

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra fyziologie živočichů**



*Bakalářská práce*

**MODULACE CHEMICKY AKTIVOVANÝCH  
IONTOVÝCH KANÁLŮ NEUROSTEROIDY**

Barbora Krausová

Školitel: MUDr. Ladislav Vyklický, DrSc

Praha 2010

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a pod vedením školitele MUDr. Ladislava Vyklického, DrSc.

V Praze dne .....

Podpis: .....

## **Poděkování:**

Děkuji svému školiteli MUDr. Ladislavu Vyklickému, DrSc za cenné rady, podnětné připomínky a trpělivost.

## Abstrakt

Termín neurosteroidy označuje skupinu steroidních látek syntetizovaných v nervové tkáni z cholesterolu nebo ze steroidních prekurzorů pocházejících z periferních zdrojů. Tyto látky ovlivňují molekulární dráždivost modulací funkce některých ligandem aktivovaných iontových kanálů. NMDA (N-methyl-D-aspartátové) receptory jsou glutamátem aktivované iontové kanály zapojené v excitačním synaptickém přenosu, synaptické plasticitě a excitotoxicitě. GABA<sub>A</sub> receptory (kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné typu A) zprostředkovávají většinu inhibičního synaptického přenosu v savčím mozku a jsou cílem mnoha klinicky významných léčiv. Funkce NMDA a GABA<sub>A</sub> receptorů může být neurosteroidy ovlivněna buď pozitivně, nebo negativně.

Cílem této práce je shrnout současné poznatky o působení neurosteroidů na činnost GABA<sub>A</sub> a NMDA receptorů a naznačit fyziologický význam a potenciální využití neurosteroidů jako regulačního mechanismu některých funkcí centrální nervové soustavy.

Klíčová slova: neurosteroidy, iontové kanály, glutamátové receptory, GABA receptory, alosterická modulace, pravděpodobnost otevření, vazebné místo

## Abstract

The term neurosteroids refers to steroids that are synthesized in the nervous tissue from cholesterol or steroidal precursors from peripheral sources. These compounds affect the neuronal excitability by modulating the function of some ligand-gated ion channels. NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors are glutamate gated ion channels involved in excitatory synaptic transmission, synaptic plasticity and excitotoxicity. GABA<sub>A</sub> ( $\gamma$ -aminobutyric acid type A) receptors mediate most of the inhibitory synaptic transmission in the mammalian brain and are targeted by many clinically important drugs. Function of NMDA and GABA<sub>A</sub> receptors can be affected by neurosteroids, both positively and negatively.

The aim of this work is to summarize the current knowledge about the neurosteroid effects on the function of NMDA and GABA<sub>A</sub> receptors and suggest the physiological role and the potential therapeutic use of the neurosteroids as a regulator of some functions of the central nervous system.

Key words: neurosteroids, ion channels, glutamate receptors, GABA receptors, allosteric modulation, open probability, binding site

## Seznam zkratek

3 $\alpha$ 5 $\alpha$	allopregnanolon (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on)
3 $\alpha$ 5 $\alpha$ S	3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on sulfát
3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -THDOC	tetrahydrodeoxykortikosteron
3 $\alpha$ 5 $\beta$	pregnanolon (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl)
3 $\alpha$ 5 $\beta$ HS	pregnanolon hemisukcinát
3 $\alpha$ 5 $\beta$ S	pregnanolon sulfát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát)
3 $\beta$ 5 $\alpha$ S	3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on sulfát
3 $\beta$ 5 $\beta$ S	epipregnanolon sulfát (3 $\beta$ -hydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on sulfát)
3 $\beta$ HSD	3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 izomeráza
5 $\alpha$ -DHT	dihydrotestosteron
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát
C	označení uhlíku v řetězci
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CGC	granulární buňky mozečku
CNS	centrální nervová soustava
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHEAS	dehydroepiandrosteron sulfát
DOC	deoxykortikosteron
EC <sub>50</sub>	koncentrace látky vyvolávající 50 % účinek
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
Glu	glutamát
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 cells
IC <sub>50</sub>	koncentrace látky vyvolávající 50 % inhibici
LTD	dlouhodobá deprese (long-term depression)
LTP	dlouhodobá potenciace (long-term potentiation)
M	membránová doména
mIPSCs	miniaturní inhibiční postsynaptické proudy
MK-801	dizocilpin
NADPH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NR	označení podjednotky NMDA receptoru
P450aro	cytochrom P450 aromatáza
P450c17	17 $\alpha$ -hydroxyláza/17,20 lyáza
P450scc	enzym štěpící postranní řetězec cholesterolu
P5	pregnenolon
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PNS	periferní nervová soustava
P <sub>o</sub>	pravděpodobnost otevření
PS	pregnenolon sulfát (20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -yl sulfát)
SR-95531	gabazin
THIP	tetrahydroisoxazolpyridinol
TM	transmembránová doména

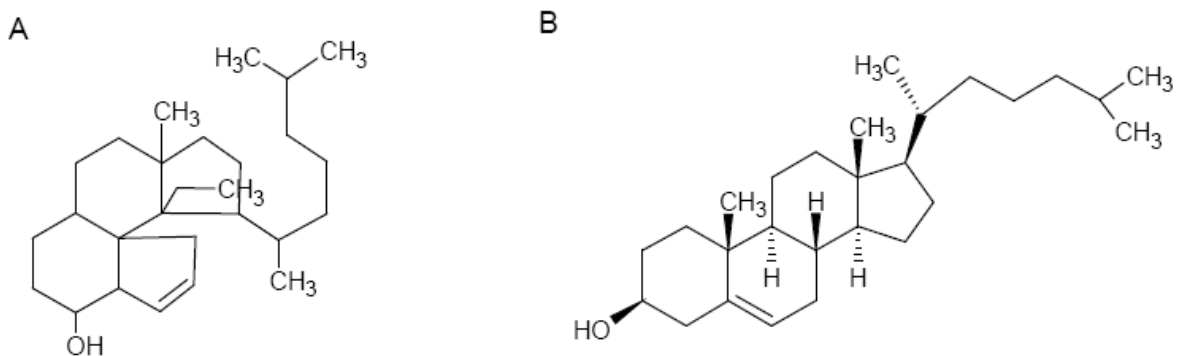
# Obsah

Abstrakt/Abstract .....	4
Seznam zkratek .....	5
Obsah .....	6
Úvod.....	7
1. Neurosteroidy a jejich syntéza.....	9
2. Účinek neurosteroidů v mozku.....	10
<b>2.1. Glutamátové receptory .....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Význam NMDA receptorů .....	11
2.1.2. Struktura NMDA receptorů.....	12
2.1.3. Farmakologie NMDA receptorů .....	12
2.1.3.1. Inhibice NMDA receptorů neurosteroidy .....	13
2.1.3.2. Potenciace NMDA receptorů neurosteroidy .....	16
2.1.3.3. Strukturální determinanty neurosteroidů jako předpoklad jejich účinku na NMDA receptorech ..	21
2.1.3.3.1. Inhibiční neurosteroidy .....	21
2.1.3.3.2. Potenciační neurosteroidy .....	22
<b>2.2. GABA<sub>A</sub> receptory.....</b>	<b>22</b>
2.2.1. Struktura GABA <sub>A</sub> receptorů .....	23
2.2.2. Farmakologie GABA <sub>A</sub> receptorů.....	23
2.2.2.1 Modulace GABA <sub>A</sub> receptorů neurosteroidy .....	24
2.2.2.2. Strukturální determinanty neurosteroidů jako předpoklad jejich účinku na GABA <sub>A</sub> receptorech ..	29
2.2.2.3. Účinek neurosteroidů na GABA <sub>A</sub> receptory .....	31
Závěr .....	32
Přehled použité literatury .....	34

## Úvod

Steroidy jsou organické látky strukturně odvozené z cyklopentanperhydrofenanthrenu, tetracyklické látky složené ze tří šestičlenných a jednoho pětičlenného cyklu. Jedná se o látky lipidové povahy, které v organismu plní řadu fyziologických funkcí. Skupina steroidů zahrnuje mnoho biologicky významných látek jako například steroly (včetně cholesterolu), pohlavní hormony (např. testosteron a estrogen), žlučové kyseliny, hormony kůry nadledvinek, některé formy vitaminů aj.

Steroly jsou speciální formy steroidů s hydroxylovou skupinou na pozici 3 a skeletem odvozeným z cholestanu. Mezi nejvýznamnější steroly patří bezesporu cholesterol. Francouzský chemik M. E. Chevreul jej v roce 1815 objevil jako složku žlučových kamenů a pojmenoval ho cholesterin (z řec. *chole* pro žluč a *stereos* pro sůl). V roce 1888 byl F. Reinitzerem stanoven empirický vzorec pro cholesterol ( $C_{27}H_{46}O$ ). Adolf Windaus byl za prvně utvořenou strukturu cholesterolu v roce 1928 oceněn Nobelovou Cenou za Chemii, avšak tato struktura navržená pro systém čtyř kruhů steroidního jádra cholesterolu nebyla úplně přesná (obr. 1). Správná struktura byla formulována v roce 1932 Heinrichem Wielandem a E. Danem, jež za své objevy také získali Nobelovu Cenu. Tato korektura byla založena na výsledcích rentgenové krystalografie a chemických studiích (Bloch 1992; Vance & Van den Bosch 2000). Objev struktury cholesterolu položil základ pro další studium steroidních látek.



Obrázek 1: Struktura cholesterolu. Chybně navržený vzorec z roku 1928 (A) byl v roce 1932 opraven (B).

Steroidní hormony ovlivňují endokrinní, neuroendokrinní a behaviorální funkce prostřednictvím intracelulárních receptorů, které regulují transkripci řízené změny v syntéze proteinů. Toto fyziologické působení se však obecně projevuje velmi pomalu (během hodin až dnů) a může přetrvávat dlouho po vymizení steroidů z mozku (McEwen 1991). Nicméně

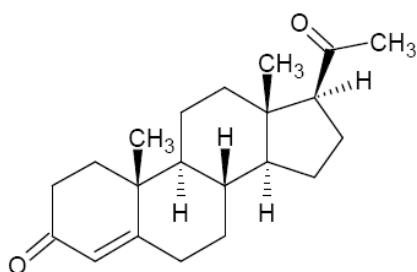
některé steroidy jsou schopny ovlivnit excitabilitu neuronů velmi rychle (v řádu sekund či dokonce milisekund), což vylučuje „klasický“ mechanismus působení těchto steroidních hormonů. V roce 1927 Cashin a Moravek poprvé zaznamenali indukci anestezie následující po intravenózním podání koloidní suspenze cholesterolu u kočky (Cashin & Moravek 1927). Následně ve 40. letech Selye zaznamenal rychlé působení některých pregnanových steroidů, kdy objev anestetického vlivu steroidních hormonů (Selye 1941) vedl k pozdějšímu vývoji syntetického anestetika alphaxalonu. Molekulární mechanismus tohoto působení ale zůstával dlouho neznámý, až přibližně v sedmdesátých letech byl při hledání mechanismu působení alphaxalonu objeven vliv steroidů na receptory pro neuropřenašeče (Smaje 1976). Následující studie ukázaly, že alphaxalon potencuje odpovědi GABA<sub>A</sub> receptorů (Harrison & Simmonds 1984) a že řada steroidních látek ovlivňuje excitabilitu neuronů nejen modulací inhibičních GABA<sub>A</sub> receptorů, ale i dalších ionotropních receptorů pro neuropřenašeče.



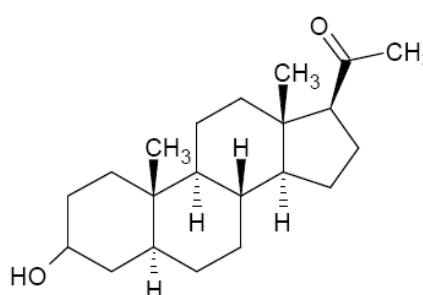
## 1. Neurosteroidy a jejich syntéza

Termínem „neurosteroidy“ jsou označovány steroidní látky syntetizované *de novo* v centrální a periferní nervové soustavě z cholesterolu a dalších steroidních prekurzorů importovaných z periferních zdrojů, které se hromadí v nervovém systému. Že k syntéze dochází v mozku lze tvrdit na základě toho, že steroidy, zejména 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta$ 5-deriváty, jako pregnenolon (P5), dehydroepiandrosteron (DHEA) a jejich sulfátové a lipidní estery, jsou přítomny ve vyšších koncentracích v nervové tkáni, než plazmě, a navíc přetrvávají v nervové soustavě dlouho po odstranění „klasických“ periferních steroidy produkujících tkání, jako jsou gonády, nadledvinky, či placenta (Baulieu 1998; Corpechot et al 1981).

(A) Progesteron



(B) Allopregnanolon



Obrázek 2: Strukturální vzorce vybraných zástupců steroidních hormonů (A) a neurosteroidů (B).

Přítomnost enzymů, zodpovědných za biosyntézu „klasických“ steroidních hormonů, byla dokázána v nervovém systému na úrovni mRNA i proteinovou analýzou (Mellon & Deschepper 1993; Mensah-Nyagan et al 1999). Neurosteroidogenní enzymy lze klasifikovat jako cytochrom P450 a non-P450 enzymy. Cytochrom P450 enzymy (např. P450<sub>scc</sub>) jsou kódovány jednotlivými geny a mohou zprostředkovávat rozmanité enzymatické reakce, např. 20 $\alpha$ -hydroxylaci, 22-hydroxylaci či rozštěpení vazby mezi C20 – C22 uhlíky cholesterolu. Naproti tomu non-P450 enzymy (např. 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 izomeráza) lze nalézt jako vícenásobné geny, kódující různé proteiny, z nichž každý katalyzuje specifickou reakci (Mellon & Griffin 2002).

