

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Denisa Fraňková**

Interakce glutamátových receptorů kainátového typu se steroidními látkami

The interaction of kainate subtypes of glutamate receptors with steroid compounds

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Praha, 2017

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

V Praze, 28. 4. 2017

.....

Denisa Fraňková

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Krůškovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, nespočet diskusí nad výsledky a především za trpělivost v průběhu vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z oddělení Buněčné neurofyzologie Fyziologického ústavu AV ČR a to především Mgr. Markovi Ladislavovi za užitečné připomínky, RNDr. Aleši Balíkovi, Ph.D. za poskytnutí DNA pro transfekci a jeho znalostí ohledně kainátových receptorů a Magdě Kuntošové za přípravu tkáňových kultur. Také bych ráda poděkovala svému konzultantovi doc. RNDr. Jiřímu Novotnému DSc., který dohlédl na to, abych splnila parametry diplomové práce, které Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy vyžaduje. Velký dík též patří mému blízkému okolí, které mě po celou dobu psaní podporovalo.

## **Abstrakt**

Kainátové receptory patří do rodiny glutamátových receptorů, mezi které se řadí také NMDA, AMPA a  $\delta$  receptory. Glutamátové receptory se hojně vyskytují v mozku, a proto se velmi dynamicky zkoumají a to především z hlediska farmakologie, neboť se vkládá velký potenciál do hledání nových a úzce specifických modulátorů, které by se mohly využít v léčbě neurodegenerativních onemocnění.

Cílem této práce bylo rozšířit poznatky o vlivu neurosteroidů na homomerní kainátové receptory (GluK1, GluK2, GluK3), u kterých je zkoumání modulace prostřednictvím neurosteroidů teprve v začátcích. Interakci homomerních kainátových receptorů s vybranými neurosteroidy (pregnenolon sulfát, pregnanolon sulfát, dehydroepiandrosteron, dehydroepiandrosteron sulfát) jsme zkoumali pomocí metody terčíkového zámku v konfiguraci měření proudů z celé buňky a také pomocí mikrospektrofluorimetrické metody. Zjistili jsme, že největší modulační efekt na homomerní kainátové receptory způsobuje pregnenolon sulfát, který inhibuje odpověď těchto receptorů na agonistu glutamát.

## **Klíčová slova**

kainátový receptor, glutamát, neurosteroidy, steroidy, metoda terčíkového zámku

## **Abstract**

Kainate receptors belong to the family of glutamate receptors, which include NMDA, AMPA and  $\delta$  receptors. Glutamate receptors are widely found in the brain and therefore they are very dynamically investigated, especially from view of pharmacology, because there is great potential for finding new and more specific modulators which could be used in the treatment of neurodegenerative diseases.

The aim of this work was to extend the knowledge about the influence of neurosteroids on homomeric kainate receptors (GluK1, GluK2, GluK3) in which is the study of modulation by neurosteroids still at the beginning. We have investigated interactions of homomeric kainate receptors with selected neurosteroids (pregnenolone sulfate, pregnanolone sulfate, dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate) by using patch clamp method in the configuration of whole-cell recording and also by using microfluorometry. We have found out that the biggest modulating effect on homomeric kainate receptors is caused by pregnenolone sulfate, which inhibits glutamate responses of these receptors.

## **Keywords**

kainate receptor, glutamate, neurosteroids, steroids, patch-clamp technique

# Obsah

1. Seznam zkratk.....	8
2. Úvod .....	10
3. Literární přehled .....	11
3.1. Struktura ionotropních glutamátových receptorů .....	11
3.2. Kainátové receptory a jejich struktura .....	13
3.2.1. N-terminální doména .....	14
3.2.2. Ligand vázající doména.....	16
3.2.3. Transmembránová doména .....	17
3.3. Farmakologie kainátových receptorů.....	18
3.3.1. Aktivace .....	18
3.3.2. Desensitizace .....	19
3.3.3. Deaktivace .....	21
3.3.4. Shrnutí .....	21
3.3.5. Antagonisté.....	22
3.3.6. Modulátory.....	22
3.4. Neurosteroidy PS, PAS, DHEA a DHEAS .....	24
3.4.1. Pregnenolon sulfát (PS) a pregnanolon sulfát (PAS) .....	24
3.4.2. Dehydroepiandrosteron (DHEA) a dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS) .....	27
4. Cíle diplomové práce .....	29
5. Materiály a metody .....	30
5.1. Elektrofyziologická měření .....	30
5.1.1. Metoda terčíkového zámku.....	30
5.1.2. Aparatura pro elektrofyziologická měření.....	32
5.1.3. Postup měření .....	32
5.1.4. Zpracování naměřených dat .....	33
5.2. Mikrospektrofluorimetrická metoda měření koncentrace volných vápenatých kationtů v cytoplasmě (calcium imaging) .....	34
5.2.1. Mikrospektrofluorimetrická metoda.....	34
5.2.2. Aparatura pro mikrospektrofluorimetrickou metodu.....	34
5.2.3. Postup měření .....	35
5.2.4. Zpracování naměřených dat .....	36
5.3. Statistické zpracování výsledků .....	36
5.4. Rovnice použité k výpočtům.....	36
5.5. Buněčné linie HEK293T.....	36
5.5.1. Transfekce.....	36

5.6.	Použité chemikálie, roztoky a média.....	37
5.6.1.	Roztoky pro elektrofyziologická měření.....	37
6.	Výsledky.....	39
6.1.	Optimalizace metod .....	39
6.1.1.	Transfekce.....	39
6.1.2.	Aplikační roztok .....	39
6.1.3.	Lektin Concanavalin A.....	40
6.2.	Účinek PS, PAS, DHEA a DHEAS na GluK1, GluK2 a GluK3 receptory .....	40
6.2.1.	GluK1 receptor.....	40
6.2.2.	GluK2 receptor.....	43
6.2.3.	GluK3 receptor.....	45
6.3.	Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci PS .....	49
6.4.	Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci glutamátu.....	50
7.	Diskuse.....	52
7.1.	Optimalizace metod – Concanavalin A.....	52
7.2.	Účinek PS, PAS, DHEA a DHEAS na GluK1, GluK2 a GluK3 receptory .....	52
7.3.	Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci PS .....	53
7.4.	Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci glutamátu.....	53
8.	Závěr .....	55
9.	Literatura .....	56
9.1.	Literární zdroje .....	56
9.2.	Internetové zdroje.....	63

