aktivity jednotlivých kanálů byly vypočítány kinetické parametry jako je pravděpodobnost otevření (P_o – Open Probability), průměrná doba otevření (MOT – Mean Open Time) a průměrná doba zavření (MCT – Mean Closed Time). Mutované GluN1/GluN2B(AAA) receptory vykazovaly 55% pokles P_o oproti WT (z $P_o = 0,10 \pm 0,02$ pro WT na $P_o = 0,045 \pm 0,011$ pro mutovaný receptor, $p = 0,032$, nepárový t-test) a také prodloužení doby strávené v zavřeném stavu receptoru

(MCT = 83 ± 29 ms pro WT a MCT = 159 ± 39 ms pro mutovaný receptor), tato hodnota ale nebyla statisticky významná ($p = 0,131$, nepárový t-test) (Hubalkova *et al.*, 2021).

Detailnější analýza kinetických parametrů odhalila u mutovaných (depalmitoylovaných) receptorů GluN1/GluN2B(AAA) změny v distribuci jednotlivých kinetických parametrů pro otvírání i zavírání kanálů – s preferencí pro zavřený stav – oproti WT (Hubalkova *et al.*, 2021). Tyto výsledky naznačují, že depalmitoylace CTD GluN2B podjednotky NMDA receptoru v těsné blízkosti membrány má vliv na funkční kinetické vlastnosti NMDA receptorů a mohou poskytnout alternativní vysvětlení pro funkční kinetické změny pozorované u NMDA receptorů bez CTD (Maki *et al.*, 2012; Punnakkal *et al.*, 2012; Iacobucci a Popescu, 2020).

Popsané změny kinetických parametrů korespondují s výsledky molekulového modelování, které ukazují, že palmitoylace stabilizuje CTD GluN2B v membráně a zprostředkovává otevření kanálů (Hubalkova *et al.*, 2021). Experimentální výsledky naznačují, že palmitoylace tří cysteinů (C849, C854, C871) na CTD GluN2B v blízkosti membrány mění citlivost NMDA receptorů k PAhPim, který se váže do aktivního místa ve vnějším (extracelulárním) ústí póru NMDA receptoru (Vyklícky *et al.*, 2016). Dále bylo studováno, zda má (de)palmitoylace CTD GluN2B vliv na strukturní změny NMDA receptoru – zda dochází ke strukturním změnám na CTD GluN2B, která je velmi dynamická, či zda například dochází ke změnám v interakci CTD s membránou. Z tohoto důvodu byla provedena molekulárně dynamická simulace části NMDA receptoru, konkrétně M4-E878X části GluN2B podjednotky, v interakci s membránou. Simulace ukázala, že palmitoylovaná i depalmitoylovaná část CTD GluN2B receptoru byla po většinu času v kontaktu s membránou. V případě simulací palmitoylované CTD, kdy alifatické řetězce kyseliny palmitové na začátku simulace směřovaly do roztoku, došlo k velmi rychlé (během méně než 100 ns) reorganizaci a zanoření zbytků kyseliny palmitové do membrány, kde zůstaly stabilní po celý zbytek simulace. Naopak depalmitoylovaný CTD zbytek vykazoval během simulace mnohem větší mobilitu (Obrázek 6.2) (Hubalkova *et al.*, 2021).



Obrázek 6.2 Molekulové modelování strukturálních změn v souvislosti s palmitoylací C-terminální domény (CTD) GluNB. **A)** Orientace tří palmitoylovaných cysteňů (C849, C854 a C871) části GluN2B podjednotky NMDA receptorů (M4-E878X, oranžově) v membráně – před simulací (vlevo) a po simulaci (vpravo). Vyjádření prostorové mobility části CTD GLuN2B v membráně během simulace pro **B)** palmitoylovaný a **C)** depalmitoylovaný receptor. Intenzita barvy značí dobu strávenou v dané pozici. (Upraveno z Hubalkova *et al.*, 2021).

Aktivace NMDA receptoru a s tím související signalizace prostřednictvím Ca^{2+} je zásadní pro synaptický přenos, indukci LTP a LTD. Nicméně nadměrná aktivace NMDA receptorů a dlouhodobě zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} vede k excitotoxickým buněčným procesům. Proto je intracelulární hladina vápníku kontrolována řadou mechanismů – pomocí intracelulárních pufrů, aktivním přenosem z buňky či Ca-indukovanou inaktivací NMDA receptorů (Mayer a Westbrook, 1985; Zorumski *et al.*, 1989; Legendre *et al.*, 1993; Vyklicky, 1993; Medina *et al.*, 1995; Iacobucci a Popescu, 2020). Námí popsaná Ca-indukovaná depalmitoylace CTD GluN2B podjednotky v těsné blízkosti membrány a s tím související změny kinetických parametrů a zvýšení citlivosti NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům tak může být dalším z molekulárních mechanismů, který brání nadměrnému vstupu Ca^{2+} do buňky.

7 SOUHRN

Disertační práce přináší nové poznatky o vztahu mezi strukturou a potenciačním či inhibičním účinkem neurosteroidů na NMDA receptory, což je důležité pro hledání nových potenciálních léčiv, ale především pro hlubší pochopení funkce a signalizace prostřednictvím těchto receptorů. Tato práce na molekulární úrovni objasňuje možný neuroprotektivní efekt zvýšeného inhibičního působení neurosteroidů na NMDA receptory za patologických podmínek, kdy dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} .

7.1 Vztah mezi strukturou inhibičních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

- V první SAR studii byl charakterizován význam steroidního D-kruhu pro inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory. Všechny nově syntetizované strukturální analogy neurosteroidů bez D-kruhu odvozené od PAS – C3-sulfátové a C3-hemisukcinátové perhydrofenantreny (látky 1.1–1.10) – si zachovaly inhibiční působení, ale ani jedna ze strukturálních modifikací nevedla k výraznému zlepšení inhibičního účinku oproti PAS. Nejúčinnější inhibitor z testované série – látka 1.9, vykazuje nízkou podjednotkovou specificitu na GluN1/GluN2A–D NMDA receptory. Zároveň je ale selektivním inhibitorem nativních GABA a NMDA receptorů v hipokampálních neuronech. Naopak na nativní AMPA receptory má látka 1.9 pouze mírné inhibiční účinky.
- Druhá SAR studie byla zaměřena na C3-amidové analogy PAS a PAG s cílem otestovat modifikace pro zlepšení účinnosti a biologické stability. Všechny nově syntetizované látky (2.2–2.12) vykazovaly vyšší inhibiční působení na rekombinantních GluN1/GluN2B NMDA receptorech exprimovaných v HEK293 buňkách než PAS a PAG. Látka 2.6, vybraná pro další charakterizaci, nevykazuje podjednotkovou specificitu pro rekombinantní GluN1/GluN2A–D. Na rozdíl od dříve studovaných analogů je ale látka 2.6 dvakrát účinnější inhibitor nativních NMDA než GABA receptorů, účinek na AMPA receptory je minimální, což z látky 2.6 dělá výchozí sloučeninu pro další testování a SAR studie s cílem optimalizovat farmakologické a farmakokinetické parametry.

7.2 Vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

- V nově připravené sérii strukturálních analogů PES byly studovány látky s rozdílnou délkou hemiesterového zbytku na C3 a s modifikacemi D-kruhu na C17 s cílem popsat souvislost mezi strukturou a účinkem neurosteroidů na NMDA receptory.
- Všechny nově syntetizované neurosteroidy (látky 3.2–3.24) vykazovaly pozitivní (potenciační) účinek na aktivitu GluN1/GluN2B receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách. Maximální míra potenciace se pohybovala od 8 % až po 452 %.
- Potenciační účinek je závislý na délce C3-hemiesterového zbytku v kombinaci s typem substituentu na C17. Substituent na C17 steroidního jádra může být modifikován či zcela odstraněn při zachování potenciačního účinku. Nejúčinnější byla skupina androst-5-enů – analogů bez substituentu na C17.
- Látka 3.6 (20-oxo-pregnenol hemiadipát) na rozdíl od PES inhibuje všechny podjednotky GluN1/GluN2A–D rekombinantních NMDA receptorů. Na nativních receptorech má látka 3.6 a PES typově stejné účinky – obě potencují NMDA receptory a inhibují AMPA a GABA receptory, liší se ale mírou účinku, kdy látka 3.6 je více selektivní a účinnější modulátor.

