

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Pavel Švehla

**Studium působení pregnanolon sulfátu a jeho derivátů na
NMDA receptorech.**

**Characterization of the effect of pregnanolone sulfate and
its derivatives on NMDA receptors.**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Doc. MUDr. Ladislav Vyklický, DrSc.

Praha, 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 04. 2015

Jméno a příjmení: Pavel Švehla

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli doc. MUDr. Ladislavu Vyklickému, DrSc. za kritické komentáře k této práci a za vynikající podmínky poskytnuté pro její vypracování. Veliký dík patří také RNDr. Vojtěchu Vyklickému, bez jehož pomoci a podnětných připomínek by tato práce nikdy nevznikla. Děkuji také všem členům oddělení Buněčné neurofyziologie za vstřícné a přátelské prostředí. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině za podporu.

ABSTRAKT

N-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory jsou v centrálním nervovém systému podtypem receptorů pro hlavní excitační neuropřenašeč glutamát. Jejich aktivita je regulována celou řadou allostेरických modulátorů, mezi které patří i endogenní neurosteroidy a jejich syntetické analogy. Dysfunkce NMDA receptorů hraje významnou úlohu v mnoha neurodegenerativních onemocněních a inhibiční neurosteroidy mají jedinečný potenciál pro vývoj léčiv s neuroprotektivním účinkem. Cílem předkládané práce je popsat vztah mezi strukturou a funkcí neurosteroidních derivátů modifikovaných na D-kruhu využitím techniky terčíkového zámku na rekombinantních GluN1/GluN2B receptorech. V této práci jsme u 19 neurosteroidů s modifikací na D-kruhu charakterizovali jejich účinek na aktivitu NMDA receptorů a řadu z nich identifikovali jako účinné inhibitory NMDA receptorů. Na základě našich výsledků jsme odhalili lineární vztah mezi lipofilitou látky a jejím IC_{50} , což naznačuje zásadní vliv cytoplazmatické membrány pro účinek neurosteroidu. Tuto teorii jsme potvrdili kapacitním snímáním v kombinaci s využitím amfipatické molekuly gama-cyklodextrinu, čímž jsme oddělili kinetiku vazby neurosteroidu do membrány od jeho vazby na receptor. Tyto experimenty dále ukázaly, že akumulace neurosteroidu v cytoplazmatické membráně hraje kritickou úlohu v inhibičním působení těchto látek. Naše výsledky jsou v souladu s již dříve navrženým modelem účinku inhibičních neurosteroidů na NMDA receptorech.

ABSTRACT

N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are a subtype of receptors for major excitatory neurotransmitter glutamate in the central nervous system. Their activity is regulated by variety of allosteric modulators, including endogenous neurosteroids and their synthetic analogues. NMDA receptor dysfunction is implicated in various forms of neurodegeneration and inhibitory neurosteroids have unique therapeutic potential to act as neuroprotective agents. The aim of this work is to investigate relationship between structure and function of neurosteroids with modifications in the D-ring region, using whole-cell patch clamp recording at recombinant GluN1/GluN2B receptors. In this work, we characterised inhibition effect of 19 neurosteroid analogues on NMDA receptor activity and found several of them to be potent NMDA receptor inhibitors. According to our results, there is a linear relationship of IC_{50} and lipophilicity of a neurosteroid compound, suggesting the plasma membrane plays an important role in neurosteroid access to NMDA receptor. Indeed, using capacitance recording configuration in combination with amphipathic molecule gamma-cyclodextrin, we were able to separate the kinetic of neurosteroid membrane binding from receptor binding. Moreover, these experiments showed that neurosteroid accumulation in the membrane is critical for its inhibition effect. Our results are consistent with previously suggested model of inhibitory neurosteroid action at NMDA receptors.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD.....	8
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1 Struktura NMDA receptorů	10
2.1.1 Podjednotky receptoru	11
2.1.2 N-koncová doména	12
2.1.3 Ligand-vazebná doména	13
2.1.4 Transmembránová doména	14
2.1.5 C-koncová doména	16
2.2 Aktivace NMDA receptorů.....	16
2.3 Farmakologie NMDA receptorů	18
2.3.1 Agonisté NMDA receptorů	18
2.3.2 Kompetitivní antagonisté NMDA receptorů	18
2.3.3 Blokátory otevřeného kanálu.....	19
2.3.4 Allosterická modulace NMDA receptorů	20
2.4 Neurosteroidy	22
2.5 Cyklodextriny.....	24
3 MATERIÁL A METODY	26
3.1 Chemikálie a roztoky	26
3.2 cDNA klony	27
3.3 Tkáňové kultury a transfekce	27
3.4 Metoda terčíkového zámku („Patch clamp“)	28
3.4.1 Kapacitní měření.....	30
3.4.2 Vyhodnocení a statistické zpracování dat	31
4 CÍLE STUDIE.....	35
4.1 Popsat vztah mezi strukturou a funkcí D-derivátů pregnanolon sulfátu na NMDA receptorech.....	35
4.2 Identifikovat molekulární mechanismus působení D-derivátů pregnanolon sulfátu na NMDA receptorech.	35
4.3 Charakterizovat úlohu cytoplazmatické membrány v inhibičním působení neurosteroidů na NMDA receptorech.	35
5 VÝSLEDKY	36
5.1 Vliv DMSO na inhibiční působení neurosteroidů a funkci NMDA receptorů	36
5.2 Vztah mezi strukturou D-derivátů 3 α 5 β S a jejich inhibičním účinkem na NMDA receptorech.....	38
5.3 Mechanismus působení D derivátů na NMDA receptor.....	41
5.4 Úloha cytoplasmatické membrány v inhibičním působení neurosteroidů na NMDA receptorech.....	46
6 DISKUZE	52
6.1 Vliv DMSO na inhibiční působení neurosteroidů a funkci NMDA receptoru	52
6.2 Vztah mezi strukturou D-derivátů a inhibičním účinkem na NMDA receptory.....	52
6.3 Mechanismus působení D-derivátů na NMDA receptor	53

6.4	Role cytoplasmatické membrány v inhibičním působení neurosteroidů na NMDA receptorech.....	54
7	SOUHRN.....	61
7.1	Popsat vztah mezi strukturou a funkcí D-derivátů pregnanolon sulfátu na NMDA receptorech.....	61
7.2	Identifikovat molekulární mechanismus působení D-derivátů pregnanolon sulfátu na NMDA receptorech.	61
7.3	Charakterizovat úlohu cytoplazmatické membrány v inhibičním působení neurosteroidů na NMDA receptorech.	62
8	ZÁVĚR.....	63
9	LITERATURA.....	64

SEZNAM ZKRATEK

3 α 5 β S	pregnanolon sulfát (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl sulfát)
ATD	amino-terminální doména
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátová kyselina
BAPTA	1,2-bis(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
C3	uhlík číslo 3 steroidního jádra
C16	uhlík číslo 16 steroidního jádra
C17	uhlík číslo 17 steroidního jádra
CD	cyklodextrin
CNS	centrální nervová soustava
CTD	C-terminální doména
DMSO	dimethylsulfoxid
ECS	extracelulární roztok
EDTA	ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
HEK293T	lidské embryonální ledvinové buňky 293T
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
IC ₅₀	poloviční účinná inhibiční koncentrace
ICS	intracelulární roztok
iGluR	ionotropní glutamátové receptory
NMDA	N-methyl-D-aspartátová kyselina
Non-NMDA	AMPA a kainatové receptory
LBD	ligand vázající doména
P _o	pravděpodobnost otevření
Pre M1	Krátký helix předcházející 1. transmembránovému helixu
TMD	transmembránová doména
M (1, 2, 3, 4)	membránové helixy
σ	směrodatná odchylka

1 ÚVOD

Synaptický přenos je podkladem pro schopnost centrálního nervového systému (CNS) zpracovávat a ukládat informace. Synapse jsou specializovaná spojení mezi neurony, kde jsou z presynaptických neuronů uvolňovány neuropřenašeče, které interagují se svými receptory na membráně postsynaptických neuronů. Excitační nervový přenos v savčím mozku je primárně zprostředkován aminokyselinou glutamátem, jehož místem účinku jsou i NMDA receptory.

Výzkum NMDA receptorů v několika posledních desetiletích zaznamenal prudký rozvoj. NMDA receptory jsou centrem zájmu pro svou duální roli v savčím mozku: mají jednak nepostradatelnou funkci v neuronální plasticitě, ale zároveň jsou klíčovým hráčem v excitotoxickém poškození neuronů, uplatňujícím se například při Alzheimerově či Parkinsonově chorobě. Cílem dlouhodobého výzkumu na poli farmakologie NMDA receptorů je identifikovat klinicky relevantního antagonistu schopného zablokovat nadměrně aktivované NMDA receptory a zároveň nepoškodit fyziologickou funkci receptoru, která je pro správné fungování CNS nezbytná.

Existuje široké spektrum antagonistů NMDA receptorů, jejich použití je však velice omezené z důvodu vedlejších účinků těchto látek. Antagonisté NMDA receptorů založené na struktuře přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu představují nadějnou skupinu, neboť jejich působení sdílí společné znaky s memantinem, který je jediným klinicky využívaným antagonistou NMDA receptorů. Pro inhibiční účinek neurosteroidů je charakteristické, že vyžaduje předchozí aktivaci receptoru. Tato vlastnost jim umožňuje preferenčně působit na NMDA receptory aktivované tonicky zvýšenou hladinou glutamátu.

V této práci jsme se zaměřili na novou skupinu neurosteroidních derivátů s cílem najít účinnější inhibitory NMDA receptorů, a dále popsat vztah mezi strukturou a funkcí pro lepší pochopení účinku neurosteroidů na NMDA receptorech.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Většina excitačního synaptického přenosu v mozku je založena na uvolňování jednoduché alfa aminokyseliny, L-glutamátu. Bylo tomu již v polovině minulého století, kdy pokusy s aplikací glutamátu do mozku poukázaly na význam této látky v CNS (Hayashi, 1954). Až s rozvojem molekulárně biologických metod koncem minulého století došlo k charakterizaci dvou základních rodin glutamátových receptorů, a sice metabotropní a ionotropní glutamátové receptory. Ionotropní glutamátové receptory (iGluR) po aktivaci glutamátem přímo otvírají s nimi spojený iontový kanál, zatímco metabotropní receptory na vazbu glutamátu odpovídají aktivací trimerního G-proteinu. Rodina iGluR byla dále rozdělena na základě selektivních agonistů na tři skupiny: N-methyl D-aspartátové (NMDA), kainátové a α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionátové (AMPA) receptory. Ačkoliv tyto receptory sdílejí jistou sekvenční i strukturní homologii, existují mezi nimi zásadní rozdíly podtrhující jejich fyziologickou funkci.

Klíčovým rysem, kterým se iGluR mezi sebou liší, je charakter podjednotkového uspořádání receptoru. AMPA a kainátové receptory (Non-NMDA) se mohou uspořádat do funkčních homotetramerů, kdežto NMDA receptory jsou obligátními heterotetramery (Kuusinen *et al.*, 1999; Leuschner *et al.*, 1999; Sobolevsky *et al.*, 2009). Díky této skutečnosti vyžadují NMDA receptory ke své aktivaci kromě glutamátu vazbu další aminokyseliny glycinu. Expres různých podtypů podjednotek NMDA receptorů se liší vývojově a v různých oblastech mozku, což dává vzniknout jejich rozsáhlé farmakologii.

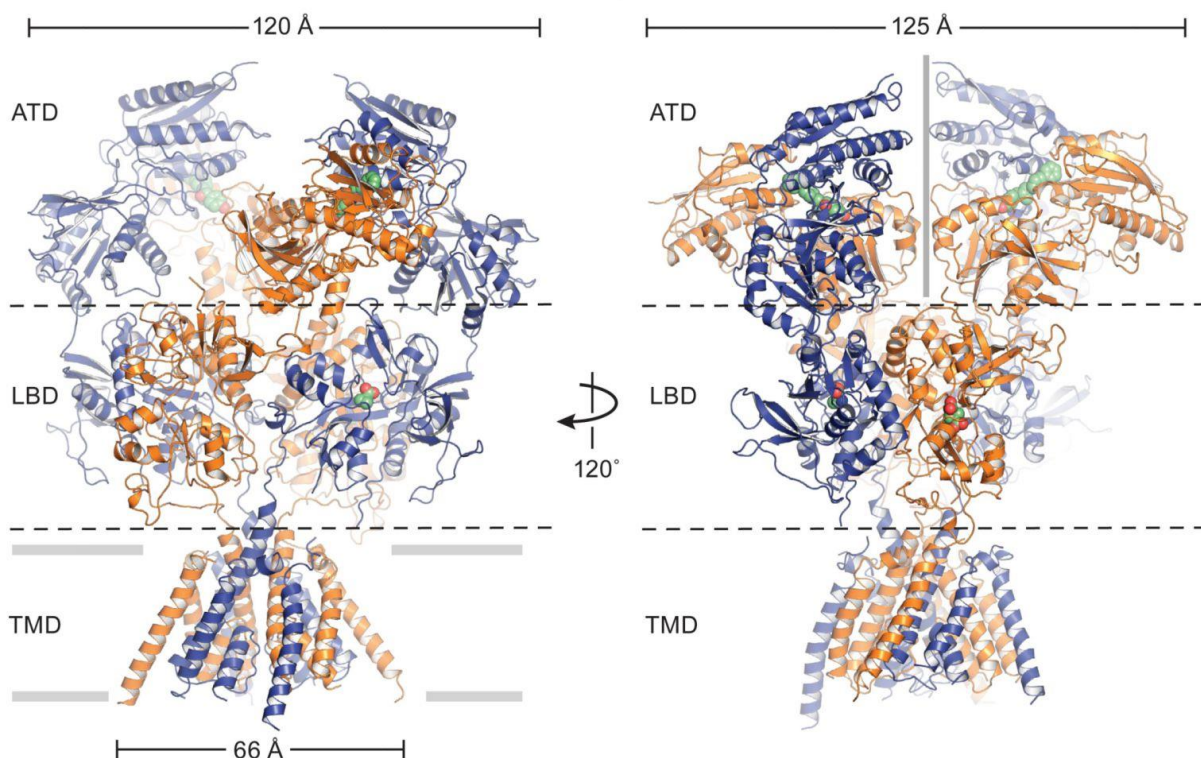
Další vlastnost odlišující NMDA receptory od receptorů non-NMDA je jejich vyšší propustnost pro ionty vápníku (Mayer *et al.*, 1987). Vápenaté ionty jsou klíčové pro spouštění buněčných signalizačních kaskád vedoucích ke smrti buňky a ovlivňují i synaptickou plasticitu. Právě pro tuto vlastnost je NMDA receptorům věnována značná pozornost na poli výzkumu neurologických onemocnění, jako je Alzheimerova, Parkinsonova choroba, či při akutním poškození nervové tkáně po mozkové mrtvici a ischemii (Traynelis *et al.*, 2010).

2.1 Struktura NMDA receptorů

NMDA receptory jsou integrální membránové proteiny vázané do cytoplasmatické membrány. Receptor je tvořen čtyřmi podjednotkami, které společně vytvářejí centrální iontový kanál. Extracelulární domény receptoru jsou organizovány jako lokální dimery; složením dvou takových dimerů vzniká heterotetramer, který zaujímá konformaci s celkovou dvojitou symetrií.

Struktura iGluR po dlouhou dobu zůstávala pouze enigmatickou záležitostí a představy o její celkové podobě byly založeny na krystalických strukturách samostatně exprimovaných extracelulárních domén (Karakas *et al.*, 2011). První detailní krystalická struktura glutamátového AMPA receptoru byla objasněna skupinou Sobolevsky *et al.* (2009) a vnesla světlo do vztahu mezi strukturou a funkcí těchto receptorů. Struktura NMDA receptoru následovala o pět let později a přinesla výsledek nečekaně rozdílný (Karakas *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014). Tyto studie ukázaly, že ačkoli iGluR sdílí podobnou terciální strukturu, organizace podjednotek v NMDA receptorech je odlišná od AMPA receptorů a jejich interakce jsou rovněž rozdílné. Vztah mezi strukturou a funkcí NMDA receptorů je obzvláště komplikovaný, protože jevy jako allosterická regulace či ligandem řízené vrátkování se dějí v kontextu celého heterotetrameru a jejich základem jsou vzájemné interakce podjednotek a domén. Pro studium farmakologických vlastností NMDA receptoru je proto důležité porozumět struktuře a tomu, jak jsou strukturální změny převáděny na změny ve funkci.

Podjednotky iGluR se skládají z následujících domén: N-koncové domény (*amino-terminal domain*; ATD), ligand-vazebné domény (*ligand-binding domain*; LBD), transmembránové domény (*transmembrane domain*; TMD) a intracelulární C-koncové domény (*carboxy-terminal domain*; CTD). Tak jako ve struktuře, hierarchii v pořadí ATD – LBD – TMD podjednotky sdílí i při konformačních změnách přenášených na iontový kanál vedoucích k otevření kanálových vrátek. Oproti struktuře AMPA receptoru jsou extracelulární domény NMDA receptoru kompaktněji uspořádány a ATD zaujímá poněkud odlišnou strukturu, která je četnými smyčkami propletena s LBD ((Lee *et al.*, 2014), Obrázek 2-1).



Obrázek 2-1. Struktura GluN1/GluN2B NMDA receptorového komplexu.

Pohled na NMDA receptor paralelně s membránou. Oranžovou barvou jsou znázorněny GluN2B a modrou barvou GluN1 podjednotky. Sférickým modelem jsou zobrazeny molekuly ligandů Ro25-6981 (allosterický inhibitor), ACPC (parciální agonista) a t-ACBD (blokátor iontového kanálu), které byly použity při krystalizaci receptoru. Šedá (vertikální) úsečka v obrázku napravo znázorňuje přibližnou dvojitou osu symetrie receptoru. Převzato z (Lee *et al.*, 2014).

V NMDA receptorech je každá doména zodpovědná za specifické vlastnosti receptoru. ATD doména řídí pravděpodobnost otevření iontového kanálu a rychlost deaktivace (Yuan *et al.*, 2009) a také váže zinečnaté ionty, ifenprodil a polyaminy (Gielen *et al.*, 2009; Karakas *et al.*, 2011; Mony *et al.*, 2011). LBD odpovídá za aktivaci vrátkování a vazbu agonisty / kompetitivního antagonisty; TMD tvoří iontový kanál a CTD interaguje s intracelulárními proteiny a moduluje synaptickou plasticitu. TMD všech podjednotek se skládají ze čtyř hydrofobních úseků; tři tvoří transmembránové oblasti (M1, M3 a M4) a druhý membránový úsek (M2) tvoří intracelulárně orientovanou kličku, která membránou neprochází (Sobolevsky *et al.*, 2009).

2.1.1 Podjednotky receptoru

Funkční NMDA receptory jsou heterotetramery složené z podjednotek GluN1 v kombinaci s GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A či GluN3B (Collingridge *et al.*, 2009). NMDA receptory vždy obsahují dvě GluN1 a dvě GluN2 podjednotky nebo dvě GluN1 v kombinaci s GluN2 a GluN3 podjednotkami. Kombinací GluN1 s dvěma různými GluN2 podjednotkami

vznikají triheteromerní receptory, které jsou charakteristické pro různé neuronální subpopulace (Brothwell *et al.*, 2008). Podjednotky NMDA receptorů jsou v heterotetrameru uspořádány v pořadí 1-2-1-2, a tedy podjednotky stejného typu spolu nesousedí (Lee *et al.*, 2014).

Zatímco AMPA a kainátové receptory jsou aktivovány samotným glutamátem, NMDA receptory fungují jako receptory koincidence a vyžadují současnou vazbu glycinu a glutamátu (Johnson *et al.*, 1987), společně s depolarizací membrány pro odstranění hořčkového bloku (Mayer *et al.*, 1984). Vazebná místa pro glycin se nacházejí na GluN1 a GluN3 podjednotkách (Furukawa *et al.*, 2003) a glutamát je vázán GluN2 podjednotkou (Furukawa *et al.*, 2005). Teoreticky tedy mohou existovat funkční GluN1/GluN3 receptory aktivované pouze glycinem, což se podařilo prokázat v oocytech *X. laevis* (Chatterton *et al.*, 2002). Tyto receptory však v neuronech pozorovány nebyly (Matsuda *et al.*, 2003).

Podjednotky NMDA receptorů jsou kódovány třemi genovými rodinami. GluN1 podjednotka je kódována jediným genem, který ale může být exprimován v osmi sestřihových variantách lišících se přítomností nebo absencí čtyř krátkých exonů (Zukin *et al.*, 1995). GluN2 podjednotky jsou pak kódovány čtyřmi geny (A – D) a GluN3 podjednotky dvěma geny (A a B). Alternativní sestřih existuje i v případě GluN2 a GluN3 podjednotek, avšak s daleko menším významem než je tomu u GluN1 podjednotky (Chandrasekar, 2013). Sestřihové varianty podjednotek a jejich specifická skladba jsou základním kamenem funkční diverzity NMDA receptorů.

2.1.2 *N-koncová doména*

V experimentech se zkrácenými podjednotkami postrádajícími celou ATD se tyto mutantní podjednotky uspořádávaly do receptorů funkčně identických s divokými typy. Zkrácení však mělo vliv na allosterickou modulaci, pravděpodobnost otevření, desenzitizaci, deaktivaci a specifitu sestavování receptoru (Yuan *et al.*, 2009). ATD nese vazebná místa pro bivalentní kationty jako Zn^{2+} (Fayyazuddin *et al.*, 2000), allosterický modulátor ifenprodil (Karakas *et al.*, 2009) a vazebná místa pro extracelulární proteiny, například N-kadheriny (Saglietti *et al.*, 2007).

V úrovni ATD GluN1/GluN2B heterotetrameru jsou v rámci celkové osy symetrie GluN2B proximálními podjednotkami, zatímco GluN1 podjednotky se nachází v distální poloze (Lee *et al.*, 2014). Roli, kterou hraje ATD ve specifitě sestavování receptoru a jeho stabilitě lze v molekulárním měřítku vysvětlit jevem zvaným záměna domén. Podstatou tohoto jevu je vzájemné překřížení proximálních a distálních podjednotek na úrovni přechodu ATD a LBD tak, že se podjednotky jednotlivých heterodimerů prohodí (Sobolevsky *et al.*, 2009).

2.1.3 *Ligand-vazebná doména*

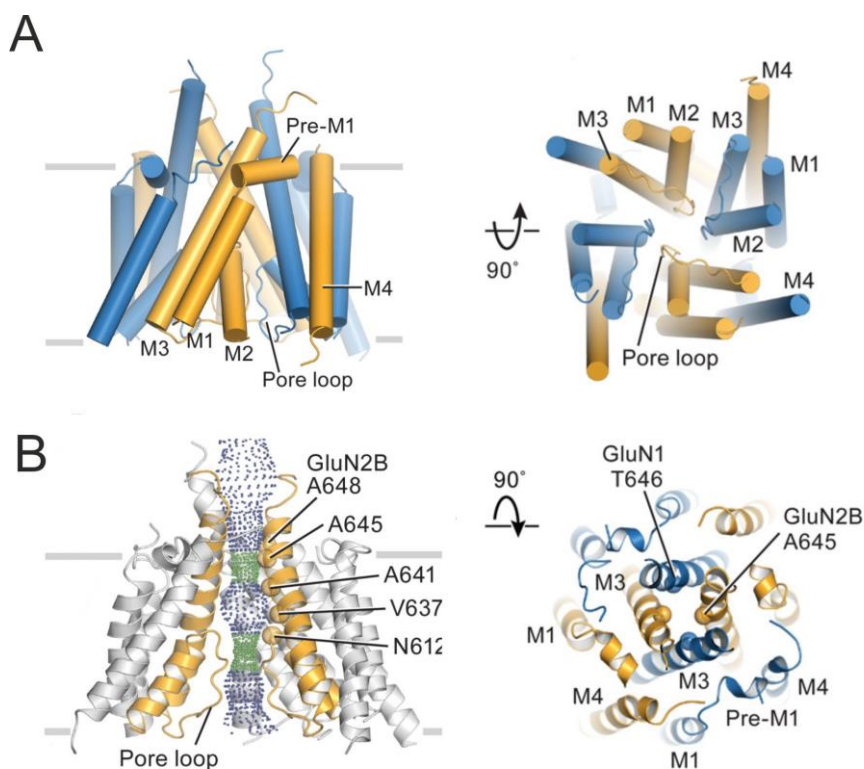
LBD jsou vysoce konzervované v rámci různých receptorových tříd a jsou tvořené dvěma extracelulárními úseky aminokyselin, které zaujímají, podobně jako ATD, konformaci písmene ‚V‘. Vazebné místo pro agonistu se nachází mezi dvěma laloky označenými D1 a D2 (Sobolevsky *et al.*, 2009). V rámci LBD existují dvě hlavní rozhraní určující konformační uspořádání heterodimeru: D1-D1 rozhraní mezi GluN1 a GluN2B v rámci jednoho heterodimeru a rozhraní mezi dvěma heterodimery. Tyto styčné plochy jsou hlavní strukturální determinantou propojující allosterickou modulaci s aktivitou vrátek iontového kanálu NMDA receptorů (Gielen *et al.*, 2008).

