

**Univerzita Karlova**  
**3. lékařská fakulta**

## Autoreferát disertační práce

Studium funkčních a farmakologických vlastností NMDA receptorů

Ing. Pavla Hubálková

Praha, 2021

**Doktorské studijní programy v biomedicíně**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

**Doktorské studijní programy v biomedicíně**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: **Neurovědy**

Předseda oborové rady: **prof. MUDr. Jan Laczó, Ph.D.**

Školící pracoviště: **Oddělení buněčné neurofyzologie, Fyziologický ústav Akademie věd ČR,  
Václavská 1083, 142 20 Praha 4**

Autor: **Ing. Pavla Hubálková**

Školitel: **prof. MUDr. Ladislav Vyklický, DrSc.**

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: .....v .....hod.

kde: .....

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

## OBSAH

ABSTRAKT .....	2
ABSTRACT .....	3
1. ÚVOD .....	4
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE .....	4
3. MATERIÁL A METODIKA .....	6
4. VÝSLEDKY .....	7
5. DISKUZE .....	12
6. ZÁVĚRY .....	16
7. POUŽITÁ LITERATURA .....	18
8. SEZNAM PUBLIKACÍ .....	20

## SEZNAM ZKRATEK

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátová kyselina
AndrAsp	androstan aspartát
C3, C17 atd.	číslo uhlíku steroidního jádra
CTD	C-terminální doména
$E_{max}$	maximální hodnota potence
ECS	extracelulární roztok
GABA	kyselina $\gamma$ -amino-máselná
GluN/A/K	podjednotka NMDA/AMPA/kainátového receptoru
$I_{kontrola/test}$	míra inhibice steroidu před/po Ca-stimulací
$IC_{50}$	koncentrace steroidu, která inhibuje 50 % proudové odpovědi vyvolané agonistou
ICS	intracelulární roztok
NMDA	N-methyl-D-aspartátová kyselina
PAG	pregnanolon glutamát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl glutamát)
PAhPim	pregnanolon hemipimelát (5 $\beta$ -pregnan-20-on 3 $\alpha$ -yl-hemipimelát)
PAS	pregnanolon sulfát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát)
PES	pregnenolon sulfát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnen-3 $\alpha$ -yl sulfát)
SAR	vztah mezi strukturou a aktivitou (Structure Activity Relationship)
WT	přirozený typ receptoru

## 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 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 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  $\text{Ca}^{2+}$ . Nárůst inhibičního působení neurosteroidů na NMDA receptory souvisí s  $\text{Ca}^{2+}$ -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 (PES) 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  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 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 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 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  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The increase in neurosteroid inhibitory activity at NMDA receptors is related to  $\text{Ca}^{2+}$ -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 (PES) 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  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.

# 1. ÚVOD

NMDA receptory jsou transmembránové heterotetramerní proteiny, které jsou složené vždy ze dvou GluN1 a dvou GluN2 a/nebo GluN3 podjednotek. NMDA receptory jsou zásadní pro excitační přenos a synaptickou plasticitu, jejich nadměrná či nedostatečná aktivita vede k patologickým stavům (Dingledine *et al.*, 1999). Proto se hledají způsoby, jak selektivně modulovat aktivaci NMDA receptorů. Jednou z možností jsou 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 (Weaver *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2018).

Tato disertační práce je zaměřena na studium funkčních a farmakologických vlastností NMDA receptorů a účinku neurosteroidů. Pomocí elektrofyziologických 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. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

### 2.1 Vztah mezi strukturou inhibičních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

**Hypotéza:** Nadměrná aktivace NMDA receptorů vede k patologickým stavům, proto se hledají účinné a selektivní inhibitory, mezi které patří i neurosteroidy odvozené od pregnanolon sulfátu (PAS). Z předchozích studií vztahu mezi strukturou a aktivitou (SAR) již víme, že 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 strukturní modifikace nevedly ke zvýšení účinku či selektivity působení. Jiné strukturní analogy PAS, například pregnanolon glutamát (PAG) a pregnanolon hemipimelát (PAhPim) vykazují neuroprotektivní účinky *in vivo* (Rambousek *et al.*, 2011; Vyklicky *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 strukturní modifikace. Náhrada 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 strukturních modifikací na C3 a chybějícího D-kruhu steroidního jádra u strukturních 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.

## **2.2 Vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory**

**Hypotéza:** Pro potenciační účinek neurosteroidů je důležitý záporně nabitý substituent v  $\beta$ -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 odvozených od pregnenolon sulfátu (PES) 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.

## **2.3 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  $\mu$ M 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.