## 1. Seznam zkratek

AMPA =  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina

AMPA/s = AMPA receptor/y

ConA = Concanavalin A

CNS = centrální nervová soustava

DHEA = dehydroepiandrosteron

DHEAS = dehydroepiandrosteron sulfát

EC<sub>50</sub> = koncentrace agonisty, při které má odpověď amplitudu 50 % maximální amplitudy

ECS = extracelulární roztok

FTS = fetální telecí sérum

GABAR/s = GABA receptor/y

Glu = kyselina glutamová

HEK293T = buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk

IC<sub>50</sub> = koncentrace antagonisty, při které má odpověď amplitudu 50 % kontrolní amplitudy

ICS = intracelulární roztok

iGluR/s = ionotropní glutamátový receptor/glutamátové receptory

KAR/s = kainátový receptor/kainátové receptory

LBD/s = ligand-vázající doména/domény

LTP = dlouhodobá potenciace

ME = mikroelektroda

NMDA = *N*-methyl-*D*-aspartátová kyselina

NMDAR/s = NMDA receptor/y



NTD/s = N-terminální doména/domény

P = pregnenolon

PAS = pregnanolon sulfát

PNS = periferní nervová soustava

PS = pregnenolon sulfát

TMD/s = transmembránová doména/transmembránové domény

## 2. Úvod

Glutamátové receptory jsou klasifikovány do dvou skupin – *ionotropní* a *metabotropní* (Partin et al. 1993). Metabotropní skupina je spojena se signalizací s G-proteiny a charakteristická je pro ni velká transmembránová doména (Bockaert & Pin 1999). Ionotropní glutamátové receptory jsou integrální membránové proteiny tvořící iontový kanál (Traynelis et al. 2010). Dělí se na NMDA, AMPA, kainátové a  $\delta$  receptory a tato práce pojednává právě o kainátových podtypech. Stejně jako ostatní ionotropní glutamátové receptory se skládají do tetramerů, které mohou obsahovat různé podjednotky (Partin et al. 1993). Konečný receptor v tetramerním uspořádání má velikost 400 – 600 kDa (Mayer 2016).

Kainátové receptory se vyskytují na presynaptické i postsynaptické membráně. Podle jejich podjednotkového složení a lokalizace na synapsi mají pak různorodou funkci (Traynelis et al. 2010). Předpokládá se, že jejich dysfunkce je spojena s mnoha neurologickými poruchami, jako jsou například poruchy bipolární či schizofrenie (Pickard et al. 2006).

Neurosteroidy jsou látky syntetizované v CNS, PNS a částečně i v některých gliových buňkách a periferních žlázách z cholesterolu, které značně ovlivňují neuronální aktivitu. Mnoho neurosteroidů působí na náš organismus skrze GABARs a NMDARs. Díky tomu se mohou podílet např. při navození spánku či regulaci úzkosti. Jedny z významných neurosteroidů CNS jsou pregnenolon (P) pregnenolonsulfát (PS), dehydroepiandrosteron (DHEA) a dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS), které se nacházejí v celém mozku a to v mnohem vyšší koncentraci v porovnání s koncentrací daných neurosteroidů v plasmě (Baulieu & Robel 1990; Baulieu 1998; Mellon & Griffin 2002).

Z mnoha studií vyplývá, že neurosteroidy hrají roli v širokém spektru neurologických a psychiatrických onemocnění (například deprese, epilepsie), a díky tomu by mohly být využívány k léčbě pacientů s těmito poruchami (Reddy 2010).

### 3. Literární přehled

#### 3.1. Struktura ionotropních glutamátových receptorů

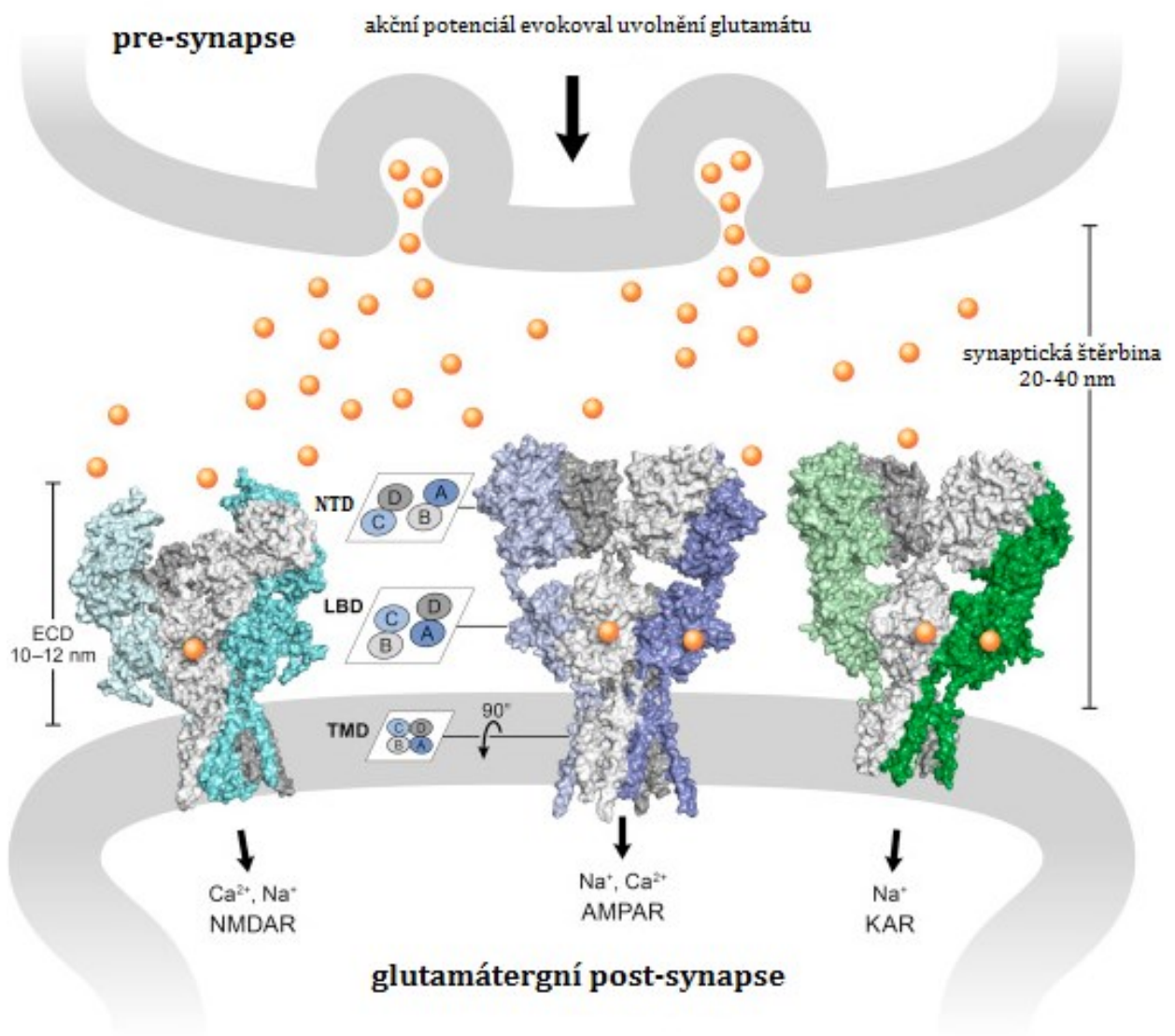
Rodina ionotropních glutamátových receptorů má několik členů. Ty se dělí podle selektivních agonistů na *NMDA receptory* a *non-NMDA receptory*. Zatímco non-NMDA receptorům stačí pro aktivaci L-glutamát, NMDA receptory vyžadují kromě L-glutamátu i glycin/D-serin, až na výjimku o podjednotkovém složení GluN1/GluN3 (Mayer et al. 1984; Kemp & McKernan 2002; Chatterton et al. 2002; Madry et al. 2008).