Na rozdíl od nesouměrnosti dimerů v úrovni ATD, ligand-vazebné domény NMDA receptoru jsou organizovány jako téměř ekvivalentní pár GluN1/GluN2B heterodimerů (Lee *et al.*, 2014). Jak již bylo zmíněno výše, ATD je centrem allosterické modulace a má vliv na aktivaci receptoru. Děje se tak skrze komunikaci extracelulárních domén: ATD shora překrývá LBD a společně vytváří velice kompaktní strukturu. Díky tomuto extenzivnímu propojení má ATD jedinečnou regulační pozici a může zasahovat do rozhraní LBD dimerů, a tak preferovat konformační stav aktivovaného či neaktivovaného receptoru (Sun *et al.*, 2002; Gielen *et al.*, 2008).

Vazba agonisty na LBD je krok předcházející aktivaci receptoru. Navázání agonisty na aminokyselinové zbytky LBD způsobí pohyb D2 laloku směrem k D1, což vede k zavření vazebné kapsy, a tato konformační změna spouští následný přechod iontového kanálu do aktivovaného stavu. Změna konformace krátkých segmentů spojujících TMD a LBD vede ke změně konformace M3 helixu, což je klíčová struktura tvořící vrátka receptoru (Erreger *et al.*, 2004; Mayer, 2006). Posun D1 a D2 laloků vůči sobě se však projevuje nestabilitou rozhraní LBD a TMD. Energeticky výhodnější stav je obnoven opětovným otevřením LBD, což je krok vedoucí k disociaci agonisty a je to i krok předcházející zavření kanálu (popřípadě změně vodivosti kanálu). Nestabilita rozhraní LBD a TMD, způsobená konformační změnou LBD, může být kompenzována přechodem receptoru do stavu o nižší energii, což je cesta, kterou receptor vstupuje do stavu desenzitizace (Sun *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003).

2.1.4 Transmembránová doména

TMD všech podjednotek se skládá z 3 transmembránových helixů (M1, M3 a M4), jedné membránové klíčky (M2) a krátkého helixu orientovaného paralelně s membránou (Pre-M1). M1, M2 a M3 z každé podjednotky přispívají k tvorbě vlastního iontového kanálu, zatímco M4 primárně zajišťuje kontakt se sousední podjednotkou a TMD propojují s LBD tři krátké linkery ((Sobolevsky *et al.*, 2009), Obrázek 2-2).



Obrázek 2-2. Transmembránová doména NMDA receptorů.

A. Schematický model TMD při pohledu paralelně s membránou. Oranžovou barvou jsou znázorněny GluN2B podjednotky a modrou barvou GluN1 podjednotky. Překlopení modelu ve směru šipky zobrazuje iontový kanál z intracelulární strany. **B.** Znárodnění povrchu iontového kanálu, kde barevné tečky značí šířku kanálu v daném místě: 1,15 Å < zelená < 2,3 Å < modrá. M3 helixy (oranžovou barvou) svým překřížením s M3 sousední podjednotky tvoří vrátka iontového kanálu, která se nachází v rovině vnějšího listu cytoplazmatické membrány. Překlopení modelu ve směru šipky ukazuje strukturu iontového kanálu při pohledu z extracelulárního prostoru. Převzato z (Lee *et al.*, 2014).

Hlavní část iontového kanálu tvoří M3 segmenty, které zaujímají tvar pyramidy s vrcholem v úrovni vnějšího listu cytoplazmatické membrány tvořícím fyzickou bariéru v dráze prostupujících iontů. Vrátka receptoru jsou pravděpodobně umístěna v tomto vrcholu v místě, kde se M3 helixy kříží. Horní zúžení iontového kanálu je určeno přítomností aminokyselinových zbytků Thr 646 GluN1 a Ala 645 GluN2B podjednotky, které jsou součástí vysoce konzervovaného motivu „...SYTANLAAF...“, kritického pro vrátkování, který se

nachází na extracelulárně orientovaných oblastech M3 helixů. Dolní zúžení iontového kanálu je tvořeno M2 kličkou (Lee *et al.*, 2014).

M4 segment jedné podjednotky je asociován s M1 a M3 segmenty sousední podjednotky. Příspěvky M4 a M1 transmembránových helixů k funkci kanálu však nejsou známy. Některé práce ukázaly, že mutantní formy M4 (Ren *et al.*, 2003) a M1 (Krupp *et al.*, 1998) mohou pozměnit vrátkování. M4 a M1 mohou mimo jiné fungovat jako kotvy přenášející konformační změny extracelulárních domén na iontový kanál. Protože v TMD je M4 blíže membráně než M3, jeho další funkcí může být snižování interakce M3 vrátkovacího elementu s hydrofobním prostředím membrány (Sobolevsky *et al.*, 2009). M4 segment se zdá být nezbytný pro funkci NMDA receptorů, jelikož podjednotky zkrácené o M4 helix nevykazují detekovatelný proud při aktivaci glutamátem (Schorge *et al.*, 2003).

Pre-M1 helixy všech čtyř podjednotek vytváří manžetu kolem horní části kanálové domény, která udržuje pohromadě C a N-konce M3 a M4 helixů. Pre-M1 je důležitou determinantou pro vrátkování kanálu (Sobolevsky *et al.*, 2009). Pro selektivitu iontového kanálu hraje významnou roli M2 vratná smyčka, která na svém vrcholku nese tzv. QRN místo, jež v různých podjednotkách NMDA receptorů obsahuje jednu klíčovou aminokyselinu, a to buď glutamin, arginin nebo asparagin (Kuner *et al.*, 1996; Wollmuth *et al.*, 1996).

Relativní orientace TMD vůči LBD u NMDA receptorů je však jiná než u AMPA receptorů. LBD u NMDA receptorů jsou rotovány o 35° kolem osy, která je přibližně shodná s celkovou dvojčetnou osou symetrie receptoru. Osa symetrie TMD u NMDA receptoru je tudíž dvojčetná, na rozdíl od AMPA receptoru, jehož TMD vykazuje symetrii podle osy čtyřčetné. Nicméně však není jisté, zda jde skutečně o charakteristiku nativních NMDA receptorů a nikoli o artefakt způsobený krystalizací receptoru s navázaným antagonistou, parciálním agonistou a blokátorem (Lee *et al.*, 2014).

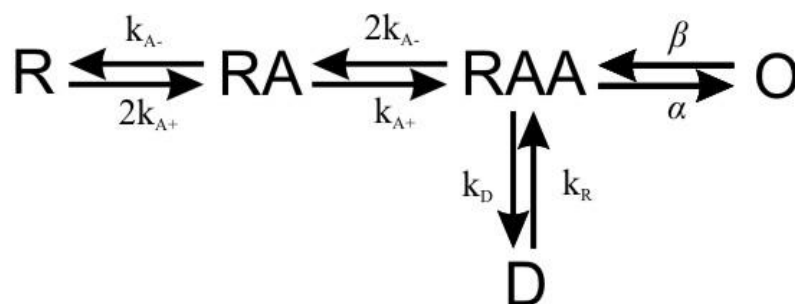
Vysoká vodivost pro vápenaté ionty je jedna ze specifických vlastností NMDA receptorů. GluN1 podjednotky obsahují shluk záporně nabitých aminokyselinových zbytků, tzv. DRPEER motiv, který je u NMDA receptorů kritický pro vysoký vtok Ca^{2+} (Watanabe *et al.*, 2002). Vazebné pokusy s lanthanoidy, které v biologických makromolekulách obsazují vazebná místa pro vápník, prokázaly akumulaci vápenatých iontů v centrální kavitě, lokalizované na extracelulární straně iontového kanálu. Tento mechanismus selektivní akumulace vápenatých iontů přispívá u NMDA receptorů k vysoké propustnosti pro tyto ionty (Karakas *et al.*, 2014).

2.1.5 C-koncová doména

CTD je nejméně konzervovanou strukturou glutamátových receptorů, liší se aminokyselinovou sekvencí i její délkou. CTD je připisován vliv na povrchovou expresi receptoru a posttranslační modifikace (Hayashi *et al.*, 2009), jakož i na degradaci receptoru (Bi *et al.*, 1998). Regulovaná modifikace CTD tudíž může mít význam při NMDA receptory zprostředkované synaptické plasticitě (Hayashi *et al.*, 2009). Obsahuje také různá fosforylační místa pro kinázy rodiny *src* a vazebná místa pro intracelulární proteiny, důležité pro regulaci funkce receptoru (Vissel *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2009). Pro některé podjednotky iGluR proto delece této domény neznamená ztrátu funkce, ale změnu regulace (Krupp *et al.*, 1998).

2.2 Aktivace NMDA receptorů

NMDA receptory jsou ligandem řízené iontové kanály. Po navázání glutamátu a glycinu prochází receptor sérií konformačních změn, jejichž výsledkem je otevření iontového kanálu. Pro popis stavů NMDA receptoru při aktivaci agonistou bylo navrženo pětistavové kinetické schéma (Obrázek 2-3; (Lester *et al.*, 1992)). Schéma uvažuje pouze obsazování glutamátových vazebných míst, jelikož agonisté glycinového vazebného místa se v CNS nacházejí v relativně stabilních koncentracích (Iijima *et al.*, 1978), které jsou dostatečné pro aktivaci receptoru.



Obrázek 2-3. Kinetické schéma aktivace NMDA receptoru.

Receptor se může nacházet podle výše uvedeného schématu v následujících konformačních stavech: stav bez (R), s jedním agonistou (RA) nebo se dvěma agonisty (RAA) navázanými do glutamátových vazebných míst, v otevřeném (O) stavu nebo ve stavu desenzitizovaném (D). Receptor přechází mezi jednotlivými konformačními stavy s danými rychlostními konstantami: asociační (k_{A+}) a disociační (k_{A-}) rychlostní konstanty pro vazbu agonisty, rychlostní konstanty desenzitizace (k_D) a resenzitizace (k_R), rychlostní konstanty otevírání (α) a zavírání (β). Upraveno dle (Lester *et al.*, 1992).

NMDA receptor je heterotetramer obsahující dvě GluN2 podjednotky vážící glutamát. Receptor se podle schématu může nacházet ve stavu bez agonisty (R), s jedním navázaným (RA) nebo se dvěma navázanými (RAA) agonisty v glutamátovém vazebném místě. Receptor s navázanými agonisty se může nacházet ve třech odlišných konformačních stavech (RAA, O a D). Stav RAA, kdy je iontový kanál stále zavřený, může přejít do stavu otevřeného (O) nebo do nevodivého stavu desenzitizace (D) se zavřeným iontovým kanálem. Rychlostní konstanty

k a koncentrace agonisty $[A]$ určují pravděpodobnost obsazení jednotlivých stavů a rychlost přechodů mezi nimi.

Vzhledem k rychlým časovým konstantám otevírání α a zavírání β a poměrně pomalým konstantám vstupu a výstupu receptoru ze stavu desenzitizace po vazbě agonistů dochází nejprve k řadě přechodů mezi stavy (RAA) a (O) za vzniku tzv. salv otevření (Gibb *et al.*, 1991). Z rychlostních konstant α a β lze určit pravděpodobnost otevření kanálu (P_O) dle vztahu $P_O = \alpha/(\alpha + \beta)$ (Huettner *et al.*, 1988). P_O vyjadřuje poměr receptorů ve stavu O a RAA v přítomnosti saturující koncentrace agonisty. P_O NMDA receptorů je předmětem allosterické potenciace či inhibice a mění se s podjednotkovým složením receptoru. U GluN1/GluN2B receptorů se P_O pohybuje okolo 10 % (Jahr, 1992; Rosenmund *et al.*, 1995). P_O u GluN1/GluN2A receptorů je výrazně vyšší a pohybuje se okolo 40 % (Chen *et al.*, 1999), zatímco u receptorů GluN1/GluN2C a GluN1/GluN2D je velmi nízká ~1-2 % (Dravid *et al.*, 2008; Vance *et al.*, 2013). Kanál iGluR je propustný pro K^+ , Na^+ a Ca^{2+} ionty a NMDA receptory nabývají hodnot vodivosti od 20 do 60 pS (Dravid *et al.*, 2008), což je podstatně více než u non-NMDA receptorů, u nichž vodivost dosahuje od <1 do 30 pS (Swanson *et al.*, 1996; Prieto *et al.*, 2010).

Bylo popsáno několik typů desenzitizace NMDA receptorů. Kromě výše zmíněného stavu desenzitizace, dosaženého spontánní konformační změnou receptoru, existují další dva typy desenzitizace, a sice glycin-závislá desenzitizace a Ca^{2+} závislá inaktivace. Zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů inhibuje aktivitu NMDA receptoru (Vyklícky, 1993), který je pro tyto ionty sám vysoce propustný, a jde tak o typ negativní zpětnovazebné regulace.

Glycin-závislá desenzitizace je charakterizována jako vzestup míry desenzitizace při snižující se extracelulární koncentraci glycinu (Mitrova *et al.*, 1989). Podstatou tohoto typu desenzitizace je negativní kooperativita mezi vazebnými místy pro glycin a glutamát (Mitrova *et al.*, 1989; Vyklícky *et al.*, 1990a). Navázání glutamátu do vazebného místa způsobí snížení afinity glycinového vazebného místa pro glycin, který disociuje z receptoru a to se projevuje poklesem makroskopického proudu. Glycin-závislá desenzitizace hraje roli při nesaturujících koncentracích glycinu, proto lze tuto desenzitizaci při experimentu odstranit přítomností saturující koncentrace obou agonistů.

2.3 Farmakologie NMDA receptorů

Aktivita NMDA receptorů může být modulována jak pozitivně, tak negativně. Pozitivní modulátory zvyšují odpovědi NMDA receptorů, váží se však na jiné vazebné místo než agonisté. Antagonisté naopak odpovědi NMDA receptorů snižují a lze je rozdělit podle místa účinku na kompetitivní antagonisty (vazebné místo pro agonistu) a nekompetitivní/akompetitivní antagonisty (specifické vazebné místo). V této kapitole je uveden krátký přehled těchto modulátorů.

2.3.1 Agonisté NMDA receptorů

NMDA receptory ke své aktivaci vyžadují současnou vazbu dvou molekul glycinu na GluN1 a dvou molekul glutamátu na GluN2 podjednotku zároveň s depolarizací membrány pro odstranění Mg^{2+} bloku (Mayer *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1987; Vyklicky *et al.*, 1990a).

Jelikož se glycin vyskytuje v extracelulárním prostředí nervového systému v saturujících koncentracích (Iijima *et al.*, 1978), většina glycinových vazebných míst je přirozeně obsazená. Bylo ukázáno, že NMDA receptory obsahující GluN2A podjednotky mají vyšší afinitu pro D-serin než pro glycin, zatímco NMDA receptory obsahující GluN2B podjednotky preferují glycin (Matsui *et al.*, 1995). Fakt, že synaptické NMDA receptory jsou ke glycinu necitlivé, naznačuje, že synaptické receptory obsahují GluN2A podjednotku, kdežto GluN2B podjednotky se vyskytují převážně extrasynapticky. To je v souladu s pozorováním, že účinek D-serinu je omezen pouze na synaptické receptory (Papouin *et al.*, 2012).

Glutamát je presynapticky uvolňován na glutamátergních synapsích a váže se na GluN2 podjednotky. Mezi další agonisty GluN2 patří D-glutamát, NMDA, L a D-aspartát a mnoho dalších (Kwekkeboom *et al.*, 1988; Nicholls, 1989; Richter *et al.*, 2013), pro přehled viz (Traynelis *et al.*, 2010). Relativní účinnost agonistů GluN2 podjednotek je obecně stupňována od nejmenší účinnosti na GluN2A k nejvyšší účinnosti na GluN2D podjednotkách. Přestože GluN2A a GluN2D sdílejí vysokou sekvenční i strukturní homologii, glutamát zaujímá při vazbě na různé podjednotky různou orientaci. Tato skutečnost umožňuje vyvíjet podjednotkově selektivní agonisty a kompetitivní antagonisty (Erreger *et al.*, 2007).

2.3.2 Kompetitivní antagonisté NMDA receptorů

Kompetitivní antagonisté NMDA receptorů se váží do vazebného místa pro glycin či glutamát, a zabraňují tak vazbě agonistů. Pro účinek těchto látek je typické, že jejich inhibiční účinek klesá s rostoucí koncentrací agonisty. Mezi první identifikované kompetitivní antagonisty

glutamátového místa na NMDA receptoru patří D-2-amino-fosfonovalerát (D-APV), který je vysoce selektivní pro NMDA receptory napříč rodinou iGluR. Tato látka však vykazuje nízkou selektivitu k podjednotkovému složení NMDA receptoru. Kompetitivních antagonistů glycinového místa GluN1 podjednotek bylo identifikováno několik, například 7-chlorokynurenová kyselina či její analog 5,7-dichlorokynurenová kyselina (Birch *et al.*, 1988; Kemp *et al.*, 1988). Na glycinovém vazebném místě účinkují rovněž anestetické plyny xenon a isofluran. Tyto anestetika postrádají vedlejší psychotomimetické účinky typické pro většinu kompetitivních antagonistů NMDA receptorů, a proto jsou pacienti velmi dobře tolerovány (Dickinson *et al.*, 2007).

Selektivity kompetitivních antagonistů NMDA receptorů je obtížné dosáhnout z důvodu vysoké homologie LBD mezi GluN2 podjednotkami. Z 39 aminokyselin lemujících vazebné místo se jich mezi GluN2 podjednotkami liší pouze osm a všech deset aminokyselin, které přicházejí do přímého kontaktu s glutamátem, je plně konzervováno (Furukawa *et al.*, 2005).

2.3.3 *Blokátory otevřeného kanálu*

Blokátory otevřeného iontového kanálu mají vazebné místo v centrální kavitě iontového kanálu. Díky tomu se váží na receptor pouze v aktivovaném stavu, kdy je iontový kanál otevřený (Neely *et al.*, 1986) a jde proto o inhibitory s akompetitivním mechanismem působení. Inhibice se zvyšuje s rostoucí pravděpodobností otevření kanálu. Protože se tyto látky váží do membránového úseku iontového kanálu, kde působí elektrické pole v důsledku transmembránového potenciálu, je tento typ blokády napěťově závislý. Po zavření iontového kanálu v něm mohou být blokátory zachyceny a proto je lze rozdělit na látky s mechanismem částečného zachycení a mechanismem úplného zachycení. Tyto dvě skupiny se liší mechanismem návratu receptoru z inhibovaného stavu. Zatímco blokátory s mechanismem úplného zachycení jsou z vazebného místa v póru iontového kanálu uvolněny pouze další aktivací receptoru, blokátory s mechanismem částečného zachycení samovolně disociují z receptoru (Parsons *et al.*, 1995; Blanpied *et al.*, 1997).

Nejvýznamnějším blokátorem iontového kanálu NMDA receptoru jsou Mg^{2+} ionty. Za fyziologických podmínek jsou NMDA receptory zablokovány extracelulárním Mg^{2+} . Pro jejich aktivaci je třeba depolarizace membrány (Mayer *et al.*, 1984), což je klíčová vlastnost NMDA receptorů umožňující fungovat jako detektory koincidence. Mezi blokátory otevřeného kanálu patří rovněž anestetika MK-801, fenylcyklidin a ketamin a v neposlední řadě deriváty amino-adamantanu memantin a amantadin (Parsons *et al.*, 1995). Z důvodu silných vedlejších účinků

je však použití blokátorů otevřeného kanálu NMDA receptorů značně omezeno. Výjimkou je memantin, který je díky svým nízkým vedlejším účinkům používán v terapii Alzheimerovy choroby (Lipton, 1993).

Memantin a amantadin jsou příkladem blokátoru iontového kanálu s mechanismem částečného zachycení. Blokují NMDA receptory po otevření iontového kanálu a ze zablokovaných receptorů jsou pak tyto látky samovolně uvolněny, a z toho důvodu jejich účinek postupně odeznívá (Blanpied *et al.*, 1997). Jejich terapeutický význam spočívá v preferenční inhibici nadměrně aktivovaných NMDA receptorů, a proto tyto látky lze využít jako účinných léků při NMDA receptory zprostředkované excitotoxicitě (Chen *et al.*, 2006).

2.3.4 *Allosterická modulace NMDA receptorů*

Allosterické modulatory jsou látky schopné měnit aktivitu NMDA receptorů, avšak jejich vazebné místo se nenachází ani ve vazebném místě pro glycin či glutamát ani v rámci iontového kanálu.

Zn²⁺

Bivalentní kationty jsou obecně schopné modulace NMDA receptorů. Nejznámější z nich jsou zinečnaté kationty, které vyvolávají napěťově nezávislou inhibici NMDA receptorů obsahujících GluN2A a GluN2B podjednotky (Westbrook *et al.*, 1987; Fayyazuddin *et al.*, 2000; Rachline *et al.*, 2005). Bylo ukázáno, že Zn²⁺ ionty se uvolňují během synaptického přenosu a v synaptické štěrbině mohou dosahovat dostatečných koncentrací pro modulaci aktivity NMDA receptorů (Assaf *et al.*, 1984; Mayer *et al.*, 1989). Lokálně zvýšená koncentrace v CNS, spolu s podjednotkovou specifitou, tak umožňuje Zn²⁺ fungovat jako endogenní modulator NMDA receptorů. Krystalografické studie ukázaly, že vazebné místo pro Zn²⁺ se nachází v ATD doméně GluN2A a GluN2B podjednotek. Mezi vazbou glutamátu k LBD a vazbou Zn²⁺ k ATD existuje pozitivní allosterický vztah. Tato interakce může mít význam pro desenzitizaci NMDA receptorů, která je důležitým regulačním mechanismem jejich funkce. Byla navržena hypotéza, že desenzitizace receptoru a relaxace proudů jsou důsledkem zvýšení afinity pro Zn²⁺, způsobené vazbou glutamátu na receptor, která vede po vazbě Zn²⁺ k inhibici NMDA receptorových proudů (Zheng *et al.*, 2001; Erreger *et al.*, 2005).

Protony

NMDA receptory jsou negativně modulovány zvýšenou koncentrací protonů v extracelulárním prostředí a tento proces je nezávislý na ionizaci agonistů (Traynelis *et al.*, 1990; Vyklicky *et al.*, 1990b). NMDA receptory o různém podjednotkovém složení se liší poloviční účinnou inhibiční koncentrací (IC_{50}) pro protony a to naznačuje, že v rozmezí fyziologického pH mohou být NMDA receptory tonicky inhibovány (Traynelis *et al.*, 1995). Inhibice NMDA receptorů snížením pH může mít fyziologický význam pro jejich funkci, neboť zvýšená synaptická aktivita vede k výraznému snížení hodnoty pH v okolí synapsí (Kraig *et al.*, 1983; Krishtal *et al.*, 1987). Oblast zodpovědná za citlivost ke změnám pH se nachází v LBD v blízkosti vnějšího ústí iontového kanálu (Low *et al.*, 2003). Regulace NMDA receptorů změnou extracelulárního pH může hrát důležitou roli při mozkové ischemii.

Polyaminy

Extracelulární polyaminy, jako spermin a spermidin, které se přirozeně vyskytují v CNS jako metabolity, mají modulační účinek na odpovědi NMDA receptorů. Spermin v nízkých koncentracích účinkuje nezávisle na napětí mechanismem na glycinu závislým i nezávislým. Glycin-závislá potenciace se vyskytuje u receptorů obsahujících GluN2A a GluN2B podjednotky prostřednictvím zvýšení afinity ke glycinu (Williams *et al.*, 1994), která je výsledkem allosterické interakce mezi polyaminy vázanými k ATD a glycinem navázaným na LBD (Han *et al.*, 2008). Glycin-nezávislá polyaminová potenciace NMDA receptorů se vyskytuje i při saturujících koncentracích glycinu, a to pouze u receptorů obsahujících GluN2B podjednotku (Ransom *et al.*, 1990; Durand *et al.*, 1993). Bylo ukázáno, že vazba polyaminů mění vlastnosti oblasti M3 helixu zodpovědné za citlivost k pH, čímž při fyziologickém pH snižuje tonickou inhibici NMDA receptorů protony (Traynelis *et al.*, 1995).