### **3. MATERIÁL A METODIKA**

#### **3.1 Elektrofyziologická měření metodou terčíkového zámku**

Pro měření proudových odpovědí rekombinantních NMDA receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách (24-48 h po transfekci pomocí MATra (IBA GmbH, Německo), cílená mutageneze receptorů byla provedena pomocí QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA)) 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“). Snímání probíhalo pomocí zesilovače Axopatch 200B (Molecular Devices, USA) v režimu napěťového zámku, kdy je membránový potenciál zpětnovazebně udržován na konstantní hodnotě -60 mV. K aplikaci roztoků byl použit rychlý aplikační systém, který umožňuje aplikaci až 10 různých roztoků s časovou konstantou ~10 ms (Vyklíčky *et al.*, 1990). Naměřená data byla analyzována v programu Clampfit 10.5, který je součástí pClamp 10.5 (Molecular Devices).

#### **3.2 Měření volných Ca<sup>2+</sup> pomocí barviva Fura**

Měření volných Ca<sup>2+</sup> pomocí barviva Fura probíhalo současně s elektrofyziologickým snímáním proudů NMDA receptorů v konfiguraci snímání z celé buňky, kdy skleněná pipeta navíc obsahovala 100 μM FURA2 (Molecular Probes). Měření fluorescence (při vlnových délkách 340 nm a 380 nm) probíhala pomocí systému Cell<sup>^</sup>R (Olympus).

#### **3.3 Měření excitotoxické buněčné smrti**

Primární hipokampální neuronální kultury (DIV 12) byly inkubovány s NMDA (3, 10, 30 μM) a s PAhPim (30 μM) či se stejným objemem DMSO po dobu 2 hod při 37 °C v kompletním MEM médiu. Po inkubaci byly neurony opláchnuty neurobazálním médiem, ve kterém byly původně kultivovány. V tomto médiu byly ponechány při 37 °C 16–20 h. Další den bylo do média přidáno 5 μM Hoechst barvivo (H) a 6 μM propidium jodid (PI). Po inkubaci (30 min při 37 °C) byly neurony opláchnuty standardním ECS. Fluorescence H (380 nm) a PI (540 nm) byla měřena na přístroji Cell<sup>^</sup>R (Olympus). Vyhodnocení probíhalo pomocí programu ImageJ 1.52 (NIH, USA).

#### **3.4 Statistické zpracování dat**

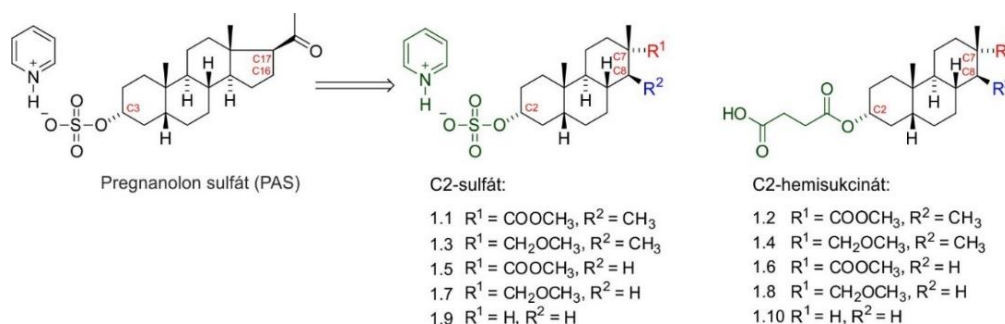
Výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr ± střední chyba průměru (SEM) z počtu *n* buněk. Ke statistickému zpracování byly použity programy Sigma Plot 10 a Sigma Stat 3.5 (Systat Software Inc., USA). Pro statistické porovnání byl použit t-test či jednofaktorová ANOVA a vícečetné srovnání vůči kontrole metodou Holm-Šidák s hladinou významnosti  $p < 0,05$ .

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Vztah mezi strukturou inhibičních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

#### 4.1.1 Perhydrofenantreny odvozené od pregnanolon sulfátu

V dřívější SAR studii byly objasněny modifikace D-kruhu v pozicích C16 a C17 PAS (Kudova *et al.*, 2015), kdy došlo k významnému zvýšení inhibice. V naší další studii bylo cílem objasnit význam samotného steroidního D-kruhu. Testována byla nová série látek 1.1–1.10, neurosteroidů odvozených od PAS s modifikací na C2, C7 a C8 perhydrofenantrenového kruhu (Obrázek 5.1). Výsledky byly publikovány v *Journal of Medicinal Chemistry* (Slavikova *et al.*, 2016).