Pro tuto rodinu receptorů je charakteristické tetramerní uspořádání podjednotek. Zatímco NMDARs se skládají pouze do heterotetramerů, AMPARs a KARs fungují i v homotetramerním uspořádání (Mayer et al. 1984). U  $\delta$  receptorů je zatím prokázána jen tvorba homotetramerů (Traynelis et al. 2010).

Všechny čtyři podjednotky těchto homo/hetero-tetramerů jsou, jak je znázorněno v **obrázku č. 1**, složené z několika domén, které mají různé funkce (Kuusinen et al. 1995). Extracelulární část tvoří *N-terminální doména (NTD; v některých člancích označována jako doména amino-terminální - ATD)* společně s *doménou ligand-vázající (LBD)* (Sobolevsky et al. 2009). LBD tvoří vazebná místa pro agonisty a antagonisty, a je tak stěžejní strukturou pro regulaci otevírání/zavírání kanálu. Jakékoliv narušení LBD struktury vede k inaktivaci receptoru a je i součástí silné desensitizace u AMPA a kainátových receptorů (Zhu & Gouaux 2017). Interakce mezi NTD a LBD se ale u jednotlivých podtypů receptorů liší. Kainátové a AMPA receptory nemají tak pevné sbalení jako NMDA receptory, u kterých potom NTD funguje jako regulátor aktivity kanálu (Yuan et al. 2009). Nicméně Karakas a jeho kolegové se domnívají, že je tato funkce NTD u NMDA receptorů způsobena hydrofóbním místem v R2 části NTD GluN2B podjednotky (Karakas et al. 2009).

Extracelulární část receptorů je propojená s *transmembránovou doménou (TMD)*, která zastává funkci vlastního iontového kanálu. Tato doména je složena ze čtyř M smyček. (Karakas & Furukawa, 2014).

Iontový kanál se pak otvírá po navázání agonisty do LBD, které způsobí zavření vazebného místa a změnu konformace TMD (Sobolevsky et al. 2009).



**Obrázek č. 1: Ionotropní glutamátové receptory na synapsi**

Žluté kuličky znázorňují neurotransmitter glutamát.

Zkratka ECD značí extracelulární doménu.

Převzato a upraveno z (Zhu & Gouaux 2017)

### 3.2. Kainátové receptory a jejich struktura

Kainátové receptory mohou být složené z podjednotek GluK1 – GluK5, přičemž podjednotky GluK1 – GluK3 mohou tvořit heterotetramery i homotetramery, zatímco podjednotky GluK4 a GluK5 tvoří funkční receptory pouze tehdy, pokud dojde ke společné expresi s GluK1 – GluK3 (Partin et al. 1993). Homotetramerní kombinace receptorů GluK1–3 jsou popsány jako nízkoafinitní kainátové receptory, zatímco GluK4-5 jako vysokoafinitní kainátové receptory (Fletcher & Lodge 1996). To znamená, že výsledný heteromerní receptor má vyšší afinitu ke glutamátu. Uvádí se, že nejvíce rozšířenou variantou KARs v mozku jsou GluK2/GluK5 receptory (Mayer 2016).

Vzhledem k tomu, že se v průběhu zkoumání glutamátových receptorů změnilo značení jejich podjednotek, přikládám **tabulku č. 1**, ve které je uvedené staré i nové značení podjednotek KARs.

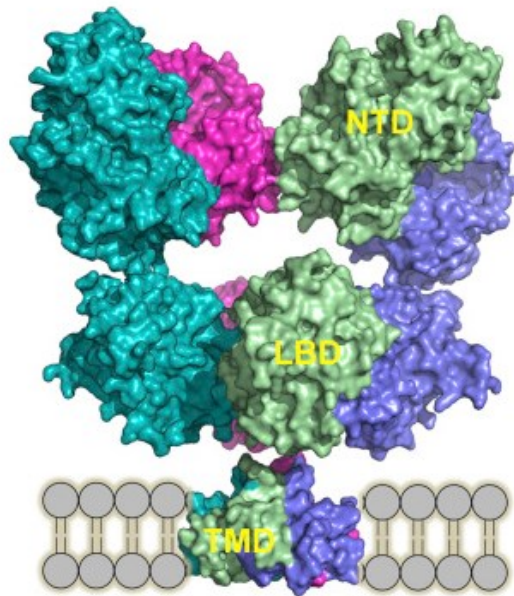
**Tabulka č. 1: Shrnutí starého a nového podjednotkového značení**

<b>staré značení</b>	GluR5	GluR6	GluR7	KA1	KA2
<b>nové značení</b>	GluK1	GluK2	GluK3	GluK4	GluK5

Převzato a upraveno z (Traynelis et al. 2010)

Ve své práci se zabývám homotetramerními typy receptorů, a proto v této kapitole budu popisovat převážně jejich strukturu. Zároveň je třeba podotknout, že ze všech typů KARs je nejlépe prozkoumaná struktura u těchto typů, kdežto na strukturu GluK4 a GluK5 se v současnosti intenzivně pracuje.

Na **obrázku č. 2** je znázorněna struktura GluK2 receptoru s vyznačenými jednotlivými doménami.