Ifenprodil

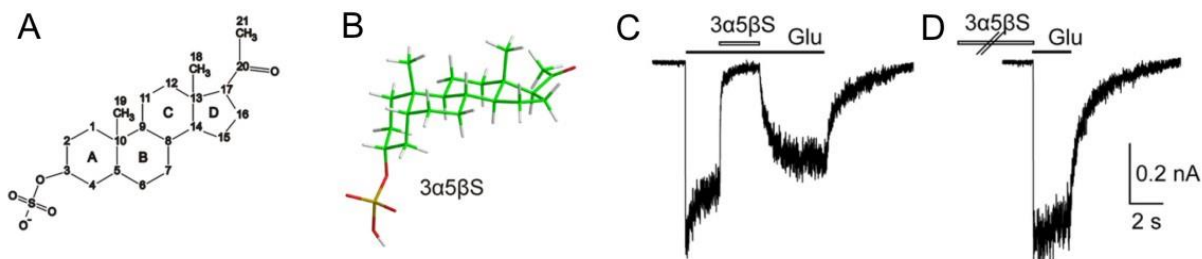
Ačkoliv antagonisté NMDA receptorů vykazují určitou míru podjednotkově selektivního působení, většinou tato selektivita není nijak výrazná a proto nelze tyto látky použít pro selektivní blokádu určité populace NMDA receptorů. První charakterizovanou látkou se selektivním antagonismem byl ifenprodil, který téměř 400 krát více selektivní pro GluN2B podjednotku než pro GluN2A podjednotku, zatímco GluN2C a D podjednotky jsou k ifenprodilu necitlivé (Williams, 1993). Vazebné místo pro ifenprodil se nachází v ATD GluN2A a GluN2B podjednotek (Perin-Dureau *et al.*, 2002).

2.4 Neurosteroidy

Neurosteroidy představují skupinu allosterických modulátorů NMDA receptorů s různým mechanismem účinku. Neurosteroidy mohou NMDA receptory modulovat v závislosti na stavu receptoru: zatímco určitá skupina látek se na receptor váže bez preference pro stav receptoru (nekompetitivní působení), jiná skupina naopak vyžaduje aktivovaný receptor (akompetitivní působení). Naše laboratoř prokázala, že inhibiční modulátory steroidní povahy inhibují NMDA receptory akompetitivním mechanismem (Petrovic *et al.*, 2005).

Inhibiční modulátory NMDA receptorů jsou velmi nadějnou skupinou farmaceutik pro léčbu širokého spektra nervových poruch, počínaje Alzheimerovou či Parkinsonovou chorobou a konče akutními stavy poškození mozku při iktu. Cílem výzkumu na poli farmakologie NMDA receptorů je identifikovat klinicky relevantního antagonistu, jenž preferenčně zablokuje jejich excitotoxickou aktivitu aniž by došlo k významnému ovlivnění normální funkce NMDA receptoru, která je důležitá pro synaptický přenos a plasticitu. Ze škály známých inhibitorů mají neurosteroidy unikátní vlastnosti: inhibují NMDA receptory akompetitivním mechanismem nezávisle na napětí a odblokování receptoru probíhá i v neaktivovaném stavu. Tyto klíčové charakteristiky jim umožňují přednostně blokovat tonicky aktivované NMDA receptory, spíše než ty aktivované fazicky. Neurosteroidy však na NMDA receptorech působí až při relativně vysokých koncentracích (řádově desítky μM) a představují tak podstatnou zátěž pro pacienta. Nízká afinita pro NMDA receptory je zároveň předurčuje k vedlejším účinkům na dalších receptorech, jako například GABA či glycinových receptorech, což je spojeno s vedlejšími účinky neurosteroidů používaných jako léčiva (Majewska *et al.*, 1988; Wu *et al.*, 1997).

V kontextu NMDA receptorů se jedná především o dvě steroidní látky s příbuznou strukturou, které se přirozeně vyskytují v CNS savců (Corpechot *et al.*, 1983). Je to pregnanolon sulfát ($3\alpha5\beta\text{S}$; 20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl sulfát), který inhibuje NMDA receptory a pregnenolon sulfát (20-oxo-5- β -pregnen-3- α -yl sulfát), který má na odpovědi potenciační vliv (Horak *et al.*, 2004; Petrovic *et al.*, 2005). Vazebné místo $3\alpha5\beta\text{S}$ na NMDA receptorech je odlišné od vazebného místa glycinu a glutamátu (Park-Chung *et al.*, 1997). Příklad inhibičního působení $3\alpha5\beta\text{S}$ na GluN1/GluN2B receptorech ukazuje Obrázek 2-4.



Obrázek 2-4. Struktura a modulační účinek pregnanolon sulfátu (3α5βS).

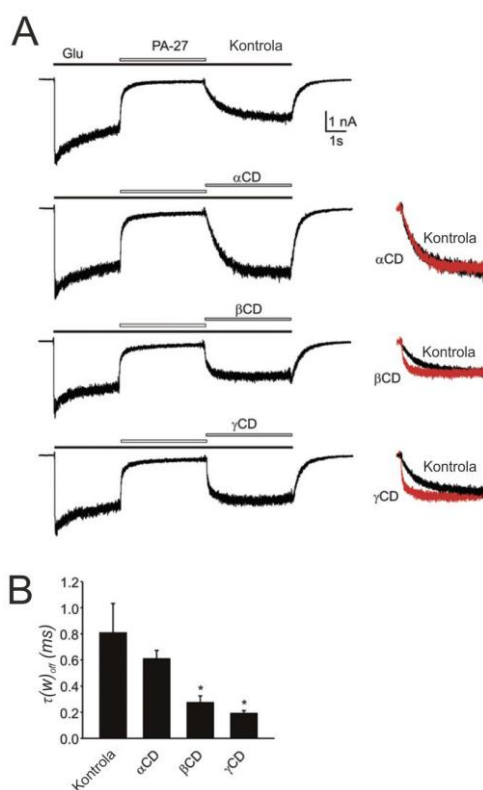
A. Strukturální vzorec 3α5βS. **B.** Prostorový model 3α5βS. **C.** Inhibiční účinek 300 μM 3α5βS na rekombinantních GluN1/GluN2B receptorech aktivovaných 1 mM glutamátu a 10 μM glycinu. **D.** Preaplikace 300 μM 3α5βS před aplikací 1 mM glutamátu a 10 μM glycinu nemá na průběh nástupu glutamátové odpovědi žádný vliv. To ukazuje, že 3α5βS účinkuje akompetitivním způsobem, neboť jeho vazba vyžaduje receptor v aktivovaném stavu.

V publikacích naší laboratoře bylo ukázáno, že acetylová skupina na uhlíku číslo 17 (C17, Obrázek 2-4A) není nezbytná pro inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptorech. Modifikací steroidního jádra na C17 lze zvýšit potenci steroidů oproti přirozeně se vyskytujícímu 3α5βS. Bylo ukázáno, že C17 substituenty přímo interagují s NMDA receptorem, a pro tuto vazbu je významná stereoizomerie neurosteroidu (Vidrna *et al.*, 2011; Cerny *et al.*, 2012). To zároveň prokazuje, že neurosteroid se fyzicky váže na NMDA receptor způsobem interakce ligand-receptor. Nejedná se tudíž o interakci nepřímou, zprostředkovanou nespécifickou modulací fyzikálních vlastností plasmatické membrány vlivem vazby steroidu do membrány, což je model navrhovaný některými pracemi (Casado *et al.*, 1998).

Pro inhibiční účinek neurosteroidů na NMDA receptorech je kritická nabitá skupina v pozici na třetím uhlíku (C3). Naše laboratoř ukázala, že substituce nenabitě skupiny na C3 ruší inhibiční vlastnosti, kdežto substituenty s kladným i záporným nábojem mají účinek zachovány. Experimenty se steroidy nesoucími náboj na jiném uhlíku než C3 neprokázaly korelaci mezi inhibičním účinkem a pozicí náboje v rámci molekuly steroidu. Tyto poznatky nasvědčují tomu, že ačkoli je nabitá skupina pro účinek steroidu nezbytná, neúčastní se přímo vazby na receptor, avšak má význam pro přístup steroidu k vazebnému místu na NMDA receptoru (Borovska *et al.*, 2012). Náboj na C3 může hrát roli v interakci s cytoplazmatickou membránou, skrze kterou se neurosteroidy dostávají k vazebnému místu na receptoru, jak bylo prokázáno v případě GABA receptorů (Akk *et al.*, 2005). Tato hypotéza je podpořena pozorováním, že kladně nabitě molekuly jsou účinnější než molekuly nabitě záporně, a ve větší míře dochází k jejich akumulaci v membráně. To lze vysvětlit elektrostatickými interakcemi kladného náboje steroidu se záporně nabitým fosfátem, neseným fosfolipidy v membráně.

2.5 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy složené z D-glukopyranózových jednotek spojených $\alpha(1-4)$ vazbou. Tyto sloučeniny jsou používány jako účinné nosiče hydrofobních látek. Molekula CD, ačkoli je vysoce hydrofilní, nese zároveň hydrofobní kavitu, do které se mohou vázat různé látky hydrofobního charakteru. CD existují jako hexamery (α -CD), heptamery (β -CD) a oktamery (γ -CD). Stupeň polymerizace glukózy definuje velikost hydrofobní kapsy a tak určuje afinitu ke specifické skupině látek (Davis *et al.*, 2004). β -CD mají největší afinitu pro cholesterol, a z cyklodextrinů jsou tak pro extrakci cholesterolu z membrán nejúčinnější. Naproti tomu, pro extrakci fosfolipidů je nejúčinnější α -CD (Ohtani *et al.*, 1989). V práci Borovska *et al.* (2012) bylo ukázáno, že cyklodextriny lze rovněž použít pro urychlení návratu odpovědi NMDA receptorů z inhibice vyvolané neurosteroidy. Zatímco α -CD nevyvolává změnu v rychlosti návratu z inhibovaného stavu, β a γ -CD významně urychlují odmyváání inhibičního účinku na GluN1/GluN2B receptorech (Obrázek 2-5).



Obrázek 2-5. Vliv jednotlivých typů cyklodextrinů na odmyváání inhibičního působení neurosteroidu z aktivovaného NMDA receptoru.

A. Kontrolní záznam inhibičního působení 10 μ M steroidu 5 β -pregnan-20-oxo-3 α -argininátu (PA-27) a vliv 10 mM α , β a γ cyklodextrinů (CD) na rychlost ukončení jeho působení na NMDA receptorech. Překryvy v pravé části ukazují odmyváání steroidu samotným glutamátem (černě) a glutamátem s CD (červeně). **B.** Graf shrnující vliv cyklodextrinů na váženou časovou konstantu odmyváání $\tau(w)_{off}$. Hvězdičkou jsou označeny signifikantní rozdíly vůči kontrole. Převzato z (Borovska *et al.*, 2012).

Vliv CD na kinetiku inhibice 5 β -pregnan-20-oxo-3 α -argininátu lze vysvětlit vyvazováním molekul steroidu molekulami cyklodextrinů a to je zároveň potvrzeno pozorováním, že přidáním β -CD k vodnému roztoku tohoto neurosteroidu dochází k vyrušení jeho účinku. Tyto experimenty s β -CD vedly k navržení mechanismu účinku inhibičních neurosteroidů na NMDA receptorech, kde hraje roli cytoplasmatická membrána (Kostakis *et al.*, 2011; Borovska *et al.*, 2012).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Chemikálie a roztoky

Všechny roztoky byly připraveny z deionizované vody, která byla přečištěna přístrojem Simplicity 185 (Millipore, Billerica, USA). Veškeré použité neurosteroidy byly nasyntetizovány oddělením Neuroprotektiv Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i. (Praha, Česká republika). Jejich čistota byla kontrolována nukleární magnetickou rezonancí, tenkovrstevnou chromatografií a elementární analýzou. Všechny ostatní chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

PBS

2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄, pH upraveno pomocí NaOH na 7,3

Versenův roztok

0,2% trypsin a 0,02% ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EDTA) v PBS; pH rovno 7,3

Transfekční médium

Kultivační médium Opti-MEM (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) bylo obohaceno o 1% fetální bovinní sérum (PAN Biotech, Aidenbach, Německo), 1 mM D,L-2-amino-5-fosfovalerovou kyselinu, 3 mM kynurenovou kyselinu, 4,2 μM ketamin a 20 mM MgCl₂.

Intracelulární roztok (ICS)

Intracelulární roztok, použitý pro elektrofyziologická snímání odpovědí NMDA receptorů, obsahoval: 120 mM Cs-glukonát, 15 mM CsCl, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonovou kyselinu (HEPES), 10 mM 1,2-bis(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctovou kyselinu (BAPTA), 1 mM CaCl₂, 2 mM Mg²⁺-ATP, 3 mM MgCl₂. pH bylo upraveno pomocí CsOH na hodnotu 7,2 a osmolarita roztoku byla 290 mOsm/l.

Extracelulární promývací roztok

Extracelulární promývací roztok používaný pro perfuzi buněk mezi elektrofyziologickými snímáními obsahoval: 2,5 mM KCl, 160 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glukózy a 10 mM HEPES. pH bylo upraveno na 7,3 přidáním NaOH a výsledná osmolarita byla 320 mOsm/l.

Extracelulární aplikační roztok (ECS)

Extracelulární aplikační roztok, ve kterém byly snímány odpovědi NMDA receptorů, obsahoval: 2,5 mM KCl, 160 mM NaCl, 10 mM glukózy, 0,7 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 0,2 mM EDTA. pH bylo upraveno přidáním NaOH na hodnotu 7,3 a výsledná osmolarita byla 320 mOsm/l.

Redukovaný extracelulární aplikační roztok

50% zředěním ECS deionizovanou vodou byl připraven redukovaný extracelulární aplikační roztok. Osmolarita byla pomocí sacharózy upravena na hodnotu původního ECS. pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,3.

Veškeré roztoky použité pro elektrofyziologická snímání byly přefiltrovány přes filtr s póry o velikosti 0,22 µm (Millipore, Billerica, USA) a skladovány po alikvotech při -20 °C. V den měření byly extracelulární roztoky ohřáty na 50°C ve vodní lázni, byli přidáni agonisté NMDA receptorů, glycin a glutamát (standardně používaná koncentrace byla 10 µM glycinu a 1 mM glutamátu, pokud není uvedeno jinak), a dále byly ze zásobních roztoků přidány steroidní látky rozpuštěné v dimethylsulfoxidu (DMSO), které byly čerstvě namíchaný. Stejně množství DMSO, které bylo v roztocích obsahujících steroid, bylo přidáno i do všech ostatních aplikačních roztoků, aby byla dosažena rovnocenná koncentrace DMSO. Pro dostatečné rozpuštění steroidních látek byly zásobní roztoky krátce sonikovány při 50 °C (Sonorex Digitec DT 100/H, Badelin electronic, Berlín, Německo).

3.2 cDNA klony

GluN1-1a (GenBank accession no. U08261) v pcDNA1

Zelený fluorescenční protein (eGFP) v pQBI 25 (Takara Bio Inc.)

GluN2B (GenBank accession no. M91562) v RK7

3.3 Tkáňové kultury a transfekce

Lidské embryonální ledvinové buňky HEK293T byly použity jako expresní systém pro rekombinantní receptory (Human Embryonic Kidney cells; ATCC, USA). Buňky byly kultivovány v médiu Opti-MEM obohaceném o 5 % fetálního telecího séra (PAN Biotech, Aidenbach, Německo) v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO₂. Pro účely transfekce byly buňky nasazeny na kultivační destičky s 24 jamkami (TPP, Trasadingen, Švýcarsko; 0,5 ml na jamku) pokrytými kolagenem (SERVA, Heidelberg, Německo) tak, aby v den transfekce

dosahovaly 80-90 % konfluence.

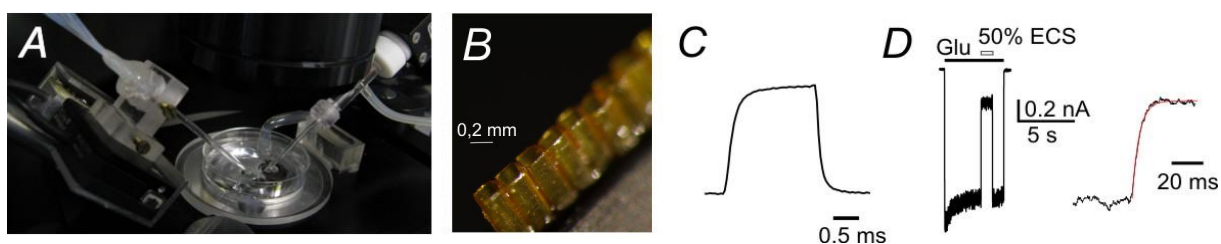
Transfekce probíhala pomocí transfekčního činidla MATra-A Reagent a silného neodymového magnetu (IBA GmbH, Göttingen, Německo) následujícím postupem: do 50 μ l kultivačního média Opti-MEM bylo přidáno 0,9 μ l činidla MATra a celkově 900 ng cDNA (po 300 ng cDNA od jednotlivých NMDA podjednotek a navíc stejné množství cDNA kódující eGFP – pro identifikaci úspěšně transfekovaných buněk). Tato směs byla ponechána 20 min při pokojové teplotě a následně přidána k buňkám v jamce. Kultivační destička byla následně umístěna po dobu 15 min na magnet do inkubátoru. Po transfekci byly buňky opláchnuty PBS a bylo k nim přidáno 200 μ l Versenova roztoku. Po uvolnění ze dna jamky byly buňky nasazeny na plastové kultivační misky s průměrem 35 mm. Tyto misky obsahovaly předem připravená krycí sklička o průměru 24 mm pokrytá kolagenem a poly-L-lysinem; v případě snímání z buněk v nadzvednuté poloze nebyla sklička pokryta kolagenem ani poly-L-lysinem. K experimentům byly buňky použity 24-48 hodin po transfekci.

3.4 Metoda terčíkového zámku („Patch clamp“)

Pro měření proudových odpovědí vyvolaných aktivací rekombinantních NMDA byla využita technika terčíkového zámku („patch clamp“) v konfiguraci snímání z celé buňky („whole cell“; (Hamill *et al.*, 1981)). Snímání probíhalo pomocí zesilovače Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) v režimu napěťového zámku, kdy je membránový potenciál zpětnovazebně udržován na konstantní úrovni. Z analogového signálu byly pomocí osmipólového Besselova filtru odfiltrovány frekvence vyšší než 2 kHz, a tento signál byl dále pomocí A/D převodníku Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) digitalizován vzorkovací frekvencí 10 kHz. Pro snímání byly použity skleněné pipety o vnějším průměru 1,5 mm a vnitřním průměru 0,86 mm vytažené z borosilikátových kapilár (BioMedical Instruments, Zöllnitz, Německo) pomocí horizontálního tahače P-1000 (Sutter Instrument, Novato, USA). Odpor mikropipet se po naplnění ICS pohyboval v rozmezí 3-5 M Ω . Umístění snímací pipety vůči membráně buňky bylo zajištěno mikromanipulátorem MP-225 (Sutter Instrument, Novato, USA). Referenční elektrodu a elektrodu zajišťující elektrický kontakt mezi intracelulárním roztokem a zesilovačem tvořila Ag/AgCl elektroda. Prostor se snímanými buňkami byl elektricky propojen pomocí solného agarového můstku s komůrkou naplněnou ECS a obsahující referenční elektrodu. Veškeré experimenty probíhaly při pokojové teplotě (23-25 °C) a membránový potenciál buněk, pokud není uvedeno jinak, byl udržován na -60 mV. Sériový odpor (< 10 M Ω) byl u všech buněk kompenzován z 80-90 %. Z důvodu odstínění

elektromagnetického rušení a vibrací byla aparatura obsahující invertovaný mikroskop Olympus CKX41 (Tokyo, Japonsko) umístěna na antivibrační stůl TMC (Technical Manufacturing Co., Peabody, USA) uzavřený do Faradayovy klece. Naměřená data byla analyzována pomocí programu Clampfit 10.2, který je součástí pClamp 10.2 softwaru a statisticky zpracována pomocí programů Sigma Plot 10 a Sigma Stat 3.5 (Systat Software Inc, San Jose, USA).

Pro aplikaci kontrolních a pokusných roztoků byl použit rychlý aplikační systém vyvinutý v naší laboratoři, který umožňuje aplikaci až deseti různých roztoků s časovou konstantou koncentračních změn aplikovaných látek v okolí snímané buňky ~ 5 ms. Pomocí mikroprocesorové řídicí jednotky lze tímto systémem přesně definovat sekvenci a délku aplikace jednotlivých roztoků v okolí snímaných buněk. Původní systém (Vyklíčky et al., 1990b, Dittert et al., 2006) byl dále vylepšen využitím super-rychlého piezo posuvu a užitím trubiček vyrobených z kapilár z polyimidového materiálu upravených do čtvercového profilu, které zajišťují úzké a přesně definované rozhraní mezi roztoky. Rychlost výměny roztoku byla určena pomocí změny difúzního potenciálu a pomocí výměny ECS za redukovaný ECS, který má za následek pokles proudu protékajícího kanály exprimovaných NMDA receptorů (Obrázek 3-1).



Obrázek 3-1. Aplikace roztoků.

A. Uspořádání elektrofyziologického experimentu. Piezo posuv s aplikačními trubičkami (vlevo) a měřící elektroda (vpravo) jsou umístěny naproti sobě a svírají s rovinou mikroskopického stolku úhel 45° . **B.** Detail aplikačních trubiček vyrobených z polyimidového materiálu. **C.** Rychlost výměny roztoků měřená jako změna difúzního potenciálu mezi otevřenou měřící elektrodou naplněnou ICS a roztoky ECS s různou iontovou silou. Doba trvání aplikačního pulzu byla 2 ms, doba nástupu $380 \mu\text{s}$ a doba poklesu $220 \mu\text{s}$ (měřeno jako 10-90 %). **D.** Rychlost aplikace měřená na HEK293T buňce transfekované GluN1/GluN2B podjednotkami. Buňka byla při experimentu nadzvednuta z podložky, aby bylo dosaženo maximální rychlosti výměny roztoku v okolí celé buňky. Aplikace ECS obsahujícího 1 mM glutamátu a $10 \mu\text{M}$ glycinu byla přerušena aplikací ECS zředěného na 50 %. Časová konstanta nástupu redukovaného ECS byla $\tau = 4.5$ ms (výřez).

Pro eliminaci sorbce neurosteroidních látek na komponenty aplikačního systému (hadičky, ventily...) byl před měřením aplikační systém vysycen čerstvě připraveným roztokem steroidu o stejné koncentraci, jako byla koncentrace steroidu v roztoku při snímání z buněk.

3.4.1 Kapacitní měření

Pro určení rychlostních konstant vazby a odvazování steroidních látek do a z cytoplasmatické membrány buněk bylo využito metody terčíkového zámku v režimu napěťového zámku v konfiguraci kapacitního měření. Tato metoda spočívá v tom, že u netransfekovaných HEK293T buněk docházelo v pravidelných intervalech k napěťovým skokům v membránovém potenciálu a následnému návratu na původní hodnotu. Jednalo se o sekvenci skokových změn z -60 mV na +30 mV po dobu 30 ms a zpět na -60 mV, která se opakovala každých 50 ms. Vlivem vazby nabitých steroidních látek do cytoplasmatické membrány dochází ke změně jejích kapacitních vlastností, což následně vede ke změnám v nabíjecích a vybíjecích proudech vzniklých v důsledku skokové změny membránového potenciálu. Vynesením integrálu těchto kapacitních proudů v čase lze určit časové konstanty interakce hydrofobních látek s membránou buněk (Mennerick *et al.*, 2008).

Cytoplasmatická membrána buněk představuje kulový kondenzátor. Protože rozdíl vnitřního a vnějšího poloměru buňky je velmi malý, kapacita cytoplasmatické membrány buňky se limitně blíží kapacitě deskového kondenzátoru o ploše rovné buňky. Její kapacitu lze tedy vypočítat dle vzorce

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{S}{d}, \quad (1)$$

kde ε_0 představuje permitivitu vakua, ε_r relativní permitivitu membrány, S povrch buňky a d tloušťku hydrofobní části membrány.