Mezi enzymy klíčové pro syntézu steroidů v nervové tkáni patří: specifický enzymatický komplex, zahrnující cytochrom P450<sub>scc</sub> (enzym štěpící postranní řetězec cholesterolu), lokalizovaný ve vnitřní mitochondriální membráně, který v několika následných enzymatických krocích přeměňuje cholesterol na pregnenolon (Hu et al 1987; Ukena et al

1998). Enzymatický systém 17 $\alpha$ -hydroxyláza/17,20 lyáza (cytochrom P450c17), jenž je zodpovědný za konverzi C21-steroidů (pregnenolon) na C19-steroidy (DHEA). Enzymatický komplex 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 izomerázy (3 $\beta$ HSD), který zprostředkovává přeměnu  $\Delta$ 5-3 $\beta$ -hydroxysteroidů (P5, DHEA) na  $\Delta$ 4-3 $\beta$ -ketosteroidy (progesteron, androstenedion). Enzym 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza (17 $\beta$ HSD), jenž katalyzuje vzájemnou přeměnu mezi 17-ketosteroidy (androstenedion) a 17 $\beta$ -hydroxysteroidy (testosteron). Činností 5 $\alpha$ -reduktázy dochází k redukci dvojné vazby mezi uhlíky v pozici 4 a 5 steroidního jádra (C4-C5), pomocí vodíků z redukované přenašeče NADPH, takže například konvertuje testosteron na dihydrotestosteron (5 $\alpha$ -DHT). Přeměnu androgenů na estrogeny zajišťuje enzymatický komplex zahrnující cytochrom P450aromatázu (Mensah-Nyagan et al 1999). Důležitá je také aktivita cytosolické sulfotransferázy, která přenáší sulfátový zbytek z univerzální donorové molekuly 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na hydroxylovou skupinu steroidního substrátu, přičemž z pregnenolonu a DHEA vzniká pregnenolonsulfát ( $\Delta$ 5PS) a dihydroepiandrosteronsulfát (DHEAS) (Compagnone et al 1997). Naproti tomu sulfatáza je zodpovědná za hydrolýzu těchto sulfátových esterů ( $\Delta$ 5PS, DHEAS) za vzniku nekonjugovaných steroidů (P5, DHEA) (Mensah-Nyagan et al 1999).

Neurosteroidy jsou syntetizovány v CNS a PNS jak v gliových, tak nervových buňkách. Expres steroidogenních enzymů byla prokázána v několika buněčných typech, a to zejména v oligodendrocytech, astrocytech typu I, Schwannových buňkách a neuronech (včetně Purkyňových buněk) (Akwa et al 1993; Robert et al 2001; Ukena et al 1998; Zwain & Yen 1999). Astrocyty jsou z hlediska steroidogeneze nejvíce aktivními buňkami v mozku, z klíčových enzymů exprimují P450scc, P450c17, 3 $\beta$ HSD, 17 $\beta$ HSD a P450aro, a tudíž mohou produkovat pregnenolon, progesteron, DHEA, androgeny a estrogeny. Neurony exprimují stejné enzymy a mohou produkovat totožné neurosteroidy jako astrocyty, s výjimkou 17 $\beta$ HSD a produkce testosteronu. Oligodendrocyty exprimují pouze P450scc a 3 $\beta$ HSD a na základě toho mohou produkovat pregnenolon a progesteron. Předpokládá se spolupráce těchto tří typů buněk v rámci ucelené steroidogenní dráhy (Zwain & Yen 1999).

## 2. Účinek neurosteroidů v mozku

Některé endogenní neurosteroidy mají přímý vliv na aktivitu chemicky ovládaných iontových kanálů, jedná se o GABA<sub>A</sub>, glycinové, glutamátové (NMDA, AMPA/kainátové) či nikotinové acetylcholinové receptory (Bullock et al 1997; Wu et al 1990; 1991). Cílem následující části je podat základní informace o působení neurosteroidů na glutamátových

receptorech (především NMDA podtypu) a GABA<sub>A</sub> receptorech, jako hlavních zástupců skupin receptorů zprostředkujících excitační a inhibiční postsynaptické proudy, na kterých byl také v uplynulých letech mechanismus účinku neurosteroidů intenzivně zkoumán.

## 2.1. Glutamátové receptory

L-glutamát je hlavní excitační neurotransmitter v savčí centrální nervové soustavě. Na základě mechanismu účinku lze rozlišit dvě hlavní skupiny glutamátových receptorů. První skupinou jsou ionotropní glutamátové receptory, což jsou iontové kanály, které po aktivaci glutamátem propouštějí kationty do buňky a K<sup>+</sup> z buněk. Druhou skupinu tvoří metabotropní glutamátové receptory, které účinkují prostřednictvím s nimi spřaženého G-proteinu (Pin & Acher 2002). Ionotropní receptory lze rozdělit do tří hlavních, farmakologicky odlišných skupin, pojmenovaných podle selektivního agonisty: α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátu (AMPA), kainátu a N-methyl-D-aspartátu (NMDA) (Dingledine et al 1999).

### 2.1.1. Význam NMDA receptorů

Výsledky elektrofyziologických, histochemických a molekulárně biologických sledování ukazují, že prakticky všechny neurony a část gliových buněk v mozku a míše exprimují NMDA receptory, které jsou umístěny v postsynaptických densitách, mimosynapticky i presynapticky. Není pochyb o tom, že aktivace tohoto typu glutamátového receptoru je zásadní pro fungování nervového systému jako celku.

Byl popsán klíčový význam NMDA receptorů pro synaptickou plasticitu, konkrétně v procesech dlouhodobé potenciace (LTP) a deprese (LTD), které jsou považovány za buněčný korelát učení a tvorby paměti (Lynch 2004). NMDA receptory mimo jiné hrají významnou roli v buněčných procesech jako je excitotoxicita, kdy nadměrnou aktivací glutamátových receptorů dojde k narušení Ca<sup>2+</sup> homeostázy, což ústí v buněčnou smrt (Arundine & Tymianski 2003). Byl také popsán význam NMDA receptorů při vzniku a průběhu řady akutních i chronických patologických stavů CNS, jako je ischemické poškození, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, či schizofrenie, což z nich činí možný cíl farmakologické intervence.

### 2.1.2. Struktura NMDA receptorů

NMDA receptory jsou iontové kanály, které po navázání glutamátu a glycinu propouští  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky a  $\text{K}^+$  z buňky. Jedná se o heteromerní komplexy, složené z NR1, NR2A-D a/nebo NR3A-B podjednotek. Podjednotky sdílejí shodnou topologii: extracelulárně směřující N-konec, čtyři membránové domény, z nichž tři jsou transmembránové (M1, M3 a M4) a druhá doména (M2) tvoří v membráně intracelulárně orientovanou vratnou kličku (M2 kompletního tetrametru receptoru vytváří pór iontového kanálu), a intracelulární C-konec (Sobolevsky et al 2009). Klička mezi třetí a čtvrtou transmembránovou doménou je 169 aminokyselinových zbytků dlouhý segment, který je vysoce konzervovaný mezi odlišnými NR2 podjednotkami (NR2A sdílí 86 %, 79 % a 77 % homologii se shodnými úseky na NR2B, NR2C a NR2D podjednotkách) (Ishii et al 1993). Gen pro NR1 podjednotku existuje v osmi sestříhových variantách, lišících se přítomností či absencí 21 aminokyselin dlouhého insertu na N-konci, zatímco NR2A-D podjednotky jsou kódovány čtyřmi různými geny (Dingledine et al 1999).

V rámci tetramerního uspořádání komplexu NMDA receptoru se vyskytují 2 vazebná místa pro glutamát/NMDA a 2 místa pro glycin (Clements & Westbrook 1991). Studie mutagenese naznačují, že vazebná místa pro glutamát/NMDA se vyskytují na NR2 podjednotce (Anson et al 1998), zatímco vazebné místo pro glycin se nachází na NR1 podjednotce (Wafford et al 1995).

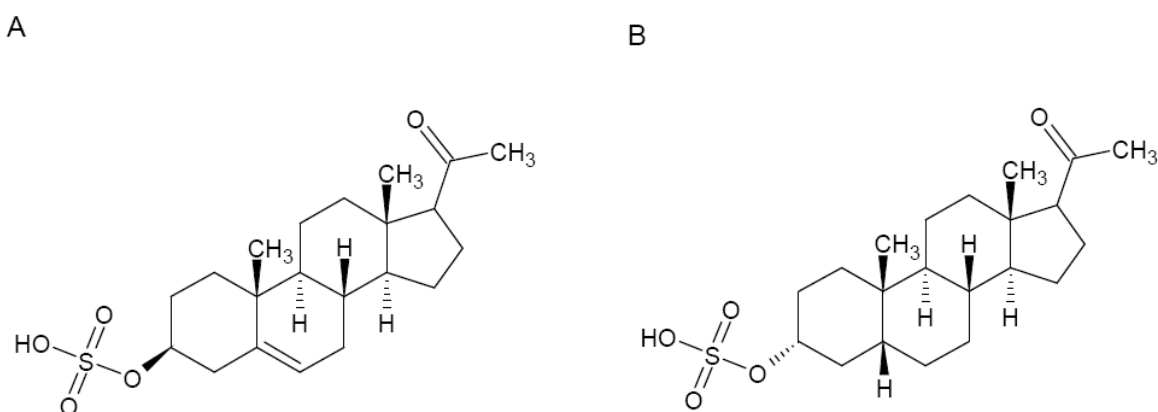
### 2.1.3. Farmakologie NMDA receptorů

Podjednotkové složení určuje biofyzikální a farmakologické vlastnosti NMDA receptor-kanálového komplexu. Na podjednotkách se vyskytují různá rozpoznávací místa pro endogenní a exogenní ligandy, včetně vazebných míst pro agonisty, blokátory otevřeného kanálu (např. MK-801), polyaminy, protony,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a neurosteroidy (Dingledine et al 1999).

Mnoho antagonistů NMDA receptoru vykazuje selektivní afinitu závislou na NR2 podjednotce. Například flebamát (Kleckner et al 1999), ifenprodil (Williams 1993) či haloperidol (Ilyin et al 1996) selektivně inhibují NMDA receptory obsahující NR2B podjednotku, zatímco třeba toxin měkkýše *Conus tulipa* conantokin-R selektivně inhibuje receptory obsahující buď NR2A, nebo NR2C podjednotku (White et al 2000).

S NMDA receptorem je asociována celá řada modulačních míst. Například pro polyaminy, jako spermin či spermidin, které v mikromolárních koncentracích zvyšují odpověď na NMDA (Sprosen & Woodruff 1990), přičemž potenciace pomocí spermidinu je závislá jak na NR1 sestříhové variantě, tak i na přítomné NR2 podjednotce (Zhang et al 1994). Arachidonová kyselina má amfipatický charakter (stejně jako PS) a pravděpodobně působí prostřednictvím vazebné domény pro mastné kyseliny na NMDA receptoru (Petrou et al 1993). Navíc jsou zde také přítomna místa, která jsou oxidována/redukována redoxními činidly, kdy redukce na těchto místech zesiluje proudy indukované NMDA, zatímco oxidace má opačný účinek (Aizenman et al 1989).

Z farmakologických studií vyplývá, že některé sulfátové steroidy mohou modulovat funkci NMDA receptorů oběma směry: například 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát (pregnanolon sulfát, 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S) působí jako inhibitor, naproti tomu např. 20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -yl sulfát (pregnenolon sulfát, PS) má potenciační účinek (Bowlby 1993; Park-Chung et al 1994; Wu et al 1991). Pregnanolon sulfát (3 $\alpha$ 5 $\beta$ S) se liší od pregnenolon sulfátu (PS) absencí dvojně vazby (obr. 3).



Obrázek 3: Chemická struktura pregnenolon sulfátu (A) a pregnanolon sulfátu (B).

#### 2.1.3.1. *Inhibice NMDA receptorů neurosteroidy*

20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát (pregnanolon sulfát, 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S) je v savčím mozku přirozeně se vyskytující neurosteroid (Robel et al 1987), který zde moduluje funkci řady iontových kanálů (NMDA, AMPA, kainátové, GABA<sub>A</sub>) (Park-Chung et al 1999; Park-Chung et al 1994). Na NMDA receptory působí 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S inhibičně (Park-Chung et al 1994), a to sice snížením pravděpodobnosti otevření ( $P_o$ ) iontového kanálu (Petrovic et al 2005).