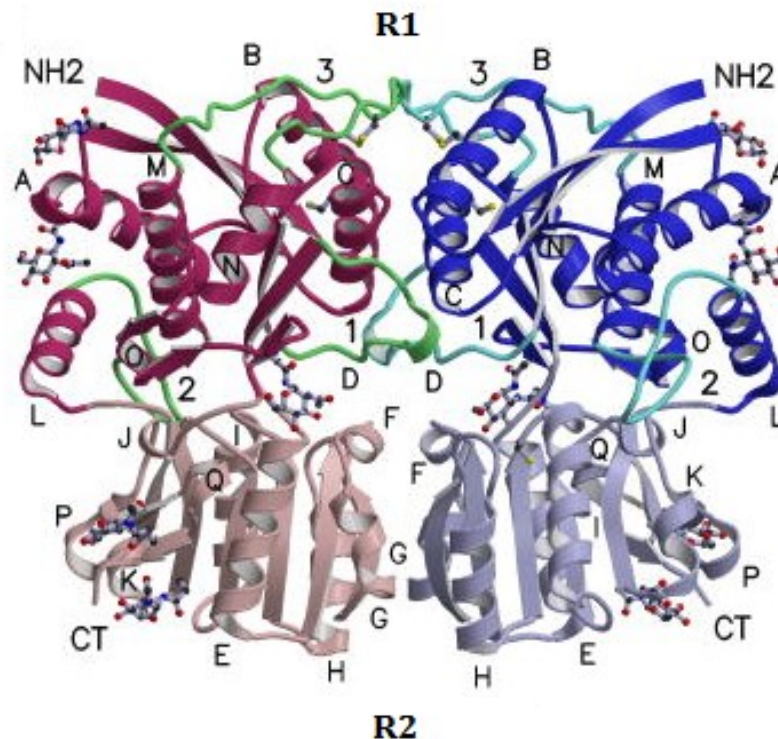
**Obrázek č. 2: Struktura GluK2 receptoru**

(Møllerud et al. 2017)

### 3.2.1. N-terminální doména

Tato doména je tvořená ze dvou dimerů a dále je pak linkery napojená na LBD, se kterou společně tvoří extracelulární část receptoru. Každá z těchto domén má svou důležitou funkci pro receptor. Konkrétně NTD je stěžejní pro sestavení tetramerní struktury receptoru (Møllerud et al. 2017).

V současné době jsou známy struktury NTD receptorů GluK2, GluK3 a GluK5, přičemž NTD dimery GluK2 a GluK3 si jsou podobné, zatímco GluK5 NTD dimer je rozdílný (Kumar & Mayer 2010; Møllerud et al. 2017). Konkrétně aminokyselinové sekvence NTDs, receptorů GluK1–3 vykazují 68 – 75% homologii a receptory GluK4–5 sdílí 65 %. Pouze 25 – 27 % aminokyselinové sekvence je sdíleno mezi těmito dvěma typy KARs. Navzdory této nízké homologii se došlo k výsledkům, které ukazují značnou příbuznost celkové struktury NTD mezi GluK3 a GluK5. NTD se dle těchto výsledků dělí na dvě části, R1 a R2, jak je vidět na **obrázku č.3**, které jsou propojeny třemi krátkými smyčkami (Kumar & Mayer 2010). Je známo, že ony dva dimery, které se následně skládají do tetrameru, jsou u GluK2 propojeny prostřednictvím zbytků na laterálním okraji R2 části (Das et al. 2010).



**Obrázek č. 3: Struktura NTD GluK2 receptoru**

Převzato a upraveno z (Kumar et al. 2009)

Struktura NTD GluK3 a GluK2 je téměř identická s výjimkou **jednoho helixu** ve smyčce mezi jedním betavlákem a helixem, **který je u GluK3 navíc**. Zároveň R1 a R2 část mají u těchto dvou receptorů podobnou orientaci.

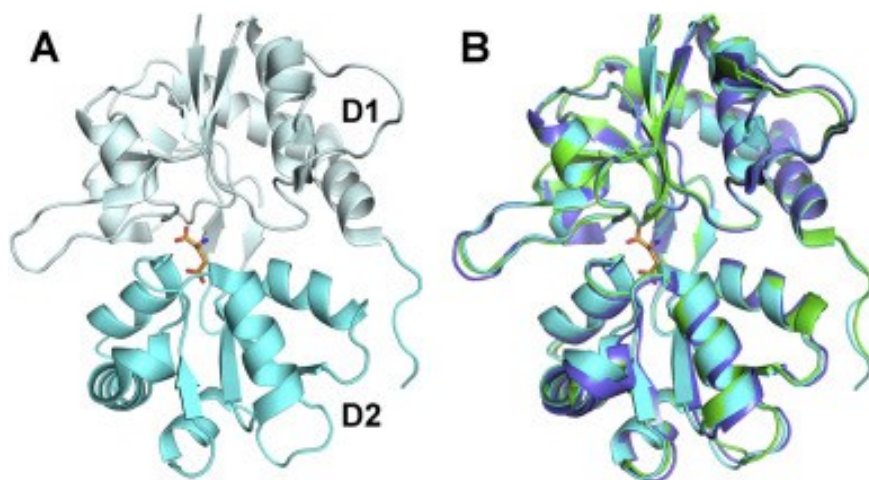
Mezi strukturami NTDs GluK2-3 a GluK5 je podstatně více rozdílů. Jedním z nich je vazebné místo pro ionty u GluK2-3 receptorů. Je možné, že toto vazebné místo v dané smyčce stabilizuje její konformaci potřebnou pro interakci NTD s extracelulárními doménami dalších membránových proteinů (Kumar & Mayer 2010).

Výše citovaný článek se zabývá též různými disulfidickými vazbami a glykosylačními místy u jednotlivých KARs, interakcí R1 a R2 částí a jejich rotací v rámci dimerů. Nejzajímavějším zjištěním byl fakt, že stupeň rotace u GluK5 byl větší než u NTDs GluK3-2 subtypů. Tato konformační heterogenita je nejspíš důsledkem změn v kontaktu na rozhraní R1 dimeru, kde rozdílné aminokyselinové složení a jejich vzájemné interakce v případě GluK5 může způsobovat volnější sbalení v rozhraní R1 dimeru. U GluK3-2 je více interakcí na rozhraních dimerů, a proto jsou tyto spoje pevnější (Kumar et al. 2009).

### 3.2.2. Ligand vázající doména

Tato doména je, stejně jako NTD, tvořená ze dvou dimerů. Nicméně tetramer LBD je vůči tetrameru NTD mírně pootočen, což je vidět na **obrázku č. 1** (Møllerud et al. 2017).