Z důvodu obtížného uplatnění Rovnice 1 v praxi jsme kapacitní změny vypočetli na základě měřených proudů ze vztahu

$$C = \frac{Q}{U}, \quad (2)$$

V tomto vztahu je C kapacita, U napětí a Q je přenesený náboj definovaný jako integrál kapacitních proudů (I):

$$Q = \int_0^{+\infty} I(t) dt. \quad (3)$$

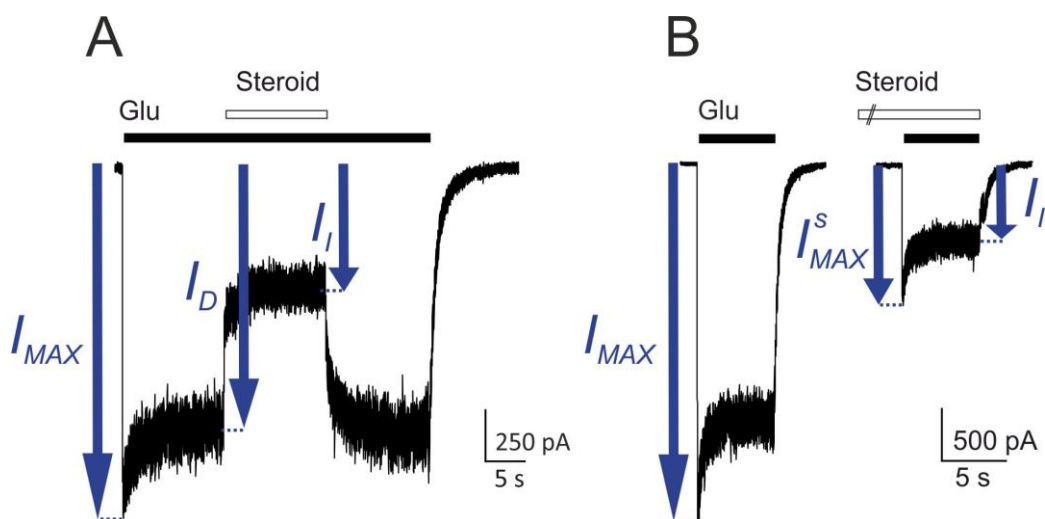
3.4.2 Vyhodnocení a statistické zpracování dat

Pro popis nástupu inhibičního účinku a jeho odmyvání bylo použito časových konstant τ_{on} a τ_{off} a příslušných konstant k_{on} a k_{off} . Pro odlišení časových konstant v kapacitním nahrávání bylo využito indexu c , příslušné časové konstanty jsou tedy značeny τ^c . Nelineární regrese, použitá k vyhodnocování časových konstant, byla prováděna v programu Clampfit 10.2 využitím Levenberg-Marquardtova algoritmu.

Relativní účinná inhibiční koncentrace IC_{50} je definována jako

$$IC_{50} = [steroid] \times \sqrt{\frac{1 - \frac{I_I}{I_D}}{\frac{I_I}{I_D}}}, \quad (4)$$

kde $[steroid]$ značí koncentraci steroidu použitou v experimentu, I_I vyjadřuje ustálený stav proudové odpovědi po nástupu inhibice vyvolané koaplikací agonisty a inhibičního neurosteroidu (Obrázek 3-2). Hillův koeficient h byl pro určení hodnot IC_{50} fixován na 1,2 (Petrovic *et al.*, 2005).



Obrázek 3-2. Vyhodnocení inhibičního účinku neurosteroidů na NMDA receptorech.

A. Koaplikační experiment. Steroid byl aplikován v přítomnosti obou agonistů a vyvolal inhibici, charakterizovanou hodnotou I_I vyjadřující ustálený stav proudové odpovědi po nástupu inhibice. I_{MAX} vyjadřuje maximální proudovou odpověď na začátku aplikace saturujících koncentrací agonistů a I_D značí ustálený stav proudové odpovědi po nástupu desenzitizace. Ustálené stavy I_D a I_I byly použity pro výpočet hodnoty IC_{50} . **B.** V tomto experimentálním protokolu záznam začíná kontrolní aplikací agonistů v saturující koncentraci vyjádřený I_{MAX} (maximální proudovou odpovědí). Po ukončení kontrolní odpovědi byl aplikován steroid v nepřítomnosti glutamátu a poté steroid v přítomnosti glutamátu. Maximální proudová odpověď, vyvolaná aktivací receptoru agonisty v kontinuální přítomnosti steroidu, je označena jako I_{MAX}^S a je charakterizována příslušnou hodnotou IC_{50}^S (kde kontrolou je I_{MAX}).

Pro charakterizaci působení neurosteroidů na NMDA receptory byla použita následující označení proudových odpovědí na aktivaci agonisty. Koaplikační experiment spočívá v simultánní aplikaci steroidu se saturující koncentrací obou agonistů, což vede k inhibici odpovědi NMDA receptorů na proudovou hodnotu I_I . Kontrolní proudy jsou popisovány maximální proudovou odpovědí I_{MAX} a proudem I_D po nástupu desenzitizovaného stavu (ustálený stav). V případě, že je steroid na NMDA receptory aplikován bez přítomnosti glutamátu a následně dojde k aktivaci receptoru v přetrvávající přítomnosti steroidu, je tato maximální proudová odpověď označena jako I_{MAX}^S a ustálený stav inhibice po nástupu desenzitizace je označen jako I_I . Vyhodnocována je maximální kontrolní odpověď I_{MAX} proti maximální proudové odpovědi v přítomnosti steroidu I_{MAX}^S (vyjádřená hodnotou IC_{50}^S) a ustálený stav kontrolní odpovědi I_D proti ustálenému stavu inhibovaných proudů I_I (vyjádřený hodnotou IC_{50}).

Pro výpočet křivky závislosti odpovědi na dávce byl použit vztah

$$f(x) = \frac{Inhibice_{max}}{\left(1 + \frac{x}{IC_{50}}\right)^h}, \quad (5)$$

kde $Inhibice_{max}$ představuje maximální možnou inhibici vyvolanou inhibitorem v procentech, IC_{50} je poloviční účinná koncentrace inhibitoru (Rovnice 4) a h vyjadřuje Hillův koeficient.

Rychlostní konstanty navazování neurosteroidu na receptor (k_{on}) a odvazování z receptoru (k_{off}) ve vodných roztocích byly vypočteny z experimentálně získaných časových konstant τ_{on} a τ_{off} využitím vztahů

$$\tau_{on} = \frac{1}{k_{on}[c] + k_{off}}, \quad (6)$$

$$\tau_{off} = \frac{1}{k_{off}}, \quad (7)$$

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{1}{A_{finita}}. \quad (8)$$

V těchto rovnicích je $[c]$ koncentrace použité látky a K_D je disociační konstanta, charakterizovaná převrácenou hodnotou afinity.

Odrzem rychlosti, se kterou se inhibitor váže na receptor, je veličina r vyjádřená vztahem

$$r = \frac{IC_{50}^s}{IC_{50}}, \quad (9)$$

který je poměrem hodnot IC_{50} pro I_{MAX}^s (IC_{50}^s) a I_l (IC_{50}) definovaných Obrázek 3-2B.

Pro jednodušší porovnání časových konstant u průběhů popisovaných dvouexponenciální funkcí bylo použito vážené časové konstanty τ_w definované vztahem

$$\tau_w = \tau_1 \frac{A_1}{A_1 + A_2} + \tau_2 \frac{A_2}{A_2 + A_1}, \quad (10)$$

kde τ_1 a τ_2 jsou časové konstanty jednotlivých exponenciál a A_1 , A_2 jsou jejich amplitudy.

Prezentované výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (σ) z počtu n buněk. K porovnání dvou skupin hodnot byl použit Studentův t-test a k porovnání více skupin hodnot metoda ANOVA. Hvězdičkou jsou označeny rozdíly s uvedenou hladinou významnosti.

4 CÍLE STUDIE

4.1 Popsat vztah mezi strukturou a funkcí D-derivátů pregnanolon sulfátu na NMDA receptorech.

Hypotéza: Mezi inhibičním účinkem D-derivátů pregnanolon sulfátu a jejich strukturou existuje funkční vztah.

Cíl: Pomocí techniky terčíkového zámku na kultivovaných HEK293T buňkách exprimujících rekombinantní NMDA receptory určit hodnoty IC_{50} charakterizující inhibiční působení D-derivátů a porovnat je se strukturami těchto látek.

4.2 Identifikovat molekulární mechanismus působení D-derivátů pregnanolon sulfátu na NMDA receptorech.

Hypotéza: Skupina neuroaktivních steroidů modifikovaných na D kruhu molekuly pregnanolon sulfátu na NMDA receptorech působí jiným mechanismem účinku než mechanismem doposud navrženým pro přirozeně se vyskytující pregnanolon sulfát.

Cíl: Pomocí techniky terčíkového zámku na kultivovaných HEK293T buňkách exprimujících rekombinantní NMDA receptory charakterizovat vlastnosti modifikovaných steroidních látek. Jedná se o časové konstanty navazování a odvazování inhibitoru na/z NMDA receptor, stav receptoru preferovaný pro vazbu neurosteroidu a napěťová závislost inhibice. Cílem bylo odpovědět na otázku, zda D-deriváty působí na NMDA receptory na vazebném místě odlišném od vazebného místa pro pregnanolon sulfát.

4.3 Charakterizovat úlohu cytoplazmatické membrány v inhibičním působení neurosteroidů na NMDA receptorech.

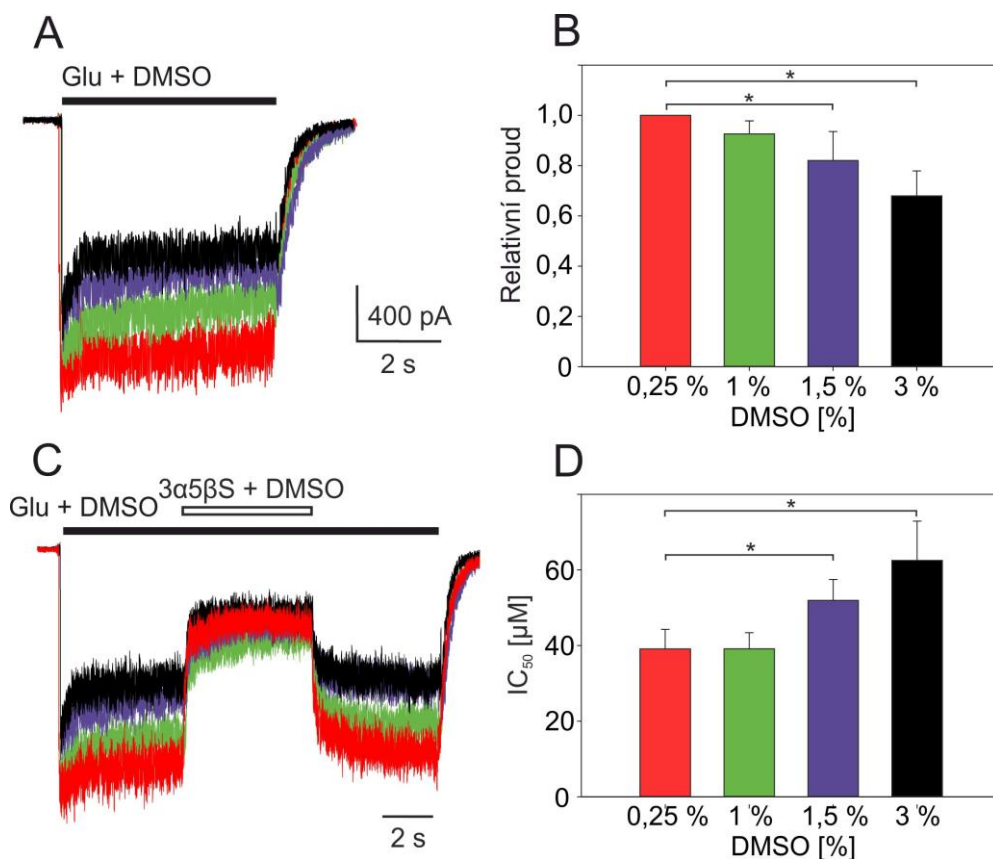
Hypotéza: D-deriváty vzniklé substitucí hydrofobních reziduí na uhlíku číslo 17 v molekule pregnanolon sulfátu zvyšují rozpustnost těchto látek v cytoplazmatické membráně buněk, což má vliv na kinetiku jejich inhibičního působení.

Cíl: Technikou terčíkového zámku v konfiguraci kapacitního nahrávání na netransfekovaných HEK293T buňkách charakterizovat vazbu steroidu do cytoplazmatické membrány na úrovni kapacitních změn. Použitím cyklodextrinu manipulovat s rychlostí odvazování steroidu z membrány. Porovnáním s daty získanými měření proudových odpovědí určit příspěvek membránové akumulace steroidu k jeho inhibičnímu účinku.

5 VÝSLEDKY

5.1 Vliv DMSO na inhibiční působení neurosteroidů a funkci NMDA receptorů

DMSO je organosírová sloučenina využívaná jako aprotické polární rozpouštědlo. Vzhledem k tomu, že dobře rozpouští polární i nepolární sloučeniny a je mísitelný s vodou, tak je často využíván pro zlepšení rozpustnosti ve vodě málo rozpustných látek. Neurosteroidy jsou amfipatické látky s nízkou rozpustností ve vodě, která může být negativně ovlivněna jejich hydrofobními modifikacemi. Pro přípravu vodných roztoků neurosteroidů se osvědčilo tyto látky nejprve rozpouštět v DMSO a následně z tohoto koncentrovaného zásobního roztoku připravovat roztok finální. Vyšší koncentrace DMSO ve vodném roztoku zvyšuje rozpustnost studovaných látek, může však mít vedlejší vliv na samotnou inhibici NMDA receptorů neurosteroidy. DMSO může ovlivňovat vlastnosti cytoplasmatické membrány buněk i samotnou funkci NMDA receptorů. Proto jsme si položili otázku, jakou nejvyšší koncentraci DMSO lze použít, aniž by došlo k ovlivnění inhibičního účinku neurosteroidů na NMDA receptorech nebo došlo k ovlivnění samotné funkce NMDA receptorů. Abychom na tuto otázku mohli odpovědět, provedli jsme sérii experimentů, při kterých jsme sledovali vliv různé koncentrace DMSO na míru inhibice NMDA receptorů vyvolanou $3\alpha5\beta S$ a velikost samotných proudů vyvolaných aktivací NMDA receptorů saturující koncentrací agonistů (10 μM glycin a 1 mM glutamát). Výsledek těchto experimentů ukazuje Obrázek 5-1.



Obrázek 5-1. Vliv DMSO na funkci NMDA receptorů a na inhibici těchto receptorů neurosteroidy.

A. Aktivace NMDA receptoru glycinem (10 μM) a glutamátem (1 mM) za přítomnosti DMSO v koncentraci 0,25 % (červená), 1 % (zelená), 1,5 % (fialová) a 3 % (černá) v aplikačních roztocích. **B.** Proudové odpovědi NMDA receptorů v přítomnosti DMSO byly normovány na proudovou odpověď při 0,25 % DMSO a vyneseny do sloupcového grafu. Mezi koncentracemi 0,25 % a 1 % DMSO nedošlo k signifikantnímu poklesu proudových odpovědí. Naproti tomu proudové odpovědi měřené v přítomnosti 0,25 % DMSO byly signifikantně vyšší v porovnání s těmi měřeními v přítomnosti 1,5 % a 3 % DMSO. Z grafu je patrné, že sumární proudy NMDA receptorů monotónně klesají se vzrůstající koncentrací DMSO v extracelulárním roztoku. **C.** Příklad inhibičního působení 3α5βS v koncentraci 50 μM v roztoku obsahujícím výše uvedené koncentrace DMSO. **D.** Hodnoty IC_{50} inhibice 3α5βS při těchto koncentracích DMSO. Inhibice byla určena z poměru proudových odpovědí vyvolaných roztokem obsahujícím glycin a glutamát a roztokem obsahujícím navíc 3α5βS, a to v trvalé přítomnosti vzrůstajících koncentrací DMSO. Mezi koncentracemi 0,25 % a 1 % DMSO nedošlo k signifikantnímu rozdílu v IC_{50} . Naproti tomu mezi 0,25 % a 1,5 % a mezi 0,25 % a 3 % DMSO již došlo k signifikantnímu vzrůstu IC_{50} o 42 % a 60 %. Statistické porovnání jsme provedli metodou ANOVA.

Proudové odpovědi na Obrázek 5-1A vyvolané roztokem obsahujícím 10 μM glycin a 1 mM glutamát (I_D ; Kapitola 3.4.2) při různých koncentracích DMSO byly normovány na proudovou odpověď naměřenou v přítomnosti 0,25 % DMSO. Tato koncentrace sloužila jako kontrola, neboť jde o nejmenší možný objem DMSO přidaného ze zásobního roztoku steroidu. Mezi koncentracemi 0,25 % a 1 % nedošlo k signifikantnímu poklesu proudových odpovědí. Naproti tomu proudové odpovědi při 0,25 % byly signifikantně vyšší v porovnání s odpověďmi při 1,5 % a 3 % DMSO. Ze sloupcového grafu na Obrázek 5-1B je patrné, že se vzrůstající koncentrací DMSO proudy NMDA receptorů monotónně klesají ($p \leq 0,05$).

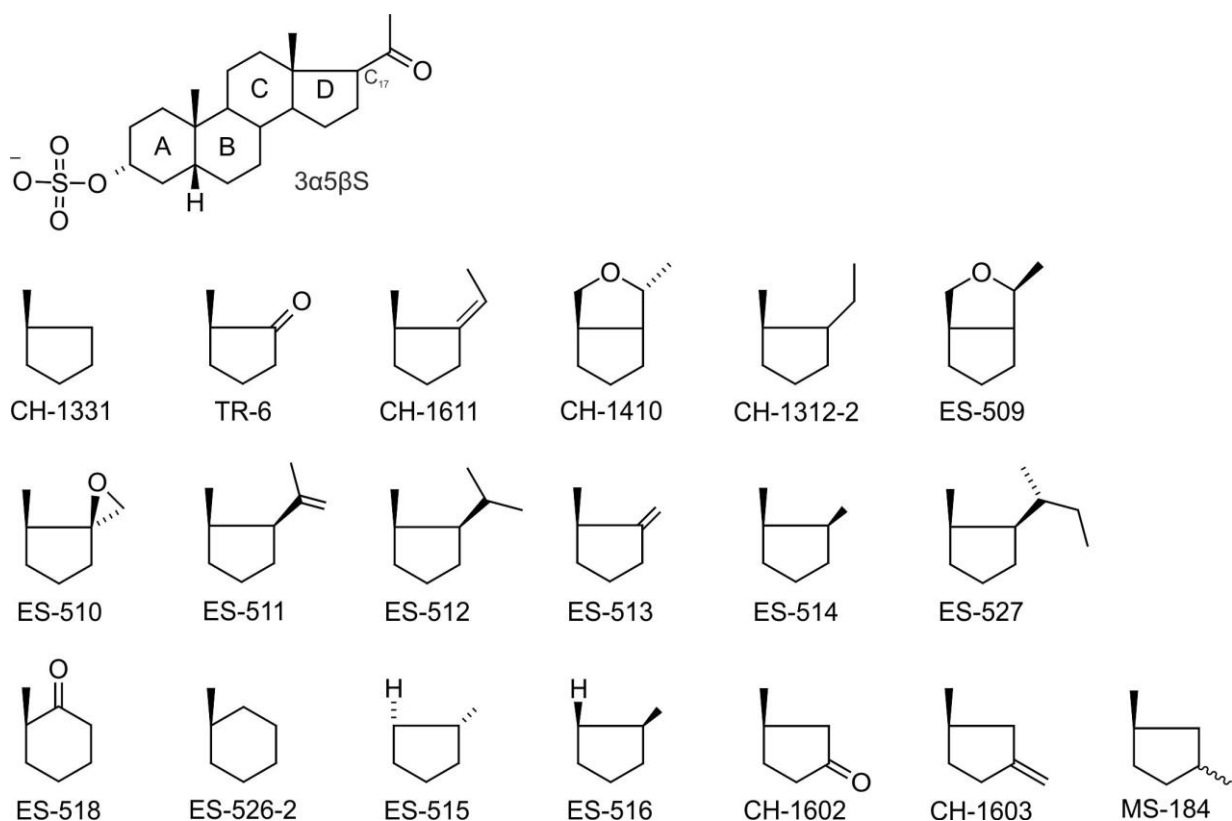
Z naměřených proudových odpovědí NMDA receptorů jsme stanovili míru inhibice vyvolanou 50 μM 3 α 5 β S v trvalé přítomnosti různých koncentrací DMSO (0,25 %, 1 %, 1,5 % a 3 %), jak ukazuje Obrázek 5-1C. Míra inhibice byla stanovena jako poměr v prouděch I_D vyvolaných glycinem a glutamátem a roztokem obsahujícím navíc 3 α 5 β S (I_I). Oba roztoky obsahovaly stejnou koncentraci DMSO. Mezi koncentracemi 0,25 % a 1 % nedošlo k signifikantnímu rozdílu v IC_{50} , zatímco mezi 0,25 % a 1,5 % DMSO došlo k signifikantnímu vzrůstu IC_{50} o 42 % a mezi 0,25 % a 3 % DMSO IC_{50} vzrostlo o 60 % (Obrázek 5-1D). Statistické porovnání dat jsme provedli metodou ANOVA.

Ze získaných dat jsme dospěli k závěru, že DMSO signifikantně ovlivňuje funkci NMDA receptoru i míru inhibice vyvolané neurosteroidy v koncentracích přesahujících 1 % DMSO. Všechna elektrofyziologická měření v této práci byla proto provedena při 1% koncentraci DMSO, která byla přítomna ve všech roztocích.

5.2 Vztah mezi strukturou D-derivátů 3 α 5 β S a jejich inhibičním účinkem na NMDA receptorech

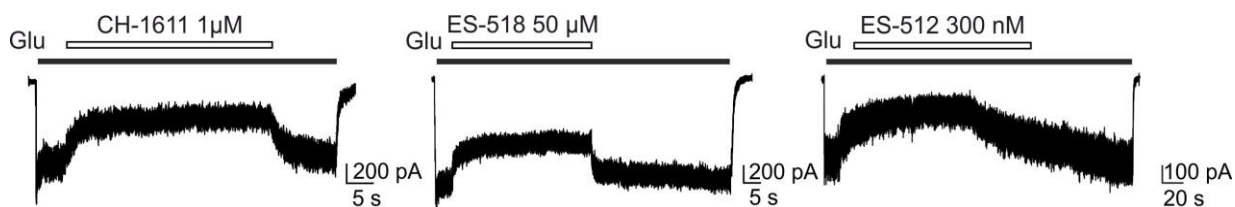
Výsledky uvedené v této kapitole jsou součástí publikace (Kudova *et al.*, 2015), která je v současné době v recenzním řízení v časopise *Journal of Medicinal Chemistry*.

Navrhli jsme a testovali 19 derivátů pregnanolon sulfátu s modifikacemi na D kruhu s cílem najít nové potentnější inhibitory steroidní povahy a popsat vztah mezi strukturou steroidu a účinností, s jakou inhibuje NMDA receptory. Rozhodli jsme se modifikovat molekulu 3 α 5 β S na uhlíku číslo 16 (C16) a 17 (C17) D-kruhu steroidního jádra. Struktury D-derivovaných steroidů ukazuje Obrázek 5-2. Jejich inhibiční účinek na NMDA receptory vyjádřený hodnotami IC_{50} ukazuje Tabulka 1 a ukázky inhibičního působení vybraných D-derivátů jsou znázorněny na Obrázek 5-3.



Obrázek 5-2. Struktura 3 α 5 β S a jeho derivátů modifikovaných na D kruhu steroidního jádra.

Struktura 3 α 5 β S je znázorněna v levém horním rohu. Struktury D-derivátů jsou znázorněny jako struktura D kruhu steroidního jádra s příslušnými substituenty; zbytek molekuly je nezměněn.



Obrázek 5-3. Příklady inhibičního působení D-derivátů 3 α 5 β S na GluN1/GluN2B receptorech.

Plné úsečky znázorňují aplikaci 1 mM glutamátu a 10 μ M glycinu a prázdné úsečky aplikaci příslušného steroidu.

Tabulka 1. Hodnoty IC_{50} pro působení D-derivátů na GluN1/GluN2B receptory.