7.3 Vliv Ca^{2+} na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory

- Zvýšená citlivost NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům souvisí s nárůstem intracelulární koncentrace Ca^{2+} po aktivaci NMDA receptorů.
- K nárůstu inhibičního působení po Ca-stimulaci dochází u endogenního (PAS) i u jeho syntetických analogů. Pregnanolon hemipimelát (PAhPim) je v kontrolní odpovědi na nativních NMDA receptorech téměř bez efektu, po Ca-stimulaci dochází k nárůstu inhibice o 64 %, což by mohlo být využitelné v klinické praxi – inhibiční neurosteroidy by působily pouze za patologických stavů, kdy dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} .
- Zvýšená citlivost NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům souvisí s depalmitoylací tří cysteinů (C849, C854, C871) na CTD GluN2B podjednotky. Depalmitoylace vede i ke změně kinetických parametrů receptoru ve prospěch zavřeného stavu.
- Námi popsáný vliv Ca-indukované depalmitoylace GluN2B podjednotky na působení inhibičních neurosteroidů a kinetiku receptoru tak může být dalším z neuroprotektivních mechanismů, který brání nadměrnému vstupu Ca^{2+} do buněk a vzniku excitotoxicity.

8 SUMMARY

This work provides new insights into the relationship between the structure and potentiating or inhibitory action of neurosteroids on NMDA receptors, which is important for finding potential new drugs, but especially for reaching a deeper understanding of function and signaling via these receptors. This work also clarifies at the molecular level possible neuroprotective effect of increased inhibitory action of neurosteroids on NMDA receptors under pathological conditions involving increased intracellular Ca^{2+} concentration.

8.1 Relationship between the structure of inhibitory neurosteroids and their ability to modulate NMDA receptors

- In the first structure-activity relationship (SAR) study, the importance of the steroid D-ring for the inhibitory action of neurosteroids on NMDA receptors was characterized. All newly synthesized D-ring-lacking structural analogues of neurosteroids derived from PAS – C3-sulfate and C3-hemisuccinate perhydrofenantrenes (substances 1.1–1.10) retained inhibitory activity, but neither structural modification resulted in significant improvement in inhibitory effect over PAS.

The most potent inhibitor in the test series, substance 1.9, exhibits low subunit specificity at GluN1/GluN2A–D NMDA receptors. It is a selective inhibitor of native GABA and NMDA receptors in hippocampal neurons. In contrast, for native AMPA receptors, substance 1.9 has only modest inhibitory effects.

- The second SAR study looked at the C3-amide analogues of PAS and PAG to test modifications to improve efficacy and biological stability. All newly synthesized compounds (2.2–2.12) showed higher inhibitory activity on recombinant GluN1/GluN2B NMDA receptors expressed in HEK293 cells than PAS and PAG.

Substance 2.6, selected for further characterization, does not show subunit specificity for recombinant GluN1/GluN2A–D. Unlike previously studied analogues, substance 2.6 is twice as effective an inhibitor of native NMDA than GABA receptors, and the effect on AMPA receptors is minimal, thus making substance 2.6 the starting compound for further testing and SAR studies to optimize pharmacological and pharmacokinetic parameters.

8.2 The structure-activity relationship of neurosteroids with a potentiating effect on NMDA receptors

- Substances with differing hemiester residue length on C3 and modifications of the D-ring on C17 were studied in the newly prepared PES structural analogue series to describe the link between the structure and the effect of neurosteroids on NMDA receptors.
- All newly synthesised neurosteroids (substances 3.2–3.24) showed a positive (potentiating) effect on GluN1/GluN2B receptor activity HEK293 cells. The maximum potentiation rate ranged from 8% to 452%.
- The potentiating effect is dependent on the length of the C3-hemiester residue in combination with the type of substituent on C17. Substituent to the steroid core at C17 may be modified or removed completely without losing potentiation. The most effective was the androst-5-en group – analogues without substitution on C17.
- Substance 3.6 (20-oxo-pregnenol hemiadipate), unlike PES, inhibits all subunits of GluN1/GluN2A-D recombinant NMDA receptors. On native receptors, substance 3.6 and PES have the same type of effects – both potentiate NMDA receptors and inhibit AMPA and GABA receptors, but they differ in their level of action, with substance 3.6 being a more selective and effective modulator.

8.3 The influence of Ca²⁺ on NMDA receptor sensitivity to inhibitory neurosteroids

- Increased sensitivity of NMDA receptors to inhibitory neurosteroids is associated with an increase in intracellular Ca²⁺ concentration after NMDA receptor activation.
- The increase in inhibitory activity after Ca²⁺ stimulation occurs for the endogenous PAS as well as its synthetic analogues. Pregnanolone hemipimelate (PAhPim) is almost without an effect in the control response at native NMDA receptors, but causes 64% inhibition following Ca²⁺ stimulation, which could be of use in clinical practice – inhibitory neurosteroids would only work in pathological conditions where there is an increase in intracellular Ca²⁺.
- Increased sensitivity of NMDA receptors to inhibitory neurosteroids is related to depalmitoylation of three cysteines (C849, C854, C871) at the CTD of the GluN2B subunit. Depalmitoylation also leads to a change in receptor kinetics in favor of the closed state.
- The effect of Ca²⁺-induced depalmitoylation of GluN2B subunits on the action of inhibitory neurosteroids and receptor kinetics may thus be another of the neuroprotective mechanisms preventing NMDA receptor overactivation and excitotoxicity.

9 ZÁVĚR

Signalizace prostřednictvím NMDA receptorů je klíčová pro normální fyziologické funkce a správné fungování centrální nervové soustavy. Jakákoli odchylka může vést k patologickým stavům plynoucím z nadměrné či nedostatečné aktivity NMDA receptorů. V posledních desetiletích se vynakládají veliké snahy na hledání vhodných terapeutických přístupů, které by kompenzovaly patologickou signalizaci bez vlivu na normální synaptickou funkci NMDA receptorů. Bohužel širšímu využití pozitivních či negativních modulátorů NMDA receptorů v klinické praxi zatím brání výrazné vedlejší účinky plynoucí z neselektivního působení. V posledních letech jsou vkládány veliké naděje do alosterických modulátorů, které oproti agonistům, kompetitivním antagonistům či blokátorům otevřeného kanálu vykazují řadu výhod: *i)* větší selektivní působení v rámci jednotlivých podjednotek, které plyne z vazebného místa mimo vysoce konzervované oblasti vazebného místa pro agonisty či iontového kanálu; *ii)* potenciační či inhibiční účinek pouze na již aktivované receptory *iii)* větší variabilitu účinku, která umožňuje pouze částečnou modulaci a nikoliv úplnou blokaci/otevření jako například při působení blokátorů otevřeného kanálu.

Tato disertační práce se zabývala terapeuticky nadějnou skupinou alosterických modulátorů – neurosteroidů, které v závislosti na své struktuře mohou mít pozitivní či negativní účinky na NMDA receptory. Na molekulární úrovni byl objasněn možný neuroprotektivní efekt zvýšeného inhibičního působení neurosteroidů na NMDA receptory za patologických podmínek, kdy dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Kromě toho tato disertační práce přináší nové poznatky o vztahu mezi strukturou a potenciačním či inhibičním účinkem neurosteroidů na NMDA receptory, kdy byly identifikovány výchozí strukturní determinanty pro další možné studie s cílem *i)* zlepšit účinnost a selektivitu působení *ii)* nalézt látky selektivně působící na triheteromerní receptory *iii)* zlepšit biologickou dostupnost a stabilitu neurosteroidů.