V současné době je LBD struktura známá jen u nízkoafinitních KARs, na struktuře LBD u vysokoafinitních KARs se intenzivně pracuje. O LBD nízkoafinitních KARs se zjistilo, že je jejich struktura velmi podobná, jak lze vidět na **obrázku č. 4**, a proto většinou články popisují jen jeden, jimi vybraný, podtyp receptoru.



**Obrázek č. 4: LBD GluK1 s navázaným glutamátem (A) + Překrytí LBDs GluK1 - GluK3 s navázaným glutamátem (B)**

*Oranžovou barvou je vyznačen S-glutamát.*

(Møllerud et al. 2017)

Z **obrázku č. 4** je také patrné, že se LBD dělí na dvě části (D1 a D2), mezi kterými je vazebné místo pro ligand glutamát, další agonisty a kompetitivní antagonisty. Jelikož je struktura LBD GluK1 - GluK3 receptorů tak podobná, také vazba glutamátu do jeho vazebného místa je srovnatelná (Møllerud et al. 2017).

Detailní popis vazby glutamátu a dalších agonistů i antagonistů do LBDs nízkoafinitních KARs je rozebrán ve výše citovaném přehledném článku. Zároveň jsou v něm i blíže rozebrány strukturní odlišnosti LBDs GluK1 - GluK3 receptorů, které i přes vysokou podobnost jejich LBDs lze najít.



### 3.2.3. Transmembránová doména

Tato doména tvoří přímo iontový kanál daného receptoru a přispívá ke stabilitě tetramerních iGluRs (Tobi 2016). U kainátových receptorů určuje TMD jejich modulaci, čili je pravděpodobné, že regulace kanálu závisí na kontaktech v membráně (Wilding et al. 2014). Nejnovější poznatky o struktuře TMD u KARs popisují, že je tato doména složena z dvanácti  $\alpha$ -helixů a čtyř smyček (Møllerud et al. 2017).

TMDs jsou zajímavé především z hlediska své funkce, zatímco jejich struktura je vcelku jednoduchá. Domnívám se, že právě proto jsou TMDs obecně zkoumány spíše z hlediska farmakologie, a proto i já se na tuto doménu zaměřím více až v následující kapitole, která pojednává právě o farmakologii KARs.

### 3.3. Farmakologie kainátových receptorů

V této kapitole je popsána farmakologie kainátových receptorů, čili proces aktivace, desensitizace a deaktivace u KARs.

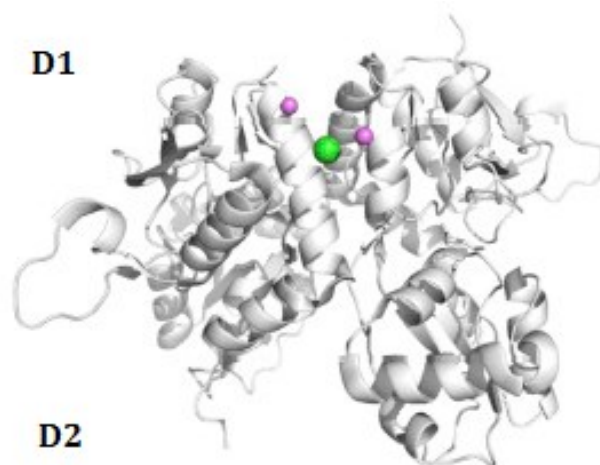
#### 3.3.1. Aktivace

Obecně pro iGluRs platí, že navázání agonisty způsobí konformační změny v LBD. Konkrétně se oblast D2 přivře kolem ligandu. Znamená to tedy, že po navázání agonisty dochází k zavírání LBD (Armstrong & Gouaux 2000).

Různí agonisté mají různou účinnost, a zároveň způsobují různou míru zavření LBD. V některých případech platí, že čím silněji je zavřená LBD, tím větší efekt agonista má. Například když se do LBD GluK1 naváže glutamát, způsobí úplné zavření domény, což koreluje s tím, že je glutamát plným agonistou. Oproti tomu částeční agonisté kainát a domoát způsobují při svém navázání menší uzavření LBD GluK1. Tento jev je způsoben v případě kainátu přítomností isopropenylové skupiny a v případě domoátu skupiny 5-karboxy-1-methyl-hexa-1,3-dienylové (Møllerud et al. 2017). Jiným způsobem se ale chová dysiherbain a jeho analoga. Zde neplatí, že by s pevnějším uzavřením LBD docházelo k vyšší účinnosti. Způsobují totiž téměř úplné zavření LBD, ale jejich účinnost je rozdílná (Frydenvang et al. 2009; Unno et al. 2011). Plné uzavření LBD je vidět u všech agonistů, které byly krystalizovány v LBD GluK2 a GluK3 s výjimkou kainátu a v případě GluK2 i domoátu, kteří způsobili menší míru zavření LBD (Møllerud et al. 2017).

Z předchozího odstavce je patrné, že má GluK1 nižší vazebnou afinitu pro kainát ve srovnání s GluK2 a GluK3. Tento fakt by mohl být zapříčiněn strukturální odlišností mezi GluK1 a GluK2-3, která pro GluK1 znamená oslabení kontaktu mezi D1 a D2 (Møllerud et al. 2017).

Kromě přítomnosti agonisty potřebují KARs ke své aktivaci přítomnost iontů. Konkrétně bylo zjištěno, že pro aktivaci glutamátem je nutná přítomnost sodných a chloridových iontů. Tyto ionty jsou důležité pro stabilizaci dimeru LBD. To znamená, že v případě nepřítomnosti těchto iontů je dimer destabilizován, což zvyšuje rychlost desensitizace (Plested & Mayer 2007; Plested et al. 2009). Na **obrázku č. 5** jsou znázorněna vazebná místa pro anionty a kationty v dimerovém rozhraní LBD GluK1.



**Obrázek č. 5: Vazebná místa pro anionty a kationty v dimerovém rozhraní LBD GluK1**

*Zeleně je znázorněno vazebné místo pro anionty ( $\text{Cl}^-$ )*

*Fialově je znázorněno vazebné místo pro kationty ( $\text{Na}^+$ )*

Převzato a upraveno z (Brent Dawe et al. 2013; Møllerud et al. 2017)

Prostřednictvím dalších pokusů s monovalentními kationty se zjistilo, že  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  a  $\text{Cs}^+$  ionty se také mohou vázat na kainátové receptory, nicméně s nižší afinitou a účinností oproti  $\text{Na}^+$  iontům (Plested et al. 2009).