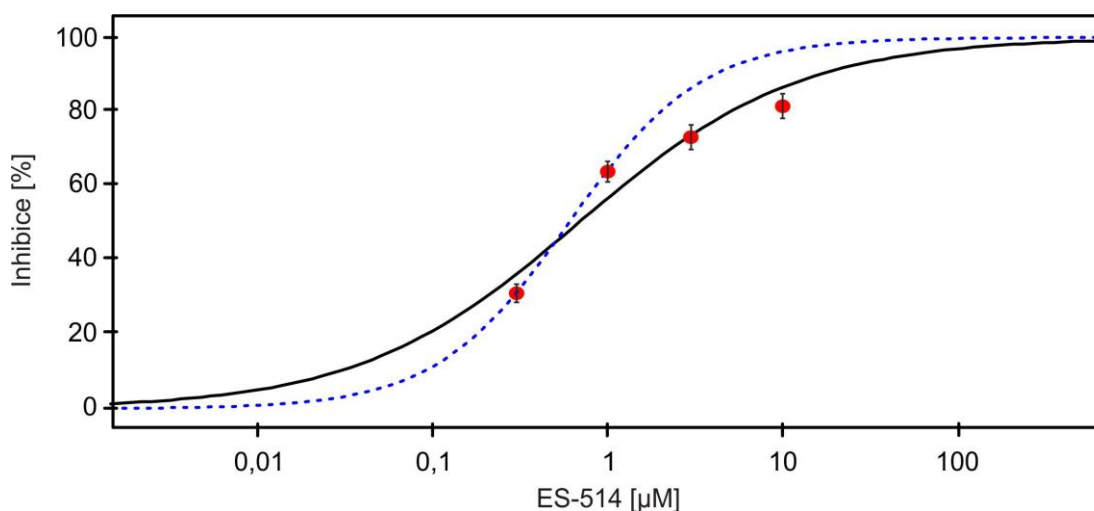
Inhibiční působení (vyjádřeno hodnotou IC_{50}) $3\alpha5\beta S$ a struktur uvedených v Obrázek 5-2. σ značí směrodatnou odchylku a n počet buněk použitých pro vyhodnocení inhibičního účinku.

	3α5βS	CH-1331	TR-6	CH-1611	CH-1410	CH-1312-2	ES-509
Systematický název	5 β -pregnan-20-on 3 α -yl-sulfát	5 β -androstan 3 α -yl-sulfát	5 β -androstan-17-on 3 α -yl-sulfát	17-ethylidene-5 β -androstan-3 α -yl 3-sulfát	5 β -pregnan-18,20(S)-epoxy 3 α -yl sulfát	5 β -pregnan-20-deoxo 3 α -yl-sulfát	5 β -pregnan-18,20(R)-epoxy 3 α -yl-sulfát
IC₅₀ [μM]	39,13	1,24	51,41	0,82	20,9	0,43	40,42
σ	4,77	0,21	13,8	0,08	3,71	0,12	1,85
n	5	11	4	4	6	4	3

	ES-510	ES-511	ES-512	ES-513	ES-514	ES-518	ES-526-2
Systematický název	5 β -androstan-3 α -yl sulfát 17 β ,20-oxiran	5 β -androstan 3 α -yl-sulfát 17 β -isopropenyl	5 β -androstan 3 α -yl-sulfát 17 β -isopropyl	5 β -androstan 3 α -yl-sulfát 17-methylen	5 β -androstan 3 α -yl-sulfát 17 β -methyl	5 β ,17 α -homo-androstan 3 α -yl-sulfát 17 α -oxo	17 α -homo-5 β -androstan 3 α -yl-sulfát
IC₅₀ [μM]	5,06	0,47	0,16	1,59	0,63	74,28	1,13
σ	0,49	0,14	0,02	0,26	0,14	9,79	0,27
n	3	5	2	6	5	9	4

	ES-527	ES-515	ES-516	CH-1602	CH-1603	MS-184
Systematický název	5 β -androstan-17 β -(2'-butyl) 3 α -yl-sulfát	5 β ,13 α ,18-nor-androstan 3 α -yl-sulfát 17 α -methyl	5 β ,13 β ,18-nor-androstan 3 α -yl-sulfát 17 α -methyl	5 α -androstan 16-on 3 α -yl-sulfát	5 α -androstan-3 α -yl-sulfát 16-methylen	5 α -androstan 3 α -yl-sulfát 16-methyl
IC₅₀ [μM]	0,084	0,89	0,75	163,81	2,1	1,33
σ	0,001	0,1	0,13	30,62	0,16	0,2
n	2	6	4	5	4	3

Stanovení hodnot IC_{50} z křivek závislosti odpovědi na dávce pro všechny látky by bylo časově velice náročné a navíc zkresleno jejich omezenou rozpustností, neboť většina analyzovaných látek není rozpustná do koncentrací vyvolávajících inhibici blízkou 100 %. Proto jsme přistoupili k alternativnímu stanovení hodnot IC_{50} , jejichž výpočet probíhal dle Rovnice 4. Abychom vyloučili zkreslení výsledků nedokonalým rozpuštěním analyzovaných látek, každá látka byla měřena při minimálně dvou koncentracích poskytujících shodné IC_{50} . Pokud experimenty s různou koncentrací látky nepřinesly totožné výsledky, koncentraci měřené látky jsme dále snižovali, dokud nedošlo ke shodě IC_{50} . Příklad určení hodnoty IC_{50} z inhibičního působení neurosteroidu měřeného při několika koncentracích ukazuje Obrázek 5-4 (pro diskuzi Kapitola 6.2).



Obrázek 5-4. Závislost odpovědi na dávce pro inhibiční neurosteroid ES-514.

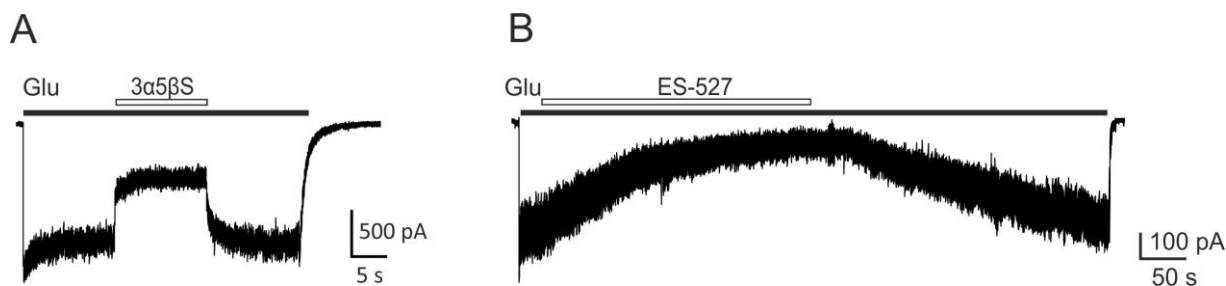
Pro stanovení IC_{50} látky ES-514 jsme charakterizovali míru inhibice při koncentracích 10 μM , 3 μM , 1 μM a 300 nM. Křivka definovaná Rovnicí 5 proložená všemi naměřenými body odpovídající míře inhibice při čtyřech různých koncentracích (černá čára) má zkrslý průběh zapříčiněný zhoršenou rozpustností steroidu při vyšších koncentracích. Vykreslením křivky pouze z bodů při nižších koncentracích 1 μM a 300 nM (modrá přerušovaná čára) jsme dostali křivku lépe odpovídající skutečné závislosti odpovědi na dávce.

IC_{50} modelové látky ES-514 jsme charakterizovali jako funkci míry inhibice při koncentracích 10 μM , 3 μM , 1 μM a 300 nM. Křivka reprezentující závislost odpovědi na dávce ze všech čtyř bodů má zkrslý průběh vlivem zhoršené rozpustnosti steroidu při vyšších koncentracích. Použitím pouze dvou nejnižších koncentrací jsme získali závislost odpovědi na dávce s pravděpodobně správnějším průběhem. Abychom však mohli určit křivku dávka-odpověď pouze ze dvou bodů jejich proložením závislostí se třemi parametry (Rovnice 5), zavedli jsme následující zjednodušující předpoklady: v případě, že křivka dávka-odpověď ES-514 je stejná jako $3\alpha5\beta\text{S}$ jsme přepokládali maximální míru inhibice 100 % a Hillův koeficient 1,2. Třetím parametrem z rovnice je tedy IC_{50} , který jsme určili proložením funkce dvěma body.

5.3 Mechanismus působení D derivátů na NMDA receptor

Položili jsme si otázku, zda nové potentnější deriváty sdílejí stejný mechanismus účinku na NMDA receptorech jako $3\alpha5\beta\text{S}$.

Standardní postup testování modulačního účinku neurosteroidů na NMDA receptorech je jeho koaplikace s oběma agonisty a vyhodnocení jeho inhibičního (popřípadě potenciačního) působení při dané koncentraci (Obrázek 3-2), které je charakterizováno hodnotou IC_{50} (Obrázek 5-5).

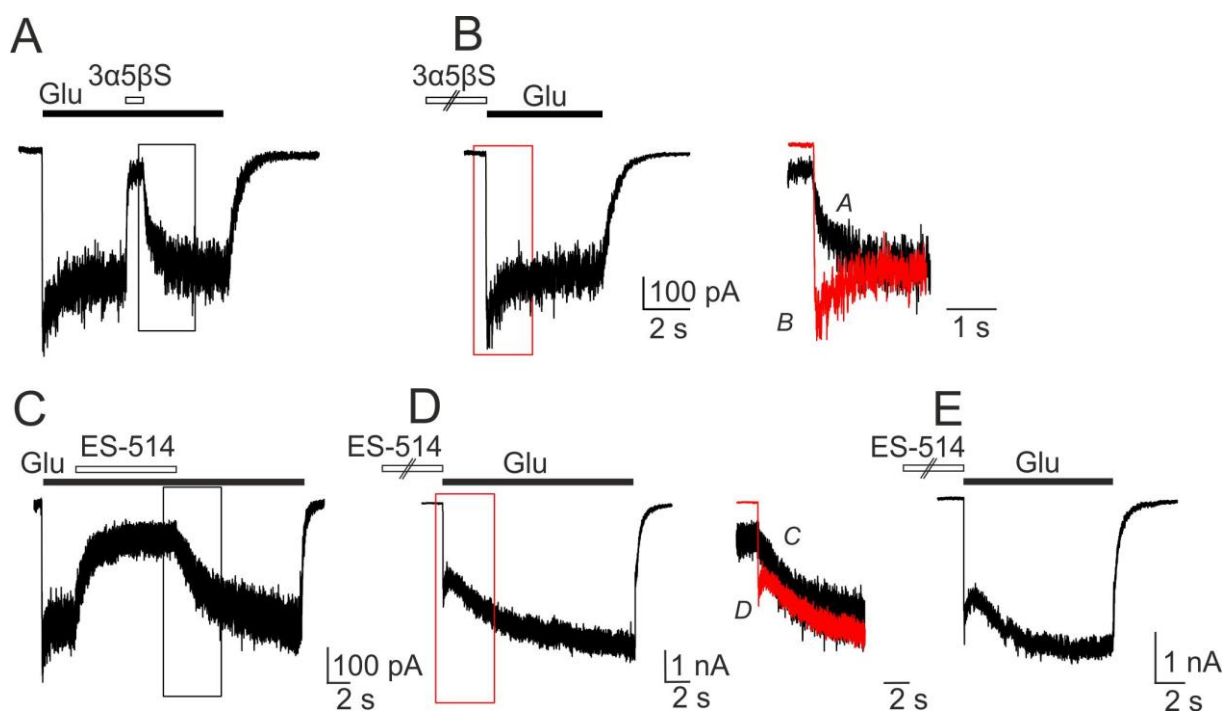


Obrázek 5-5. Porovnání inhibičního působení pregnanolon sulfátu a jeho derivátu ES-527 vzniklého substitucí acetylové skupiny na C17 2-butylovou skupinou.

A. Pregnanolon sulfát v koncentraci 50 μM byl koaplikován s glycinem a glutamátem po dobu 5 s a vyvolal $57 \pm 3\%$ inhibici ($n = 5$). Vážená časová konstanta nástupu inhibice $\tau(w)_{on}$ byla 218 ± 70 ms a vážená časová konstanta odmývání inhibice $\tau(w)_{off}$ byla 197 ± 46 ms. **B.** ES-527 v koncentraci 300 nM po 260s aplikaci inhiboval proudovou odpověď ze $76 \pm 11\%$ ($n = 2$), přičemž τ_{on} záznamu na obrázku B bylo 81 s a τ_{off} bylo 135 s.

V experimentu s $3\alpha5\beta\text{S}$ o koncentraci 50 μM došlo k $57 \pm 3\%$ inhibici s váženou časovou konstantou nástupu inhibice $\tau(w)_{on} = 218 \pm 70$ ms a váženou časovou konstantou odmývání inhibice $\tau(w)_{off} = 197 \pm 46$ ms ($n = 5$). Naproti tomu, derivát ES-527 vzniklý substitucí acetylové skupiny na C17 za 2-butylovou skupinu v koncentraci 300 nM inhiboval receptor z $76 \pm 11\%$ s časovou konstantou nástupu inhibice $\tau_{on} = 81$ s. IC_{50} pro $3\alpha5\beta\text{S}$ jsme vypočetli na 39 ± 5 μM ($n = 5$) a pro ES-527 84 ± 1 nM ($n = 2$). Nejenže došlo k výraznému snížení IC_{50} ES-527 oproti $3\alpha5\beta\text{S}$ (325 krát), ale časová konstanta nástupu inhibice se zvýšila téměř 290 krát. Obdobným způsobem došlo i ke změně časové konstanty odmývání inhibičního účinku τ_{off} , a to více než 600 krát. Stejně jako u $3\alpha5\beta\text{S}$, míra inhibice steroidem ES-527 se signifikantně nelišila při membránových potenciálech -60 mV a +40 mV. To ukazuje, že inhibiční působení obou látek je napěťově nezávislé.

Jelikož pomalé časové konstanty τ_{on} a τ_{off} látky ES-527 kladou velké nároky na měření, jako modelovou látku reprezentující vlastnosti D-derivátů jsme zvolili ES-514 s hodnotou IC_{50} $0,6 \pm 0,1$ μM a časovou konstantou $\tau_{on} = 2137 \pm 480$ ms a $\tau_{off} = 4254 \pm 1677$ ms ($n = 7$). Jednou z typických vlastností $3\alpha5\beta\text{S}$ při působení na NMDA receptory je akompetitivní působení. To znamená, že jeho vazba na receptor je možná až po jeho plné aktivaci agonisty. Abychom určili, zda i ES-514 inhibuje NMDA receptory akompetitivním mechanismem, provedli jsme experiment, který spočívá v preaplikaci steroidu na neaktivovaný receptor a následné aktivaci receptoru bez přítomnosti steroidu (Obrázek 5-6).



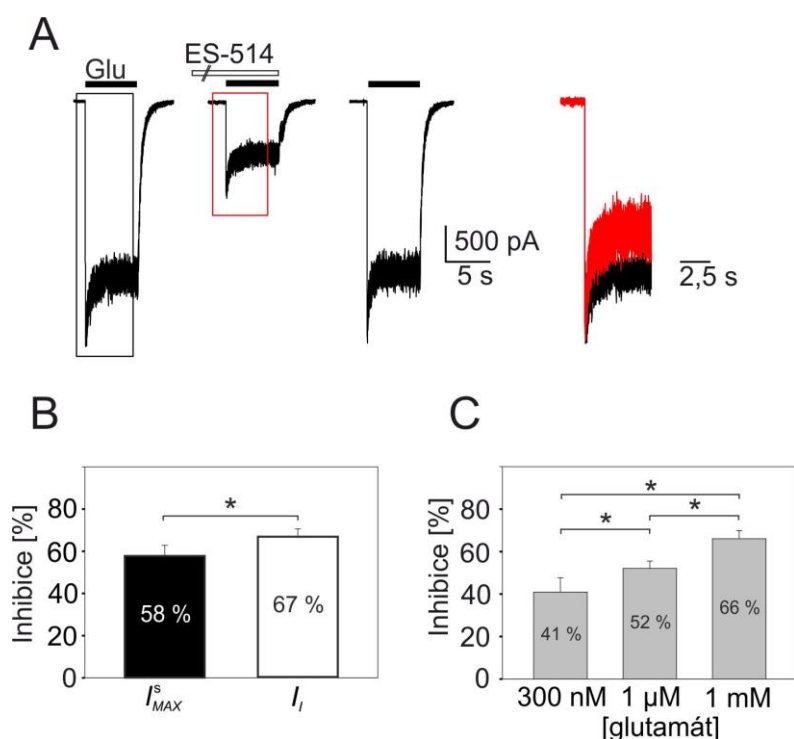
Obrázek 5-6. Působení 3 α 5 β S a ES-514 na NMDA receptory v aktivovaném a neaktivovaném stavu.

Pro inhibici 3 α 5 β S je charakteristické jeho akompetitivní působení. **A.** Aktivované NMDA receptory byly inhibovány přítomností 3 α 5 β S, po ukončení jeho aplikace se proudy vrací na původní hodnotu. **B.** Preaplikace 3 α 5 β S ve stejné koncentraci nemá na následnou odpověď vyvolanou glutamátem vliv. **C.** Záznam inhibičního působení ES-514 v kontinuální přítomnosti glutamátu. **D, E.** Aplikace ES-514 na receptor v neaktivovaném stavu a následná aktivace receptoru glutamátem vyvolala odpověď již z větší části inhibovanou. Záznam na obrázku D byl pořízen z buňky přisedlé a záznam na obrázku E z buňky nadzvednuté z podložky. Jelikož tyto dva záznamy poskytují kvalitativně shodné výsledky, není tento jev primárně způsoben artefaktem hromadění steroidu pod buňkou. Tento experiment ukazuje spíše na nekompetitivní inhibici ES-514.

V preaplikačních experimentech s ES-514 se tento steroid částečně jevil jako inhibitor nekompetitivní, jelikož se vázal na receptory i bez přítomnosti agonisty, čili na neaktivované receptory. Naproti tomu, 3 α 5 β S vykazuje inhibici akompetitivní (Obrázek 5-6A a B). Tento rozdíl v působení 3 α 5 β S a D-derivátů naznačuje rozdíl v mechanismu inhibice NMDA receptorů. Nicméně z Obrázek 5-6D je vidět, že proudová odpověď vyvolaná aplikací glutamátu po předchozí preaplikaci steroidu klesá a poté až narůstá, což pro nekompetitivní inhibitory není typické. U těch dochází zpravidla po aktivaci glutamátem pouze k pozvolnému návratu ke kontrolní proudové odpovědi. Tento jev by bylo možné vysvětlit buď nástupem desenzitizace neinhibované populace receptorů nebo hromaděním steroidu v úzkém prostoru mezi buňkou a podložkou, který se ve vodných roztocích vyskytuje ve formě micel a může tak zpomalovat odmyváání steroidu, jak bylo ukázáno (Vyklícky *et al.*, 2015). Je tedy možné, že při preaplikaci ES-514 došlo k akumulaci steroidu pod buňkou a při následné aplikaci glutamátu toto množství steroidu inhibovalo právě aktivované receptory. Abychom eliminovali tento

případný artefakt, měřené buňky jsme mikropipetou nadzvedli ze dna místičky a snímání probíhalo na buňce umístěné volně v roztoku. V případě preaplikace ES-514 provedené tímto způsobem jsme dostali kvalitativně shodný výsledek jako při preaplikaci na buňce přisedlé (Obrázek 5-6D a E), nicméně nadzvednutím buňky došlo k snížení tohoto efektu. Hromadění steroidu pod buňkou tak samostatně není zodpovědné za pozorované inhibiční vlastnosti ES-514.

Odlíšné inhibiční působení neurosteroidů nesoucích modifikace na D kruhu uhlíkového skeletu nás vedlo k vytvoření hypotézy, že tato skupina látek má jiný mechanismus působení než $3\alpha5\beta$ S. Abychom mohli charakterizovat preferenční stav NMDA receptoru pro vazbu ES-514, rozhodli jsme se provést experiment zobrazený na Obrázek 5-7.



Obrázek 5-7. Analýza IC_{50} I_{MAX}^S a I_I inhibice látky ES-514 a jejího inhibičního působení na NMDA receptorech aktivovaných různými koncentracemi glutamátu.

A. Po kontrolní aplikaci glutamátu a jeho odmytí byl aplikován steroid po dobu 15 s nejprve bez přítomnosti glutamátu a následně steroid v přítomnosti glutamátu po dobu 5 s. Druhá kontrolní aplikace glutamátu proběhla 20 s po konci aplikace steroidu. Kontrolní proudová odpověď (černý rámeček) a proudová odpověď v přítomnosti steroidu (červený rámeček) byly normovány na stejnou amplitudu proudu a přeloženy přes sebe. **B.** Porovnáním kontrolních proudů s proudy v přítomnosti steroidu jsme vypočetli míru inhibice pro maximální amplitudu proudu (I_{MAX}^S , 58 ± 5 %) a pro ustálený stav (I_I , 67 ± 4 %). Obě hodnoty se signifikantně liší s hladinou významnosti $p \leq 0,005$ (t-test). **C.** Experiment, ve kterém byla měřena míra inhibice NMDA receptorů vyvolaná 1 μ M ES-514 pro aktivaci různou koncentrací glutamátu. Hvězdička značí signifikantní rozdíl mezi dvěma skupinami s hladinou pravděpodobnosti $p \leq 0,001$ (ANOVA).

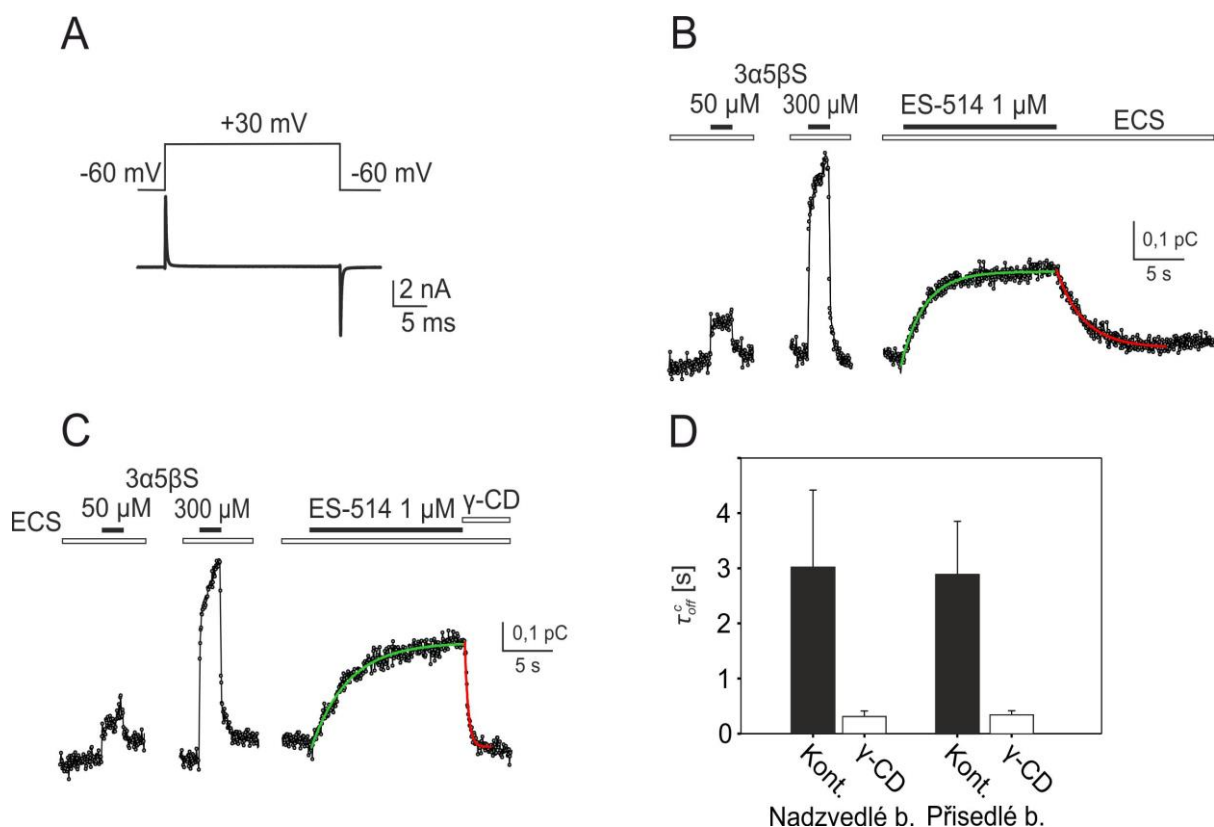
Tento experiment je zaměřený na zodpovězení otázky, zda daný neurosteroid účinkuje nekompetitivním či akompetitivním mechanismem. Po kontrolní aplikaci glutamátu a jeho odmytí byl aplikován steroid po dobu 15 s nejprve bez přítomnosti glutamátu a následně steroid v přítomnosti glutamátu po dobu 5 s. 20 s po ukončení aplikace steroidu následovala druhá kontrolní aplikace samotného glutamátu (Obrázek 5-7A). Vyhodnocovali jsme maximální proudovou odpověď I_{MAX}^S a proudovou odpověď po dosažení ustáleného stavu I_I , a to v přítomnosti steroidu a bez něj (Obrázek 3-2). Při porovnání s kontrolními odpověďmi byla maximální proudová odpověď vlivem 1 μ M ES-514 inhibována z $58 \pm 5\%$ a ustálený stav z $67 \pm 4\%$ (Obrázek 5-7B). Tomu odpovídající hodnoty IC_{50}^S pro inhibici I_{MAX}^S jsou $0,78 \pm 0,14 \mu$ M a IC_{50} pro inhibici I_I $0,57 \pm 0,09 \mu$ M ($n = 6$). Výsledkem tohoto experimentu je, že maximální proudová odpověď je inhibována signifikantně méně než ustálený stav ($p \leq 0,005$; t-test), což je znakem akompetitivních inhibitorů. Vysvětlení tohoto jevu je takové, že akompetitivní inhibitor se může vázat na receptor až po jeho aktivaci, a tudíž pokud je rychlostní konstanta navazování inhibitoru pomalejší než aktivace receptoru, inhibitor nestačí okamžitě zablockovat rychle aktivovaný receptor (I_{MAX}^S) do míry odpovídající míře inhibice v ustáleném stavu.