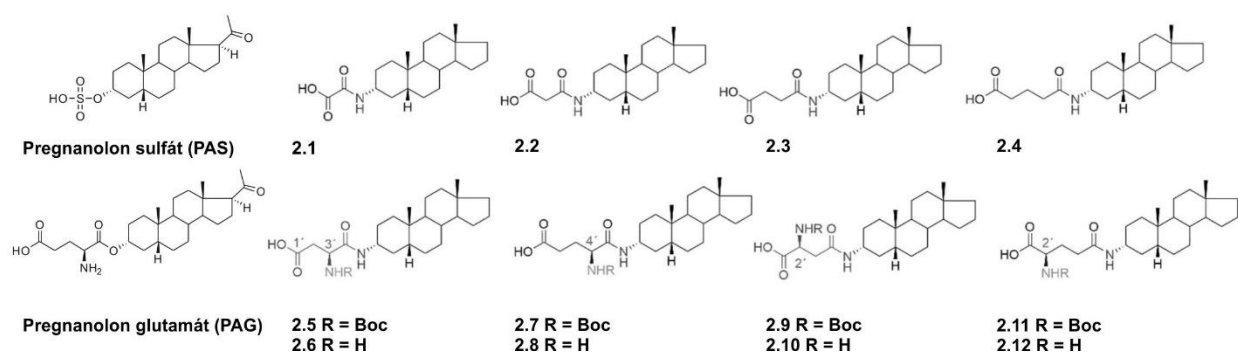


**Obrázek 5.1** Struktury C2-sulfátových a C2-hemisukcinátových perhydrofenantrenů – strukturálních analogů odvozených od pregnanolon sulfátu, kterým zcela chybí D-kruh steroidního jádra.

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  $IC_{50}$  ( $15,6 \pm 1,5$  a  $23,2 \pm 2,9$   $\mu\text{M}$ ) než přirozeně se vyskytující PAS ( $IC_{50} = 24,6 \pm 2,4$   $\mu\text{M}$ ); (Kudova *et al.*, 2015). U látky 1.9 byla dále měřena míra inhibice na jednotlivých podjednotkách GluN2A–D exprimovaných v HEK293 buňkách a také na nativních NMDA, AMPA a GABA receptorech v primárních hipokampálních neuronech. Látka 1.9 vykazuje mírnou podjednotkovou specifitu pro GluN2B oproti GluN2A/C/D. Látka 1.9 je 6x účinnější inhibitor NMDA receptorů než nativních AMPA receptorů. Nejúčinnější je látka 1.9 na inhibici nativních GABA receptorů s  $IC_{50} = 3,1 \pm 0,1$   $\mu\text{M}$  (Slavikova *et al.*, 2016).

#### 4.1.2 Amidové neurosteroidy odvozené od pregnanolon sulfátu a pregnanolon glutamátu

V druhé SAR studii byla testována série strukturálních analogů PAS a PAG (látky 2.1–2.12) s amidovou vazbou na C3 (Obrázek 5.2). 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).



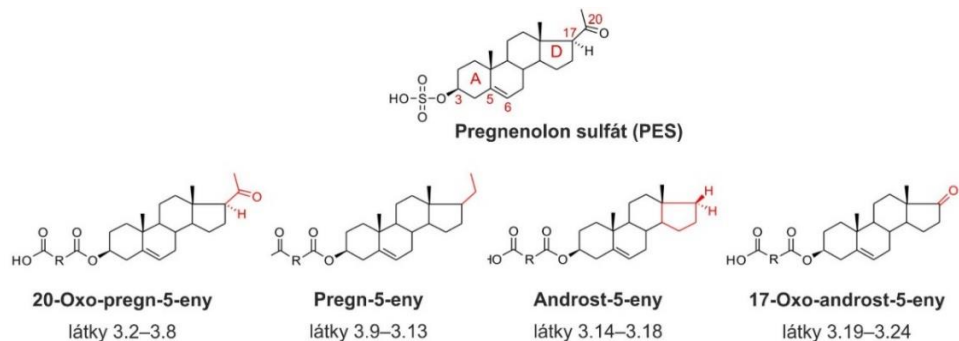
**Obrázek 5.2** Struktury amidových neurosteroidů (látky 2.1–2.12) odvozených od pregnanolon sulfátu (PAS) a pregnanolon glutamátu (PAG). Boc: ochranná tercbutyloxykarbonylová skupina

Všech dvanáct amidových neurosteroidů má nižší  $IC_{50}$  než PAS a PAG (Obrázek 5.2), na základě čehož by bylo možné tvrdit, že amidové zbytky na C3 zlepšují inhibiční působení látek. Pro další charakterizaci byla vybrána látka 2.6, její účinek není selektivní pro GluN1/GluN2A–D. Látka 2.6 ale vykazovala signifikantně vyšší inhibiční působení na nativní NMDA receptory než na GABA a AMPA receptory v hipokampálních neuronálních kulturách (Adla *et al.*, 2018).

#### 4.2 Vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

Další SAR studie byla zaměřena na sérii strukturálních analogů PES (látky 3.2–3.24, Obrázek 5.3) 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).

Všechny nově syntetizované látky (3.2–3.24) potencují GluN1/GluN2B receptory v rozmezí  $E_{max}$  48 až 452 % ( $EC_{50}$  od 1,8 do 151,4  $\mu$ M) (Krausova *et al.*, 2018). Celkem deset látek je účinnější pozitivní modulátor rekombinantních GluN1/GluN2B receptorů než PES ( $EC_{50}$  = 21,7  $\mu$ M). Jako nejúčinnější strukturální modifikace na C17 se jeví androst-5-eny ( $EC_{50}$  od 1,8 až 7,4  $\mu$ M). Naopak nejméně účinné jsou látky 3.19 a 3.20 se 17-oxo skupinou.