Poznatky plynoucí z této disertační práce přispívají k hlubšímu pochopení funkce a signalizace prostřednictvím NMDA receptorů a stejně tak mohou přispět při hledání nových potenciálních léčiv kompenzujících nadměrnou či nedostatečnou aktivitu NMDA receptorů.

10 SEZNAM PUBLIKACÍ

Tato disertační práce je založena na následujících impaktovaných publikacích:

- **Hubalkova, P.**, Ladislav, M., Vyklicky, V., Smejkalova, T., Krausova, B.H., Kysilov, B., Krusek, J., Naimová, Z., Korinek, M., Chodounska, H., Kudova, E., Cerny, J., Vyklicky, L. (2021). Palmitoylation Controls NMDA Receptor Function and Steroid Sensitivity. *Journal of Neuroscience* 41, 2119–2134. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2654-20.2021

PH: návrh experimentů, příprava mutací, provádění většiny elektrofyziologických experimentů a jejich analýza, měření FURA, měření excitotoxicity, příprava manuskriptu
IF: 5,673, rok 2019

- Krausova, B., Slavikova, B., Nekardova, M., **Hubalkova, P.**, Vyklicky, V., Chodounska, H., Vyklicky, L., Kudova, E. (2018). Positive Modulators of N-Methyl-D-Aspartate Receptor: Structure-Activity Relationship Study on Steroidal 3-Hemiesters. *Journal of Medicinal Chemistry* 61 (10), 4505–4516. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00255

PH: podíl na elektrofyziologických experimentech a jejich analýze
IF: 6,205, rok 2019

- Adla, S.K., Slavikova, B., Chodounska, H., Vyklicky, V., Ladislav, M., **Hubalkova, P.**, Krausova, B., Smejkalova, T., Nekardova, M., Smidkova, M., Monincova, L., Soucek, R., Vyklicky, L., Kudova, E. (2018). Strong Inhibitory Effect, Low Cytotoxicity and High Plasma Stability of Steroidal Inhibitors of N-Methyl-D-Aspartate Receptors With C-3 Amide Structural Motif. *Frontiers in Pharmacology* 9, 1299. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.01299

PH: podíl na elektrofyziologických experimentech a jejich analýze
IF: 4,225, rok 2019

- Adla, S. K., Slavikova, B., Smidkova, M., Tloustova, E., Svoboda, M., Vyklicky, V., Krausova, B., **Hubalkova, P.**, Nekardova, M., Holubova, K., Vales, K., Budesinsky, M., Vyklicky, L., Chodounska, H., Kudova, E. (2017). Physicochemical and Biological Properties of Novel Amide-Based Steroidal Inhibitors of NMDA Receptors. *Steroids* 117, 52–61. ISSN 0039128X. Dostupné z: doi:10.1016/j.steroids.2016.08.010

PH: podíl na elektrofyziologických experimentech a jejich analýze
IF: 1,948, rok 2019

- Slavíkova, B., Chodounska, H., Nekardova, M., Vyklicky, V., Ladislav, M., **Hubalkova, P.**, Krausova, B., Vyklicky, L., Kudova, E. (2016). Neurosteroid-Like Inhibitors of N-Methyl-D-Aspartate Receptor: Substituted 2-Sulfates and 2-Hemisuccinates of Perhydrophenanthrene. *Journal of Medicinal Chemistry* 59, 4724–4739. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00079

PH: podíl na elektrofyziologických experimentech a jejich analýze

IF: 6,205, rok 2019

Další odborné publikace:

- Chiu, A., Wang, J., Fiske, M., **Hubalkova, P.**, Barse, L., Gray, J. A., Sanz-Clemente, A. (2019). NMDAR-Activated PP1 Dephosphorylates GluN2B to Modulate NMDAR-Plasticity. *Cell Reports* 28(2), 332–341. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2019.06.030

IF: 8,109, rok 2019

- Chiu A. M., Barse L., **Hubalkova P.**, Sanz-Clemente A. (2019). An Antibody Feeding Approach to Study Glutamate Receptor Trafficking in Dissociated Primary Hippocampal Cultures. *Journal of Visualized Experiments* 150. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/59982

IF: 1,140, rok 2019

- Hajkova, A., Techlovska, S., Dvorakova, M., Chambers, J.N., Kumpost, J., **Hubalkova, P.**, Prezeau, L., Blahos, J. (2016). SGIP1 Alters Internalization and Modulates Signaling of Activated Cannabinoid Receptor 1 in Biased Manner. *Neuropharmacology* 107, 201–214. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2016.03.008

IF: 4,249, rok 2017

- **Hubalkova, P.** (2015). G-kvadruplexy v oblasti lidských telomer a jejich terapeutický potenciál. *Chemické listy* 109, 918–922. ISSN 1213-7103.

IF: 0,390, rok 2019

11 LITERATURA

- Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J.W., Wang, Y.T., Salter, M.W., Tymianski, M. (2002). Treatment of Ischemic Brain Damage by Perturbing NMDA Receptor-PSD-95 Protein Interactions. *Science* 298, 846–850. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1072873
- Abdallah, C.G., Sanacora, G., Duman, R.S., Krystal, J.H. (2015). Ketamine and Rapid-Acting Antidepressants: A Window into a New Neurobiology for Mood Disorder Therapeutics. *Annual Review of Medicine* 66, 509–523. ISSN 0066-4219. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-med-053013-062946
- Adams, D. R., Yuan, H., Holyoak, T., Aarajs, K. H., Hakimi, P., Markello, T. C., Wolfe, L.A., Vilboux, T., Burton, B.K., Fajardo, K.F., Grahame, G., Holloman, C., Sincan, M., Smith, A.C.M., Wells, G.A., *et al.* (2014). Three rare diseases in one Sib pair: RAI1, PCK1, GRIN2B mutations associated with Smith-Magenis Syndrome, cytosolic PEPCK deficiency and NMDA receptor glutamate insensitivity. *Molecular Genetics and Metabolism* 113, 161–170. ISSN 10967192. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2014.04.001
- Adla, S.K., Slavikova, B., Chodounska, H., Vyklicky, V., Ladislav, M., Hubalkova, P., Krausova, B., Smejkalova, T., Nekardova, M., Smidkova, M., Monincova, L., Soucek, R., Vyklicky, L., Kudova, E. (2018). Strong Inhibitory Effect, Low Cytotoxicity and High Plasma Stability of Steroidal Inhibitors of N-Methyl-D-Aspartate Receptors With C-3 Amide Structural Motif. *Frontiers in Pharmacology* 9. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.01299
- Adla, S. K., Slavikova, B., Smidkova, M., Tloustova, E., Svoboda, M., Vyklicky, V., Krausova, B., Hubalkova, P., Nekardova, M., Holubova, K., Vales, K., Budesinsky, M., Vyklicky, L., Chodounska, H., Kudova, E. (2017). Physicochemical and biological properties of novel amide-based steroidal inhibitors of NMDA receptors. *Steroids* 117, 52–61. ISSN 0039128X. Dostupné z: doi:10.1016/j.steroids.2016.08.010
- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., Mizuno, N. (1994). Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *Journal of Comparative Neurology* 347, 150–160. ISSN 0021-9967. Dostupné z: doi:10.1002/cne.903470112
- Amico-Ruvio, S.A., Popescu, G.K. (2010). Stationary gating of GluN1/GluN2B receptors in intact membrane patches. *Biophysical journal* 98, 1160–1169. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2009.12.4276
- Ballarin, B., Tymianski, M. (2018). Discovery and development of NA-1 for the treatment of acute ischemic stroke. *Acta Pharmacologica Sinica* 39, 661–668. ISSN 1671-4083. Dostupné z: doi:10.1038/aps.2018.5
- Banke, T.G., Dravid, S.M., Traynelis, S.F. (2005). Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *The Journal of Neuroscience* 25, 42–51. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3154-04.2005
- Baulieu, E.E. (1998). Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23, 963–987. ISSN 03064530. Dostupné z: doi:10.1016/S0306-4530(98)00071-7
- Bayer, K.U., Schulman, H. (2019). CaM Kinase: Still Inspiring at 40. *Neuron* 103, 380–394. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2019.05.033