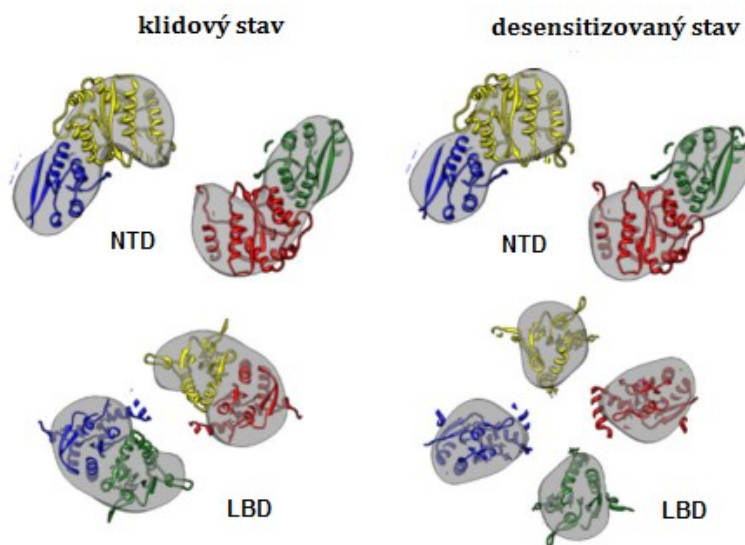
Další studie popisuje, že ačkoliv jsou si vazebná místa pro anionty a kationty funkčně i fyzikálně podobná, tak pouze kationty, nikoliv anionty, významně ovlivňují reakci agonistů na KARs. Konkrétně je stěžejní vazba daného kationtu na methionin 770. Předpokládá se tedy, že klíčovým faktorem pro účinnost agonisty je stabilizace konformace vhodné pro vazbu agonisty, což je regulováno jak agonistou samotným tak externími kationty (MacLean et al. 2011).

### **3.3.2. Desensitizace**

Po navázání agonisty a následné aktivaci kanálu dochází k takzvané desensitizaci, což znamená, že i přes navázaného agonistu přechází receptor do uzavřené konformace iontového kanálu (Meyerson et al. 2014).

Nejvíce se účastní desensitizace LBD a TMD. LBD velmi dynamicky mění svou konformaci, což prostřednictvím linkerů mezi jednotlivými doménami způsobí změny i v NTD a TMD.

Jak je patrné z **obrázku č. 6**, NTD prochází jen malou změnou v podobě rotace. Tato doména tedy zůstává v dimerním uspořádání. Jiná situace je u LBD, kde dochází k rozvázání dimerního uspořádání na čtyři protomery. Hovoří se zde o tvorbě takzvané prstencové struktury, jejíž narušení pak pravděpodobně vede k navrácení receptoru do klidového stavu. Je tedy možné, že po odvázání agonisty a následném otevření LBD dojde k narušení této prstencové struktury. Závěrem je pak přeskupení zpět do klidového stavu receptoru s intaktními LBD dimery (Schauder et al. 2013; Meyerson et al. 2016).



**Obrázek č. 6: NTD a LBD GluK2 receptoru v klidovém a desenzitizovaném stavu**

Na obrázku jsou znázorněny strukturální změny probíhající v průběhu desenzitizace u NTD a LBD. Z obrázku je patrné, že LBD prochází značnou změnou, kdy dochází k separaci dimerů na protomery.

Převzato a upraveno z (Schauder et al. 2013)

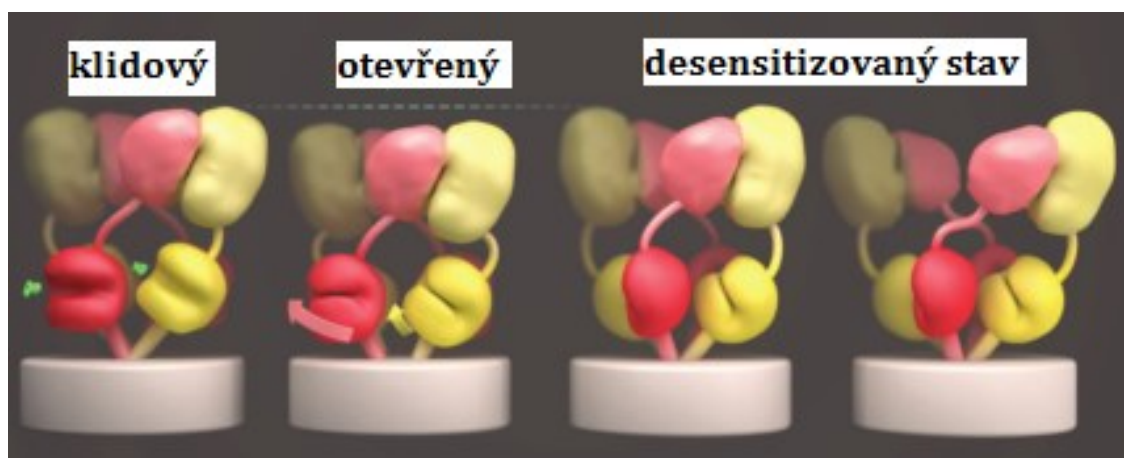
TMD reaguje na konformační změny LBD zavřením iontového kanálu, které nastává poté, co transmembránové linkery zaujmou planární uspořádání. Tato pozice transmembránových linkerů během desenzitizace se liší od jejich uspořádání při zavřeném stavu, kdy zaujímají polohu zkrouceného hranolu. Samotné zavření TMD probíhá tak, že se M3 helix propojí křížem s pre-M1 helixem, a vytvoří tak šroubovici, kterou obalí iontový kanál zvenku (Sobolevsky et al. 2009; Meyerson et al. 2014).

### 3.3.3. Deaktivace

Obecně platí, že deaktivace nastává po odváznání agonisty. Jelikož KARs ale vyžadují ke své aktivaci i kationty, zkoumalo se, konkrétně na GluK2 receptorech, zda je odváznání agonisty a kationtů nějak propojeno. Z pokusů vzešlo, že deaktivace nastane, když se odváže agonista, zatímco kationt je stále navázaný, kdežto desensitizace nastane, když je ligand navázaný, ale kationt ne. Teoreticky by tedy desensitizace neměla nastat, pokud je kationt ještě navázan. Vypadá to tedy, jakoby přítomnost navázaného kationtu byla stěžejní pro udržení receptoru s navázaným agonistou v aktivovaném stavu. Tato závislost na vazbě kationtů je pro KARs unikátní, a proto by se nabízela možnost potenciálního využití k ovlivnění odpovědí nativních KARs v centrálních synapsích (Brent Dawe et al. 2013).