**Obrázek 5.3** Struktury potenciačních látek (látky 3.2–3.24) odvozených od pregnenolon sulfátu (PES).

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

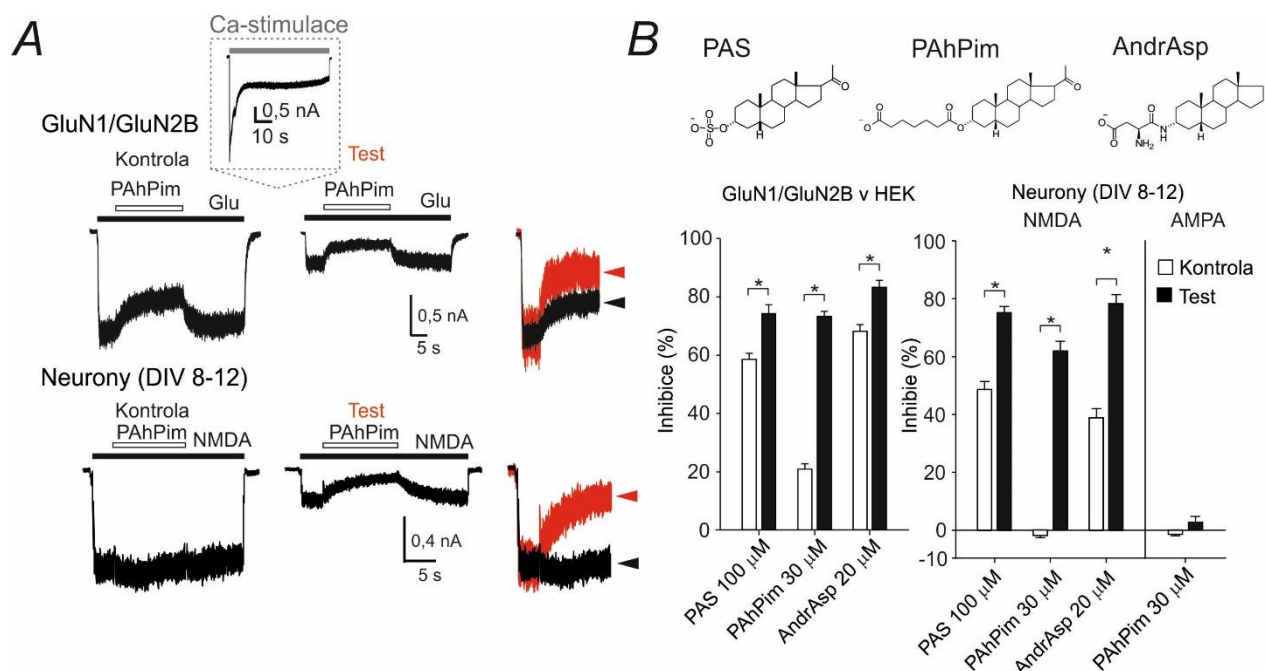
### 4.3 Vliv $\text{Ca}^{2+}$ na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory

V rámci předchozích SAR studií byla u 50  $\mu\text{M}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ , byl testován vliv  $\text{Ca}^{2+}$  na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory. Výsledky uvedené v této kapitole jsou publikované v *Journal of Neuroscience* (Hubalkova *et al.*, 2021).

#### 4.3.1. 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  $\mu\text{M}$  glutamátem byla snímána technikou terčíkového zámku v konfiguraci snímání z celé buňky v přítomnosti 0,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ECS. Ca-stimulace probíhala jako 50 s aktivace NMDA receptorů 1 mM glutamátem v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ECS. Tento protokol simuluje podmínky nadměrné aktivace NMDA receptorů, což má za následek zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  (MacDermott *et al.*, 1986).

Obrázek 5.4 shrnuje inhibiční působení třech vybraných neurosteroidů na rekombinantní i nativní NMDA receptory. Endogenní neurosteroid PAS (100  $\mu\text{M}$ ) 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 (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 PAhPim ( $\Delta I = 52$  % u rekombinantních a 64 % u nativních NMDA receptorů), a proto byl PAhPim studován v dalších pokusech. Nárůst míry inhibice nebyl pozorován u nativních AMPA receptorů (Obrázek 5.4).