- Benveniste, M., Mayer, M.L. (1993). Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* 464, 131–163. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.1993.sp019627
- Bergles, D.E., Diamond, J.S., Jahr, C.E. (1999). Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Current Opinion in Neurobiology* 9, 293–298. ISSN 09594388. Dostupné z: doi:10.1016/S0959-4388(99)80043-9
- Bettini, E., Sava, A., Griffante, C., Carignani, C., Buson, A., Capelli, A.M., Negri, M., Andreetta, F., Senar-Sancho, S.A., Guiral, L., Cardullo, F. (2010). Identification and Characterization of Novel NMDA Receptor Antagonists Selective for NR2A- over NR2B-Containing Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 335, 636–644. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.110.172544
- Bolshakov, K.V., Gmiro, V.E., Tikhonov, D.B., Magazanik, L.G. (2003). Determinants of trapping block of N-methyl-d-aspartate receptor channels. *Journal of Neurochemistry* 87, 56–65. ISSN 00223042. Dostupné z: doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01956.x
- Borovska, J., Vyklicky, V., Stastna, E., Kapras, V., Slavikova, B., Horak, M., Chodounska, H., Vyklicky, L. (2012). Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *British Journal of Pharmacology* 166, 1069–1083. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01816.x
- Bouvier, G., Bidoret, C., Casado, M., Paoletti, P. (2015). Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules. *Neuroscience* 311, 322–340. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2015.10.033
- Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J.P., Gunther, W., Seeburg, P., Sakmann, B. (1992). Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257, 1415–9. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1382314
- Burnell, E.S., Irvine, M., Fang, G., Sapkota, K., Jane, D.E., Monaghan, D.T. (2018). Positive and Negative Allosteric Modulators of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) Receptors: Structure–Activity Relationships and Mechanisms of Action. *Journal of Medicinal Chemistry* 62, 3–23. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01640
- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell* 131, 1047–1058. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
- Clark, G.D., Cufford, D.B., Zorumski, C.F. (1990). The effect of agonist concentration, membrane voltage and calcium on n-methyl-d-aspartate receptor desensitization. *Neuroscience* 39, 787–797. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/0306-4522(90)90261-2
- Clements, J., Lester, R., Tong, G., Jahr, C., Westbrook, G. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258, 1498–1501. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1359647
- Conibear, E., Davis, N.G. (2010). Palmitoylation and depalmitoylation dynamics at a glance. *Journal of Cell Science* 123, 4007-4010. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.059287
- Davies, J., Francis, A.A., Jones, A.W., Watkins, J.C. (1981). 2-Amino-5-phosphonovalerate (2APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neuroscience Letters* 21, 77–81. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3940(81)90061-6
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* 51, 7–61. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.109.002451

- Dore, K., Aow, J., Malinow, R. (2016). The Emergence of NMDA Receptor Metabotropic Function: Insights from Imaging. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 8. ISSN 1663-3563. Dostupné z: doi:10.3389/fnsyn.2016.00020
- Dzamba, D., Honsa, P., Anderova, M. (2013). NMDA Receptors in Glial Cells: Pending Questions. *Current Neuropharmacology* 11, 250–262. ISSN 1570159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X11311030002
- Ehlers, M.D., Zhang, S., Bernhardt, J.P., Huganir, R.L. (1996). Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84, 745–755. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81052-1
- Emnett, C.M., Eisenman, L.N., Taylor, A.M., Izumi, Y., Zorumski, C.F., Mennerick, S. (2013). Indistinguishable Synaptic Pharmacodynamics of the N-Methyl-d-Aspartate Receptor Channel Blockers Memantine and Ketamine. *Molecular Pharmacology* 84, 935–947. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.113.089334
- 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., Jørgensen, L., Clausen R.P., Wyllie, D.J.A., Snyder, J.P., Traynelis, S.F. (2007). Subunit-Specific Agonist Activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-Containing N-Methyl-d-aspartate Glutamate Receptors. *Molecular Pharmacology* 72, 907–920. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.107.037333.
- Feng, B., Morley, R., Jane, D., Monaghan, D. (2005). The effect of competitive antagonist chain length on NMDA receptor subunit selectivity. *Neuropharmacology* 48, 354–359. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2004.11.004
- Flood, J.F., Morley, J.E., Roberts, E. (1992). Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1567–1571. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.89.5.1567
- Furukawa, H. (2012). Structure and function of glutamate receptor amino terminal domains. *The Journal of physiology* 590, 63–72. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2011.213850
- Ge, Y., Chen, W., Axerio-Cilies, P., Wang, Y.T. (2020). NMDARs in Cell Survival and Death: Implications in Stroke Pathogenesis and Treatment. *Trends in Molecular Medicine* 26, 533–551. ISSN 14714914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2020.03.001
- Gerets, H.H.J., Hanon, E., Cornet, M., Dhalluin, S., Depelchin, O., Canning, M., Atienzar, F.A. (2009). Selection of cytotoxicity markers for the screening of new chemical entities in a pharmaceutical context: a preliminary study using a multiplexing approach. *Toxicology in Vitro* 23, 319–332. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2008.11.012
- Gibb, A.J., Colquhoun, D. (1991). Glutamate activation of a single NMDA receptor-channel produces a cluster of channel openings. *Proceedings Biological sciences* 243, 39–45. ISSN 0962-8452. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.1991.0007
- Giffard, R.G., Monyer, H., Christine, C.W., Choi, D.W. (1990). Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Research* 506, 339–342. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/0006-8993(90)91276-M
- Gonnord, P., Delarasse, C., Auger, R., Benihoud, K., Prigent, M., Cuif, M.H., Lamaze, C., Kanellopoulos, J.M. (2008). Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *The FASEB Journal* 23, 795–805. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.08-114637

- Groc, L., Heine, M., Cousins, S.L., Stephenson, F.A., Lounis, B., Cognet, L., Choquet, D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A–2B subunits. *Proceedings of The National Academy Of Sciences* 103, 18769–18774. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0605238103
- Gubitosi-Klug, R.A., Mancuso, D.J., and Gross, R.W. (2005). The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 102, 5964-5968. SSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0501999102
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 391, 85–100. ISSN 0031-6768. Dostupné z: doi:10.1007/BF00656997
- Hansen, K.B., Ogden, K.K., Traynelis, S.F. (2012). Subunit-Selective Allosteric Inhibition of Glycine Binding to NMDA Receptors. *Journal of Neuroscience* 32, 6197-6208. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.5757-11.2012
- Hansen, K.B., Traynelis, S.F. (2011). Structural and mechanistic determinants of a novel site for noncompetitive inhibition of GluN2D-containing NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience* 31, 3650–3661. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.5565-10.2011
- Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Furukawa, H., Wollmuth, L.P., Gibb, A.J., Traynelis, S.F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *The Journal of General Physiology* 150, 1081–1105. ISSN 0022-1295. Dostupné z: doi:10.1085/jgp.201812032
- Hardingham, G. (2019). NMDA receptor C-terminal signaling in development, plasticity, and disease. *F1000Research* 8, 1547. Dostupné z: doi: 10.12688/f1000research.19925.1
- Hardingham, G.E., Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signaling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience* 11, 682–696. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/nrn2911
- Hatton, C. J., Paoletti, P. (2005). Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* 46, 261–274. SSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2005.03.005
- Hayashi, T. (1952). A Physiological Study of Epileptic Seizures Following Cortical Stimulation in Animals and Its Application to Human Clinics. *The Japanese Journal of Physiology* 3, 46–64. ISSN 1881-1396. Dostupné z: doi:10.2170/jjphysiol.3.46
- Hayashi, T. (2021). Post-translational palmitoylation of ionotropic glutamate receptors in excitatory synaptic functions. *British Journal of Pharmacology* 178, 784–797. ISSN 0007-1188. Dostupné z: doi:10.1111/bph.15050
- Hayashi, T., Rumbaugh, G., Haganir, R.L. (2005). Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. *Neuron* 47, 709–723. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2005.06.035
- Hayashi, T., Thomas, G.M., Haganir, R.L. (2009). Dual Palmitoylation of NR2 Subunits Regulates NMDA Receptor Trafficking. *Neuron* 64, 213–226. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2009.08.017
- Herman, M.A., Jahr, C.E. (2007). Extracellular Glutamate Concentration in Hippocampal Slice. *Journal of Neuroscience* 27, 9736–9741. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3009-07.2007