### 3.3.4. Shrnutí

Obecně lze říci, že jsou si strukturální změny během aktivace-desensitizace-deaktivace u iGluRs podobné. Usuzuje se tak na základě podobností mezi jednotlivými iGluRs. Rovněž je zřejmé, že během aktivace a desensitizace hrají hlavní úlohu LBDs společně s TMDs. Pomocí **obrázku č. 7** lze popsat celý mechanismus (Meyerson et al. 2014).



**Obrázek č. 7: Znárodnění konformačních změn během otevírání a desensitizace ionotropních glutamátových receptorů**

*Do receptoru v klidovém stavu se naváže glutamát, který způsobí uzavření a otočení LBD. To zároveň znamená i změny v NTD a TMD, neboť jsou tyto domény propojeny linkery. Konkrétně linkery TMD se od sebe oddálí, a dojde tak k otevření kanálu. Během desensitizace se iontový kanál uzavře, nicméně v LBD je stále ještě navázaný glutamát (Sobolevsky et al. 2009; Meyerson et al. 2014).*

*Přerušovaná čára nad otevřeným stavem značí zkrácení receptoru díky rotaci, pomocí které dochází k otevření kanálu.*

*Zelené kuličky značí glutamát.*

Převzato a upraveno z (Meyerson et al. 2014)

### **3.3.5. Antagonisté**

Antagonisté mohou být *kompetitivní* nebo *nekompetitivní* vůči agonistovi. V obou případech se jedná o látky, které zabraňují otevření kanálu. Předpokládá se, že se kompetitivní antagonisté vážou do LBD přímo do vazebného místa agonisty či do jeho těsné blízkosti, a tím stabilizují tuto doménu v otevřené konformaci a blokují navázání agonisty, a tím i aktivaci receptoru. Nekompetitivní antagonisté se vážou blíže či přímo do TMD, čili mimo vazebné místo pro agonistu, a proto není možné je vytlačit nadbytkem agonisty jako v případě kompetitivního antagonisty. Mechanismus účinku mohou mít různý (Sobolevsky et al. 2009; Traynelis et al. 2010).

Objevováním nekompetitivních antagonistů se zabývala skupina Kaczor a spol., která mimo jiné identifikovala i deriváty indolu a karbazolu jako nekompetitivní antagonisty GluK2 receptorů. Zjistili také, že zatímco aktivita indolových derivátů je v mikromolárním rozsahu, deriváty karbazolu aktivitu postrádají. Zároveň také odhalili vazebné místo pro deriváty indolu, které se nachází v oblasti mezi LBD a TMD na jedné podjednotce (Kaczor et al. 2015). Nekompetitivními antagonisty GluK1 a GluK3 receptorů se zabývala například skupina Sköld a spol. (Sköld et al. 2014).

Mezi kompetitivní antagonisty AMPARs ale i KARs patří například CNQX spadající do skupiny quinoxalinedionů. CNQX zde zmiňuji především proto, že jsme ho používali při transfekci (viz metody). Obecný souhrn dalších antagonistů a dále i agonistů i různých modulátorů je rozebrán v přehledných člancích (Traynelis et al. 2010) a (Møllerud et al. 2017).

### **3.3.6. Modulátory**

Modulátorů KARs je mnoho, a proto v této práci popisují jen několik vybraných zástupců. Velkou skupinou modulátorů KARs jsou ionty, konkrétně ionty vápníku, bária, hořčíku a zinku. Ty mohou potencovat či inhibovat proudové odpovědi nativních i rekombinantních receptorů. Například zinek může mít efekt jak inhibiční, tak potenciační, čili může

fungovat jako pozitivní i jako negativní alosterický modulátor. Závisí při tom na podjednotkovém složení daného receptoru, ale i na koncentraci zinečnatých kationtů a pH. Zároveň také platí, že pokud KAR zahrnuje podjednotku GluK4 či GluK5, pak je tento receptor citlivější k zinku, a také k dalším endogenním modulátorům (Hoo et al. 1994; Fukushima et al. 2003; Mott et al. 2008; Veran et al. 2012).

Zajímavým modulátorem jsou také extracelulární protony, které inhibují KARs s výjimkou receptorů, které obsahují GluK4 podjednotku. U nich fungují protony naopak jako pozitivní alosterické modulátory. (Mott et al. 2003).

Dalšími možnými modulátory jsou lektiny. Konkrétně bych ráda zmínila *concanavalin A* (*ConA*), který jsem používala pro své experimenty (viz metody). ConA funguje jako ireversibilní blokátor silné desensitizace a zároveň jako látka zvyšující afinitu agonisty u některých KARs. Díky tomu nevratně potencuje agonistou evokované proudy. Předpokládá se, že se ConA váže do N-glykosylované části NTD (Partin et al. 1993; Everts et al. 1997; Everts et al. 1999).

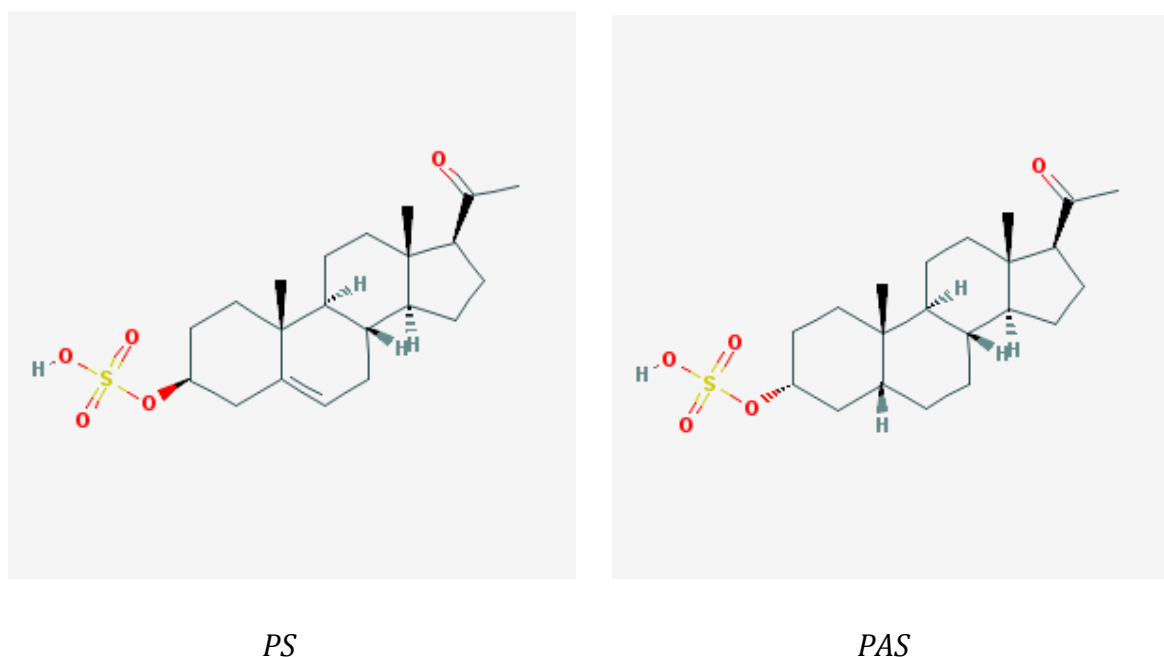
Mezi modulátory KARs se řadí i neurosteroidy, kterým je věnovaná následující kapitola.