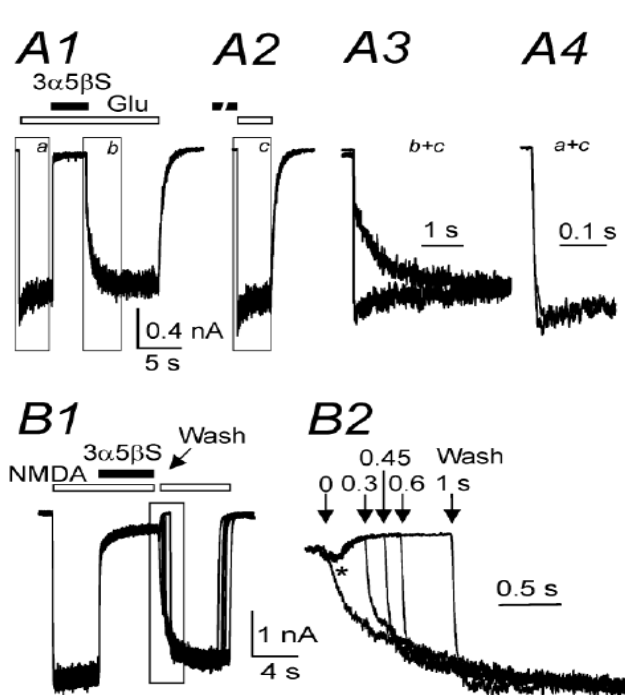
Z kinetických experimentů vyplývá, že ke snížení  $P_o$  dochází prodloužením průměrné doby

uzavření, bez vlivu na průměrnou dobu otevření, čímž dochází k hromadění receptorů v desenzitizovaném stavu (Kussius et al 2009). Například při současné aplikaci 100  $\mu\text{M}$   $3\alpha5\beta\text{S}$  a 30  $\mu\text{M}$  NMDA byla maximální odpověď indukovaná NMDA v buněčných kulturách embryonálních kuřecích míšních neuronů výrazně snížena, avšak pouze s malým účinkem na  $\text{EC}_{50}$  NMDA (koncentrace látky vyvolávající 50% účinek), kdy v nepřítomnosti  $3\alpha5\beta\text{S}$  byla  $\text{EC}_{50}$  pro NMDA 156  $\mu\text{M}$  a v přítomnosti tohoto neurosteroidu byla hodnota  $\text{EC}_{50} = 106 \mu\text{M}$ . Tyto výsledky naznačují, že efekt  $3\alpha5\beta\text{S}$  na odpovědi vyvolané NMDA je nekompetitivní povahy, to znamená, že  $3\alpha5\beta\text{S}$  nepůsobí prostřednictvím vazebného místa pro NMDA (Park-Chung et al 1994). Další experimenty také prokázaly, že k inhibičnímu působení nedochází ani interakcí s vazebnými místy pro jiné významné modulátory NMDA receptorů (Park-Chung et al 1994; Petrovic et al 2005).

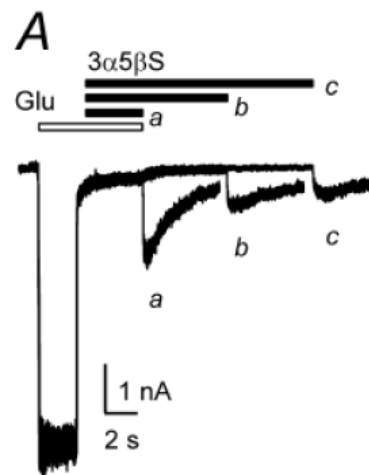
Míra inhibice není závislá na membránovém potenciálu buňky, z čehož vyplývá, že  $3\alpha5\beta\text{S}$  nepůsobí jako blokátor otevřeného iontového kanálu (Park-Chung et al 1994; Park-Chung et al 1997; Petrovic et al 2005), jakým je například anestetikum dizocilpin (MK-801), jehož účinek vykazuje výraznou závislost na membránovém potenciálu buňky (Huettnner & Bean 1988). Navázání  $3\alpha5\beta\text{S}$  na NMDA receptor však může nastat pouze v přítomnosti agonisty (preaplikace  $3\alpha5\beta\text{S}$  před aplikaci glutamátu či NMDA žádný efekt nevyvolává), čili  $3\alpha5\beta\text{S}$  je „use-dependentní“ (Petrovic et al 2005), stejně jako blokátory (obr. 4). Naproti tomu rychlost disociace  $3\alpha5\beta\text{S}$  z vazebného místa je podobná pro aktivované i neaktivované receptory (Petrovic et al 2005).

Tyto výsledky poskytují silnou podporu pro existenci samostatného vazebného místa na NMDA receptoru pro inhibiční neurosteroidy (Park-Chung et al 1997), ale přesná identifikace tohoto místa se zatím nezdařila. Pokusy, sledující účinek neurosteroidů aplikovaných buď extracelulárně, nebo intracelulárně, prokázaly, že  $3\alpha5\beta\text{S}$  působí výhradně z extracelulární části NMDA receptoru (Park-Chung et al 1997; Petrovic et al 2005). Dále byl sledován inhibiční účinek  $3\alpha5\beta\text{S}$  na rekombinantní NMDA receptory, exprimované v HEK293 buňkách (Petrovic et al 2005), případně v oocytech *Xenopus laevis* (Malayev et al 2002). Z pokusů vyplývá, že inhibiční působení  $3\alpha5\beta\text{S}$  je závislé na přítomnosti určitého podtypu NR2 podjednotky, přičemž  $3\alpha5\beta\text{S}$  je přibližně dvakrát více účinný při inhibici NR1-1a/NR2C-D receptorů než při inhibici NR1-1a/NR2A-B receptorů (hodnota  $\text{IC}_{50}$  (udává koncentraci látky vyvolávající 50% inhibici) v rozsahu od 26  $\mu\text{M}$  (pro NR1-1a/NR2C) do 50  $\mu\text{M}$  (pro NR1-1a/NR2A)). Naproti tomu schopnost  $3\alpha5\beta\text{S}$  inhibovat glutamátové odpovědi se v rámci experimentální chyby nelišila u NR1-1b/NR2B a NR1-1a/NR2B

receptorů, což svědčí o tom, že různé sestříhové varianty NR1 podjednotky nemají vliv na inhibiční působení  $3\alpha5\beta S$  (Petrovic et al 2005). Pro vysvětlení molekulární podstaty působení  $3\alpha5\beta S$  na NR2 podjednotku byla použita chimerická podjednotka, v níž byla extracelulární klička mezi třetí (M3) a čtvrtou (M4) transmembránovou doménou podjednotky NR2A nebo NR2B nahrazena odpovídajícím úsekem z NR2C podjednotky (NR2A3C4A). Inhibiční účinek  $3\alpha5\beta S$  na chimerický receptor NR1-1a/NR2A3C4A byl shodný s účinkem na NR1-1a/NR2C receptory, to poskytuje důkaz o významnosti M3-M4 kličky pro působení  $3\alpha5\beta S$  (Petrovic et al 2005).



Obrázek 4:  $3\alpha5\beta S$  je „use-dependentní“ inhibitor NMDA receptorů. (A1) Odpověď na koplikaci  $300 \mu M$   $3\alpha5\beta S$  a  $1 \text{ mM}$  glutamátu (Glu) byla inhibována z 95 % a obnova z inhibice byla relativně pomalá. (A2) Odpověď na aplikaci  $1 \text{ mM}$  Glu následující po preaplikaci ( $37 \text{ s}$ )  $300 \mu M$   $3\alpha5\beta S$  byla podobná kontrolní odpovědi na glutamát (a, zarámovaná oblast v A1). (A3) Ilustrace rozdílu v časovém průběhu odpovědi na Glu po koaplikaci  $3\alpha5\beta S$  a Glu (b, zarámovaná oblast v A1) a po preaplikaci  $3\alpha5\beta S$  (c, zarámovaná oblast A2). (A4) Doba nárůstu odpovědi na Glu po preaplikaci  $3\alpha5\beta S$  (c, zarámovaná oblast A2) byla podobná té při kontrolní odpovědi na Glu (a, zarámovaná oblast v A1). (B1) Záznam pěti za sebou následujících odpovědí na  $100 \mu M$  NMDA, koaplikovaného s  $300 \mu M$   $3\alpha5\beta S$ , a jejich obnova po různé době (0; 0,3; 0,45; 0,6 a 1 s) odmytí neurosteroidu. (B2) Zobrazení obnovy po inhibici. Aplikace kontrolního extracelulárního roztoku bezprostředně po koaplikaci neurosteroidu a NMDA vede k pozdní odpovědi (označena hvězdičkou). Převzato z (Petrovic et al 2005).



Obrázek 5: Opožděná disociace agonisty z receptoru s navázaným  $3\alpha5\beta S$ . Zobrazení tří za sebou jdoucích odpovědí na  $1 \text{ mM}$  glutamátu (Glu) v případě, kdy  $300 \mu M$   $3\alpha5\beta S$  bylo aplikováno po předchozí aplikaci Glu. Po odmytí Glu a  $3\alpha5\beta S$  se objevila pozdní odpověď. Převzato z (Petrovic et al 2005).

Existence pozdní odpovědi (~ 26 % potenciace) indukované kontrolním extracelulárním roztokem (obsahujícím  $300 \mu M$   $3\alpha5\beta S$ ) po koaplikaci neurosteroidu ( $300 \mu M$   $3\alpha5\beta S$ ) a  $1 \text{ mM}$  glutamátu naznačuje existenci neurosteroidem indukovaného

konformačního stavu NMDA receptorového komplexu, který zabraňuje disociaci glutamátu z NMDA receptoru modulovaného neurosteroidem (obr. 5). Po ukončení inhibice, NMDA

receptor s „polapeným“ glutamátem podstupuje konformační přechody, zahrnující konformační stav s otevřeným iontovým kanálem NMDA receptoru, což vyvolá zmíněnou pozdní odpověď. Jeden z modelů předpokládá, že navázání glutamátu indukuje konformační změny v rámci M3-M4 kličky, které postupně vedou k tvorbě specifického vazebného místa pro neurosteroid, a vazba  $3\alpha5\beta S$  do tohoto místa zastaví receptor ve stavu se zachyceným agonistou. Tento model je v souladu s experimentálními výsledky, avšak jeho potvrzení předpokládá další experimentální práci, která by určila vztah mezi vazebnými místy pro glutamát a pro neurosteroid (Petrovic et al 2005).

#### 2.1.3.2. Potenciace NMDA receptorů neurosteroidy

20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -yl sulfát (pregnenolon sulfát, PS) je hojně se vyskytující neurosteroid, syntetizovaný *de novo* v centrálním nervovém systému (viz výše kapitola 1). Vykazuje odlišné modulační účinky na několika typech receptorů: specificky potencuje odpovědi vyvolané NMDA receptory (Wu et al 1991), zatímco inhibuje proudy indukované GABA<sub>A</sub> (Majewska et al 1988), glycinovými (Wu et al 1997) a AMPA/kainátovými receptory (Wu et al 1991).

Potenciační účinek PS na NMDA receptorech byl poprvé pozorován v buněčných kulturách embryonálních kuřecích míšních neuronů, kdy aplikace 100  $\mu M$  PS vedla k přibližně 197 % nárůstu odpovědi vyvolané 30  $\mu M$  NMDA (Wu et al 1991). V dalších pokusech byl tento potenciační účinek PS na rekombinantní i nativní NMDA receptory potvrzen (Bowlby 1993; Ceccon et al 2001; Horak et al 2004; Malayev et al 2002; Park-Chung et al 1997).

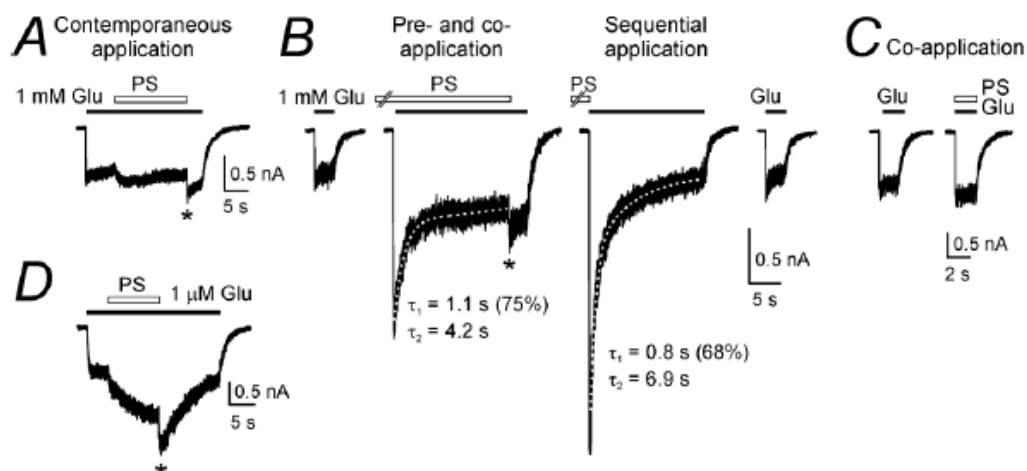
Z pozorování, že v přítomnosti maximální koncentrace glycinu (10  $\mu M$ ), PS (100  $\mu M$ ) výrazně zesiloval (~ 179 %) proud vyvolaný rychlou aplikací 30  $\mu M$  NMDA, a zároveň v přítomnosti téměř maximální koncentrace PS (100  $\mu M$ ), glycin reverzibilně potencoval (~210 %) maximální odpověď na NMDA vyplývá, že PS a glycin potencují NMDA odpovědi prostřednictvím nezávislých mechanismů (Wu et al 1991). Z dalších pokusů také vyplývá, že vzájemné působení PS a glutamátu je nekompetitivní povahy, tudíž neurosteroid nepůsobí ani prostřednictvím tohoto vazebného místa (Malayev et al 2002).