**Obrázek 5.4** Vliv Ca<sup>2+</sup> na inhibiční působení vybraných neurosteroidů na rekombinantní a nativní receptory. **A)** Ukázky elektrofyziologických záznamů inhibičního působení PAhPim (30 μM, aplikace vyznačena bílým obdélníkem) na GluN1/GluN2B receptory exprimované v HEK293 buňkách/nativní NMDA receptory, které byly aktivované 1 μM glutamát/10 μM NMDA (černý obdélník) v 0,2 mM Ca<sup>2+</sup> ECS před (*kontrola*) a po (*test*) Ca-stimulaci (aktivace 1 mM glutamát/100 μM NMDA v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup> 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). **B)** Ukázky struktur neurosteroidů a graf reprezentující průměr inhibice ± SEM pro PAS (100 μM), PAhPim (30 μM) a AndrAsp (20 μM) před (*kontrola*) a po (*test*) Ca-stimulaci na rekombinantních GluN1/GluN2B a nativních NMDA a AMPA receptorech. PAS: pregnanolon sulfát; PAhPim: pregnanolon hemipimelát; AndrAsp: androstan aspartát.

Dalším cílem bylo zjistit, zda nárůst míry inhibice neurosteroidů závisí přímo na zvýšené intracelulární koncentraci Ca<sup>2+</sup> či spíše souvisí s následnou Ca-dependentní signalizací, která změní citlivost NMDA receptorů k neurosteroidům. Při současném elektrofyziologickém snímání a měření intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup> pomocí barviva Fura bylo zjištěno, že po Ca-stimulaci dochází pouze k přechodnému zvýšení intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup> bezprostředně po Ca-stimulaci a během ~2 min dojde k návratu na původní hodnotu fluorescence (F340/380), ale zvýšená míra inhibičního působení neurosteroidů přetrvává i 30 minut po Ca-stimulaci (Hubalkova *et al.*, 2021).

#### 4.3.2 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<sup>2+</sup>, byla v prvním kroku studována intracelulární CTD. V případě delece CTD u obou podjednotek GluN1/GluN2B nebo pouze delece CTD GluN2B je míra inhibice

PAhPim maximálně zvýšená již v kontrolní odpovědi a po Ca-stimulaci nedochází k dalšímu nárůstu míry inhibice. Z toho lze usuzovat, že místo zodpovědné za regulaci citlivosti NMDA receptorů k neurosteroidům leží na CTD GluN2B podjednotky, 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. Pomocí online predikčního programu CSS-Palm 2.0 (Ren *et al.*, 2008) a poznatků z literatury (Hayashi *et al.*, 2009) byly v této oblasti predikovány tři cysteiny C849, C854 a C871, které mohou být posttranslačně palmitoylovány. Pomocí cílené mutagenese byly připraveny mutantní formy NMDA receptorů s náhradou těchto cysteinů za alanin, který znemožňuje palmitoylaci a mutovaný receptor se chová jako depalmitoylovaný. V případě náhrady všech tří cysteinů za alanin GluN2B(AAA) byla již míra inhibice 30  $\mu$ M PAhPim v kontrolní odpovědi výrazně zvýšená oproti WT a po Ca-stimulaci došlo již jen k mírnému navýšení. Oproti WT se rozdílně chovaly i mutantní formy, kdy byl alaninem nahrazen pouze jediný cystein (C849A, C854A či C871A). Pro potvrzení bylo provedeno měření s antibiotikem tunicamycinem, které brání palmitoylaci (Patterson a Skene, 1995). Inhibice kontrolních odpovědí GluN1/GluN2B vyvolaná 30  $\mu$ M PAhPim u buněk inkubovaných 1–2 hodiny před měřením v 1,2  $\mu$ M tunicamycinu byla signifikantně větší ( $48,3 \pm 5,9$  %;  $n = 10$ ) než u WT ( $21,1 \pm 1,9$  %;  $n = 60$ ). 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.

#### **4.3.3 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. Neurony inkubované dvě hodiny s NMDA vykazují nárůst mrtvých neuronů v závislosti na koncentraci NMDA (3, 10, 30  $\mu$ M). Pokud ale byly neurony inkubovány s 30  $\mu$ M NMDA spolu s PAhPim (30  $\mu$ M), bylo pozorováno signifikantní snížení PI-pozitivních neuronů, a tedy neuroprotektivní účinek PAhPim.