- Herman, M.A., Nahir, B., Jahr, C.E., Ferreira, S.T. (2011). Distribution of Extracellular Glutamate in the Neuropil of Hippocampus. *Plos One* 6. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0026501
- Holubova, K., Nekovarova, T., Pistovcakova, J., Sulcova, A., Stuchlík, A., Vales, K. (2014). Pregnanolone Glutamate, a Novel Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor, Exerts Antidepressant-Like Properties in Animal Models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8, 130. ISSN 1662-5153. Dostupné z: doi:10.3389/fnbeh.2014.00130
- Horak, M., Vlcek, K., Chodounska, H., Vyklicky, L. Jr. (2006). Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* 137, 93–102. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2005.08.058
- Horak, M., Vlcek, K., Petrovic, M., Chodounska, H., Vyklicky, L. Jr. (2004). Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *The Journal of Neuroscience* 24, 10318–10325. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2099-04.2004
- Hrcka Krausova, B., Kysilov, B., Cerny, J., Vyklicky, V., Smejkalova, T., Ladislav, M., Balik, A., Korinek, M., Chodounska, H., Kudova, E., Vyklicky, L. (2020). Site of action of brain neurosteroid pregnenolone sulfate at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of Neuroscience* 40, 5922–5936. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3010-19.2020
- Hu, C., Chen, W., Myers, S.J., Yuan, H., Traynelis, S.F. (2016). Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. *Journal of Pharmacological Sciences* 132 (2), 115-121. ISSN 13478613. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphs.2016.10.002
- Hubalkova, P., Ladislav, M., Vyklicky, V., Smejkalova, T., Hrcka Krausova, B., Kysilov, B., Krusek, J., Naimova, Z., Korinek, M., Chodounska, H., Kudova, E., Cerny, J., Vyklicky, L. (2021). Palmitoylation Controls NMDA Receptor Function and Steroid Sensitivity. *The Journal of Neuroscience* 41, 2119–2134. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2654-20.2021
- Chang, H.R., Kuo, C.C. (2008). The activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. *Journal of Neuroscience* 28, 1546–1556. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3485-07.2008
- Charollais, J., Van Der Goot, F.G. (2009). Palmitoylation of membrane proteins (Review). *Molecular Membrane Biology* 26, 55–66. ISSN 0968-7688. Dostupné z: doi:10.1080/09687680802620369
- 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. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415, 793–798. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature715
- Chen, B.-S., Roche, K.W. (2007). Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology* 53, 362–368. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2007.05.018
- Chen, P.E., Geballe, M.T., Katz, E., Erreger, K., Livesey, M.R., O'Toole, K.K., Le, P., Lee, C.J., Snyder, J.P., Traynelis, S.F., Wyllie, D.J.A. (2008). Modulation of glycine potency in rat recombinant NMDA receptors containing chimeric NR2A/2D subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of Physiology* 586, 227–245. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2007.143172
- Choi D.W. (1992) Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology* 23, 1261–1276. ISSN 0022-3034. Dostupné z: doi:10.1002/neu.480230915
- Choi, D.W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience* 7, 369–379. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.07-02-00369.1987

- Choi, D.W. (1992). Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology* 23, 1261–1276. ISSN 0022-3034. Dostupné z: doi:10.1002/neu.480230915
- Choi, D.W., Koh, J.Y., Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *Journal of Neuroscience* 8, 185–196. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.08-01-00185.1988
- Iacobucci, G.J., Popescu, G.K. (2017). NMDA receptors: linking physiological output to biophysical operation. *Nature Reviews Neuroscience* 18, 236–249. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/nrn.2017.24
- Iacobucci, G.J., Popescu, G.K. (2020). Ca²⁺-Dependent Inactivation of GluN2A and GluN2B NMDA Receptors Occurs by a Common Kinetic Mechanism. *Biophysical Journal* 118, 798–812. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2019.07.057
- Iijima, K., Takase, S., Tsumueaya, K., Endo, M., Itahara, K. (1978). Changes in Free Amino Acids of Cerebrospinal Fluid and Plasma in Various Neurological Diseases. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 126, 133–150. ISSN 0040-8727. Dostupné z: doi:10.1620/tjem.126.133
- Irwin, R.P., Lin, S.Z., Rogawski, M.A., Purdy, R.H., Paul, S.M. (1994). Steroid potentiation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated intracellular Ca⁺⁺ responses: structure-activity studies. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 271, 677–682. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bbmt.2020.09.004.
- Jurd, R., Thornton, C., Wang, J., Luong, K., Phamluong, K., Kharazia, V., Gibb, S.L., Ron, D. (2008). Mind Bomb-2 Is an E3 Ligase That Ubiquitinates the N-Methyl-d-aspartate Receptor NR2B Subunit in a Phosphorylation-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* 283, 301–310. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M705580200
- Karakas, E., Furukawa, H. (2014). Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science (New York, N.Y.)* 344, 992–997. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1251915
- Karakas, E., Simorowski, N., Furukawa, H. (2009). Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *The EMBO journal* 28, 3910–3920. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2009.338
- Karakas, E., Simorowski, N., Furukawa, H. (2011). Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475, 249–253. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature10180
- Kleteckova, L., Tsenov, G., Kubova, H., Stuchlik, A., Vales, K. (2014). Neuroprotective effect of the 3 α 5 β -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats. *Neuroscience Letters* 564, 11–15. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2014.01.057
- Korinek, M., Kapras, V., Vyklicky, V., Adamusova, E., Borovska, J., Vales, K., Stuchlik, A., Horak, M., Chodounska, H., Vyklicky, L. (2011). Neurosteroid modulation of N-methyl-d-aspartate receptors: Molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids* 76, 1409–1418. ISSN 0039128X. Dostupné z: doi:10.1016/j.steroids.2011.09.002
- Kornau, H.-C., Seeburg, P.H., Kennedy, M.B. (1997). Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Current Opinion in Neurobiology* 7, 368–373. ISSN 0039128X. Dostupné z: doi:10.1016/j.steroids.2011.09.002
- Krausova, B., Slavikova, B., Nekardova, M., Hubalkova, P., Vyklicky, V., Chodounska, H., Vyklicky, L., Kudova, E. (2018). Positive Modulators of the N-Methyl-d-aspartate Receptor: Structure–