Potenciace vyvolaná PS nevykazovala závislost na membránovém potenciálu buňky, což svědčí o tom, že PS nepůsobí jako blokátor otevřeného iontového kanálu. Potenciační efekt PS není dále zprostředkován interakcí tohoto neurosteroidu s vazebnými místy pro polyaminy a arachidonovou kyselinu, ani redoxními modulačními místy (Park-Chung et al 1997). Tyto



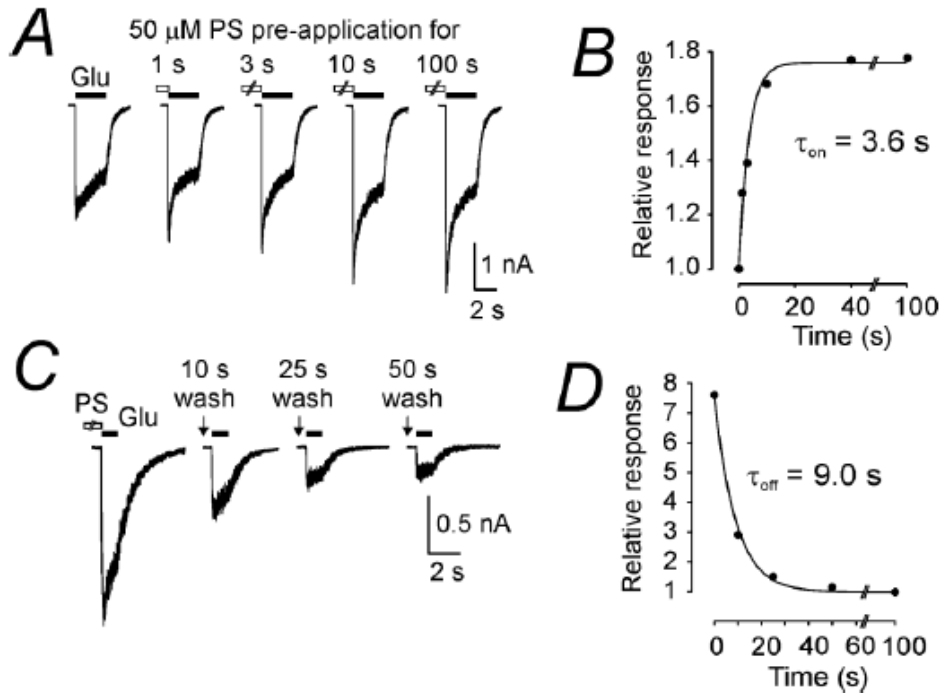
výsledky naznačují existenci samostatného extracelulárního vazebného místa specifického pro PS, které je však odlišné od inhibičního vazebného místa pro  $3\alpha5\beta S$  (Park-Chung et al 1997).

Výzkum, objasňující molekulární mechanismus potenciačního působení PS, naznačuje, že tento neurosteroid zvyšuje pravděpodobnost otevření ( $P_o$ ) iontového kanálu NMDA receptoru (Horak et al 2004). PS zvyšuje účinnost působení glutamátu, plynoucí z konformační změny spojené s otevřením kanálu (Horak et al 2006). Potenciační účinek mimo jiné také závisí na podjednotkovém složení NMDA receptoru. Saturující koncentrace PS ( $300 \mu M$ ) vede přibližně k čtyřnásobné potenciaci receptorů složených z NR1/NR2A a NR1/NR2B podjednotek, naproti tomu u NR1/NR2AC a NR1/NR2AD receptorů dochází pouze k mírné ( $\sim 1,5$ násobné) potenciaci (Horak et al 2006; Horak et al 2004). Navíc tento potenciační účinek je větší ( $\sim 300 \%$ ), v případě, že je neurosteroid preaplikován (37 s) před agonistou (glutamát), naproti tomu koaplikace PS s agonistou vede jen k malému ( $\sim 25 \%$ ) zvýšení odpovědi NMDA receptorů (obr. 6). Tyto výsledky naznačují alosterické spojení vazebných míst pro PS a glutamát, kdy po aktivaci receptoru agonistou dochází k snížení afinity receptoru k neurosteroidu (Horak et al 2004).



Obrázek 6: Míra potenciace NMDA receptoru vyvolaná PS je ovlivněna načasováním aplikace neurosteroidu a glutamátu. (A) Při současně aplikaci glutamátu (Glu) a  $300 \mu M$  PS (Contemporaneous application) byl proud vyvolaný  $1 \mu M$  Glu potencován (+ 27 %). Nárůst pozdní odpovědi po ukončení aplikace PS je označen hvězdičkou (patrný také u odpovědi zobrazených v B a D). (B) Po preaplikaci (37 s) byla odpověď na  $1 \text{ mM}$  Glu koaplikovaného s  $300 \mu M$  PS potencována z + 317 % (Pre- and co- application). Odpověď na glutamát po preaplikaci PS (Sequential application) byla potencována z + 559 % v porovnání s kontrolní odpovědí na  $1 \text{ mM}$  Glu. (C) Odpověď na koaplikaci  $300 \mu M$  PS a  $1 \text{ mM}$  Glu bez PS preaplikace (Co-application) byla potencována pouze z 15 %. (D) Odpověď vyvolaná  $1 \mu M$  Glu byla v případě koaplikace s PS potencována (+ 97 %). Převzato z (Horak et al 2004).

Pozdější výzkumy odhalily komplexnější působení tohoto neurosteroidu na NMDA receptorech. Z výsledků elektrofyziologických měření prováděných na rekombinantních NMDA receptorech exprimovaných v oocytech *Xenopus laevis* a HEK293 buňkách vyplývá, že zatímco PS potencuje odpovědi vyvolané receptory o podjednotkovém složení NR1/NR2A a NR1/NR2B, inhibuje proudy indukované NR1/NR2C a NR1/NR2D receptorovými komplexy (Ceccon et al 2001; Horak et al 2006; Horak et al 2004; Malayev et al 2002). Inhibiční účinek PS byl prokázán i u NR1/NR2A a NR1/NR2B receptorů, avšak míra 300  $\mu\text{M}$  PS inhibice je u nich přibližně 2,5násobně menší než u NR1/NR2C a NR1/NR2D receptorových komplexů, a obvykle je maskována jejich silnější potenciací (Horak et al 2006). Negativní účinek PS, lze pozorovat například u experimentů, kdy je roztok PS z buněčných kultur rychle odmyván (obr. 7). Zesílená pozdní odpověď, následující po ukončení působení neurosteroidu je pravděpodobně způsobena rychlým snížením inhibičního účinku PS, zatímco jeho potenciační účinek přetrvává. Nárůst pozdní odpovědi je rychlý, což značí, že kinetika odvažování PS z potenciačního místa je rychlejší, než kinetika odvažování neurosteroidu z potenciačního vazebného místa (Horak et al 2004). Na rozdíl od potenciačního účinku PS, jeho inhibiční působení není závislé na aktivaci NMDA receptoru (Horak et al 2006). Analýzy hodnot  $EC_{50}$  a  $IC_{50}$  pro působení PS na rekombinantní typy NR1/NR2A-D receptorů, poskytují dodatečný důkaz o existenci dvou samostatných, alosterických, extracelulárně směřujících vazebných míst na NMDA receptoru pro inhibiční a potenciační působení PS (Horak et al 2006; Park-Chung et al 1997), kde inhibiční místo může být identické s vazebným místem pro  $3\alpha5\beta\text{S}$  (Park-Chung et al 1997). Převažující účinek PS (potenciace NR1/NR2A a NR1/NR2B, inhibice NR1/NR2C a NR1/NR2D) je výsledkem různých afinit PS k těmto vazebným místům a různé účinnosti s jakou modulují aktivitu NMDA receptoru (Horak et al 2006).



Obrázek 7: Kinetika navazování a odvazování PS. (A) Odpovědi na 1 mM glutamátu (Glu) vyvolané po různé dlouhé preaplikaci 50  $\mu$ M PS. (B) Graf určující míru potenciace glutamátových odpovědí vyvolanou PS (50  $\mu$ M), vyjádřenou jako funkci délky preaplikace neurosteroidu (pro data v A). (C) První křivka znázorňuje odpověď na Glu (1 mM) vyvolanou bezprostředně po aplikaci PS (300  $\mu$ M). Další křivky zobrazují odpověď na Glu po různé době (10-50 s) odmytí PS. (D) Graf znázorňující míru potenciace NMDA receptorů, vyjádřenou jako funkci doby odmytí PS (pro data v B). Převzato z (Horak et al 2004).

NR2 podjednotka má klíčový význam pro modulaci NMDA receptorů pomocí PS (Malayev et al 2002). Pro odhalení molekulární podstaty působení PS na NR2 podjednotku byly použity sady chimér, u kterých byly fragmenty z NR2A nebo NR2B podjednotek (silně potencovány, slabě inhibovány PS) vyměněny za homologní úsek z NR2C podjednotky (silně inhibována, slabě potencována PS) a exprimovány spolu s NR1-1a podjednotku. Účinek PS na chimerický receptor NR1-1a/NR2A3C4A (viz výše) nebyl výrazně odlišný od působení na NR1-1a/NR2C receptory, což naznačuje, že struktura extracelulární M3-M4 klíčky na NR2 podjednotce je zásadní pro jeho účinek na NMDA receptorech (Horak et al 2006). Další studie odhaluje také důležitost čtvrté transmembránové domény (M4) (Jang et al 2004). V rámci této studie byly v příslušné oblasti na NR2B podjednotce prováděny bodové mutace, kdy z patnácti mutovaných aminokyselin pouze substituce glutamátu v pozici 812 za lysin (který je přítomen ve stejné pozici na NR2C podjednotce) významně snížila účinek PS. Je možné, že se tento aminokyselinový zbytek přímo účastní vazby PS, avšak v úvahu přicházejí i jiná vysvětlení. Z dalších studií vyplývá, že nízký stupeň potenciace u receptorů

obsahujících podjednotky NR2C-D je způsoben spíše malou účinností PS, než nízkou afinitou k tomuto steroidu, která je u těchto podjednotek naopak vyšší (Horak et al 2006). Tyto poznatky naznačují, že extracelulární M3-M4 smyčka se bude pravděpodobněji podílet na zprostředkování signálu, než na přímé vazbě PS.

Při zkoumání významu NR1 podjednotky pro působení PS, bylo prokázáno, že inzert na N- konci NR1 podjednotky není přímo zapojen do účinku PS na NMDA receptory, nicméně možnost, že se PS navíc váže i na NR1 podjednotku nemůže být vyloučena (Horak et al 2006).

Dále bylo prokázáno, že PS ovlivňuje funkci rekombinantních receptorů již v nanomolárních koncentracích. Neurosteroid v této koncentraci zvyšuje inhibici NR1/NR2B receptorů zprostředkovanou ifenprodilem, avšak nemění odpověď na glutamát. Výsledky dané studie naznačují existenci více vazebných míst pro PS na NMDA receptoru, která se navzájem liší afinitou k tomuto neurosteroidu (Johansson et al 2008).

Následné studie byly zaměřeny na objasnění buněčného mechanismu, který kontroluje a ovlivňuje funkci NMDA receptoru působením PS. V rámci tohoto výzkumu byly srovnávány proudové odpovědi snímané z celých buněk a izolovaných membránových terčíků z kultivovaných hipokampálních neuronů a HEK293 buněk exprimujících NR1-1a/NR2B receptory (Petrovic et al 2009). Již dříve bylo prokázáno, že PS několikanásobně potencuje odpovědi NMDA receptorů vyvolané současnou aplikací s NMDA (Horak et al 2004). V případě membránových terčíků byl tento potenciační účinek pozorován bezprostředně po vytržení terčíku, poté se míra potenciace postupně snižovala a přibližně dvě minuty po izolaci terčíku zcela vymizela. U inhibičního účinku  $3\alpha5\beta S$  tento efekt však pozorován nebyl (Petrovic et al 2009), což dodatečně potvrzuje hypotézu, že modulační účinky  $3\alpha5\beta S$  a PS na NMDA receptory jsou zprostředkovány odlišnými mechanismy (Park-Chung et al 1997). Tyto výsledky dále naznačují, že citlivost NMDA receptorů vůči potenciaci PS je kontrolována endogenními faktory, mezi něž mohou patřit např. fosforylační/defosforylační procesy v buňce. Pro testování této hypotézy byly použity specifické i nespecifické inhibitory a aktivátory jednotlivých fosforylačních a defosforylacích drah. Aplikace cyklosporinu A, specifického inhibitoru kalmodulin-dependentní fosfatázy 2B, či okadaové kyseliny, inhibující fosfatázy 1 a 2A, vedla ke snížení rychlosti, s jakou klesala míra potenciace v izolovaných terčících. Přidáním saturosporinu, nespecifického inhibitoru Ser/Thr proteinkináz, naopak došlo k ještě výraznějšímu snížení míry potenciace PS. Pro zjištění, která serin/treonin kináza je v tomto procesu zapojena, byl použit nehydrolyzovatelný analog

cyklického AMP, 8-Br-cAMP, po jehož přidání došlo ke zmírnění snižujícího účinku saturosporinu. To naznačuje, že na regulaci citlivosti NMDA receptoru vůči PS se podílí cAMP-dependentní proteinkináza A (PKA), což bylo potvrzeno použitím specifického inhibitoru PKA, H89, které opět vedlo k významnému poklesu míry potenciace. Navíc byla úloha PKA v kontrole potenciačního účinku PS na NMDA receptory dále potvrzena pokusy s katalytickou podjednotkou PKA, jejíž intracelulární aplikace také zpomalila pokles míry potenciace v membránových terčích. Naproti tomu aktivace PKC pomocí specifického aktivátoru phorbol 12-myristát 13-acetátu neměla žádný výrazný účinek (Petrovic et al 2009). Tyto výsledky naznačují, že potenciace NMDA receptorů prostřednictvím PS je závislá na úrovni fosforylace a také že se na tomto mechanismu specificky podílí PKA. Avšak je nutno stanovit, zdali jsou fosforylovány samotné NMDA receptory, nebo nějaký jiný cílový protein, asociovaný s NMDA receptory. Na fosforylačních/defosforylacích procesech se mohou podílet další mechanismy, zahrnující extracelulární, membránové a intracelulární složky, jako například protein extracelulární matrix reelin (Groc et al 2007), G-protein (Lu et al 1999), aktin (Rosenmund & Westbrook 1993), či membránové komponenty, jako je cholesterol (Frank et al 2004).