Vzhledem k relativně malému, nicméně signifikantnímu rozdílu v předchozím experimentu a možnosti, že tento rozdíl je způsoben tím, že steroid je schopen se v menší míře vázat i do neaktivovaného receptoru, jsme se rozhodli pro alternativní ověření. Následující experiment je založen na vlastnosti akompetitivních inhibitorů s nekompetitivním odvázáváním, u kterých hodnota IC_{50} roste s klesající koncentrací agonistů použitých pro aktivaci studovaných receptorů (Vyklícky *et al.*, 2014). Mezi takové inhibitory patří blokátory iontového kanálu s mechanismem částečného zachycení, ale patří mezi ně i $3\alpha5\beta$ S (Sobolevskii *et al.*, 2002; Petrovic *et al.*, 2005). Tato vlastnost je pro tuto skupinu látek jedinečná, proto na základě tohoto experimentu lze usuzovat na mechanismus účinku studované látky.

Míra inhibice vyvolaná 1 μ M ES-514 NMDA receptorů aktivovaných 300 nM, 1 μ M a 1 mM v přetrvávající přítomnosti 10 μ M glycinu je uvedena na Obrázek 5-7C. 1 μ M ES-514 vyvolal $66 \pm 4\%$ inhibici při koncentraci glutamátu 1 mM, $52 \pm 3\%$ při koncentraci glutamátu 1 μ M a $41 \pm 7\%$ při koncentraci glutamátu 300 nM. Tyto hodnoty se navzájem liší s hladinou významnosti $p \leq 0,001$ (ANOVA). Závěrem těchto výsledků je, že D-deriváty $3\alpha5\beta$ S mají zřejmě stejný mechanismus působení jako látka, ze které byly odvozeny a na neaktivovaný receptor se neváží, a zároveň je jejich odvázávání na aktivaci nezávislé.

5.4 Úloha cytoplasmatické membrány v inhibičním působení neurosteroidů na NMDA receptorech

V předchozí kapitole jsme ukázali, že $3\alpha5\beta\text{S}$ a deriváty odvozené od této molekuly substitucí na D-kruhu mají stejný mechanismus působení. Nicméně to nevysvětluje, proč je glutamátová odpověď následující preaplikaci steroidu již částečně inhibovaná. Pregnanolon sulfát a jeho neuroaktivní deriváty jsou látky s amfipatickým charakterem a díky tomu přirozeně interagují s buněčnými membránami. Pokud tyto látky nesou trvalý náboj, přes membránu neprochází (Schreier *et al.*, 2000). Bylo ukázáno, že $3\alpha5\beta\text{S}$ se ve vodných roztocích vyskytuje převážně ve formě micel a pro jeho působení na NMDA receptorech je nutná jeho interakce s cytoplasmatickou membránou buněk, která $3\alpha5\beta\text{S}$ v micelární formě přeměňuje na formu monomerů. Tato monomerní forma je pak schopna blokovat kanál NMDA receptoru z extracelulární strany. V případě $3\alpha5\beta\text{S}$ probíhá jeho vazba do a z membrány rychleji, než je rychlost samotné výměny roztoků (Vyklícky *et al.*, 2015). Rozhodli jsme se testovat hypotézu, že v případě derivátů $3\alpha5\beta\text{S}$, které nesou hydrofobní reziduum na D-kruhu, dochází ke zpomalení vazby a odvazování těchto látek do a z membrány, což má důsledky na kinetiku měřených proudů. Abychom prověřili relevanci této hypotézy, přistoupili jsme k metodě měření kapacitních proudů, pomocí které lze určit časové konstanty vazby a odvazování steroidů z cytoplasmatické membrány buněk. Jelikož námi použité neurosteroidy jsou látky nabitě, jejich vazba do membrány mění její kapacitní vlastnosti (Mennerick *et al.*, 2008). Měřením kapacity membrány v konfiguraci napěťového zámku jsme tak nepřímě měřili vazbu steroidu do membrány (Kapitola 3.4.1). V práci Borovska *et al.* (2012) bylo ukázáno, že aplikací γ a β -CD lze urychlit kinetiku inhibičního neurosteroidu 5β -pregnan-20-oxo- 3α -argininátu, molekuly $3\alpha5\beta\text{S}$ modifikované na třetím uhlíku. Naším cílem bylo charakterizovat vliv γ -CD na odmyváání inhibičního neurosteroidu z membrány. Za účelem stanovení rychlosti odvazování z membrány jsme provedli sérii kapacitních experimentů (Obrázek 5-8).



Obrázek 5-8. Měření kapacity membrány při aplikaci 3 α 5 β S a ES-514 v konfiguraci napět'ového zámku provedená na HEK293 buňkách.

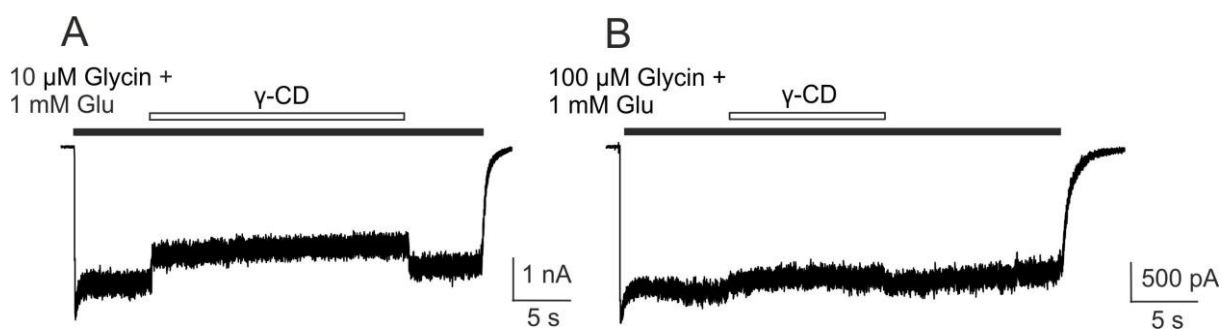
Plné úsečky znázorňují aplikaci steroidních látek o uvedené koncentraci a prázdné úsečky aplikaci ECS. Mezi aplikacemi byly buňky omývány extracelulárním promývacím roztokem. Roztoky neobsahující 10mM γ -CD obsahovaly 10mM sacharózu pro dosažení rovnocenné osmolarity všech roztoků. **A.** Protokol napět'ových skoků při kapacitním měření. Z membránového potenciálu -60 mV došlo ke změně na +30 mV po dobu 30 ms a následně k návratu na původní potenciál -60 mV. **B.** Záznam kapacitních změn vzniklých aplikací 50 μ M a 300 μ M 3 α 5 β S a 1 μ M ES-514. V tomto záznamu aplikaci ES-514 následovala aplikace kontrolního extracelulárního roztoku obsahujícího rovněž 1 % DMSO. Zelenou a červenou křivkou jsou znázorněny jednoexponenciální funkce proložené do naměřených dat s časovými konstantami τ_{on}^c a τ_{off}^c ve stejném pořadí. **C.** Experiment v totožném uspořádání jako na obrázku B, kde však odmyváni ES-514 probíhalo v přítomnosti 10mM γ -CD. K povšimnutí je vyšší rychlost odvažování steroidu z membrány (τ_{off}^c). **D.** Vynesení časových konstant τ_{off}^c látky ES-514 do grafu. Kapacitní experimenty byly provedeny na buňkách jak přisedlých tak z podložky nadzvednutých z důvodu případné eliminace artefaktu hromadění steroidu pod buňkou. Statistická analýza těchto dvou skupin neprokázala signifikantní rozdíl mezi způsoby provedení experimentu. Uvedené záznamy byly pořízeny na buňce nadzvedlé z podložky.

Principem námi provedených kapacitních měření jsou napět'ové skoky z membránového potenciálu -60 mV na +30 mV (Δ 90 mV) po dobu 30 ms a následný návrat na původní membránový potenciál (Obrázek 5-8A). V důsledku periodického nabíjení a vybíjení membrány dochází ke vznikům kapacitních proudů, jejichž integrací podle Rovnice 3 jsme získali kapacitu buňky v jednotkách pC (pikocoulomb). Vynesení těchto kapacitních změn v čase ukazuje Obrázek 5-8B a C. V experimentech jsme nejprve aplikovali 3 α 5 β S v koncentraci 50 μ M a 300 μ M a poté ES-514 v koncentraci 1 μ M, přičemž 3 α 5 β S nám sloužil jako kontrola kapacitních změn, kde rychlost navazování této látky do membrány je srovnatelná

s rychlostí aplikace (Vyklícky *et al.*, 2015). Objektem našeho zájmu byly změny časových konstant τ_{off}^c pro ES-514, které reprezentují odvažování této látky z membrány. Odmývání ES-514 z membrány probíhalo v přítomnosti 1 % DMSO v ECS (Obrázek 5-8B) a v přítomnosti ECS obsahujícího navíc 10 mM γ -CD (Obrázek 5-8C). Roztoky bez γ -CD obsahovaly 10mM sacharózu pro dosažení rovnocenné osmolarity všech roztoků. Abychom odstranili potenciální vliv artefaktu hromadění steroidu v prostoru mezi podložkou a nahrávanou buňkou, provedli jsme sérii kapacitních experimentů na buňkách přisedlých a buňkách nadzvednutých z podložky (Obrázek 5-8D).

V kapacitních experimentech jsme určili hodnotu časové konstanty vazby ES-514 do membrány $\tau_{on}^c = 2480 \pm 466$ (n = 7) pro buňky přisedlé a $\tau_{on}^c = 1750 \pm 799$ (n = 7) pro buňky nadzvednuté z podložky, přičemž mezi těmito hodnotami jsme neprokázali signifikantní rozdíl. Časová konstanta odvažování ES-514 z membrány kontrolním roztokem byla $\tau_{off}^c = 2621 \pm 1327$ ms (n = 7) a odmyváání v přítomnosti 10 mM γ -CD bylo $\tau_{off}^c = 287 \pm 97$ ms (n = 5). Z výsledků těchto experimentů vyplývá, že γ -CD výrazně urychluje odvažování ES-514 z membrány netransfekovaných HEK293 buněk. Vlivem γ -CD dochází k urychlení τ_{off}^c zhruba z 3 s na 287 ms, tedy více než desetkrát. Statistické zhodnocení experimentů na buňkách přisedlých i na buňkách nadzvednutých neukázalo signifikantní rozdíl mezi výsledky získanými oběma metodami.

Jak jsme ukázali v kapacitních experimentech, cyklodextriny lze použít pro manipulaci rychlosti odvažování steroidu z cytoplasmatické membrány buněk. Z práce Borovska *et al.* (2012) vyplývá, že zatímco α -CD kinetiku inhibičního působení neurosteroidů neovlivňuje, γ -CD pro tento účel funguje nejlépe (Kapitola 2.5). Protože experimenty v následující části této práce byly prováděny v přítomnosti γ -CD, cílem dalších pokusů bylo zjistit, zda tato látka neovlivňuje funkci samotných NMDA receptorů (Obrázek 5-9).

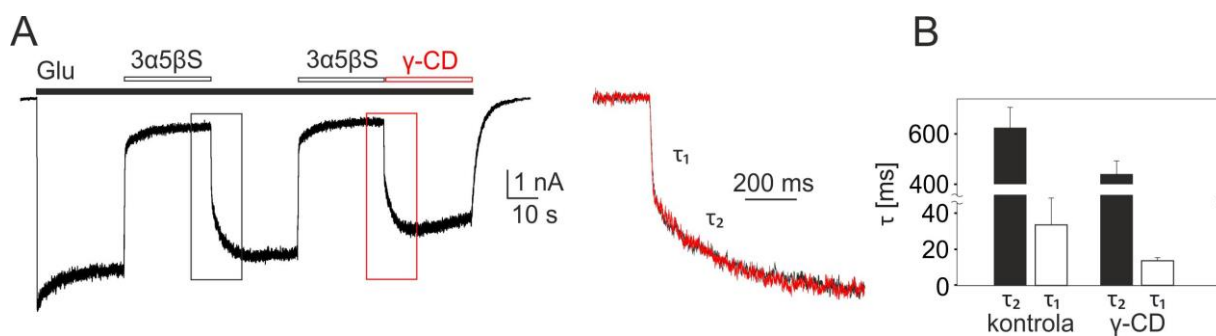


Obrázek 5-9. Vliv 10mM γ -CD na NMDA receptor aktivovaný různou koncentrací agonisty glycinu.

A. Při 1mM koncentraci glutamátu a 10 μ M koncentraci glycinu aplikace 10 mM γ -CD vyvolala 18 ± 7 % inhibici ($n = 5$). **B.** Při zvýšení koncentrace glycinu na 100 μ M byla inhibice proudů podstatně menší (jednotky procent). Závěrem těchto experimentů je, že γ -CD váže i aminokyseliny, čímž snižuje jejich volnou koncentraci dostupnou pro aktivaci receptoru.

V experimentu, kdy byl 10mM roztok γ -CD aplikován v přítomnosti 1 mM glutamátu a 10 μ M glycinu jsme pozorovali inhibici 18 ± 7 % ($n = 5$; Obrázek 5-9A). Pokud byl ale ve stejném experimentu glycin přítomen v koncentraci desetkrát vyšší, tento inhibiční efekt γ -CD se pohyboval v řádu jednotek procent (Obrázek 5-9B). Tyto experimenty nám umožnily vyvrátit možnost, že výsledky prezentované v této práci jsou významně zkresleny přítomností γ -CD v aplikačních roztocích.

Dále jsme si položili otázku, zda γ -CD nemůže kromě vyvazování steroidů z membrány vyvazovat rovněž steroid z jeho vazebného místa na NMDA receptoru, které se nachází ve vnějším vestibulu iontového kanálu (Vyklícky *et al.*, 2015). Kdyby tomu tak bylo, tento nežádoucí efekt by značně komplikoval analýzu a interpretaci dat získaných za použití γ -CD. Odmývání $3\alpha5\beta S$ z NMDA receptoru je charakterizováno dvouexponenciální funkcí s rychlostními konstantami τ_1 a τ_2 . Komponenta τ_1 je rychlá, jejíž hodnoty se pohybují v desítkách milisekund a τ_2 představuje pomalou komponentu odmývání v řádu stovek milisekund. Tato kinetika je způsobena odstavováním $3\alpha5\beta S$ z různých stavů receptorů, pravděpodobně ze stavu s oběma navázanými agonisty (RAA) a ze stavu otevřeného (O) (Petrovic *et al.*, 2005). Jak už jsme zmínili výše, $3\alpha5\beta S$ je látka relativně málo lipofilní a její odmývání z membrány probíhá v rámci jednotek milisekund. $3\alpha5\beta S$ lze tedy s výhodou použít k odpovědi na otázku vlivu γ -CD na rychlost odmývání inhibičních neurosteroidů z jejich vazebného místa (Obrázek 5-10).

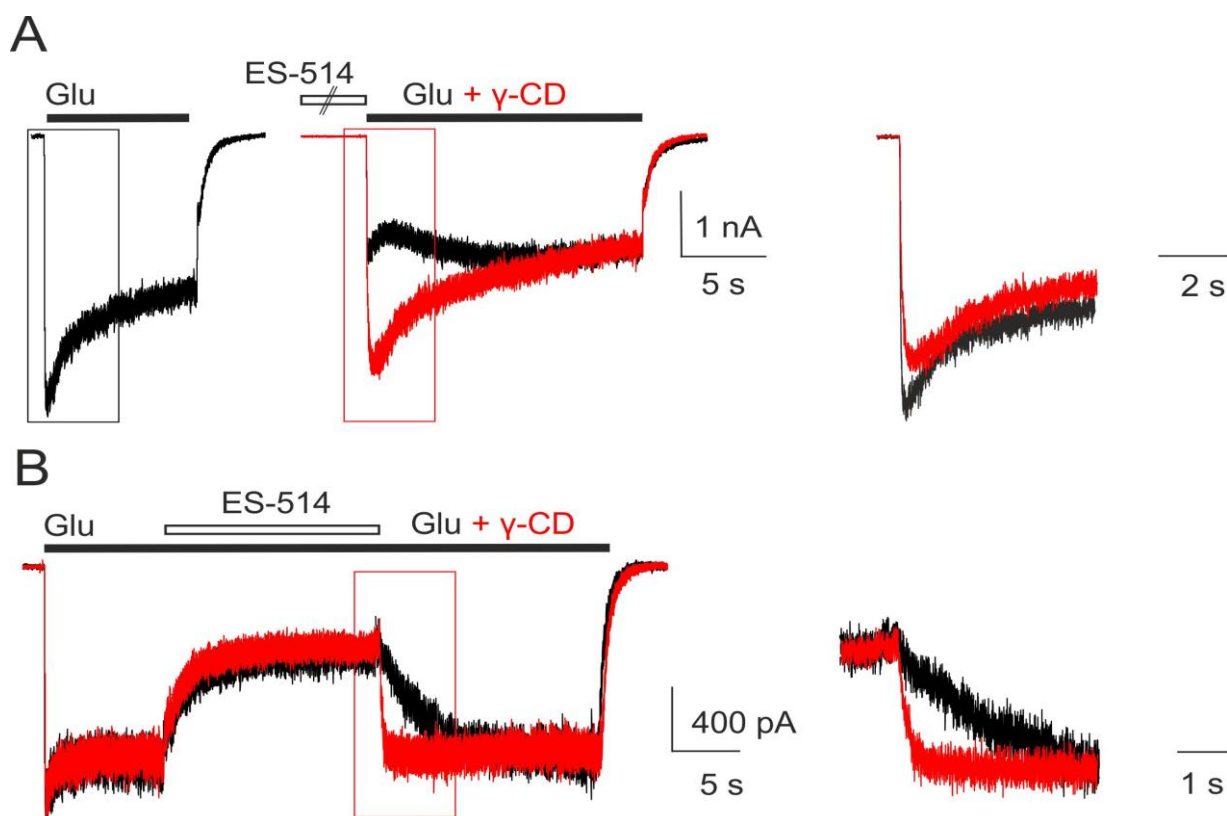


Obrázek 5-10. Dvouexponenciální kinetika odmyváni 3α5βS není ovlivněna γ-CD.

A. 150 μM roztok 3α5βS byl aplikován za kontinuální přítomnosti glutamátu na NMDA receptor v následující sekvenci: glutamát – glutamát + 3α5βS – glutamát – glutamát + 3α5βS – 10mM γ-CD s glutamátem. Za účelem porovnání časových konstant odmyváni v přítomnosti kontrolního roztoku (černý rámeček) a v přítomnosti 10 mM γ-CD (červený rámeček) jsou záznamy v rámečcích normovány na amplitudu kontroly a superponovány. Rychlou komponentu odmyváni značí τ₁ a pomalou τ₂. Je patrné, že nedošlo ke změně časových konstant odmyváni. **B.** Vynesení rychlých a pomalých exponenciálních konstant odmyváni do grafu ukazuje, že k signifikantní změně rychlé ani pomalé komponenty τ_{off} vlivem γ-CD nedošlo (n = 4).

Provedli jsme experiment, ve kterém jsme po koaplikaci 150 μM 3α5βS s glutamátem aplikovali 10mM γ-CD s glutamátem nebo roztok obsahující pouze glutamát. Působením γ-CD nedošlo k signifikantnímu urychlení odvazování 3α5βS z receptoru. To ukazuje, že γ-CD je schopen vázat pouze steroid vázaný v membráně, nikoli však steroid vázaný ve vazebném místě na NMDA receptoru. Toto nám umožňuje využít γ-CD k urychlení odvazování steroidních látek z membrány buněk a studovat tak vliv vazby neurosteroidů do membrány na jejich inhibiční působení na NMDA receptorech.

Bylo ukázáno, že pro inhibiční působení 3α5βS na NMDA receptory je potřeba cytoplazmatická membrána (Vyklícky *et al.*, 2015). Nicméně, 3α5βS se odvazuje z membrány rychle, takže na preaplikační experimenty nemá vliv. D-deriváty jsou ale látky hydrofobnějšího charakteru a jak jsme ukázali v kapacitním měření, jejich odvazování z membrány je pomalé a lze jej urychlit γ-CD. Následně jsme provedli experiment, kdy jsme s použitím γ-CD po preaplikaci ES-514 téměř eliminovali inhibiční účinek steroidu a v koaplikaci ES-514 s glutamátem jsme pomocí γ-CD významně urychlili kinetiku inhibice ES-514 (Obrázek 5-11).



Obrázek 5-11. Akompetitivní působení ES-514 na NMDA receptory a použití γ -CD pro manipulaci rychlosti odmývání steroidu z membrány.

A. ES-514 v koncentraci 1 μ M byl aplikován na receptor bez přítomnosti glutamátu a následná aktivace ECS obsahujícím glutamát vedla k odpovědi inhibované z 55 %. Experiment v totožném uspořádání, kdy však roztok aplikovaný na receptor po aplikaci ES-514 obsahující kromě glutamátu také 10 mM γ -CD vyvolal maximální proudovou odpověď srovnatelnou s kontrolou. Záznam s použitím γ -CD je označen červenou barvou a černou barvou je označen experiment kontrolní. Detaily I_{MAX} odpovědi kontroly (černý rámeček) a aplikace γ -CD s glutamátem (červený rámeček) ilustrují proporcionální velikosti odpovědi. **B.** Aplikace 1 μ M ES-514 za kontinuální přítomnosti glutamátu, kdy steroid vyvolal 60% inhibici s pozvolným odmýváním inhibičního účinku. Záznam v červené barvě je obdobný experiment, kde inhibice ES-514 byla odmývána v přítomnosti 10 mM γ -CD a tato látka způsobila výrazné urychlení τ_{off} z původní hodnoty 4254 ± 1677 ms ($n = 7$) na hodnotu 175 ± 19 ms ($n = 4$). Detail v červeném rámečku ukazuje urychlení odmývání inhibičního účinku ES-514. Normováno na stejnou amplitudu proudů.

Při preaplikaci 1 μ M ES-514 bez přítomnosti glutamátu a následné aktivaci NMDA receptorů glutamátem jsme pozorovali charakteristicky inhibovanou maximální proudovou odpověď. Pokud ale glutamát aplikovaný po preaplikaci ES-514 obsahoval navíc 10 mM γ -CD, naměřili jsme I_{MAX} o srovnatelné amplitudě jako v kontrole (Obrázek 5-11A). V experimentu, kdy jsme koaplikovali 1 μ M ES-514 v kontinuální přítomnosti glutamátu (Obrázek 5-11B) vyvolal γ -CD v koncentraci 10 mM urychlení τ_{off} z původní hodnoty 4254 ± 1677 ms ($n = 7$) na hodnotu 175 ± 19 ms ($n = 4$).