- Activity Relationship Study of Steroidal 3-Hemiesters. *Journal of Medicinal Chemistry* 61, 4505–4516. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00255
- Krupp, J.J., Vissel, B., Thomas, C.G., Heinemann, S.F., Westbrook, G.L. (1999). Interactions of Calmodulin and α -Actinin with the NR1 Subunit Modulate Ca^{2+} -Dependent Inactivation of NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience* 19, 1165–1178. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.19-04-01165.1999
- Kudova, E., Chodounska, H., Slavikova, B., Budesinsky, M., Nekardova, M., Vyklicky, V., Krausova, B., Svehla, P., Vyklicky, L. (2015). A New Class of Potent N-Methyl-d-Aspartate Receptor Inhibitors: Sulfated Neuroactive Steroids with Lipophilic D-Ring Modifications. *Journal of Medicinal Chemistry* 58, 5950–5966. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00570
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., Mishina, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358, 36–41. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/358036a0
- Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., Natsume, R., Watanabe, M., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S., Arakawa, M., Takahashi, T., Nakamura, Y., Mori, H., Mishina, M. (1996). Impairment of Suckling Response, Trigeminal Neuronal Pattern Formation, and Hippocampal LTD in NMDA Receptor $\epsilon 2$ Subunit Mutant Mice. *Neuron* 16, 333–344. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/S0896-6273(00)80051-3
- Lee, C.-H., Lü, W., Michel, J.C., Goehring, A., Du, J., Song, X., Gouaux, E. (2014). NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature* 511, 191–197. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature13548
- Legendre, P., Rosenmund, C., Westbrook, G.L. (1993). Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium. *Journal of Neuroscience* 13, 674–684. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.13-02-00674.1993
- Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E.V., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A.H., Ware, J.S., Hill, A.J., Cummings, B.B., Tukiainen, T., Birnbaum, D.P., Kosmicki, J.A., Duncan, L.E., Estrada, K., *et al.* (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536, 285–291. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature19057
- Lemke, J.R., Hendrickx, R., Geider, K., Laube, B., Schwake, M., Harvey, R.J., James, V.M., Pepler, A., Steiner, I., Hörtnagel, K., Neidhard, J., Ruf, S., Wolf, M., Bartholdi, D., Caraballo, R., *et al.* (2014). GRIN2B mutations in west syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. *Annals of Neurology* 75, 147–154. ISSN 03645134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.24073
- Lester, R., Jahr, C.E. (1992). NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *The Journal of Neuroscience* 12, 635–643. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.12-02-00635.1992
- Lin, D.-T., Makino, Y., Sharma, K., Hayashi, T., Neve, R., Takamiya, K., Huganir, R.L. (2009). Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nature Neuroscience* 12, 879–887. ISSN 1097-6256. Dostupné z: doi:10.1038/nn.2351
- Lipton, S.A. (1993). Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends in Neurosciences* 16, 527–532. ISSN 01662236. Dostupné z: doi:10.1016/0166-2236(93)90198-U
- Liu, J., Chang, L., Song, Y., Li, H., and Wu, Y. (2019). The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* 13, 43. ISSN 1662-453X. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2019.00043

- Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., Wang, Y.T. (2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience* 27, 2846–2857. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007
- Low C.M, Zheng F, Lyuboslavsky P, Traynelis S.F (2000). Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11062–11067. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.180307497
- Lü, W., Du, J., Goehring, A., Gouaux, E. (2017). Cryo-EM structures of the triheteromeric NMDA receptor and its allosteric modulation. *Science* 355 (6331). ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aal3729
- Lüscher, C., Malenka, R.C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, 1–15. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a005710
- Lussier, M.P., Sanz-Clemente, A., Roche, K.W. (2015). Dynamic Regulation of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) and α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Posttranslational Modifications. *Journal of Biological Chemistry* 290, 28596–28603. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R115.652750
- Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews* 84, 87–136. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00014.2003
- MacDermott, A.B., Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Smith, S.J., Barker, J.L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature* 321, 519–522. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/321519a0
- Maki, B.A., Popescu, G.K. (2014). Extracellular Ca^{2+} ions reduce NMDA receptor conductance and gating. *The Journal of General Physiology* 144, 379–392. ISSN 1540-7748. Dostupné z: doi:10.1085/jgp.201411244
- Maki, B.A., Aman, T.K., Amico-Ruvio, S.A., Kussius, C.L., Popescu, G.K. (2012). C-terminal domains of N-methyl-D-aspartic acid receptor modulate unitary channel conductance and gating. *Journal of Biological Chemistry* 287, 36071–36080. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.390013
- Malenka, R.C. (1999). Long-Term Potentiation – A Decade of Progress? *Science* 285, 1870–1874. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.285.5435.1870
- Malenka, R.C., Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5–21. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2004.09.012
- Martel, M.-A., Soriano, F.X., Baxter, P., Rickman, C., Duncan, R., Wyllie, D.J.A., Hardingham, G.E. (2014). Inhibiting pro-death NMDA receptor signaling dependent on the NR2 PDZ ligand may not affect synaptic function or synaptic NMDA receptor signaling to gene expression. *Channels* 3, 12–15. ISSN 1933-6950. Dostupné z: doi:10.4161/chan.3.1.7864
- Matt, L., Kim, K., Chowdhury, D., Hell, J.W. (2019). Role of Palmitoylation of Postsynaptic Proteins in Promoting Synaptic Plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12. ISSN 1662-5099. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2019.00008
- Mayer M.L. (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 440, 456–462. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature04709

- Mayer, M.L., Armstrong, N. (2004). Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annual Review of Physiology* 66, 161–181. ISSN 0066-4278. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.physiol.66.050802.084104
- Mayer, M.L., Vyklicky, L. (1989). The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. *The Journal of Physiology* 415, 351–365. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.1989.sp017725
- Mayer, M.L., Vyklicky, L., Clements, J. (1989). Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* 338, 425–427. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/338425a0
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L. (1985). The action of N-methyl-D-aspartic acid on mouse spinal neurones in culture. *Journal of Physiology* 361, 65–90. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.1985.sp015633
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L. (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *The Journal of Physiology* 394, 501–527. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.1987.sp016883
- McNamara, D., Smith, E.C.R., Calligaro, D.O., O'Malley, P.J., McQuaid, L.A., Dingledine, R. (1990). 5,7-Dichlorokynurenic acid, a potent and selective competitive antagonist of the glycine site on NMDA receptors. *Neuroscience Letters* 120, 17–20. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3940(90)90157-5
- Medina, I., Filippova, N., Charton, G., Rougeole, S., Ben-Ari, Y., Khrestchatsky, M., Bregestovski, P. (1995). Calcium-dependent inactivation of heteromeric NMDA receptor-channels expressed in human embryonic kidney cells. *Journal of Physiology* 482, 567–573. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020540
- Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanish, T., Arakawa, M., Sakimura, K., Mishina, M. (1992). Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* 357, 70–74. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/357070a0
- Milani, D., Cross, J.L., Anderton, R.S., Blacker, D.J., Knuckey, N.W., Meloni, B.P. (2017). Delayed 2-h post-stroke administration of R18 and NA-1 (TAT-NR2B9c) peptides after permanent and/or transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Research Bulletin* 135, 62–68. ISSN 03619230. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresbull.2017.09.012
- Mony, L., Kew, J.N.C., Gunthorpe, M.J., Paoletti, P. (2009). Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *British Journal Of Pharmacology* 157, 1301–1317. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00304.x
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/0896-6273(94)90210-0
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1992). Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. *Science* 256, 1217–1221. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.256.5060.1217
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354, 31–37. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/354031a0

- Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774–776. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/319774a0
- Mosley, C.A., Acker, T.M., Hansen, K.B., Mullasseril, P., Andersen, K.T., Le, P., Vellano, K.M., Bräuner-Osborne, H., Liotta, D.C., Traynelis, S.F. (2010). Quinazolin-4-one Derivatives: A Novel Class of Noncompetitive NR2C/D Subunit-Selective N-Methyl-d-aspartate Receptor Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 5476–5490. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm100027p
- Muir, K. (2006). Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Current Opinion in Pharmacology* 6, 53–60. ISSN 14714892. Dostupné z: doi:10.1016/j.coph.2005.12.002
- Mullasseril, P., Hansen, K.B., Vance, K.M., Ogden, K.K., Yuan, H., Kurtkaya, N.L., Santangelo, R., Orr, A.G., Le, P., Vellano, K.M., Liotta, D.C., Traynelis, S.F. (2010). A subunit-selective potentiator of NR2C- and NR2D-containing NMDA receptors. *Nature Communications* 1, 90. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms1085
- Nakanishi, N., Tu, S., Shin, Y., Cui, J., Kurokawa, T., Zhang, D., Chen, H.-S.V., Tong, G., and Lipton, S.A. (2009). Neuroprotection by the NR3A Subunit of the NMDA Receptor. *Journal of Neuroscience* 29, 5260–5265. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.1067-09.2009
- Neyton, J., Paoletti, P. (2006). Relating NMDA Receptor Function to Receptor Subunit Composition: Limitations of the Pharmacological Approach. *Journal of Neuroscience* 26, 1331–1333. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.5242-05.2006
- Ogden, K.K., Traynelis, S.F. (2011). New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences* 32, 726–733. ISSN 01656147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2011.08.003
- Pachernegg, S., Strutz-Seebohm, N., Hollmann, M. (2012). GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in Neurosciences* 35, 240–249. ISSN 01662236. Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2011.11.010
- Paoletti, P., Ascher, P., Neyton, J. (1997). High-Affinity Zinc Inhibition of NMDA NR1–NR2A Receptors. *The Journal of Neuroscience* 17, 5711–5725. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.17-15-05711.1997
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 14, 383–400. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/nrn3504
- Papadia, S., Soriano, F.X., Léveillé, F., Martel, M.-A., Dakin, K.A., Hansen, H.H., Kaindl, A., Siffringer, M., Fowler, J., Stefovská, V., McKenzie, G. Craigon, M., Corriveau, R., Ghazal, P., Horsburgh, K., *et al.* (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nature Neuroscience* 11, 476–487. ISSN 1097-6256. Dostupné z: doi:10.1038/mn2071
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.-P., Oliet, S. H.R. (2012). Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell* 150, 633–646. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2012.06.029
- Park-Chung, M., Wu, F.S., Purdy, R.H., Malayev, A.A., Gibbs, T.T., Farb, D.H. (1997). Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Molecular pharmacology* 52, 1113–1123. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.52.6.1113