### *2.1.3.3. Strukturální determinanty neurosteroidů jako předpoklad jejich účinku na NMDA receptorech*

#### *2.1.3.3.1. Inhibiční neurosteroidy*

Aplikace 50  $\mu\text{M}$  nesulfátovaného  $3\alpha5\beta$  nevykazovala výrazný účinek na proud vyvolaný 30  $\mu\text{M}$  NMDA (~ 4 % potenciace), což naznačuje, že sulfátová skupina na uhlíku C3 má význam pro působení  $3\alpha5\beta\text{S}$  na NMDA receptory (Park-Chung et al 1994). Některé další sulfátové steroidy také vykazují inhibiční účinek na NMDA receptory, jako například epipregnanolon sulfát ( $3\beta5\beta\text{S}$ , 100  $\mu\text{M}$ ), který inhibuje NMDA odpověď přibližně z 50 %. Naproti tomu 100  $\mu\text{M}$   $3\beta5\alpha\text{S}$  má potenciační účinek (~39 %). Opačné působení stereoizomerů  $3\beta5\beta\text{S}$  a  $3\beta5\alpha\text{S}$  na NMDA receptory nasvědčuje tomu, že interakce těchto steroidů s NMDA receptory je stereospecifická ohledně substituentů na uhlíku C5 (Park-Chung et al 1997). Společným rysem inhibičních steroidů (endogenních i uměle syntetizovaných) je tedy obecně přítomnost záporně nabitých skupin na C3 uhlíku steroidního jádra spolu s takovým prostorovým uspořádáním chirálních uhlíků C3 a C5, které dává celé molekule steroidu lomený tvar (Park-Chung et al 1997; Weaver et al 2000).

Pro bližší určení strukturních determinant ovlivňujících inhibiční účinek neurosteroidů byly syntetizovány deriváty  $3\alpha5\beta S$  a  $3\alpha5\alpha S$ , různě substituované na uhlících C3 a C7, a následně byl jejich účinek testován elektrofyziologickými metodami na NMDA receptorech exprimovaných v kultivovaných hipokampálních neuronech (Stastna et al 2009). Strukturálně-funkční analýzy 10 syntetizovaných steroidů naznačují, že substituce na A kruhu steroidního jádra podstatně ovlivňuje hodnoty  $IC_{50}$ , a že substituenty na C3 a C7 uhlících ovlivňují navázání steroidu na receptor. Z výsledků této studie vyplývá, že nejúčinnějším inhibitorem NMDA receptorů je pregnanolon sulfát ( $3\alpha5\beta S$ ), pro nějž byla stanovena hodnota  $IC_{50} = 47 \mu M$ . Téměř shodný inhibiční účinek ( $IC_{50} = 52 \mu M$ ) má také pregnanolonhemisukcinát ( $3\alpha5\beta HS$ ), což naznačuje, že po výměně sulfátového zbytku  $3\alpha5\beta S$  na uhlíku C3 za hemisukcinátový si steroid zachovává svou schopnost inhibovat odpovědi NMDA receptorů, zatímco podobná substituce u  $3\alpha5\alpha S$  vede ke statisticky významnému zvýšení  $IC_{50}$ . Dále bylo zjištěno, že navázání zbytku kyseliny octové či nikotinové na uhlík C7 také vede ke zvýšení hodnoty  $IC_{50}$ . Navázání objemnějšího nikotinového zbytku však vedlo k menšímu snížení účinnosti inhibice, nežli substituce acetátem, což značí, že sterické důvody nemají takový význam, a pravděpodobně zde více záleží na nekovalentních interakcích steroidu s molekulou receptoru (Stastna et al 2009).

#### 2.1.3.3.2. Potenciační neurosteroidy

Sulfátová skupina na C3 uhlíku má pro funkci PS význam jakožto nositel záporného náboje, neboť může být, bez vlivu na funkci, nahrazena hemiskucinátovým zbytkem, nikoliv však jeho methylesterem (Park-Chung et al 1997).  $11\beta$ -hydroxy-pregnenolon sulfát s hydroxylovou skupinou na C11 uhlíku má slabý inhibiční účinek (~ 31 %), naproti tomu sloučeniny s modifikací na C17 postranním řetězci, jako 17-hydroxy-pregnenolon sulfát (~ 178 %), 21-acetoxypregnenolon sulfát (~ 85%) či 20 $\beta$ -dihydropregnenolon sulfát (~ 90 %), stále potencují odpověď na NMDA. Pokud však dojde k adici ketonové skupiny na uhlíky C11 či C17 dojde k úplné ztrátě aktivity neurosteroidu (Park-Chung et al 1997). Z hlediska geometrie steroidního jádra je pro potenciační účinek určující planární tvar pregnenolonu (Weaver et al 2000).

## 2.2. GABA<sub>A</sub> receptory

Kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) je nejrozšířenějším inhibičním neurotransmiterem v CNS savců. Receptory aktivované tímto neurosteroidem se dále dělí na ionotropní GABA<sub>A</sub>

a GABA<sub>C</sub> receptory, jenž přímo tvoří iontový kanál pro Cl<sup>-</sup> ionty, přičemž GABA<sub>C</sub> se od GABA<sub>A</sub> receptorů odlišují podjednotkovým složením, farmakologickými vlastnostmi a distribucí v organismu, a metabotropní GABA<sub>B</sub> receptory, které jsou prostřednictvím G-proteinu spřaženy s Na<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> kanály (Beleboni et al 2004).

### 2.2.1. Struktura GABA<sub>A</sub> receptorů

GABA<sub>A</sub> receptory jsou tvořeny pěti transmembránovými podjednotkami, které jsou uspořádány do kanálu propustného pro anionty. Dnes je známo 19 těchto podjednotek (  $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  a  $\rho$ 1-3), které jsou řazeny do osmi tříd na základě sekvenční homologie (~ 70 % v rámci třídy a ~ 30 % mezi jednotlivými třídami). Tato heterogenita může být dále zvyšována alternativním sestřihem exonů (Simon et al 2004). To teoreticky nasvědčuje existenci tisíců možných podtypů GABA<sub>A</sub> receptorů, avšak ve skutečnosti se sestavování kanálového komplexu těchto receptorů řídí přísnými pravidly. Podle současných odhadů existuje okolo 30 podtypů GABA<sub>A</sub> receptorových komplexů s různým podjednotkovým složením a charakteristickým expresním vzorcem (Belelli & Lambert 2005).

Většina nativních GABA<sub>A</sub> receptorů je složena z  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ - podjednotek v předpokládaném stechiometrickém poměru 2 $\alpha$ :2 $\beta$ :1 $\gamma$ . Převládajícím podtypem je  $\alpha$ <sub>1</sub> $\beta$ <sub>2</sub> $\gamma$ <sub>2</sub> isoforma (~ 60 %) následována  $\alpha$ <sub>2</sub> $\beta$ <sub>3</sub> $\gamma$ <sub>2</sub> (~ 15-20 %) a  $\alpha$ <sub>3</sub> $\beta$ <sub>x</sub> $\gamma$ <sub>2</sub> (~ 10-15 %) typy receptorů (Mohler et al 2004). U menší populace receptorů může dojít k substituci  $\delta$ - či  $\epsilon$ - podjednotky za  $\gamma$ -podjednotku. Homomerní a heteromerní GABA<sub>C</sub> receptory jsou tvořeny  $\rho$ -podjednotkami (Beleboni et al 2004).

### 2.2.2. Farmakologie GABA<sub>A</sub> receptorů

Mnoho klinicky významných léčiv včetně benzodiazepinů (např. diazepam), barbiturátů, a celkových anestetik jako propofol a etomidát působí jako pozitivní alosterické modulátory tohoto receptoru (Mohler et al 2002). Farmakologický účinek těchto látek vykazuje závislost na podjednotkovém složení GABA<sub>A</sub> receptorů, jako například anestetikum etomidát či antikonvulzivní loreclezol, které jsou vysoce selektivní pro  $\beta$ <sub>2</sub>, nebo  $\beta$ <sub>3</sub> podjednotkovou isoformu, oproti receptorům obsahujícím  $\beta$ <sub>1</sub> podjednotku (Belelli et al 1997). Také farmakologie benzodiazepinů je ovlivněna isoformami  $\alpha$ - a  $\gamma$ - podjednotek GABA<sub>A</sub> receptorů (Belelli et al 2002).

Agonisté těchto receptorů jsou mimo GABA i třeba tetrahydroisoxazolpyridinol (THIP) či  $\beta$ -alanin. Klasickými antagonisty GABA<sub>A</sub> receptorů jsou například picrotoxin, či

pentylenetetrazol. Proudly vzniklé aplikací GABA jsou reverzibilně inhibovány bicuculinem a SR-95531, zatímco chloridiazepoxid odpovědi potencuje (Wu et al 1990).

Některé přirozeně se vyskytující steroidy mohou specificky modulovat funkci GABA<sub>A</sub> receptorů, například 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on (allopreganon, 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ ) má potenciační účinek, zatímco 20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -yl sulfát (pregnenolon sulfát, PS) působí inhibičně (Wu et al 1990). Některé potenciační neurosteroidy, např. tetrahydrodeoxykortikosteron (3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -THDOC), jsou ve vyšších koncentracích schopny aktivovat GABA<sub>A</sub> receptory (Majewska et al 1986).

#### 2.2.2.1 *Modulace GABA<sub>A</sub> receptorů neurosteroidy*

Bylo zjištěno, že endogenní neurosteroid progesteron potencuje proudy vyvolané aplikací GABA, avšak s relativně nižší účinností nežli jeho redukované deriváty (Wu et al 1990). Některé další neurosteroidy, jako například redukované metabolity progesteronu, 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on (allopreganon, 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ ), 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on (pregnanolon, 3 $\alpha$ 5 $\beta$ ) či derivát deoxykortikosteronu (DOC) 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,21-diol-20-on (tetrahydrodeoxykortikosteron, 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -THDOC), také potencují odpovědi GABA<sub>A</sub> receptorů. Tyto sloučeniny pozitivně modulují GABA<sub>A</sub> receptory tak, že prodlužují dobu otevření jednotlivých iontových kanálů (Callachan et al 1987). Tento mechanismus je odlišný od působení benzodiazepinů, ty zvyšují frekvenci otevírání Cl<sup>-</sup> kanálů, aniž by ovlivňovaly dobu jejich otevření. Nejvíce účinné steroidy (jako 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ ) působí v nízkých koncentracích (3-30 nM) (Belelli et al 2002). Kromě pozitivního působení na GABA<sub>A</sub> receptory, vykazují některé steroidy (např. 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -THDOC, 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ ) ve vyšších koncentracích také GABA-mimetické účinky, což znamená, že jsou schopné aktivovat receptor i bez přítomnosti agonisty (Callachan et al 1987). Aktivace iontového kanálu vyvolaná aplikací steroidu v nepřítomnosti agonisty spočívá v krátkých otevřeních kanálu, vyskytujících se buď izolovaně, nebo tvořících shluky (Akk et al 2007).

Naproti tomu jiné neurosteroidy mohou působit na GABA<sub>A</sub> receptory inhibičně, například 20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -yl sulfát (pregnenolon sulfát, PS), dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS), nebo 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát (pregnanolon sulfát, 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S) (Park-Chung et al 1999). Inhibiční účinek PS je nezávislý na membránovém potenciálu buňky, což značí, že nepůsobí jako blokátor otevřeného kanálu, navíc inhibice pomocí PS je spojována se snížením frekvence otevírání kanálu, bez vlivu na dobu otevření kanálu (Mienville & Vicini



1989). To nasvědčuje tomu, že odlišné modulační účinky steroidů jsou závislé na jejich struktuře a jsou zprostředkovány různými mechanismy (Park-Chung et al 1999).