6 DISKUZE

6.1 Vliv DMSO na inhibiční působení neurosteroidů a funkci NMDA receptoru

Z výsledků experimentů na Obrázek 5-1 vyplývá, že vlivem DMSO dochází ke snížení proudů zprostředkovaných NMDA receptory a ke snížení inhibičního působení neurosteroidů na těchto receptorech. Snížení proudů zprostředkovaných NMDA receptory je v souladu s prokázaným neuroprotektivním účinkem DMSO. Bylo ukázáno, že v hipokampálních neuronech jsou proudy NMDA a AMPA receptorů inhibovány při extracelulárních koncentracích DMSO překračujících 1 % (Lu *et al.*, 2001). To ukazuje na kritickou koncentraci 1 % pro působení DMSO na glutamátové receptory. Za předpokladu, že DMSO ovlivňuje pouze celkové proudy NMDA receptoru bychom však očekávali nezměněnou míru inhibičního účinku antagonistů. Nicméně, zvýšená koncentrace DMSO v našich experimentech současně snižuje míru inhibice vyvolanou neurosteroidy. Tento jev může být způsoben tím, že DMSO ovlivňuje přímo či nepřímo funkci NMDA receptorů, a tím se mění jejich citlivost k neurosteroidům, a/nebo DMSO může ovlivňovat dostupnost aktivní formy steroidu pro receptor. Byl navržen model, který ukazuje, že pro účinek neurosteroidů na NMDA receptorech je nutné, aby steroid v micelární formě nejprve splýnul s cytoplasmatickou membránou buněk, ze které je pak do extracelulárního prostoru uvolňován ve své aktivní monomerní formě (Vyklícky *et al.*, 2015). DMSO tedy může mít vliv na rychlost a rovnováhu tohoto procesu. Nelze však vyloučit možnost, že DMSO mění kinetické vlastnosti NMDA receptoru nebo i strukturu samotného receptoru, čímž je narušena schopnost NMDA receptorů být inhibovány 3 α 5 β S.

6.2 Vztah mezi strukturou D-derivátů a inhibičním účinkem na NMDA receptory

Námi naměřené hodnoty IC_{50} 19 D-derivátů odvozených od přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu 3 α 5 β S se pohybovaly v širokém rozmezí hodnot od 164 μ M do 84 nM (Tabulka 1). Řadu těchto látek jsme identifikovali jako vysoce potentní inhibitory NMDA receptorů, přičemž derivát ES-527 z této řady měl nejnižší IC_{50} s hodnotou 84 nM. Dva deriváty v námi charakterizované sérii látek obsahovaly rovněž své enantiomery lišících se orientací substituentů na jednom (ES-509 a CH-1410) či dvou atomech uhlíku (ES-515 a ES 516). V případě CH-1410 se hodnota IC_{50} snížila přibližně dvakrát oproti svému enantiomeru a stereoizomery ES-515 a ES-516 nevykazovaly žádnou změnu v IC_{50} . Vlivem stereoizomerických vlastností molekuly steroidu tedy nedošlo k výraznému ovlivnění IC_{50} .

Vnesením polární skupiny obsahující atom kyslíku do steroidní struktury zapříčinilo snížení inhibičního účinku, kdežto nepolární substituenty inhibiční účinek naopak zvyšovaly. Eliminací acetylové skupiny $3\alpha5\beta\text{S}$ v poloze C17 vznikla látka CH-1331 s IC_{50} zhruba třicetkrát nižší, což ukazuje, že tato acetylová skupina není pro inhibiční účinek $3\alpha5\beta\text{S}$ nezbytná. Malá stereospecifita a možnost široké záměny reziduí na D-kruhu naznačuje, že je receptor vůči těmto modifikacím necitlivý anebo, že tato část molekuly se vazby na NMDA receptor neúčastní.

Všechna měření s neurosteroidy jsme prováděli při minimálně dvou koncentracích, abychom ověřili rozpuštěnost dané látky v extracelulárním roztoku obsahujícím 1 % DMSO. Při nedostatečné rozpuštěnosti látky nedochází k adekvátnímu poklesu inhibičního účinku s koncentrací a takto určená hodnota IC_{50} je chybná. Na Obrázek 5-4 jsme stanovovali inhibiční účinek při čtyřech různých koncentracích. Při koncentracích 10 μM , 3 μM a 1 μM nedošlo k výraznému poklesu inhibice, k čemuž došlo až při snížení koncentrace ES-514 z 1 μM na 300 nM. To naznačuje, že při koncentracích nad 1 μM jsme se pohybovali nad maximální rozpustností této látky. Jinými slovy, koncentrace účinné formy neurosteroidu zůstávala prakticky neměnná a zvýšením koncentrace docházelo pouze k akumulaci steroidních molekul do makroskopických aglomerátů, které na funkci receptoru nemají vliv. Z tohoto důvodu jsme prováděli měření s klesající koncentrací steroidu až do té doby, než se hodnoty míry inhibice při těchto koncentracích významně lišily a zároveň se z nich vypočtené hodnoty IC_{50} významně nelišily. Aglomeráty steroidních molekul jsou v mikroskopu patrné od koncentrací cca 10 μM a při koncentracích nižších není již jejich výskyt vizuálně zjištělný. Tato metoda nám dává možnost kontrolovat rozpuštěnost látky bez nutnosti ověřování její rozpustnosti jinými metodami.

6.3 Mechanismus působení D-derivátů na NMDA receptor

Přestože se nejprve mechanismus působení D-derivátů zdál nekompetitivní, naše další experimenty ukazují na akompetitivní působení těchto látek. Experiment na Obrázek 5-7A porovnávající I_{MAX}^S a I_I ukázal na významně nižší inhibici maximální proudové odpovědi, což je typické pro akompetitivní inhibitory. Zvyšující se hodnota IC_{50} s klesající koncentrací glutamátu (Obrázek 5-7C) je druhým argumentem pro akompetitivní mechanismus působení ES-514 a navíc ukazuje, že tato látka má nekompetitivní odvažování stejně jako $3\alpha5\beta\text{S}$. Inhibice NMDA receptorů $3\alpha5\beta\text{S}$ je napěťově nezávislá (Petrovic *et al.*, 2005), což jsme prokázali i pro látku ES-527 a totožný mechanismus inhibice jsme navrhli pro D-deriváty. Experimenty s $\gamma\text{-CD}$ jsou rovněž v souladu s akompetitivním působením ES-514 na NMDA receptorech.

6.4 Role cytoplasmatické membrány v inhibičním působení neurosteroidů na NMDA receptorech

Při elektrofyziologických měřeních prováděných na buňkách přisedlých k podložce dochází k akumulaci steroidu ve formě micel (popřípadě mikroskopických krystalků při nedokonalé rozpuštěnosti) v prostoru mezi buňkou a sklíčkem, což se může uplatňovat v prodlužování časových konstant nástupu a odmývání inhibičního účinku. V takovém případě se budou uplatňovat faktory jako velikost a tvar měřené buňky společně s reálnou rychlostí od vazování steroidu z membrány. Pro odstranění tohoto artefaktu je třeba měření provádět na buňkách z podložky nadzvednutých a umístěných volně v roztoku, což však klade vyšší nároky na experiment. Statistické zhodnocení experimentů na Obrázek 5-8 na buňkách přisedlých a na buňkách nadzvednutých neukázalo signifikantní rozdíl v rychlosti od vazování ES-514 z membrány (τ_{off}^c). V souladu s tímto pozorováním jsou i experimenty na Obrázek 5-6D a E, kdy preaplikace ES-514 provedená na buňce nadzvednuté z podložky poskytla kvalitativně stejný výsledek jako na buňce přisedlé, ačkoliv efekt ukládání steroidu pod buňkou se projevil menší amplitudou I_{MAX} a pomalejším návratem na kontrolní proud u buněk přisedlých k podložce. Z těchto výsledků vyplývá, že v případě hydrofobní látky, jakou je ES-514, nezáleží na způsobu provedení nahrávání z HEK293 buněk a proto jsme měření prováděli na buňkách přisedlých.

Jelikož je známo, že β -CD je schopen z buněčných membrán vyvazovat cholesterol (Ohtani *et al.*, 1989) a Borovska *et al.* (2012) ukázali, že z cyklodextrinů je γ -CD pro manipulaci kinetiky neurosteroidů neúčinnější, rozhodli jsme se pro urychlení od vazování neurosteroidních analogů z cytoplasmatické membrány buněk použít γ -CD. V práci Korinek *et al.* (2015) bylo ukázáno, že pravděpodobnost otevření NMDA receptorů je citlivá ke koncentraci cholesterolu v cytoplasmatické membráně buněk a již po mírném snížení koncentrace cholesterolu dochází ke snižování proudových odpovědí NMDA receptorů. Vzhledem k tomu, že po aplikaci γ -CD se odpovědi vracely na původní hodnotu, v časových horizontech našich experimentů tak nedochází k depleci cholesterolu z membrán měřených buněk. γ -CD se tak ukázal jako vhodný prostředek pro urychlení kinetiky hydrofobních neurosteroidů z cytoplasmatické membrány. Jak jsme ukázali na Obrázek 5-9, přítomnost γ -CD v koncentraci 10 mM způsobuje inhibici NMDA receptorů, kterou lze eliminovat zvýšením koncentrace agonisty glycinu. To naznačuje, že γ -CD ovlivňuje NMDA receptor nepřímo vyvazováním aminokyselin glycinu a glutamátu svou hydrofobní částí, a tak snižuje jejich volnou koncentraci dostupnou k aktivaci receptorů. Tuto hypotézu potvrzují práce zabývající se vazbou aminokyselin s cyklodextriny (Kahle *et al.*,

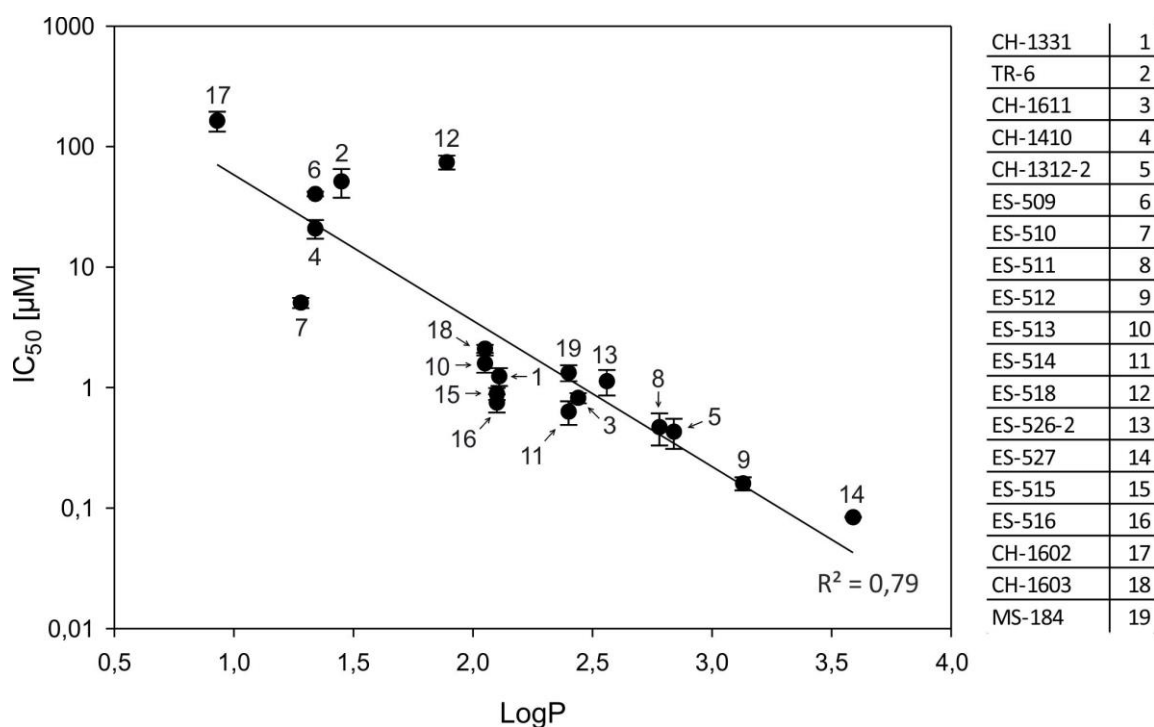
2004). Zvýšením koncentrace agonisty lze předejít cyklodextrinem vyvolané inhibici. Jelikož jde o koncentrace dalece saturující (Poloviční účinná aktivační koncentrace pro glycin je $1 \mu\text{M}$ (Johnson *et al.*, 1987) a pro glutamát $2,3 \mu\text{M}$ (Patneau *et al.*, 1990)), toto zvýšení se na proudové odpovědi nijak neprojeví. 1mM koncentrace glutamátu je natolik saturující, že se její snížení v tomto případě neuplatní.

Vazba neurosteroidu na receptor je charakterizována konstantami navazování neurosteroidu na receptor (k_{on}) a odvazování z receptoru (k_{off}). Tyto konstanty lze vypočítat z experimentálně získaných časových konstant inhibičního působení (τ_{on} a τ_{off}) z Rovnic 6 a 7. Zatímco rychlost navazování steroidu na receptor je závislá na koncentraci, pro rychlost odvazování totéž neplatí, protože v ideálním případě se steroid v roztoku již nevyskytuje. Převrácenou hodnotu afinity steroidu k NMDA receptoru charakterizuje jeho rovnovážná disociační konstanta K_D (Rovnice 8). Položili jsme si otázku, který z parametrů k_{on} , k_{off} a $[c]$ je zodpovědný za vysokou schopnost D-derivátů inhibovat NMDA receptor. Neurosteroidy jsou látky přirozeně lipofilní, a tudíž dochází k jejich akumulaci v hydrofobním prostředí, které představuje cytoplazmatická membrána (Kapitola 5.4). Koncentrace, ve které se steroid nachází v blízkosti receptorů na buněčném povrchu, může být o několik řádů vyšší než ta aplikovaná v extracelulárním roztoku. Proto je třeba uvažovat reálnou koncentraci v blízkosti receptoru jako další neznámou, $[c]_{lokální}$.

Ukázali jsme, že D-deriváty s hydrofobními modifikacemi mají oproti $3\alpha5\beta\text{S}$ sníženou hodnotu IC_{50} pro inhibici NMDA receptorů. Důvodem tohoto snížení může být změna k_{on} , k_{off} nebo reálné koncentrace steroidu – $[c]_{lokální}$. Pokud by došlo ke změně pouze k_{off} , muselo by v případě ES-514 dojít k zpomalení k_{off} z $5,5 \pm 1,8 \text{ s}^{-1}$ ($n = 5$; převrácená hodnota $\tau(w)_{off}$ pro $3\alpha5\beta\text{S}$) více než šedesátkrát, aby došlo k adekvátnímu poklesu IC_{50} . Abychom určili příspěvek k_{off} ke snížení IC_{50} u hydrofobních D-derivátů, provedli jsme experiment, kde jsme se zaměřili na rychlost odmývání inhibice ES-514 $\gamma\text{-CD}$ (Obrázek 5-11C a D). $1 \mu\text{M}$ ES-514 byl aplikován v kontinuální přítomnosti glutamátu, což vyvolalo inhibici proudů o 60 % s charakteristicky pomalým τ_{off} . Aplikací $\gamma\text{-CD}$ s glutamátem jsme dosáhli zrychlení τ_{off} z původní hodnoty $4254 \pm 1677 \text{ ms}$ ($n = 7$) na hodnotu $175 \pm 19 \text{ ms}$ ($n = 4$). Porovnáním tohoto experimentu s kapacitními měřeními je patrné, že $\gamma\text{-CD}$ může zkrátit τ_{off} maximálně na $175 \pm 19 \text{ ms}$. To je hodnota blízká té získané měřením kapacity ($\tau_{off}^c = 287 \pm 97 \text{ ms}$), s přihlédnutím k jejímu širšímu rozptylu. Z toho vyplývá, že konstanta odvazování ES-514 z receptoru je rychlejší než odvazování ES-514 z membrány, neboť odvazování steroidu z receptoru nelze cyklodextrinem urychlit (Obrázek 5-10). k_{off} látky ES-514 jsme tedy vypočetli na $5,8 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$, což je hodnota, která se v rámci chyby shoduje s k_{off} $3\alpha5\beta\text{S}$ ($5,5 \pm 1,8 \text{ s}^{-1}$).

Experimenty s γ -CD jsme vyloučili zásadní příspěvek k_{off} k vyšší schopnosti D-derivátů inhibovat NMDA receptory. Pro vysvětlení tohoto jevu se dále nabízejí dvě možnosti: za prvé, rychlostní konstanta vazby inhibitoru na receptor k_{on} je u D-derivátů zrychlena oproti $3\alpha5\beta S$ anebo za druhé, koncentrace $[C_{lokální}]$ D-derivátů je extrémně zvýšena v okolí receptorů na buněčném povrchu. Jak ale vyplývá z Rovnice 6, experimentálně je nemožné odlišit k_{on} a $[C_{lokální}]$. Naše výsledky však naznačují, že dohromady tento člen nabývá vyšších hodnot a je tak zodpovědný za snížení IC_{50} pozorovaného u D-derivátů.

Bližší analýzou inhibičního působení D-derivátů se ukázalo, že existuje vztah mezi inhibičním působením těchto derivátů a jejich lipofilitou, reprezentovanou partičním koeficientem LogP. Tento koeficient udává poměr rovnovážných koncentrací dané látky ve vodné fázi a v 1-oktanolu. LogP proto odráží, do jaké míry je látka hydrofobní či hydrofilní. Vynesením hodnot IC_{50} proti LogP jsme ukázali, že mezi těmito dvěma veličinami existuje pozitivní korelace s hodnotou korelačního koeficientu $R^2 = 0,79$ (Obrázek 6-1).



Obrázek 6-1. Závislost IC_{50} na LogP D-derivátů. Závislost je proložena lineární funkcí ($R^2 = 0,79$). V grafu jsou vyneseny hodnoty IC_{50} v závislosti na LogP reprezentujícím lipofilitou. Číslování látek v grafu je uvedeno v tabulce v pravo. Látka s největší lipofilitou, v poloze C17 substituovaná 2-butylem, měla rovněž nejnižší hodnotu IC_{50} (84 nM).

Lineární závislost IC_{50} na lipofilitě ukazuje, že pravděpodobným důvodem snížení IC_{50} D-derivátů je jejich zvýšená koncentrace v místě působení $[C_{lokální}]$ než změna rychlostní konstanty k_{on} .

V kapacitních experimentech, kde $3\alpha5\beta\text{S}$ sloužil jako kontrola kapacitních změn, bylo navazování této látky do membrány rychlejší než byla rozlišovací schopnost kapacitního nahrávání (perioda 50 ms) a tudíž byla kinetika změn v kapacitě membrány vyvolaná vazbou $3\alpha5\beta\text{S}$ rychlejší než vzorkovací frekvence experimentu. Odmývání $3\alpha5\beta\text{S}$ je však charakterizováno dvouexponenciálním průběhem, rychlostními konstantami τ_1 a τ_2 . Důvod, proč jsme při použití $\gamma\text{-CD}$ viděli u odmyvání inhibice ES-514 pouze jednoexponenciální τ_{off} je pravděpodobně rychlostní limit účinku $\gamma\text{-CD}$, který je dán rychlostí vazby steroidu do hydrofobní kapsy cyklodextrinu. Pokud je tedy rychlá komponenta odmyvání $3\alpha5\beta\text{S}$ zhruba 30 ms, použitím $\gamma\text{-CD}$ nelze zachytit případné víceexponenciální komponenty odmyvání D-derivátů rychlejší než 175 ms.

Mennerick *et al.* (2008) ukázali, že pro změnu v kapacitních proudech je klíčový náboj steroidu a nikoliv steroidní jádro, které se pro $3\alpha5\beta\text{S}$ a ES-514 mírně liší (Obrázek 5-2). Vazbou steroidu do membránové dvojvrstvy z extracelulární strany tak nejspíše dochází k efektivnímu ztenčení hydrofobní části membrány, která zde tvoří dielektrikum, což se následně projevuje vzrůstem kapacity v souladu s Rovnicí 1. Neurosteroidy bez náboje změnu v kapacitních proudech nevyvolávají, což ukazuje na význam náboje při jimi vyvolaných změnách kapacity. Nabité steroidní látky membránou neprocházejí ani nedochází k pohybu nabitě části molekuly v rámci elektrického pole mezi oběma listy cytoplazmatické membrány (Mennerick *et al.*, 2008). Díky tomu lze vyloučit, že vlivem změny elektrického pole dochází k pohybu náboje sulfatovaných neurosteroidů a tím k ovlivnění kapacitních změn.

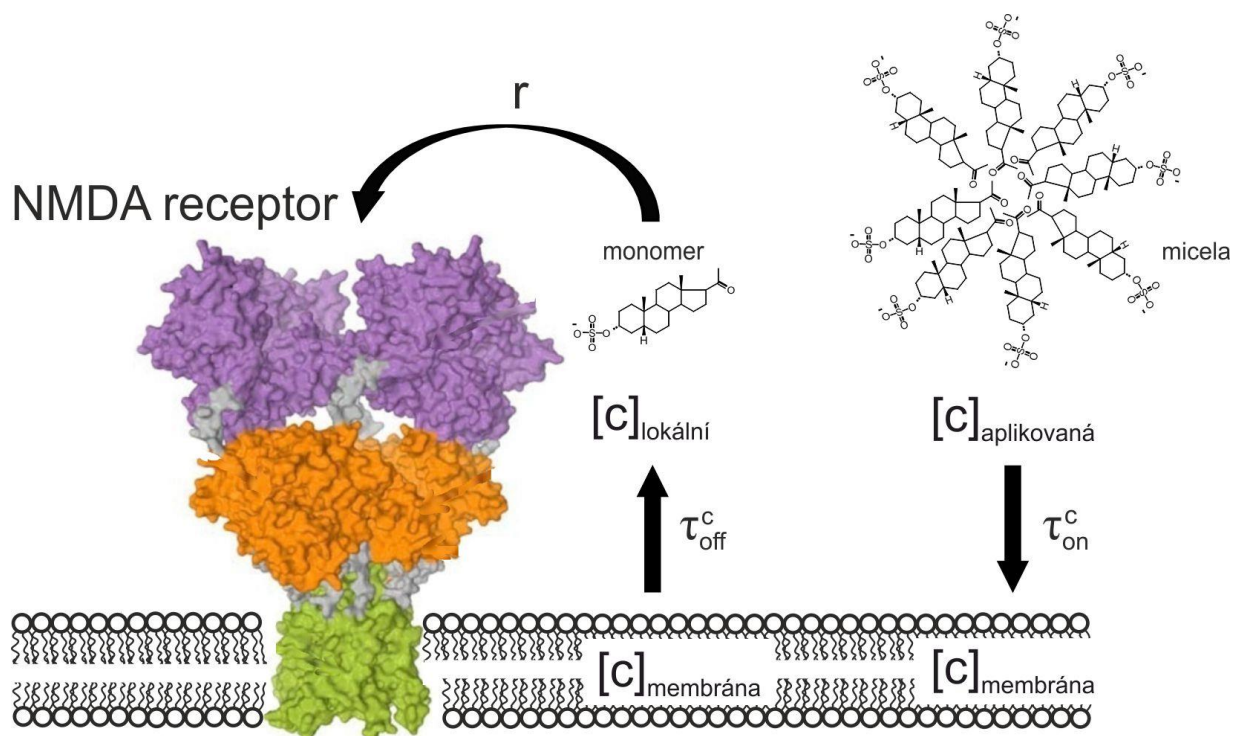
Kapacitní měření, které jsme provedli na Obrázek 5-8, nám umožňují experimentálně určit hodnotu LogP porovnáním změn kapacity membrány daných aplikací látky o neznámé lipofilicitě a látky s dobře charakterizovaným LogP. $3\alpha5\beta\text{S}$ má hodnotou LogP 1,67 což znamená, že jeho koncentrace v membráně je 47 krát vyšší než ve vodné fázi v okolí membrány. Pokud víme, že tato látka v koncentraci 300 μM způsobila svou vazbou do membrány průměrnou změnu v kapacitě o 0,56 pC, lze tuto změnu přepočítat na změnu odpovídající 1 μM koncentraci $3\alpha5\beta\text{S}$. Porovnáním jednotkové změny kapacity látek $3\alpha5\beta\text{S}$ a ES-514 jsme vypočetli, že ES-514 je akumulován v membráně 162 krát více než $3\alpha5\beta\text{S}$. To znamená, že ES-514 je v membráně akumulován v 7614 krát vyšší koncentraci než ve vodné fázi. Zlogaritmováním toho čísla jsme dostali hodnotu pro ES-514 $\text{LogP} = 3,88$.

Tyto výsledky jsme porovnali s hodnotami LogP získanými *in silico* on-line programem VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org>, 2005. Tento program umožňuje na základě vložené struktury vypočítat odhad lipofilicity. Pro ES-514 jsme

tímto výpočtem dostali $\text{LogP} = 2,4$ (pro $\text{pH} = 7,4$) což je hodnota podstatně odlišná od té získané kapacitním měřením. Exaktní stanovení lipofilicity steroidních látek na základě kapacitních změn cytoplazmatické membrány by proto mohlo poskytovat validnější výsledky než odhad LogP založený na struktuře. Pro ověření přesnosti této metody by však bylo třeba měření provést pro širší spektrum steroidních látek a tyto hodnoty porovnat s dalšími experimentálními metodami měření lipofilicity. Hodnota LogP $3\alpha5\beta\text{S}$ byla experimentálně charakterizována metodou vazby do erytrocytárních membrán, jde tudíž o hodnotu validní, na které lze zakládat odvození lipofilicity pro ostatní látky.