- Parsons, C.G., Stöfler, A., Danysz, W. (2007). Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system – too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* 53, 699–723. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2007.07.013
- Parsons, M. P., Raymond, L. A. (2014). Extrasynaptic NMDA Receptor Involvement in Central Nervous System Disorders. *Neuron* 82, 279–293. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2014.03.030
- Patterson, S.I., Pate Skene, J.H. (1995). Inhibition of dynamic protein palmitoylation in intact cells with tunicamycin. *Methods in Enzymology* 250, 284–300. ISBN 9780121821517. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(95)50079-0
- Perin-Dureau, F., Rachline, J., Neyton, J., Paoletti, P. (2002). Mapping the Binding Site of the Neuroprotectant Ifenprodil on NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience* 22, 5955–5965. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.22-14-05955.2002
- Petrovic, M., Sedlacek, M., Cais, O., Horak, M., Chodounska, H., Vyklicky, L. (2009). Pregnenolone sulfate modulation of N-methyl-d-aspartate receptors is phosphorylation dependent. *Neuroscience* 160, 616–628. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2009.02.052
- Petrovic, M., Sedlacek, M., Horak, M., Chodounska, H., Vyklický, L. (2005). 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *The Journal of Neuroscience* 25, 8439–8450. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.1407-05.2005
- Pickering, D.S., Taverna, F.A., Salter, M.W., Hampson, D.R. (1995). Palmitoylation of the GluR6 kainate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12090–12094. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.92.26.12090
- Popescu, G.K., Auerbach, A. (2003). Modal gating of NMDA receptors and the shape of their synaptic response. *Nature neuroscience* 6, 476–483. ISSN 1097-6256. Dostupné z: doi:10.1038/nn1044
- Punnakkal, P., Jendritza, P., Kohr, G. (2012). Influence of the intracellular GluN2 C-terminal domain on NMDA receptor function. *Neuropharmacology* 62, 985–1992. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2011.12.018
- Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Costantin, J.L., Stefani, E., Birnbaumer, L. (1998). Unique regulatory properties of the type 2a Ca²⁺ channel beta subunit caused by palmitoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4690–4695. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.95.8.4690
- Rachline, J., Perin-Dureau, F., Le Goff, A., Neyton, J., Paoletti, P. (2005). The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *Journal of Neuroscience* 25, 308–317. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3967-04.2005
- Rambousek, L., Bubenikova-Valesova, V., Kacer, P., Syslova, K., Kenney, J., Holubova, K., Najmanova, V., Zach, P., Svoboda, J., Stuchlik, A., Chodounska, H., Kapras, V., Adamusova, E., Borovska J., Vyklicky, L., Vales, K. (2011). Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-d-aspartate receptor 3 α 5 β -pregnanolone glutamate. *Neuropharmacology* 61, 61–68. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2011.02.018
- Rathenberg, J., Kittler, J.T., Moss, S.J. (2004). Palmitoylation regulates the clustering and cell surface stability of GABAA receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience* 26, 251–257. ISSN 10447431. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcn.2004.01.012
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y., Yao, X. (2008). CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. In: *Protein Engineering Design and Selection* [online]. 21 (11), 639–644. ISSN 1741-0126. Dostupné z: <http://csspalm.biocuckoo.org/>

- Rosenmund, C., Westbrook, G.L. (1993). Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. *Neuron* 10, 805–814. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/0896-6273(93)90197-Y
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., Roche, K.W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 19, 62–75. ISSN 1073-8584. Dostupné z: doi:10.1177/1073858411435129
- Sattler, R. Specific Coupling of NMDA Receptor Activation to Nitric Oxide Neurotoxicity by PSD-95 Protein. *Science* 284, 1845–1848. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.284.5421.1845
- Sedlacek, M., Korinek, M., Petrovic, M., Cais, O., Adamusova, E., Chodounska, H., Vyklicky, L. (2008). Neurosteroid modulation of ionotropic glutamate receptors and excitatory synaptic transmission. *Physiological Research* 57 Suppl 3, 49–57. ISSN 0862-8408
- Shipston, M.J. (2011). Ion channel regulation by protein palmitoylation. *Journal of Biological Chemistry* 286, 8709–8716. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R110.210005
- Slavikova, B., Chodounska, H., Nekardova, M., Vyklicky, V., Ladislav, M., Hubalkova, P., Krausova, B., Vyklicky, L., Kudova, E. (2016). Neurosteroid-like Inhibitors of N -Methyl- d -aspartate Receptor: Substituted 2-Sulfates and 2-Hemisuccinates of Perhydrophenanthrene. *Journal of Medicinal Chemistry* 59, 4724–4739. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00079
- Soto, D., Altafaj, X., Sindreu, C., Bayés, À. (2014). Glutamate receptor mutations in psychiatric and neurodevelopmental disorders. *Communicative & Integrative Biology* 7, e27887. ISSN 1942-0889. Dostupné z: doi:10.4161/cib.27887
- Stern, M.D. (1992). Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium* 13, 183–192. ISSN 01434160. Dostupné z: doi:10.1016/0143-4160(92)90046-U
- 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. (1995). Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *Journal of Neuroscience* 15, 6509–6520. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.15-10-06509.1995
- Swanger, S. A., Chen, W., Wells, G., Burger, P. B., Tankovic, A., Bhattacharya, S., Strong, K. L., Hu, C., Kusumoto, H., Zhang, J., Adams, D.R., Millichap, J.J., Petrovski, S., Traynelis, S.F., Yuan, H. (2016). Mechanistic Insight into NMDA Receptor Dysregulation by Rare Variants in the GluN2A and GluN2B Agonist Binding Domains. *The American Journal of Human Genetics* 99, 1261–1280. ISSN 00029297. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2016.10.002
- Szydłowska K., Tymianski M. (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47, 122–129.
- Tang, C.M., Dichter, M., Morad, M. (1990). Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H⁺. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 87, 6445–6449. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.87.16.6445
- Tarabeux, J., Kebir, O., Gauthier, J., Hamdan, F.F., Xiong, L., Piton, A., Spiegelman, D., Henrion, Millet, B., Fathalli, F., Joover, R., Rapoport, J.L., DeLisi, L.E., Fombonne, É., Motttron, L., *et al.* (2011). Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Translational Psychiatry* 1, e55. ISSN 2158-3188. Dostupné z: doi:10.1038/tp.2011.52
- Traynelis, S.F., Burgess, M.F., Zheng, F., Lyuboslavsky, P., Powers, J.L. (1998). Control of Voltage-Independent Zinc Inhibition of NMDA Receptors by the NR1 Subunit. *The Journal*

of Neuroscience 18, 6163–6175. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.18-16-06163.1998