Modulační účinek neurosteroidu  $3\alpha5\alpha$  je ovlivněn podjednotkovým složením  $GABA_A$  receptorů. Isoforma  $\beta$ -podjednotky (1,2 a 3) má pouze malý vliv na modulační působení, kdy odpovědi  $\alpha_1\beta_2\gamma_{21}$  a  $\alpha_1\beta_3\gamma_{21}$  receptorů byly  $3\alpha5\alpha$  v 1  $\mu\text{M}$  koncentraci téměř shodně potencovány ( $z \sim 75\%$  a  $72\%$ ) (Belelli et al 2002). Ačkoliv vliv  $\alpha$ -podjednotky na  $EC_{50}$  tohoto steroidu je relativně mírný, při „fyziologických“ koncentracích  $3\alpha5\alpha$  (v rozmezí 3-100 nM za různých fyziologických okolností, (Paul & Purdy 1992)) se objevují rozdíly v senzitivě vůči tomuto neurosteroidu (Belelli et al 2002). Proudě vyvolané  $GABA$  zprostředkované  $\alpha_1\beta_1\gamma_{21}$  a  $\alpha_3\beta_1\gamma_{21}$  receptory jsou významně potencovány 3 nM  $3\alpha5\alpha$ , zatímco pro účinek na  $\alpha_6\beta_1\gamma_{21}$  receptory je vyžadována 10 nM koncentrace  $3\alpha5\alpha$ . Naproti tomu, receptory tvořené  $\alpha_2$ -,  $\alpha_4$ - a  $\alpha_5$ - podjednotkami jsou relativně málo citlivé vůči  $3\alpha5\alpha$  a ve srovnání s receptory obsahujícími  $\alpha_1$ - a  $\alpha_3$ - podjednotky vyžadujícími desetinásobně větší koncentraci ( $\sim 30$  nM) tohoto steroidu. Isoforma  $\gamma$ -podjednotky ( $\alpha_1\beta_1\gamma_{(1-3)}$ ) ovlivňuje účinnost, se kterou  $3\alpha5\alpha$  moduluje odpovědi vyvolané  $GABA$ , kde receptory obsahující  $\gamma_2$ -podjednotku byly nejvíce citlivé ( $EC_{50} = 90$  nM) a receptory tvořené  $\gamma_1$ -podjednotkou vykazovaly nejmenší citlivost ( $EC_{50} = 560$  nM) vůči  $3\alpha5\alpha$  (Belelli et al 2002). Rekombinantní receptory tvořené  $\epsilon$ -podjednotkou se jeví necitlivé vůči modulačnímu účinku, avšak vykazují  $GABA$ -mimetické působení neurosteroidů ( $\sim 17\%$ ) (Belelli et al 2002). Expres  $\delta$  podjednotky v rekombinantních expresních systémech byla zpočátku problematická, avšak koexpres spolu s  $\alpha_4$ - a  $\beta_3$ - podjednotkami vedla k tvorbě funkčního  $GABA$  aktivovaného receptoru. K zesílení odpovědi na  $GABA$  produkované  $\alpha_4\beta_3\delta$  receptory došlo při saturující koncentraci (1  $\mu\text{M}$ )  $3\alpha5\alpha$ , kdy 1  $\mu\text{M}$  koncentrace steroidu přibližně 16násobně zvýšila odpověď na  $GABA$  ( $\sim 170\%$ ) (Belelli et al 2002). Naproti tomu u  $\alpha_4\beta_3\gamma_2$  došlo maximálně k  $\sim 80\%$  nárůstu při aplikaci  $3\alpha5\alpha$ , což naznačuje, že neurosteroid se přednostně váže k receptorům obsahujícím  $\delta$ -podjednotku, nicméně tato selektivita je spíše následkem funkčních, nežli vazebných vlastností steroidu (Belelli & Lambert 2005).

V rámci pokusů, kdy byl současně aplikován steroid s potenciačním účinkem ( $3\alpha5\alpha$ ) spolu s inhibítorem (DHEAS), bylo zjištěno, že existují odlišná vazebná místa pro pozitivní a negativní modulatory na  $GABA_A$  receptoru. Byla totiž zaznamenána „pozdní odpověď“, která pravděpodobně odráží rychlejší disociaci DHEAS z inhibičního místa než  $3\alpha5\alpha$  z potenciačního místa (Park-Chung et al 1999). Tuto hypotézu také potvrzuje

11-ketopregnenolon sulfát, který vykazuje dvojité působení na odlišném pozitivním a negativním místě asociovaném s GABA<sub>A</sub> receptory (Park-Chung et al 1999).

Ačkoli vazebná místa pro neurosteroidy na GABA<sub>A</sub> receptorech nebyla zatím jednoznačně identifikována, výsledky různých experimentů značí, že endogenní steroidy ovlivňují GABA<sub>A</sub> receptory nekompetitivně, to znamená mimo vazebná místa pro agonistu (GABA), a nepůsobí ani prostřednictvím vazebných míst pro jiné alosterické modulátory jako např. benzodiazepiny (Akk et al 2004).

Pro bližší identifikaci místa zprostředkujícího účinek neurosteroidů na GABA<sub>A</sub> receptory byly konstruovány chiméry, které postupně odhalily význam některých aminokyselinových zbytků na první (TM1) a druhé (TM2) transmembránové doméně  $\alpha 1$  podjednotky (Morris & Amin 2004). Odpovědi na GABA zprostředkované monomerními receptory obsahujícími  $\rho_1$ -podjednotku vykazovaly odlišnou steroidní farmakologii: byly zesilovány prostřednictvím  $3\alpha 5\alpha$ -THDOC v koncentracích větších než 1  $\mu$ M, a naopak inhibovány pomocí  $3\alpha 5\beta$ .  $3\alpha 5\alpha$  nevykazoval výrazný účinek na tyto receptory. Povaha aminokyselinového zbytku v TM2 (izoleucin 307) ovlivňuje stupeň potenciace pomocí  $3\alpha 5\alpha$ -THDOC, a také může změnit inhibiční působení  $3\alpha 5\beta$  na potenciační (Morris & Amin 2004). Tento aminokyselinový zbytek však ovlivňuje i působení jiných alosterických modulátorů (například barbiturátů a benzodiazepinů), z čehož se dá usuzovat, že tyto specifické  $\rho_1$ - podjednotkové zbytky spíše tvoří součást obecného mechanismu alosterické regulace, než přímo vazebné místo pro neurosteroidy (Belelli & Lambert 2005).

Pomocí cílené mutagenese byl odhalen význam polárních zbytků Thr 236 a Gln 241 na  $\alpha 1$  podjednotce pro steroidní působení na GABA<sub>A</sub> receptory (Hosie et al 2006). Mutace T236I významně snížila aktivaci GABA<sub>A</sub> receptoru prostřednictvím  $3\alpha 5\alpha$ -THDOC a  $3\alpha 5\alpha$ , bez vlivu na jejich potenciační účinek, naproti tomu mutace Q241W vyrušila potenciaci GABA indukovaných proudů. Tyto odlišné funkce Thr 236 a Gln 241 v aktivaci a potenciaci neurosteroidy naznačuje, že se mohou podílet na dvou odlišných vazebných místech. Tuto hypotézu dále podporuje odlišné umístění těchto zbytků v rámci TM1 domény. Thr 236 leží na povrchu receptoru, poblíž rozhraní  $\alpha/\beta$  podjednotky, a je tudíž přístupné pro hydrofobní molekuly neurosteroidů v membráně. Naproti tomu Gln 241 leží na dně vodou vyplněné kavity mezi TM1-TM4 doménami  $\alpha$  podjednotky. Pro účinek neurosteroidů na GABA<sub>A</sub> receptory je vyžadována hydroxylová skupina v pozici C3 $\alpha$  na A kruhu a C20 keton na D kruhu steroidního jádra (Park-Chung et al 1999). Glutaminový zbytek na pozici 241 slouží jako akceptor vodíkového můstku. Jelikož C20 keton neurosteroidu může pouze

přispívat jako akceptor vodíkového můstku, je pravděpodobné, že C3 $\alpha$  hydroxylová skupina slouží jako donor vodíkového můstku pro Gln 241. V rámci kavity byly identifikovány další polární zbytky, které se mohou vázat s C20 ketonovou skupinou neurosteroidu, a to sice Asn 407 a Tyr 410 na TM4 doméně  $\alpha$ 1 podjednotky. Oba zbytky mohou sloužit jako donory vodíkového můstku pro C20 keton neurosteroidu. Tyto tři zbytky (Gln 241, Asn 407 a Tyr 410) jsou ideálně umístěny pro tvorbu vazebného místa, z něhož neurosteroidy potencují odpovědi GABA<sub>A</sub> receptorů. Thr 236 se pravděpodobně podílí na tvorbě druhého vazebného místa spojeného s aktivací GABA<sub>A</sub> receptoru. Pro aktivaci receptoru se jeví zásadní přítomnost orientované hydroxylové skupiny v pozici 236. Dále byl odhalen význam Tyr 284 na TM3 doméně  $\beta$ 2 podjednotky, jenž je schopný tvorby vodíkového můstku s neurosteroidem. Mutace  $\beta$ Tyr 284 snižuje schopnost 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -THDOC a 3 $\alpha$ 5 $\alpha$  aktivovat GABA<sub>A</sub> receptory, avšak nemá žádný účinek na jejich potenciaci. To naznačuje, že tyto zbytky ( $\alpha$ Thr 236 a  $\beta$ Tyr 284) mohou tvořit aktivační vazebné místo pro neurosteroidy na GABA<sub>A</sub> receptoru, odlišné od toho zprostředkujícího potenciační účinek (Hosie et al 2006). Ačkoli tyto data podporují existenci dvou odlišných vazebných míst na GABA<sub>A</sub> receptoru, mutace  $\alpha$ Q241 mimo potenciace narušila i neurosteroidem indukovanou aktivaci receptoru. To zvyšuje pravděpodobnost, že navázání neurosteroidu do  $\alpha$ Thr 236 —  $\beta$ Tyr 284 vyvolává pouze málo účinnou aktivaci, a pro vysoce účinnou aktivaci je vyžadováno obsazení jak aktivačního ( $\alpha$ Thr 236 —  $\beta$ Tyr 284), tak potenciačního ( $\alpha$ Gln 241 —  $\alpha$ Asn 407) vazebného místa (Hosie et al 2006). Při stechiometrii receptoru 2 $\alpha$ :2 $\beta$ :1 $\gamma$  budou přítomny dvě kopie těchto míst na molekulu receptoru (Hosie et al 2007). Navíc jsou tyto zbytky konzervovány v rámci  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotkových rodin, čímž jsou ideálně umístěné pro zprostředkování neurosteroidní regulace všech GABA<sub>A</sub> receptorových podtypů (Hosie et al 2009).

Z dosavadních studií vyplývá, že na GABA<sub>A</sub> receptoru existují 3 nebo 4 možná oddělená vazebná místa pro neurosteroidy- potenciační ( $\alpha$ Gln 241 —  $\alpha$ Asn 407/ $\alpha$ Tyr 410), aktivační ( $\alpha$ Thr 236 —  $\beta$ Tyr 284) a přinejmenším 1 nebo 2 vazebná místa pro inhibiční sulfátové steroidy. Na rozdíl od pozitivních modulátorů, umístění inhibičních vazebných míst a jejich klíčové determinanty zůstávají zatím neznámé, avšak mohou se vyskytnout v rámci TM1 a/nebo TM2 domény (Hosie et al 2007). Mutace 2' zbytku v TM2 doméně  $\alpha$ 1 podjednotky ( $\alpha$ 1V256S) snížila schopnost inhibičních steroidů modulovat funkci GABA<sub>A</sub> receptorů, bez vlivu na účinek potenciačních neurosteroidů (Akk et al 2001). Tento zbytek však pravděpodobně netvoří vazebné místo pro inhibiční neurosteroidy, ale spíše reguluje

alosterický účinek těchto antagonistů. Použitím chimér bylo identifikováno 6 zbytků v TM1 doméně (F257, L258, Q259, F262, A264 a S265) jako významné determinanty inhibice PS (Wardell et al 2006). Avšak není zatím jasné, zdali se tyto zbytky podílejí na tvorbě vazebného místa, či pouze přispívají k regulačnímu alosterickému efektu inhibičních steroidů (Hosie et al 2007).

Následné studie odhalily, že modulace synaptických GABA<sub>A</sub> receptorů prostřednictvím neurosteroidů je ovlivněna inhibitory proteinkináz. To zvyšuje pravděpodobnost, že jedním z buněčných mechanismů, podílejícím se modulačním účinku neurosteroidů, jsou fosforylační a defosforylační procesy, které mohou přispívat k heterogenitě účinků těchto endogenních steroidů. Proteinkináza C (PKC) se podílí na modulaci funkce GABA<sub>A</sub> receptorů prostřednictvím 3 $\alpha$ 5 $\alpha$  v hypotalamických řezech u potkana (Fancsik et al 2000). Účinek fosforylace na funkci GABA<sub>A</sub> receptorů je komplexní a závislý na tom, jaká isoforma kinázy nebo fosfatázy je přítomna, na podjednotkovém složení receptoru a na aminokyselinových zbytcích, které jsou fosforylovány (Fancsik et al 2000). Nedávné studie naznačují, že v plasticitě GABA<sub>A</sub> receptorů a neurosteroidů je zapojena  $\epsilon$ -isoforma proteinkinázy C (Belelli & Lambert 2005). Přesto molekulární cíl fosforylace není dosud znám. Navíc je nutné stanovit, zdali je fosforylací primárně pozměněno navázání neurosteroidu, či ovlivňuje steroidem-indukované změny v kinetice GABA aktivovaných iontových kanálů (Belelli & Lambert 2005).