Z experimentu v Obrázek 5-7 jsme získali hodnoty IC_{50}^S pro maximální proudovou odpověď v přítomnosti steroidu I_{MAX}^S ($0,78 \pm 0,14 \mu\text{M}$) a IC_{50} pro ustálený stav inhibice I_I ($0,57 \pm 0,09 \mu\text{M}$) látkou ES-514. Poměr r (Rovnice 9) pro ES-514 je číslo 1,37 odrážející rychlost akompetitivního inhibitoru vázat se na receptor. Tento poměr je pro $3\alpha5\beta\text{S}$ roven 2, čili $3\alpha5\beta\text{S}$ preferenčně inhibuje tonicky aktivované receptory (nepublikované výsledky). To, že amplituda I_{MAX}^S v kontinuální přítomnosti ES-514 při i před aplikací glutamátu je již z velké většiny inhibovaná vypovídá o tom, že k_{on} není limitujícím krokem inhibičního účinku ES-514 na NMDA receptorech.

Experimentální hodnoty, které jsme použili pro popis významu cytoplazmatické membrány v inhibičním působení neurosteroidů na NMDA receptorech lze shrnout schématem na Obrázek 6-2.



Obrázek 6-2. Schéma role cytoplazmatické membrány v působení neurosteroidů na NMDA receptorech.

Roztok steroidu aplikovaného na extracelulární stranu membrány $[c]_{\text{aplikovaná}}$ obsahuje steroid převážně v neúčinné micelární formě. Micela fúzeje s cytoplazmatickou membránou a dochází k akumulaci steroidu ve vnějším listu membrány, $[c]_{\text{membrána}}$. Z membrány jsou pak molekuly steroidu uvolňovány ve své monomerní formě, $[c]_{\text{lokální}}$, která představuje účinnou formu steroidu a je schopna se vázat na NMDA receptor. Vazbu do a z membrány jsme charakterizovali rychlostními konstantami τ_{on}^c a τ_{off}^c (Obrázek 5-8) a rychlost vazby monomerní formy steroidu na NMDA receptor koeficientem r (Obrázek 5-7). Upraveno dle (Sobolevsky *et al.*, 2009).

Z elektrofyziologických experimentů víme, že rychlost, se kterou nastupuje inhibiční působení ES-514 v koaplikačních experimentech (Obrázek 5-6C) je $\tau_{\text{on}} = 2137 \pm 480$ ms a ukázali jsme, že jeho vazba je akompetitivní. Dle schématu na Obrázek 6-2 při koaplikačním experimentu měříme τ_{on}^c a r zároveň, přičemž limitujícím krokem účinku je vazba steroidu do membrány. V experimentu zaměřeném na poměr IC_{50}^S a IC_{50} (koeficient r) na Obrázek 5-7A jsme ukázali, že vazba ES-514 na samotný receptor je velmi rychlá a tudíž ustálení rovnováhy při vazbě na receptor po jeho aktivaci je srovnatelné s rychlostí aktivace 1 mM glutamátem, což je pro NMDA receptor o podjednotkovém složení GluN1/GluN2B ~ 10 ms. Z kapacitních experimentů vyplývá, že rychlost vazby ES-514 do membrány ($\tau_{\text{on}}^c = 2480 \pm 466$ ms) se signifikantně neliší od rychlosti nástupu inhibice v koaplikačních experimentech. To vše nasvědčuje tomu, že steroid ve formě aplikované na NMDA receptor z extracelulární strany membrány není schopný s receptorem interagovat a vyvolat inhibiční účinek. Zřejmě je tedy nutná jeho předchozí akumulace v membráně, což v případě D-derivátů tvoří krok limitující rychlost jeho účinku, zatímco u $3\alpha 5\beta S$ tento krok představuje rychlost vazby na receptor.

Teprve po akumulaci steroidu v membráně je možná jeho interakce s receptorem. S touto představou jsou v souladu experimenty s γ -CD, ve kterých jsme naměřili amplitudu I_{MAX} po preaplikaci ES-514 podobnou kontrole (Obrázek 5-11A) a signifikantně urychlili kinetiku odmývání inhibice steroidu koaplikovaného s glutamátem (Obrázek 5-11B). Nedávno publikovaná krystalografická struktura NMDA receptoru (Lee *et al.*, 2014) nenasvědčuje tomu, že by byla možná přímá vazba steroidu z membrány do vazebného místa ve vnějším ústí iontového kanálu (Vyklícky *et al.*, 2015). To nasvědčuje tomu, že model přeměny micelární formy steroidu na formu monomerů v membráně, která je pak uvolňuje, je validní. Výsledky této práce nám proto umožnily ověřit navržený model působení neurosteroidů na NMDA receptor dle práce (Vyklícky *et al.*, 2015).

7 SOUHRN

7.1 Popsat vztah mezi strukturou a funkcí D-derivátů pregnanolon sulfátu na NMDA receptorech.

- A. Ze série 19 D-derivátů jsme řadu identifikovali jako potentní inhibitory NMDA receptorů.
- B. Substituent na D kruhu má zásadní vliv na hodnotu IC_{50} D-derivátů na NMDA receptorech. Substitucí acetylového řetězce na uhlíku číslo 17 za 2-butyl došlo ke snížení hodnoty IC_{50} z 39,1 μ M pro pregnanolon sulfát na 84 nM pro 5 β -androstan-17 β -(2'-butyl) 3 α -yl-sulfát.
- C. Vnesení postranního řetězce obsahujícího atom kyslíku do D kruhu molekuly steroidu způsobilo snížení inhibičního účinku D-derivátů. To je v souladu s pozitivní korelací lipofilicity a inhibičního účinku D-derivátů na NMDA receptorech.
- D. Nízká míra stereoselektivity a široká možnost záměny acetylové skupiny na uhlíku číslo 17 naznačuje, že NMDA receptor je k těmto záměnám necitlivý nebo se tato část molekuly vazby na receptor neúčastní.

7.2 Identifikovat molekulární mechanismus působení D-derivátů pregnanolon sulfátu na NMDA receptorech.

- A. D-deriváty na NMDA receptorech působí napětově nezávislým mechanismem akompetitivní inhibice s nekompetitivním odvazováním, stejně jako 3 α 5 β S. Obě tyto skupiny látek proto s největší pravděpodobností působí na stejném vazebném místě.
- B. Kinetika nástupu a odmývání inhibičního účinku lipofilních D-derivátů je oproti 3 α 5 β S pomalejší, což není způsobeno odlišným mechanismem působení ale zvýšenou mírou akumulace D-derivátů v cytoplazmatické membráně, čímž dochází k dramatickému zvýšení lokální koncentrace neurosteroidu v blízkosti receptoru. Vazba D-derivátů na NMDA receptor je přitom velice rychlá, rychlejší než ~ 10 ms. Z důvodu omezené rychlosti působení gama-cyklodextrinu byla rychlost odvazování D-derivátů z receptoru stanovena na hodnotu menší než 175 ms.

7.3 Charakterizovat úlohu cytoplazmatické membrány v inhibičním působení neurosteroidů na NMDA receptorech.

- A. Vazba hydrofobního steroidu do cytoplazmatické membrány měřená metodou kapacitního nahrávání na netransfekovaných buňkách koreluje s nástupem jeho inhibičního účinku na buňkách transfekovaných GluN1/GluN2B receptory. To naznačuje, že ukládání steroidu v membráně je kritické pro jeho působení na těchto receptorech.
- B. Metoda kapacitního nahrávání nám umožňuje experimentálně stanovit hodnotu koeficientu LogP lipofilních látek komparativní metodou.
- C. Role cytoplazmatické membrány v inhibičním působení D-derivátů na NMDA receptorech je v souladu s modelem navrženým prací (Vyklíčky *et al.*, 2015), kde je membrána důležitá pro přeměnu neúčinné micelární formy neurosteroidu na účinnou formu monomerů schopné vazby do vazebného místa na NMDA receptorech.

8 ZÁVĚR

Přestože NMDA receptory jsou pro správnou funkci CNS nezbytné, hrají roli rovněž při excitotoxickém poškození mozku. Projevem mnoha patologických stavů je zvýšená hladina glutamátu v extracelulárním prostředí, která tonicky aktivuje NMDA receptory. Cílem výzkumu mnoha laboratoří a farmaceutických firem je identifikace takového antagonisty, který by preferenčně zablokoval tonicky aktivované NMDA receptory a jejich fázickou aktivitu ponechal netknutou. Analogy neurosteroidů založené na struktuře přirozeně se vyskytujícího pregnanolon sulfátu jsou jednou z možných cest při hledání takové látky.

V předkládané práci jsme charakterizovali vztah mezi strukturou a funkcí D-derivátů pregnanolon sulfátu a identifikovali jsme řadu potentních inhibitorů NMDA receptorů. Lipofilní D-deriváty se vyznačují pomalou kinetikou nástupu a odmývání inhibice, která je způsobena jejich zvýšenou lokální koncentrací v cytoplazmatické membráně. Z našich výsledků vyplývá, že substituce hydrofobního rezidua na D-kruhu způsobuje zvýšení inhibičního účinku. Na základě experimentů s využitím gama-cyklodextrinu se nám podařilo objasnit mechanismus, kterým dochází ke komplexním průběhům proudových odpovědí v preaplikačních experimentech s D-deriváty. Tyto poznatky by mohly v budoucnu přispět k vývoji nových účinných látek pro léčbu chorob spojených s poruchami funkce NMDA receptorů.

Bylo ukázáno, že neurosteroidy s potenciačním účinkem na NMDA receptorech se váží na odlišné vazebné místo než neurosteroidy s inhibičním účinkem. Vazebné místo neurosteroidů s inhibičním působením bylo objeveno v nedávné době (Vyklícky *et al.*, 2015), zatímco vazebné místo neurosteroidů s potenciačním působením zůstává neznámé. Podle naší hypotézy neurosteroidy s potenciačním účinkem přistupují k vazebnému místu přímo z membránové dvojvrstvy, bez nutnosti difúze do centrálního vestibulu iontového kanálu. Experimenty s gama-cyklodextrinem by bylo možné tuto hypotézu testovat a přispět k nalezení vazebného místa neurosteroidů s potenciačním účinkem na NMDA receptorech.

9 LITERATURA

- Akk G, Shu HJ, Wang C, Steinbach JH, Zorumski CF, Covey DF, *et al.* (2005). Neurosteroid access to the GABAA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**(50): 11605-11613.
- Assaf SY, Chung SH (1984). Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature* **308**(5961): 734-736.
- Bi X, Rong Y, Chen J, Dang S, Wang Z, Baudry M (1998). Calpain-mediated regulation of NMDA receptor structure and function. *Brain research* **790**(1-2): 245-253.
- Birch PJ, Grossman CJ, Hayes AG (1988). Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *European journal of pharmacology* **154**(1): 85-87.
- Blanpied TA, Boeckman FA, Aizenman E, Johnson JW (1997). Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *Journal of neurophysiology* **77**(1): 309-323.
- Borovska J, Vyklicky V, Stastna E, Kapras V, Slavikova B, Horak M, *et al.* (2012). Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *British journal of pharmacology* **166**(3): 1069-1083.
- Brothwell SL, Barber JL, Monaghan DT, Jane DE, Gibb AJ, Jones S (2008). NR2B- and NR2D-containing synaptic NMDA receptors in developing rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. *The Journal of physiology* **586**(3): 739-750.
- Casado M, Ascher P (1998). Opposite modulation of NMDA receptors by lysophospholipids and arachidonic acid: common features with mechanosensitivity. *The Journal of physiology* **513** (Pt 2): 317-330.
- Cerny I, Budesinsky M, Pouzar V, Vyklicky V, Krausova B, Vyklicky L, Jr. (2012). Neuroactive steroids with perfluorobenzoyl group. *Steroids* **77**(12): 1233-1241.
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**(1): 2-5.
- Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjoval J, Vihko R, *et al.* (1983). Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain research* **270**(1): 119-125.
- Davis ME, Brewster ME (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature reviews. Drug discovery* **3**(12): 1023-1035.
- Dickinson R, Peterson BK, Banks P, Simillis C, Martin JC, Valenzuela CA, *et al.* (2007). Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor by the anesthetics xenon and isoflurane: evidence from molecular modeling and electrophysiology. *Anesthesiology* **107**(5): 756-767.

- Dravid SM, Prakash A, Traynelis SF (2008). Activation of recombinant NR1/NR2C NMDA receptors. *The Journal of physiology* **586**(Pt 18): 4425-4439.
- Durand GM, Bennett MV, Zukin RS (1993). Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(14): 6731-6735.
- Erreger K, Geballe MT, Kristensen A, Chen PE, Hansen KB, Lee CJ, *et al.* (2007). Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Mol Pharmacol* **72**(4): 907-920.
- Erreger K, Chen PE, Wyllie DJ, Traynelis SF (2004). Glutamate receptor gating. *Critical reviews in neurobiology* **16**(3): 187-224.
- Erreger K, Traynelis SF (2005). Allosteric interaction between zinc and glutamate binding domains on NR2A causes desensitization of NMDA receptors. *The Journal of physiology* **569**(Pt 2): 381-393.
- Fayyazuddin A, Villarroel A, Le Goff A, Lerma J, Neyton J (2000). Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn²⁺ binding to NMDA receptors. *Neuron* **25**(3): 683-694.
- Furukawa H, Gouaux E (2003). Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *Embo Journal* **22**(12): 2873-2885.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**(7065): 185-192.
- Gibb AJ, Colquhoun D (1991). Glutamate activation of a single NMDA receptor-channel produces a cluster of channel openings. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **243**(1306): 39-45.
- Gielen M, Le Goff A, Stroebel D, Johnson JW, Neyton J, Paoletti P (2008). Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* **57**(1): 80-93.
- Gielen M, Sieglar Retchless B, Mony L, Johnson JW, Paoletti P (2009). Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* **459**(7247): 703-707.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **391**(2): 85-100.
- Han X, Tomitori H, Mizuno S, Higashi K, Full C, Fukiwake T, *et al.* (2008). Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of neurochemistry* **107**(6): 1566-1577.
- Hayashi T (1954). The effect of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.* **3**: 183.

Hayashi T, Thomas GM, Huganir RL (2009). Dual palmitoylation of NR2 subunits regulates NMDA receptor trafficking. *Neuron* **64**(2): 213-226.

Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2004). Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**(46): 10318-10325.

Huettnner JE, Bean BP (1988). Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(4): 1307-1311.

Chandrasekar R (2013). Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction. *Frontiers in molecular neuroscience* **6**: 14.

Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, *et al.* (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**(6873): 793-798.

Chen HSV, Lipton SA (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry* **97**(6): 1611-1626.

Chen N, Luo T, Raymond LA (1999). Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(16): 6844-6854.

Iijima K, Takase S, Tsumuraya K, Endo M, Itahara K (1978). Changes in free amino acids of cerebrospinal fluid and plasma in various neurological diseases. *The Tohoku journal of experimental medicine* **126**(2): 133-150.

Jahr CE (1992). High probability opening of NMDA receptor channels by L-glutamate. *Science* **255**(5043): 470-472.

Jin RS, Banke TG, Mayer ML, Traynelis SF, Gouaux E (2003). Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nature neuroscience* **6**(8): 803-810.

Johnson JW, Ascher P (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**(6104): 529-531.

Kahle C, Holzgrabe U (2004). Determination of binding constants of cyclodextrin inclusion complexes with amino acids and dipeptides by potentiometric titration. *Chirality* **16**(8): 509-515.

Karakas E, Furukawa H (2014). Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* **344**(6187): 992-997.

Karakas E, Simorowski N, Furukawa H (2009). Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *Embo Journal* **28**(24): 3910-3920.

- Karakas E, Simorowski N, Furukawa H (2011). Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* **475**(7355): 249-253.
- Kemp JA, Foster AC, Leeson PD, Priestley T, Tridgett R, Iversen LL, *et al.* (1988). 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(17): 6547-6550.
- Korinek M, Vyklicky V, Borovska J, Lichnerova K, Kaniakova M, Krausova B, *et al.* (2015). Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. *The Journal of physiology*.
- Kostakis E, Jang MK, Russek SJ, Gibbs TT, Farb DH (2011). A steroid modulatory domain in NR2A collaborates with NR1 exon-5 to control NMDAR modulation by pregnenolone sulfate and protons. *Journal of neurochemistry* **119**(3): 486-496.
- Kraig RP, Ferreira-Filho CR, Nicholson C (1983). Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment. *Journal of neurophysiology* **49**(3): 831-850.
- Krishtal OA, Osipchuk YV, Shelest TN, Smirnoff SV (1987). Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain research* **436**(2): 352-356.
- Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL (1998). N-terminal domains in the NR2 subunit control desensitization of NMDA receptors. *Neuron* **20**(2): 317-327.
- Kudova E, Chodounska H, Slavikova B, Budesinsky M, Nekardova M, Vyklicky V, *et al.* (2015). New Class of Potent Inhibitors of NMDA Receptors: Sulfated Neuroactive Steroids with Lipophilic Modification in the D-ring Region. *Journal of medicinal chemistry*.
- Kuner T, Wollmuth LP, Karlin A, Seeburg PH, Sakmann B (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* **17**(2): 343-352.
- Kuusinen A, Abele R, Madden DR, Keinänen K (1999). Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD. *Journal of Biological Chemistry* **274**(41): 28937-28943.
- Kwekkeboom J, van Voorthuizen EM, Princen HM, Kempen HJ (1988). Feedback inhibition of bile acid synthesis in cultured pig hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **155**(2): 850-856.
- Lee CH, Lu W, Michel JC, Goehring A, Du J, Song X, *et al.* (2014). NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature* **511**(7508): 191-197.
- Lester RA, Jahr CE (1992). NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**(2): 635-643.

- Leuschner WD, Hoch W (1999). Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their n-terminal domains. *Journal of Biological Chemistry* **274**(24): 16907-16916.
- Lipton SA (1993). Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends in neurosciences* **16**(12): 527-532.
- Low CM, Lyuboslavsky P, French A, Le P, Wyatte K, Thiel WH, *et al.* (2003). Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. *Molecular pharmacology* **63**(6): 1212-1222.
- Lu C, Mattson MP (2001). Dimethyl sulfoxide suppresses NMDA- and AMPA-induced ion currents and calcium influx and protects against excitotoxic death in hippocampal neurons. *Experimental neurology* **170**(1): 180-185.
- Majewska MD, Mienville JM, Vicini S (1988). Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonizes electrophysiological responses to GABA in neurons. *Neuroscience letters* **90**(3): 279-284.
- Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M (2003). Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(31): 10064-10073.
- Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K (1995). Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *Journal of neurochemistry* **65**(1): 454-458.
- Mayer ML (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **440**(7083): 456-462.
- Mayer ML, Vyklicky L, Jr. (1989). The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. *The Journal of physiology* **415**: 351-365.
- Mayer ML, Westbrook GL (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *The Journal of physiology* **394**: 501-527.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**(5965): 261-263.
- Mennerick S, Lamberta M, Shu HJ, Hogins J, Wang C, Covey DF, *et al.* (2008). Effects on membrane capacitance of steroids with antagonist properties at GABAA receptors. *Biophysical journal* **95**(1): 176-185.
- Mitrova E, Mayer V (1989). Antibodies to axonal neurofilaments in Creutzfeldt-Jakob disease and other organic dementias. *Acta Virol* **33**(4): 371-374.
- Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P (2011). Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *The EMBO journal* **30**(15): 3134-3146.

- Neely A, Lingle CJ (1986). Trapping of an open-channel blocker at the frog neuromuscular acetylcholine channel. *Biophysical journal* **50**(5): 981-986.
- Nicholls DG (1989). Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *Journal of neurochemistry* **52**(2): 331-341.
- Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J (1989). Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* **186**(1-2): 17-22.
- Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, *et al.* (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* **150**(3): 633-646.
- Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev AA, Gibbs TT, Farb DH (1997). Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Molecular pharmacology* **52**(6): 1113-1123.
- Parsons CG, Quack G, Bresink I, Baran L, Przegalinski E, Kostowski W, *et al.* (1995). Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* **34**(10): 1239-1258.
- Patneau DK, Mayer ML (1990). Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **10**(7): 2385-2399.
- Perin-Dureau F, Rachline J, Neyton J, Paoletti P (2002). Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(14): 5955-5965.
- 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**(37): 8439-8450.
- Prieto ML, Wollmuth LP (2010). Gating modes in AMPA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**(12): 4449-4459.
- Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, Paoletti P (2005). The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**(2): 308-317.
- Ransom RW, Deschenes NL (1990). Polyamines regulate glycine interaction with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Synapse* **5**(4): 294-298.
- Ren H, Honse Y, Karp BJ, Lipsky RH, Peoples RW (2003). A site in the fourth membrane-associated domain of the N-methyl-D-aspartate receptor regulates desensitization and ion channel gating. *Journal of Biological Chemistry* **278**(1): 276-283.

- Richter D, Richter J, Gruner B, Kranz K, Franz J, Kern P (2013). In vitro efficacy of triclabendazole and clorsulon against the larval stage of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology research* **112**(4): 1655-1660.
- Rosenmund C, Feltz A, Westbrook GL (1995). Synaptic NMDA receptor channels have a low open probability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**(4): 2788-2795.
- Saglietti L, Dequidt C, Kamieniarz K, Rousset MC, Valnegri P, Thoumine O, *et al.* (2007). Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron* **54**(3): 461-477.
- Schorge S, Colquhoun D (2003). Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(4): 1151-1158.
- Schreier S, Malheiros SV, de Paula E (2000). Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochimica et biophysica acta* **1508**(1-2): 210-234.
- Sobolevskii AI, Khodorov BI (2002). Blocker studies of the functional architecture of the NMDA receptor channel. *Neuroscience and behavioral physiology* **32**(2): 157-171.
- Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **462**(7274): 745-756.
- Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2002). Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* **417**(6886): 245-253.
- Swanson GT, Feldmeyer D, Kaneda M, Cull-Candy SG (1996). Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *The Journal of physiology* **492** (Pt 1): 129-142.
- Traynelis SF, Cull-Candy SG (1990). Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* **345**(6273): 347-350.
- Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF (1995). Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* **268**(5212): 873-876.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, *et al.* (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* **62**(3): 405-496.
- Vance KM, Hansen KB, Traynelis SF (2013). Modal gating of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *Neuropharmacology* **71**: 184-190.
- Vidrna L, Cerny I, Pouzar V, Borovska J, Vyklicky V, Vyklicky L, Jr., *et al.* (2011). Azido analogs of neuroactive steroids. *Steroids* **76**(10-11): 1043-1050.

- Vissel B, Krupp JJ, Heinemann SF, Westbrook GL (2001). A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nature Neuroscience* **4(6)**: 587-596.
- Vyklicky L, Jr. (1993). Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* **470**: 575-600.
- Vyklicky L, Jr., Benveniste M, Mayer ML (1990a). Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *The Journal of physiology* **428**: 313-331.
- Vyklicky L, Jr., Vlachova V, Krusek J (1990b). The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *The Journal of physiology* **430**: 497-517.
- Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, *et al.* (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **63 Suppl 1**: S191-203.
- Vyklicky V, Krausova B, Cerny J, Balik A, Zapotocky M, Lichnerova K, *et al.* (2015). Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the open channel conformation. *Scientific Reports*.
- Watanabe J, Beck C, Kuner T, Premkumar LS, Wollmuth LP (2002). DRPEER: a motif in the extracellular vestibule conferring high Ca²⁺ flux rates in NMDA receptor channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22(23)**: 10209-10216.
- Westbrook GL, Mayer ML (1987). Micromolar concentrations of Zn²⁺ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* **328(6131)**: 640-643.
- Williams K (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular pharmacology* **44(4)**: 851-859.
- Williams K, Zappia AM, Pritchett DB, Shen YM, Molinoff PB (1994). Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Molecular pharmacology* **45(5)**: 803-809.
- Wollmuth LP, Kuner T, Seeburg PH, Sakmann B (1996). Differential contribution of the NR1- and NR2A-subunits to the selectivity filter of recombinant NMDA receptor channels. *The Journal of physiology* **491 (Pt 3)**: 779-797.
- Wu FS, Chen SC, Tsai JJ (1997). Competitive inhibition of the glycine-induced current by pregnenolone sulfate in cultured chick spinal cord neurons. *Brain research* **750(1-2)**: 318-320.
- Yuan H, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Traynelis SF (2009). Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29(39)**: 12045-12058.

Zheng F, Erreger K, Low CM, Banke T, Lee CJ, Conn PJ, *et al.* (2001). Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nat Neurosci* **4**(9): 894-901.

Zukin RS, Bennett MV (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDARI receptor subunit. *Trends in neurosciences* **18**(7): 306-313.