## 5. DISKUZE

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

Z řady předchozích SAR studií vyplývá, že pro zachování inhibičního působení strukturálních analogů PAS na NMDA receptory je důležitý záporně nabitý substituent v  $\alpha$ -stereochemii na C3 a  $\beta$ -stereochemie na C5 steroidního jádra (Irwin *et al.*, 1994; Park-Chung *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2000). V předchozí 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  $\mu$ 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, ale tyto strukturální modifikace, až na látky 1.9 a 1.10, 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. Látka 1.9, vykazuje mírnou podjednotkovou specifitu pro GluN2B oproti GluN2A, GluN2C a GluN2D, kdy je pro GluN2B signifikantně méně účinným inhibitorem. Tím se odlišuje od PAS, který je přibližně dvakrát účinnější inhibitor podjednotek GluN2C a GluN2D ( $IC_{50} = 26$  a  $30 \mu$ M) než GluN2A a GluN2B ( $IC_{50} = 50$  a  $44 \mu$ 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 inhibitor GABA než NMDA receptorů. V porovnání nejúčinnější inhibitor z testované série modifikací D-kruhu (Kudová *et al.*, 2015) nemá signifikantně odlišné působení na nativních GABA a NMDA receptorech (Kudová *et al.*, 2015). 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; Vyklicky *et al.*, 2016). Látka 1.9 je zároveň šestkrát účinnější inhibitor nativních NMDA receptorů než AMPA receptorů, což je obdobné jako u 17 $\beta$ -methyl-5 $\beta$ -androstano-3 $\alpha$ -yl 3-sulfátu (Kudová *et al.*, 2015), jenž je desetkrát účinnější inhibitor nativních NMDA receptorů než AMPA receptorů.

Druhou testovanou skupinou látek byly amidové neurosteroidy odvozené od PAS a PAG. Neurosteroid PAG (Borovská *et al.*, 2012) v *in vivo* studiích vykazuje neuroprotektivní účinky (Rambousek *et al.*, 2011; Kleteckova *et al.*, 2014), jeho inhibiční účinky 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 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 nabitě substituenty jsou na C3 steroidního jádra připojeny pomocí amidové vazby s cílem zlepšit účinek, rozpustnost, propustnost a náchylnost k degradaci v organismu. Tato strukturální C3-amidová modifikace se ukázala jako úspěšná, protože všechny nově připravené analogy mají nižší hodnoty  $IC_{50}$  (od 1,4 do 21,7  $\mu\text{M}$ ) a jsou tak účinnějšími inhibitory GluN1/GluN2B receptorů než výchozí PAS a PAG ( $IC_{50} = 25$  a  $52 \mu\text{M}$ ).

Pro další charakterizaci byla vybrána látka 2.6 – C3-amidový analog PAS bez substituentu na C17. Na rekombinantních GluN1/GluN2A–D receptorech nevykazuje podjednotkovou specificitu. Látka 2.6 je přibližně dvakrát účinnějším inhibitorem nativních NMDA receptorů než GABA receptorů ( $IC_{50} = 8,3$  vs.  $17,0 \mu\text{M}$ ), což je odlišné od dříve studovaných strukturálních analogů (Kudova *et al.*, 2015; Slavikova *et al.*, 2016), jejichž účinek na NMDA a GABA receptory se nelišil či byl vyšší pro GABA receptory. Zároveň látka 2.6 má minimální účinek na AMPA receptory ( $IC_{50} = 276 \mu\text{M}$ ), 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). 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 a má vyšší stabilitu v krevní plasmě než PAG, což z látky 2.6 dělá výchozí látku pro další testování a navazující studie s cílem optimalizovat farmakologické a farmakokinetické parametry.

## **5.2 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).

V této pilotní studii byl po vzoru strukturních 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 strukturní analogy androst-5-enu (látky 3.14–3.18) – neurosteroidy bez substituentu na C17. To je ve shodě s výsledky SAR studie inhibičních neurosteroidů, kdy neurosteroidy bez substituentu na C17 jsou účinnější modulátory NMDA receptorů než přirozeně se vyskytující PAS (Kudova *et al.*, 2015; Slavikova *et al.*, 2016; Adla *et al.* 2018). Z výsledků dále vyplývá, že potenciační účinek je závislý na délce C3-hemiesterového zbytku v kombinaci s typem substituentu na C17.

Látka 3.6 má přibližně stejný účinek na jednotlivé podjednotky NMDA receptorů (Krausova *et al.*, 2018), čímž se liší od PES, který má na NMDA receptory kombinovaný potenciačně-inhibiční efekt (Horak *et al.*, 2004; Horak *et al.*, 2006). Na nativních receptorech v hipokampálních kulturách má látka 3.6 a PES typově stejné účinky, ale 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 (Krausova *et al.*, 2018).

### **5.3 Vliv $\text{Ca}^{2+}$ na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory**

Cílem bylo objasnit možný vliv  $\text{Ca}^{2+}$  na účinek neurosteroidů na NMDA receptory. V prvním kroku byl optimalizován protokol Ca-stimulace. Intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  byla zvyšována prostřednictvím dialýzy intracelulárního prostoru pomocí ICS obsahující  $\text{Ca}^{2+}$  či různě dlouhou aktivací NMDA receptorů v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ . Ve všech případech došlo ke zvýšení inhibičního působení neurosteroidů po Ca-stimulaci. V dalších experimentech byl k Ca-stimulaci využíván protokol aktivace NMDA receptorů 1 mM glutamátem v prostředí 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ECS po dobu 50 s, který nejvíce připomíná přirozenou aktivaci NMDA receptorů. Tato Ca-stimulace nebyla pro buňky příliš toxická a umožnila další měření, zároveň ale bylo dosaženo stabilního efektu. To, že pozorovaný efekt skutečně souvisí s nárůstem intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  bylo potvrzeno i měřením v ECS bez  $\text{Ca}^{2+}$ , kdy nedošlo k významnému nárůstu inhibice oproti Ca-stimulaci. Měření volné koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ .

Postupnou mutací NMDA receptorů byl objasněn molekulární mechanismus zvýšeného inhibičního působení neurosteroidů na NMDA receptory, kdy byla identifikována oblast na CTD GluN2B podjednotky v těsné blízkosti membrány (R847–E878), která se významně podílí na zvýšené citlivosti NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům. V této oblasti byly identifikovány tři cysteiny, které mohou být palmitoylovány (Hayashi *et al.*, 2009). 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) a byla popsána pro mnoho proteinů, včetně iontových kanálů – například NMDA (Hayashi, 2021), AMPA (Hayashi *et al.*, 2005), GABA<sub>A</sub> (Rathenberg *et al.*, 2004).

Porovnání sekvencí CTD v blízkosti membrány i u dalších glutamátových receptorů 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.

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 (Gubitski-Klug *et al.*, 2005), zatímco palmitoylace  $\beta$ 2a podjednotky N-typu vápníkových kanálů ovlivňuje napětově-závislou inaktivaci (Qin *et al.*, 1998). V rámci studie (Hubalkova *et al.*, 2021) bylo provedeno snímání jednotlivých kanálů (single-channel recordings) v HEK293 buňkách exprimujících GluN1/GluN2B (WT) nebo GluN1/GluN2B(AAA) receptory. Mutované receptory vykazovaly 55% pokles pravděpodobnosti otevření ( $P_o$ ) 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. Výsledky také 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). To dále koresponduje s výsledky molekulového modelování, které ukazuje, že palmitoylace stabilizuje CTD GluN2B v membráně a zprostředkovává otevření kanálů (Hubalkova *et al.*, 2021). Námi 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  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky.

## 6. ZÁVĚRY

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. Dále 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  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 6.1 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 látky 1.1–1.10 si zachovaly inhibiční působení, ale ani jedna ze strukturních modifikací nevedla k výraznému zlepšení inhibičního účinku oproti PAS.

Nejúčinnější inhibitor z testované série – látka 1.9, vykazuje nízkou podjednotkovou specifitu 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 než PAS a PAG. Látka 2.6 nevykazuje podjednotkovou specifitu 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 studie s cílem optimalizovat farmakologické a farmakokinetické parametry.

## 6.2 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 %.
- Látka 3.6 na rozdíl od PES inhibuje všechny podjednotky GluN1/GluN2A–D. Na nativních receptorech má látka 3.6 a PES typově stejné účinky (potenciace NMDA a inhibice AMPA a GABA receptorů), látka 3.6 je ale více selektivní a účinnější modulátor.

## 6.3 Vliv $\text{Ca}^{2+}$ na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory

- Zvýšená citlivost NMDA receptorů k inhibičním neurosteroidům souvisí s nárůstem intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 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 popsaný vliv Ca-indukované depalmitoylace GluN2B podjednotky na působení inhibičních neurosteroidů a kinetiku receptoru tak může být dalším z neuroprotektivních mechanismů, který brání nadměrnému vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do buněk a vzniku excitotoxicity.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Adla, S.K., Slavikova, B., Chodounska, H., Vyklicky, V., *et al.* (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.
- Adla, S. K., Slavikova, B., Smidkova, M., Tloustova, E., *et al.* (2017). Physicochemical and biological properties of novel amide-based steroidal inhibitors of NMDA receptors. *Steroids* 117, 52–61. ISSN 0039128X.
- Borovska, J., Vyklicky, V., Stastna, E., Kapras, V., *et al.* (2012). Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *British Journal of Pharmacology* 166, 1069–1083. ISSN 00071188.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* 51, 7–61. ISSN 0031-6997.
- 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.
- Gerets, H.H.J., Hanon, E., Cornet, M., Dhalluin, S., *et al.* (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.
- 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. ISSN 0027-8424.
- Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Furukawa, H., *et al.* (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *The Journal of General Physiology* 150, 1081–1105. ISSN 0022-1295.
- Hayashi, T. (2021). Post-translational palmitoylation of ionotropic glutamate receptors in excitatory synaptic functions. *British Journal of Pharmacology* 178, 784–797. ISSN 0007-1188.
- 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.
- Hayashi, T., Thomas, G.M., Haganir, R.L. (2009). Dual Palmitoylation of NR2 Subunits Regulates NMDA Receptor Trafficking. *Neuron* 64, 213–226. ISSN 08966273.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hubalkova, P., Ladislav, M., Vyklicky, V., Smejkalova, T., *et al.* (2021). Palmitoylation Controls NMDA Receptor Function and Steroid Sensitivity. *The Journal of Neuroscience* 41, 2119–2134. ISSN 0270-6474
- Charollais, J., Van Der Goot, F.G. (2009). Palmitoylation of membrane proteins (Review). *Molecular Membrane Biology* 26, 55–66. ISSN 0968-7688.
- 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.
- Iacobucci, G.J., Popescu, G.K. (2020). Ca<sup>2+</sup>-Dependent Inactivation of GluN2A and GluN2B NMDA Receptors Occurs by a Common Kinetic Mechanism. *Biophysical Journal* 118, 798–812. ISSN 00063495.
- 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<sup>++</sup> responses: structure-activity studies. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 271, 677–682. ISSN 0022-3565.
- Kleteckova, L., Tsenov, G., Kubova, H., Stuchlik, A., Vales, K. (2014). Neuroprotective effect of the 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats. *Neuroscience Letters* 564, 11–15. ISSN 03043940.
- Krausova, B., Slavikova, B., Nekardova, M., Hubalkova, P., *et al.* (2018). Positive Modulators of the N-Methyl-d-aspartate Receptor: Structure–Activity Relationship Study of Steroidal 3-Hemiesters. *Journal of Medicinal Chemistry* 61, 4505–4516. ISSN 0022-2623.