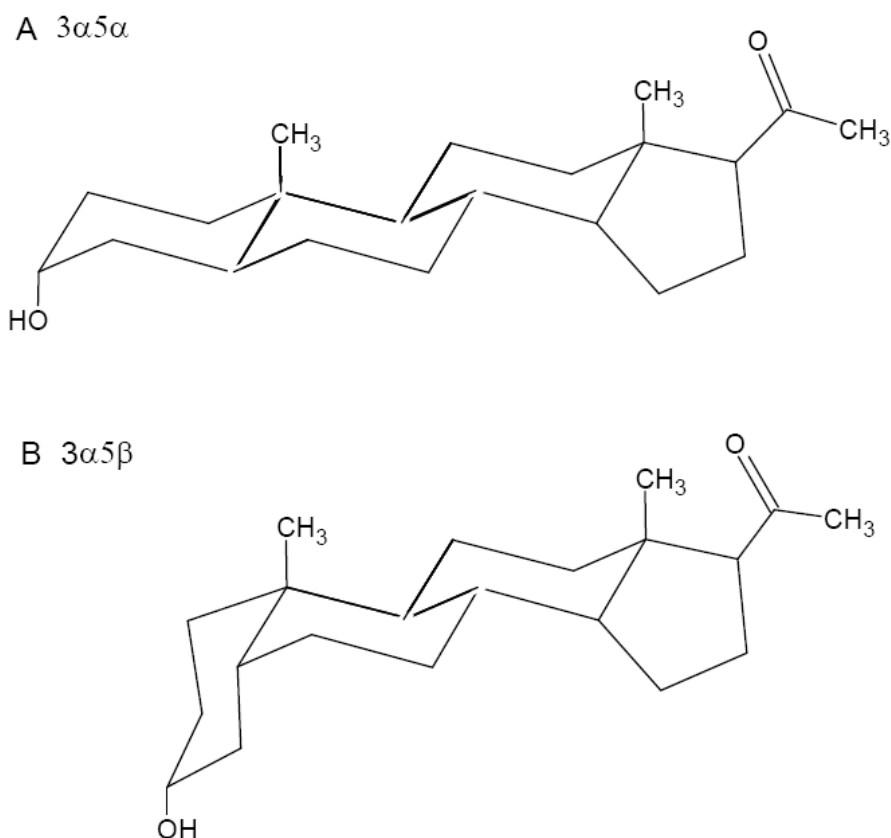
Vzhledem k tomu, že vazebné místo pro neurosteroidy se největší pravděpodobností vyskytuje v rámci transmembránových domén, případně v dalších hydrofobních oblastech receptoru, steroidy tak mohou pronikat k vazebným místům buď prostřednictvím laterální difuze, nebo z intracelulární strany receptoru (Akk et al 2007). Účinek a doba působení steroidů na GABA<sub>A</sub> receptory je tudíž ovlivněna mimo specifických vlastností neurosteroidu (např. afinita vůči vazebnému místu), také jeho nespecifickými vlastnostmi, jako je například lipofilita steroidní molekuly (Chisari et al 2009). Pro modulaci GABA<sub>A</sub> receptorů má větší význam membránová koncentrace steroidu, nežli jeho koncentrace ve vodě. Pokud je afinita neurosteroidů relativně stejná, lipofilnější steroidy budou více účinné, neboť dosáhnou vyšší membránové koncentrace než méně lipofilní molekuly. Vyšší lipofilita také ovlivňuje nespecifické hromadění různých steroidů v buňce a jejich odstraňování. Pro otestování hypotézy, zdali se nespecifické hromadění v buňce liší mezi steroidními analogy s odlišnou rozpustností v membráně, byly použity fluorescenčně značené analogy 3 $\alpha$ 5 $\alpha$  (více lipofilní) a alfaxalonu. Z pozorování vyplývá, že v případě 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -značeného analogu dochází

k nahromadění pomaleji a je více rezistentní vůči odmytí nežli analog alfaxalonu. Je možné, že 11-ketonová skupina analogu alfaxalonu mu umožňuje rychlejší vstup do plazmatické membrány a přenos do dalších membránových kompartmentů. Další pokusy zjišťovaly, jestli zbytkové intracelulární steroidy mohou mít vliv na funkci GABA<sub>A</sub> receptorů. Měřila se potenciace přetrvávající po 20s odmytí. V případě analogu alfaxalonu nebyla po 20s pozorována žádná změna, naproti tomu při aplikaci 3 $\alpha$ 5 $\alpha$  analogu byla zaznamenána přibližně trojnásobná zbytková potenciace GABA proudových odpovědí. Použití eantiomeru analogu 3 $\alpha$ 5 $\alpha$  prokázalo, že k intracelulárnímu hromadění steroidů dochází nespecifickou difúzí a není nutně vyžadováno zapojení selektivních transportních mechanismů. Avšak z elektrofyziologických studií vyplývá, že potenciace GABA<sub>A</sub> receptorů fluorescentními analogy je vysoce eantioselektivní. Přirozeně se vyskytující steroidy jsou v absolutní konformaci (+)-eantiomery, jež jsou mnohem účinnější než (-)-eantiomery (uměle syntetizované) (Akk et al 2007). Přestože oba eantiomery nevykazují rozdíly při přechodu přes plazmatickou membránu a hromadění v buňce, tyto výsledky naznačují, že pro působení na GABA<sub>A</sub> receptory jsou vyžadovány další strukturní determinanty (jako například specifické vlastnosti pro navázání do bílkovinného místa) (Chisari et al 2009).

#### *2.2.2.2. Strukturální determinanty neurosteroidů jako předpoklad jejich účinku na GABA<sub>A</sub> receptorech*

Negativní a pozitivní steroidní modulátory GABA<sub>A</sub> receptorů mají pro své působení odlišné strukturní požadavky. Přítomnost záporně nabitě skupiny na uhlíku C3 výrazně zesiluje inhibiční účinek neurosteroidu. Například DHEA vykazuje pouze mírný inhibiční účinek (~ 40 %), avšak jeho sulfátový ester DHEAS silně inhibuje (~ 90 %) odpovědi GABA<sub>A</sub> receptorů. Naproti tomu androsteron (10  $\mu$ M) silně potencuje (~ 1500 %) GABA<sub>A</sub> odpověď, přičemž androsteron sulfát (300  $\mu$ M) působí inhibičně (~ 60 %) (Park-Chung et al 1999). Pro negativní působení steroidních modulátorů není vyžadována dvojná vazba na C5 uhlíku a také stereochemie na tomto uhlíku není zásadní pro inhibici. Avšak to, zdali je přítomen 3 $\alpha$ , či 3 $\beta$  izomer zásadním způsobem ovlivňuje účinek neurosteroidu, kdy 3 $\beta$  redukované neurosteroidy (3 $\beta$ 5 $\alpha$  a 3 $\beta$ 5 $\beta$ ) působí inhibičně, na rozdíl od jejich 3 $\alpha$ -redukovaných analogů (3 $\alpha$ 5 $\alpha$  a 3 $\alpha$ 5 $\beta$ ), které způsobují potenciaci GABA<sub>A</sub> receptorů (Wang et al 2002). Nejvíce účinné pozitivní modulátory GABA<sub>A</sub> receptorů mají 3 $\alpha$ -hydroxylovou skupinu a jednoduchou vazbu mezi C5-C6 uhlíky. Například 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ , je jeden z nejučinnějších potencujících steroidů, zatímco jeho 3 $\beta$ 5 $\alpha$  izomer je bez vlivu. Konfigurace

na C5 uhlíku určuje tvar celé molekuly, kdy  $5\alpha$ -redukované steroidy mají spíše planární strukturu, kdežto  $5\beta$ -izomery obsahují ohnuté steroidní jádro (obr. 8). Obě skupiny steroidů potencují  $GABA_A$  receptory, avšak potenciace probíhá odlišnými mechanismy (Mennerick et al 2004). Inhibiční steroidy se lépe přizpůsobují širokému rozmezí strukturních modifikací bez ztráty účinku, na rozdíl od pozitivních steroidních modulátorů, což lze demonstrovat u substituentů na uhlíku C17. Pokud nahradíme acetylovou skupinu na C17 u  $3\alpha5\alpha$  za ketonovou skupinu (androsteron) či hydroxylovou skupinu ( $5\alpha$ -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol), dojde ke značnému snížení potenciační aktivity. Naproti tomu negativní modulátory jsou přizpůsobivé celé řadě substituentů na C17 uhlíku s minimálním vlivem na jejich působení, např. DHEAS s ketonovou skupinou na tomto uhlíku má téměř stejný inhibiční účinek ( $\sim 90\%$ ) jako PS ( $100\ \mu\text{M}$ ,  $\sim 91\%$  inhibice), který má na C17 uhlíku acetylovou skupinu (Park-Chung et al 1999). Redukce ketonové skupiny na C20 uhlíku u  $3\alpha5\alpha$  na  $20\alpha$ -hydroxylovou skupinu ( $5\alpha$ -pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol) také vysoce snižuje potenciaci (z  $\sim 1300\%$  na  $170\%$ ) (Park-Chung et al 1999).



Obrázek 8: Prostorový model ukazuje, jakým způsobem konfigurace na uhlíku C5 ovlivňuje tvar celé molekuly:  $5\alpha$ -redukované steroidy jsou planární (A), kdežto u  $5\beta$ -redukovaných steroidů je základní steroidní skelet zalomený (B).

### 2.2.2.3. Účinek neurosteroidů na $GABA_A$ receptory

Jeden z možných účinků neurosteroidů na synaptické  $GABA_A$  receptory může být prodloužení doby deaktivace miniaturních inhibičních postsynaptických proudů (mIPSCs), přičemž neovlivňují jejich amplitudu. Tento efekt je pravděpodobně neuron- specifický: k prodloužení mIPSCs dochází už při nanomolárních koncentracích steroidů u Purkyňových buněk, granulárních buněk mozečku (CGC) a buněk z CA1 oblasti hippocampu, naproti tomu pro účinek na neurony z hypotalamu jsou vyžadovány mikromolární koncentrace (Belelli & Lambert 2005).

Studium vlivu neurosteroidů se zpravidla zaměřuje na inhibiční synaptický přenos, kdy krátká aktivace synaptických  $GABA_A$  receptorů vede k přechodné, tzv. fázické inhibici. GABA však může působením na extrasynaptické receptory vyvolat i tzv. tonickou inhibici. Na těchto receptorech se u některých typů neuronů výrazně projevuje vliv neurosteroidů, kdy nízké koncentrace  $3\alpha5\alpha$ -THDOC (10-100 nM) selektivně zvyšují tonickou vodivost, bez téměř žádného účinku na fázickou vodivost (Belelli & Lambert 2005).

## Závěr

Poznatky o molekulárním působení neurosteroidů na ionotropních receptorech naznačují jejich fyziologický a potenciální terapeutický význam. Řada behaviorálních studií ukázala, že neurosteroidy ovlivňují např. reakci a stres, agresivitu či úzkost (Akwa et al 1999; Barbaccia et al 1996; Slavikova et al 2001). Za fyziologických podmínek mohou neurosteroidy ovlivňovat široké spektrum behaviorálních funkcí, jako sexuální a potravní chování, emoce, paměť a schopnost učení (Backstrom et al 1985; Frye 2001; Melcangi & Mensah-Nyagan 2008; Vallee et al 1997).

Za patofyziologických podmínek také hrají významnou roli v patofyziologii a léčbě neurologických a psychiatrických poruch jako je epilepsie, premenstruální syndrom, schizofrenie, deprese, úzkost, roztroušená skleróza a další neurodegenerativní onemocnění (MacKenzie et al 2007; Marx et al 2006; Morrow 2007; Pisu & Serra 2004).

Interakce  $3\alpha$ -redukovaných pregnanových steroidů s  $GABA_A$  receptory je základem pro většinu významných behaviorálních účinků neurosteroidů, zahrnujících sedativní, hypnotické, anxiolytické a antikonvulzivní působení, včetně modulace spánkového režimu (Belelli et al 1989; Crawley et al 1986; Lancel et al 1996; Mendelson et al 1987).

Vzhledem ke klíčové úloze NMDA receptorů v kognitivních procesech, další oblast výzkumu představuje studium úlohy neurosteroidů pro tvorbu paměti a schopnost učení. Byla popsána korelace mezi sníženou hladinou PS v hippocampu starších potkanů a jejich horšími výkony v paměťových testech, kdy intraperitoneální či intrahipokampální injekce PS výsledky přechodně zlepšila (Vallee et al 1997). Mimo NMDA receptorů v těchto procesech zřejmě hrají významnou úlohu i  $GABA_A$  receptorový systém: pozitivní modulátor  $GABA_A$  receptorů,  $3\alpha5\alpha$ , zhoršuje kognitivní schopnosti experimentálních zvířat (Turkmen et al 2004). Obecně se tedy předpokládá, že neurosteroidy zlepšují kognitivní schopnosti prostřednictvím pozitivní modulace NMDA receptorů a/nebo negativní modulace  $GABA_A$  receptorů. Tyto výsledky zvyšují vyhlídky na využití neurosteroidů jako kognitivních posilovačů.

Inhibiční steroidní sulfáty jako  $3\beta5\beta S$  a  $3\alpha5\beta S$  a od nich odvozené sloučeniny by mohly být užitečné jako neuroprotektivní agens. Neuroprotektivní účinek syntetického analogu  $3\alpha5\beta S$  hemisukcinát esteru byl již prokázán jak *in vitro* (hipokampální neurony), tak *in vivo* (míšňní neurony), což naznačuje jeho potenciální terapeutické využití (Lapchak 2004; Weaver et al 1997).



Přes slibné výsledky dosavadních pokusů je vyžadována další experimentální práce, aby plně objasnila spektrum možností využití neurosteroidů v klinické praxi.

Cílem další experimentální práce by tedy mělo být určení strukturálních determinant neurosteroidů, které jsou podstatné pro vazbu na receptor, a dále přesná identifikace vazebného místa na receptoru, do kterého se tyto látky váží, neboť detailní znalost tohoto regulačního mechanismu může při hledání vhodného terapeutického postupu sehrát klíčovou úlohu.