- Traynelis, S.F., Cull-Candy, S.G. (1990). Proton inhibition of N-methyl- D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* 345, 347–350. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/345347a0
- Traynelis, S.F., Hartley, M., Heinemann, S.F. (1995). Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268, 873–876. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.7754371
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews* 62, 405–496. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.109.002451
- Tymianski, M., Charlton, M.P., Carlen, P.L., Tator, C.H. (1993). Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *The Journal of Neuroscience* 13, 2085–2104. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.13-05-02085.1993
- Vieira, M., Yong, X.L.H., Roche, K.W., Anggono, V. (2020). Regulation of NMDA glutamate receptor functions by the GluN2 subunits. *Journal of Neurochemistry* 154, 121–143. ISSN 0022-3042. Dostupné z: doi:10.1111/jnc.14970
- Vieira, M.M., Jeong, J., and Roche, K.W. (2021). The role of NMDA receptor and neuroligin rare variants in synaptic dysfunction underlying neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurobiology* 69, 93–104. ISSN 09594388. Dostupné z: doi:10.1016/j.conb.2021.03.001
- Vyklicky, L. (1993). Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* 470, 575–600. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.1993.sp019876
- Vyklicky, L. Jr., Vlachova, V., Krusek, J. (1990). The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *Journal of Physiology* 430, 497–517. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.1990.sp018304
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M., Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research* 63 Suppl 1, 191–203. ISSN 0862-8408. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.932678
- Vyklicky, V., Krausova, B., Cerny, J., Balik, A., Zapotocky, M., Novotny, M., Lichnerova, K., Smejkalova, T., Kaniakova, M., Korinek, M., Petrovic, M., Kacer, P., Horak, M., Chodounska, H., Vyklicky, L., (2015). Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids : implications for the agonist induced conformational states of the channel vestibule. *Scientific Reports* 5, 10935. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep10935
- Vyklicky, V., Krausova, B., Cerny, J., Ladislav, M., Smejkalova, T., Kysilov, B., Korinek, M., Danacikova, S., Horak, M., Chodounska, H., Kudova, E., Vyklicky, L. (2018). Surface Expression, Function, and Pharmacology of Disease-Associated Mutations in the Membrane Domain of the Human GluN2B Subunit. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11, 110. ISSN 1662-5099. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2018.00110
- Vyklicky, V., Smejkalova, T., Krausova, B., Balik, A., Korinek, M., Borovska, J., Horak, M., Chvojikova, M., Kleteckova, L., Vales, K., Cerny, J., Nekardova, M., Chodounska, H., Kudova, E., Vyklicky, L. (2016). Preferential Inhibition of Tonically over Phasically Activated NMDA Receptors by Pregnane Derivatives. *The Journal of Neuroscience* 36, 2161–2175. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3181-15.2016

- Watkins, J.C. (2000). L-Glutamate as a Central Neurotransmitter: Looking Back. *Biochemical Society Transactions* 28, 297–310. ISSN 0300-5127. Dostupné z: doi:10.1042/bst0280297
- Watkins, J.C., Evans, R.H. (1981). Excitatory amino acid transmitters. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 21,165–204. ISSN 0362-1642. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pa.21.040181.001121
- Warnet, X.L., Bakke Krog, H., Sevillano-Quispe, O.G., Poulsen, H., Kjaergaard, M. (2020). The C-terminal domains of the NMDA receptor: How intrinsically disordered tails affect signaling, plasticity and disease. *European Journal of Neuroscience*. 2020 May 28. Online ahead of print. ISSN 0953-816X. Dostupné z: doi:10.1111/ejn.14842
- Weaver, C.E., Land, M.B., Purdy, R.H., Richards, K.G., Gibbs, T.T., Farb, D.H. (2000). Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N- methyl-D-aspartate receptor-induced Ca²⁺ accumulation and cell death. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293, 747–754. ISSN 0022-3565.
- Wilding, T.J., Lopez, M.N., Huettner, J.E. (2016). Chimeric glutamate receptor subunits reveal the transmembrane domain is sufficient for NMDA receptor pore properties but some positive allosteric modulators require additional domains. *Journal of Neuroscience* 36, 8815–8825. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.0345-16.2016
- Wiliams, K. (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology* 44, 851–859. ISSN 0026-895X.
- Wu, F.S., Gibbs, T.T., Farb, D.H. (1991). Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular Pharmacology* 40, 333–336. ISSN 0026-895X.
- Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., Beggs, A.H., Craig, A.M., Sheng, M. (1997). Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385, 439–442. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/385439a0
- Xia, P., Chen, H.-s. V., Zhang, D., Lipton, S.A. (2010). Memantine Preferentially Blocks Extrasynaptic over Synaptic NMDA Receptor Currents in Hippocampal Autapses. *Journal of Neuroscience* 30, 11246–11250. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2488-10.2010
- XiangWei, W., Jiang, Y., & Yuan, H. (2018). De novo mutations and rare variants occurring in NMDA receptors. *Current Opinion in Physiology* 2, 27–35. ISSN 24688673. Dostupné z: doi:10.1016/j.cophys.2017.12.013
- Zhang, S., Ehlers, M.D., Bernhardt, J.P., Su, C.T., Haganir, R.L. (1998). Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuron* 21, 443–453. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/S0896-6273(00)80553-X
- Zhou, X., Hollern, D., Liao, J., Andrechek, E., Wang, H. (2013). NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell Death & Disease* 4, e560. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2013.82
- Zorumski, C.F., Yang, J., Fischbach, G.D. (1989). Calcium-dependent, slow desensitization distinguishes different types of glutamate receptors. *Cellular and Molecular Neurobiology* 9, 95–104. ISSN 0272-4340. Dostupné z: doi:10.1007/BF00711446

12 PŘÍLOHY

Příloha 1

Hubalkova, P., Ladislav, M., Vyklicky, V., Smejkalova, T., Krausova, B.H., Kysilov, B., Krusek, J., Naimová, Z., Korinek, M., Chodounska, H., Kudova, E., Cerny, J., Vyklicky, L. (2021). Palmitoylation Controls NMDA Receptor Function and Steroid Sensitivity. *Journal of Neuroscience* 41, 2119–2134. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2654-20.2021

Příloha 2

Krausova, B., Slavikova, B., Nekardova, M., Hubalkova, P., Vyklicky, V., Chodounska, H., Vyklicky, L., Kudova, E. (2018). Positive Modulators of N-Methyl-D-Aspartate Receptor: Structure-Activity Relationship Study on Steroidal 3-Hemiesters. *Journal of Medicinal Chemistry* 61 (10), 4505–4516. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00255

Příloha 3

Adla, S.K., Slavikova, B., Chodounska, H., Vyklicky, V., Ladislav, M., Hubalkova, P., Krausova, B., Smejkalova, T., Nekardova, M., Smidkova, M., Monincova, L., Soucek, R., Vyklicky, L., Kudova, E. (2018). Strong Inhibitory Effect, Low Cytotoxicity and High Plasma Stability of Steroidal Inhibitors of N-Methyl-D-Aspartate Receptors With C-3 Amide Structural Motif. *Frontiers in Pharmacology* 9, 1299. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.01299

Příloha 4

Adla, S. K., Slavikova, B., Smidkova, M., Tloustova, E., Svoboda, M., Vyklicky, V., Krausova, B., Hubalkova, P., Nekardova, M., Holubova, K., Vales, K., Budesinsky, M., Vyklicky, L., Chodounska, H., Kudova, E. (2017). Physicochemical and Biological Properties of Novel Amide-Based Steroidal Inhibitors of NMDA Receptors. *Steroids* 117, 52–61. ISSN 0039128X. Dostupné z: doi:10.1016/j.steroids.2016.08.010

Příloha 5

Slavikova, B., Chodounska, H., Nekardova, M., Vyklicky, V., Ladislav, M., Hubalkova, P., Krausova, B., Vyklicky, L., Kudova, E. (2016). Neurosteroid-Like Inhibitors of N-Methyl-D-Aspartate Receptor: Substituted 2-Sulfates and 2-Hemisuccinates of Perhydrophenanthrene. *Journal of Medicinal Chemistry* 59, 4724–4739. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00079