- Kudova, E., Chodounska, H., Slavikova, B., Budesinsky, M., *et al.* (2015). A New Class of Potent N-Methyl-d-Aspartate Receptor Inhibitors: Sulfated Neuroactive Steroids with Lipophilic D-Ring Modifications. *Journal of Medicinal Chemistry* 58, 5950–5966. ISSN 0022-2623.
- Lussier, M.P., Sanz-Clemente, A., Roche, K.W. (2015). Dynamic Regulation of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Posttranslational Modifications. *Journal of Biological Chemistry* 290, 28596–28603. ISSN 00219258.
- 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.
- 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.
- 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.
- Park-Chung, M., Wu, F.S., Purdy, R.H., Malayev, A.A., *et al.* (1997). Distinct sites for inverse modulation of NMDA receptors by sulfated steroids. *Molecular pharmacology* 52, 1113–1123. ISSN 0026-895X.
- 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.
- Petrovic, M., Sedlacek, M., Horak, M., Chodounska, H., Vyklický, L. (2005). 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfate is a use-dependent NMDAR receptor inhibitor. *The Journal of Neuroscience* 25, 8439–8450. ISSN 0270-6474.
- Punnakkal, P., Jendritza, P., Kohr, G. (2012). Influence of the intracellular GluN2 C-terminal domain on NMDA receptor function. *Neuropharmacology* 62, 985–1002. ISSN 00283908.
- Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Costantin, J.L., *et al.* (1998). Unique regulatory properties of the type 2a  $\text{Ca}^{2+}$  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.
- Rambousek, L., Bubenikova-Valesova, V., Kacer, P., Syslova, K., *et al.* (2011). Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-d-aspartate receptor 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate. *Neuropharmacology* 61, 61–68. ISSN 00283908.
- 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.
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., *et al.* (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
- Shipston, M.J. (2011). Ion channel regulation by protein palmitoylation. *Journal of Biological Chemistry* 286, 8709–8716. ISSN 00219258.
- Slavikova, B., Chodounska, H., Nekardova, M., Vyklicky, V., *et al.* (2016). Neurosteroid-like Inhibitors of N-Methyl-D-aspartate Receptor: Substituted 2-Sulfates and 2-Hemisuccinates of Perhydrophenanthrene. *Journal of Medicinal Chemistry* 59, 4724–4739. ISSN 0022-2623.
- 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.
- Vyklicky, V., Krausova, B., Cerny, J., Ladislav, M., *et al.* (2018). Surface Expression, Function, and Pharmacology of Disease-Associated Mutations in the Membrane Domain of the Human GluN2B Subunit. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11, 110. ISSN 1662-5099.
- Vyklicky, V., Smejkalova, T., Krausova, B., Balik, A., *et al.* (2016). Preferential Inhibition of Tonically over Phasically Activated NMDA Receptors by Pregnane Derivatives. *The Journal of Neuroscience* 36, 2161–2175. ISSN 0270-6474.
- 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.
- Weaver, C.E., Land, M.B., Purdy, R.H., Richards, K.G., *et al.* (2000). Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N- methyl-D-aspartate receptor-induced  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation and cell death. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293, 747–754. ISSN 0022-3565.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ

### 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.  
*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.  
*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.  
*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.  
*PH: podíl na elektrofyziologických experimentech a jejich analýze (IF: 1,948, rok 2019)*
- 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.  
*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. *(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. *(IF: 1,140, rok 2019)*
- Hajkova, A., Techlovská, 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. *(IF: 4,249, rok 2017)*
- **Hubalkova, P.** (2015). G-kvadrupelexy v oblasti lidských telomer a jejich terapeutický potenciál. *Chemické listy*. 109, 918–922. *(IF: 0,390, rok 2019)*