## **Přehled použité literatury:**

- Aizenman E, Lipton SA, Loring RH. 1989. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2:1257-63
- Akk G, Bracamontes J, Steinbach JH. 2001. Pregnenolone sulfate block of GABA(A) receptors: mechanism and involvement of a residue in the M2 region of the alpha subunit. *J Physiol* 532:673-84
- Akk G, Bracamontes JR, Covey DF, Evers A, Dao T, Steinbach JH. 2004. Neuroactive steroids have multiple actions to potentiate GABAA receptors. *J Physiol* 558:59-74
- Akk G, Covey DF, Evers AS, Steinbach JH, Zorumski CF, Mennerick S. 2007. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABAA receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 116:35-57
- Akwa Y, Purdy RH, Koob GF, Britton KT. 1999. The amygdala mediates the anxiolytic-like effect of the neurosteroid allopregnanolone in rat. *Behav Brain Res* 106:119-25
- Akwa Y, Sananes N, Guezou M, Robel P, Baulieu EE, Le Goascogne C. 1993. Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. *J Cell Biol* 121:135-43
- Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R. 1998. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 18:581-9
- Arundine M, Tymianski M. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325-37
- Backstrom T, Bixo M, Hammarback S. 1985. Ovarian steroid hormones. Effects on mood, behaviour and brain excitability. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 130:19-24
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Mostallino MC, Concas A, et al. 1996. Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABAA receptor function after acute stress. *Neuroendocrinology* 63:166-72
- Baulieu EE. 1998. NEUROSTEROIDS: A NOVEL FUNCTION OF THE BRAIN. *Psychoneuroendocrinology* 23:963-87
- Beleboni RO, Carolino RO, Pizzo AB, Castellan-Baldan L, Coutinho-Netto J, et al. 2004. Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. *Cell Mol Neurobiol* 24:707-28
- Belelli D, Bolger MB, Gee KW. 1989. Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 alpha-pregnan-3 alpha-ol-20-one. *Eur J Pharmacol* 166:325-9

- Belelli D, Casula A, Ling A, Lambert JJ. 2002. The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA<sub>A</sub> receptors. *Neuropharmacology* 43:651-61
- Belelli D, Lambert JJ. 2005. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Nature Reviews Neuroscience* 6:565-75
- Belelli D, Lambert JJ, Peters JA, Wafford K, Whiting PJ. 1997. The interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11031-6
- Bloch K. 1992. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* 57:378-83
- Bowlby MR. 1993. Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 43:813-9
- Bullock AE, Clark AL, Grady SR, Robinson SF, Slobe BS, et al. 1997. Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes. *J Neurochem* 68:2412-23
- Callachan H, Cottrell GA, Hather NY, Lambert JJ, Nooney JM, Peters JA. 1987. Modulation of the GABA<sub>A</sub> receptor by progesterone metabolites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 231:359-69
- Cashin MF, Moravsek V. 1927. The physiological action of cholesterol. *Am J Physiol* 81:294-298
- Ceccon M, Rumbaugh G, Vicini S. 2001. Distinct effect of pregnenolone sulfate on NMDA receptor subtypes. *Neuropharmacology* 40:491-500
- Clements JD, Westbrook GL. 1991. Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* 7:605-13
- Compagnone NA, Salido E, Shapiro LJ, Mellon SH. 1997. Expression of steroid sulfatase during embryogenesis. *Endocrinology* 138:4768-73
- Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjoval J, Baulieu EE. 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4704-7
- Crawley JN, Glowa JR, Majewska MD, Paul SM. 1986. Anxiolytic activity of an endogenous adrenal steroid. *Brain Res* 398:382-5
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61

- Fancsik A, Linn DM, Tasker JG. 2000. Neurosteroid modulation of GABA IPSCs is phosphorylation dependent. *J Neurosci* 20:3067-75
- Frank C, Giammarioli AM, Pepponi R, Fiorentini C, Rufini S. 2004. Cholesterol perturbing agents inhibit NMDA-dependent calcium influx in rat hippocampal primary culture. *FEBS Lett* 566:25-9
- Frye CA. 2001. The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. *Brain Res Brain Res Rev* 37:201-22
- Groc L, Choquet D, Stephenson FA, Verrier D, Manzoni OJ, Chavis P. 2007. NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J Neurosci* 27:10165-75
- Harrison NL, Simmonds MA. 1984. Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* 323:287-92
- Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2006. Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* 137:93-102
- Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2004. Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *J Neurosci* 24:10318-25
- Hosie AM, Clarke L, da Silva H, Smart TG. 2009. Conserved site for neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Neuropharmacology* 56:149-54
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG. 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444:486-9
- Hosie AM, Wilkins ME, Smart TG. 2007. Neurosteroid binding sites on GABAA receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 116:7-19
- Hu ZY, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. 1987. Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8215-9
- Huettner JE, Bean BP. 1988. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1307-11
- Chisari M, Eisenman LN, Krishnan K, Bandyopadhyaya AK, Wang C, et al. 2009. The influence of neuroactive steroid lipophilicity on GABAA receptor modulation: evidence for a low-affinity interaction. *J Neurophysiol* 102:1254-64

- Ilyin VI, Whitemore ER, Guastella J, Weber E, Woodward RM. 1996. Subtype-selective inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by haloperidol. *Mol Pharmacol* 50:1541-50
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, et al. 1993. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 268:2836-43
- Jang MK, Mierke DF, Russek SJ, Farb DH. 2004. A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8198-203
- Johansson T, Frandberg PA, Nyberg F, Le Greves P. 2008. Molecular mechanisms for nanomolar concentrations of neurosteroids at NR1/NR2B receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 324:759-68
- Kleckner NW, Glazewski JC, Chen CC, Moscrip TD. 1999. Subtype-selective antagonism of N-methyl-D-aspartate receptors by felbamate: insights into the mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 289:886-94
- Kussius CL, Kaur N, Popescu GK. 2009. Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors. *J Neurosci* 29:6819-27
- Lancel M, Faulhaber J, Holsboer F, Rupprecht R. 1996. Progesterone induces changes in sleep comparable to those of agonistic GABAA receptor modulators. *Am J Physiol* 271:E763-72
- Lapchak PA. 2004. The neuroactive steroid 3-alpha-ol-5-beta-pregnan-20-one hemisuccinate, a selective NMDA receptor antagonist improves behavioral performance following spinal cord ischemia. *Brain Res* 997:152-8
- Lu WY, Xiong ZG, Lei S, Orser BA, Dudek E, et al. 1999. G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nat Neurosci* 2:331-8
- Lynch MA. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136
- MacKenzie EM, Odontiadis J, Le Melleo JM, Prior TI, Baker GB. 2007. The relevance of neuroactive steroids in schizophrenia, depression, and anxiety disorders. *Cell Mol Neurobiol* 27:541-74
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232:1004-7
- Majewska MD, Mienville JM, Vicini S. 1988. Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonizes electrophysiological responses to GABA in neurons. *Neurosci Lett* 90:279-84

- Malayev A, Gibbs TT, Farb DH. 2002. Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. *Br J Pharmacol* 135:901-9
- Marx CE, Stevens RD, Shampine LJ, Uzunova V, Trost WT, et al. 2006. Neuroactive steroids are altered in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics. *Neuropsychopharmacology* 31:1249-63
- McEwen BS. 1991. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci* 12:141-7
- Melcangi RC, Mensah-Nyagan AG. 2008. Neurosteroids: measurement and pathophysiologic relevance. *Neurochem Int* 52:503-5
- Mellon SH, Deschepper CF. 1993. Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res* 629:283-92
- Mellon SH, Griffin LD. 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13:35-43
- Mendelson WB, Martin JV, Perlis M, Wagner R, Majewska MD, Paul SM. 1987. Sleep induction by an adrenal steroid in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 93:226-9
- Mennerick S, He Y, Jiang X, Manion BD, Wang M, et al. 2004. Selective antagonism of 5alpha-reduced neurosteroid effects at GABA(A) receptors. *Mol Pharmacol* 65:1191-7
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51:63-81
- Mienville JM, Vicini S. 1989. Pregnenolone sulfate antagonizes GABAA receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res* 489:190-4
- Mohler H, Fritschy JM, Crestani F, Hensch T, Rudolph U. 2004. Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. *Biochem Pharmacol* 68:1685-90
- Mohler H, Fritschy JM, Rudolph U. 2002. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 300:2-8
- Morris KDW, Amin J. 2004. Insight into the Mechanism of Action of Neuroactive Steroids. *Molecular Pharmacology* 66:56-69
- Morrow AL. 2007. Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids--Introduction to the special issue. *Pharmacol Ther* 116:1-6

- Park-Chung M, Malayev A, Purdy RH, Gibbs TT, Farb DH. 1999. Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res* 830:72-87
- Park-Chung M, Wu FS, Farb DH. 1994. 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol Pharmacol* 46:146-50
- Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev AA, Gibbs TT, Farb DH. 1997. Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol* 52:1113-23
- Paul SM, Purdy RH. 1992. Neuroactive steroids. *FASEB J* 6:2311-22
- Petrou S, Ordway RW, Singer JJ, Walsh JV, Jr. 1993. A putative fatty acid-binding domain of the NMDA receptor. *Trends Biochem Sci* 18:41-2
- Petrovic M, Sedlacek M, Cais O, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2009. Pregnenolone sulfate modulation of N-methyl-D-aspartate receptors is phosphorylation dependent. *Neuroscience* 160:616-28
- Petrovic M, Sedlacek M, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2005. 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *J Neurosci* 25:8439-50
- Pin JP, Acher F. 2002. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:297-317
- Pisu MG, Serra M. 2004. Neurosteroids and neuroactive drugs in mental disorders. *Life Sci* 74:3181-97
- Robel P, Bourreau E, Corpechot C, Dang DC, Halberg F, et al. 1987. Neuro-steroids: 3 beta-hydroxy-delta 5-derivatives in rat and monkey brain. *J Steroid Biochem* 27:649-55
- Robert F, Guennoun R, Desarnaud F, Do-Thi A, Benmessahel Y, et al. 2001. Synthesis of progesterone in Schwann cells: regulation by sensory neurons. *Eur J Neurosci* 13:916-24
- Rosenmund C, Westbrook GL. 1993. Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. *Neuron* 10:805-14
- Selye H. 1941. The anesthetic effect of steroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med* 46:116-121
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA. 2004. Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem* 279:41422-35

- Slavikova B, Kasal A, Uhlirova L, Krsiak M, Chodounska H, Kohout L. 2001. Suppressing aggressive behavior with analogs of allopregnanolone (epalon). *Steroids* 66:99-105
- Smaje JC. 1976. General anesthetics and the acetylcholine-sensitivity of cortical neurons. *Br J Pharmacol* 58:359-366
- Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E. 2009. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462:745-56
- Sprosen TS, Woodruff GN. 1990. Polyamines potentiate NMDA induced whole-cell currents in cultured striatal neurons. *Eur J Pharmacol* 179:477-8
- Stastna E, Chodounska H, Pouzar V, Kapras V, Borovska J, et al. 2009. Synthesis of C3, C5, and C7 pregnane derivatives and their effect on NMDA receptor responses in cultured rat hippocampal neurons. *Steroids* 74:256-63
- Turkmen S, Lundgren P, Birzniece V, Zingmark E, Backstrom T, Johansson IM. 2004. 3beta-20beta-dihydroxy-5alpha-pregnane (UC1011) antagonism of the GABA potentiation and the learning impairment induced in rats by allopregnanolone. *Eur J Neurosci* 20:1604-12
- Ukena K, Usui M, Kohchi C, Tsutsui K. 1998. Cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the cerebellar Purkinje neuron and its neonatal change in rats. *Endocrinology* 139:137-47
- Vallee M, Mayo W, Darnaudery M, Corpechot C, Young J, et al. 1997. Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14865-70
- Vance DE, Van den Bosch H. 2000. Cholesterol in the year 2000. *Biochim Biophys Acta* 1529:1-8
- Wafford KA, Kathoria M, Bain CJ, Marshall G, Le Bourdelles B, et al. 1995. Identification of amino acids in the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit that contribute to the glycine binding site. *Mol Pharmacol* 47:374-80
- Wang M, He Y, Eisenman LN, Fields C, Zeng CM, et al. 2002. 3beta -hydroxypregnane steroids are pregnenolone sulfate-like GABA(A) receptor antagonists. *J Neurosci* 22:3366-75
- Wardell B, Marik PS, Piper D, Rutar T, Jorgensen EM, Bamber BA. 2006. Residues in the first transmembrane domain of the *Caenorhabditis elegans* GABA(A) receptor confer sensitivity to the neurosteroid pregnenolone sulfate. *Br J Pharmacol* 148:162-72



- Weaver CE, Jr., Marek P, Park-Chung M, Tam SW, Farb DH. 1997. Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10450-4
- Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT, Farb DH. 2000. Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca(2+) accumulation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 293:747-54
- White HS, McCabe RT, Armstrong H, Donevan SD, Cruz LJ, et al. 2000. In vitro and in vivo characterization of conantokin-R, a selective NMDA receptor antagonist isolated from the venom of the fish-hunting snail *Conus radiatus*. *J Pharmacol Exp Ther* 292:425-32
- Williams K. 1993. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44:851-9
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. 1990. Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol Pharmacol* 37:597-602
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. 1991. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40:333-6
- Wu FS, Chen SC, Tsai JJ. 1997. Competitive inhibition of the glycine-induced current by pregnenolone sulfate in cultured chick spinal cord neurons. *Brain Res* 750:318-20
- Zhang L, Zheng X, Paupard MC, Wang AP, Santchi L, et al. 1994. Spermine potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is affected by subunit composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10883-7
- Zwain IH, Yen SS. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140:3843-52