### 3.4. Neurosteroidy PS, PAS, DHEA a DHEAS

Jelikož se tato diplomová práce zabývá kainátovými receptory, které spadají do rodiny glutamátových receptorů, zaměřím se zde především na účinek těchto neurosteroidů na rodinu glutamátových receptorů.

#### 3.4.1. Pregnenolon sulfát (PS) a pregnanolon sulfát (PAS)

Strukturálně si jsou tyto dva neurosteroidy velmi podobné. Jsou hydrofobní s polárně nabitou skupinou. PAS má oproti PS planární uspořádání a o jednu dvojnou vazbu méně, jak je vidět na **obrázku č. 8** (Smith et al. 2014).



**Obrázek č. 8: Chemické struktury neurosteroidů PS a PAS**

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Pregnenolon sulfát** ovlivňuje mnoho různých receptorů a je jedním z nejčastěji se vyskytujících neurosteroidů v CNS. Jako o endogenním neurosteroidu se o něm mluví od roku 1983 (Corpéchet et al. 1983). V lidských i hlodavčích mozcích je PS přítomný ve fyziologické koncentraci, avšak jeho koncentrace není v celém mozku stejná (Smith et al. 2014). Například hipokampus lidského mozku obsahuje kolem 5 nmol/kg PS, zatímco frontální kortex kolem 6 nmol/kg a hypotalamus kolem 45 nmol/kg. Koncentrací PS v dalších částech mozku zdravých jedinců ale i pacientů s Alzheimerovou demencí se více zabývá článek od Sébastiena Weill-Engerera a jeho kolegů (Weill-Engerer et al. 2002).

PS velkou měrou moduluje glutamatergický excitační synaptický přenos, který je základem učení a paměti. Ovlivňuje především NMDARs a to dvěma cestami. PS může



interagovat s NMDARs *přímo jako alosterický modulátor* a to už v koncentracích pM a nM. V takovém případě se jedná o rychlý efekt. Vzhledem k tomu, že koncentrace PS v mozku jsou nM či vyšší, může mít PS značnou fyziologickou roli právě jako neuromodulátor neurotransmiterů (Smith et al. 2014). Druhou možností ovlivňování NMDARs pregnenolon sulfátem je prostřednictvím *přesunu a zabudování (trafficking) funkčních receptorů* na buněčný povrch, kdy PS tento proces stimuluje. I k tomuto účinku stačí nízká koncentrace PS (nM). Jedná se ale o delší proces, a tak může také vznikat opožděná odpověď NMDARs, která je typická pro tento typ receptoru obsahujícího podjednotky GluN2A nebo GluN2B (Kostakis et al. 2013). Vzhledem k tomuto faktu, že PS přispívá k zabudování NMDARs do membrány, vznikl předpoklad, že by tento neurosteroid mohl zlepšovat paměť, neboť NMDARs souvisí s dlouhodobou potenciací (LTP). Z hipokampálních řezů již bylo zjištěno, že PS (300 nM) zvyšuje LTP, a zároveň zlepšuje prostorovou paměť u potkanů při behaviorálních testech (Flood et al. 1995; Sliwinski et al. 2004). PS však zvyšuje LTP jen v některých částech mozku, v jiných ji naopak inhibuje. Zároveň se také zjistilo, že PS potencuje i krátkodobou potenciací (Smith et al. 2014).

Funkce PS jako alosterického modulátoru je rovněž velmi zkoumaná, a proto je o ní již známo hned několik parametrů. Zjistilo se, že modulace NMDARs je podjednotkově specifická. Zatímco na NMDARs obsahující GluN2A či GluN2B podjednotky působí PS potenciačně, na NMDARs obsahující GluN2C a GluN2D podjednotky působí PS inhibičně (Yaghoubi et al. 1998; Malayev et al. 2002). Zároveň ale také může modulace PS záviset na pH a to konkrétně v případech NMDARs s podjednotkami GluN2A a GluN2D (Kostakis et al. 2011). Také se zjistilo, že je modulace NMDARs PS ovlivněná fosforylací receptoru (Petrovic et al. 2009). V současné době se také zkoumá působení intra- i extra-celulárního prostředí buňky. Například Divyan A. Chopra se svými kolegy dělali elektrofyziologické pokusy na NMDARs s GluN2A podjednotkami a zjistili, že intracelulární prostředí a výskyt vápenatých kationtů v extracelulárním prostředí ovlivňuje to, zda PS bude působit jako potenciační nebo inhibiční neuromodulátor na tomto typu receptoru. Nicméně používali ke svému výzkumu více typů elektrofyziologických metod a jen u některých došli k těmto výsledkům. Zároveň poukazují na fakt, že také záleží na způsob aplikace, tedy zda je PS pre- či ko-aplikovaný s agonistou. Ve své práci připomínají, že efekt PS na NMDARs nastává prostřednictvím fosforylace, a tak může mít vnitřní prostředí vliv na modulaci tímto neurosteroidem a dále, že se vazebné místo pro PS nachází na smyčce mezi TM3 a TM4 v TMD (Horak et al. 2006). K těmto faktům přidává Divyan A. Chopra se svými kolegy myšlenku, že by mohla být pozitivní modulace zprostředkovávána skrze GluN2

podjednotku a ta inhibiční skrze podjednotku GluN1. Důležitým poznatkem také je, že PS ovlivňuje NMDARs především modulací průměrného času otevření. Čili PS ve funkci pozitivního modulátoru prodlužuje průměrnou dobu otevření kanálu a jako negativní modulátor ji snižuje (Chopra et al. 2015)

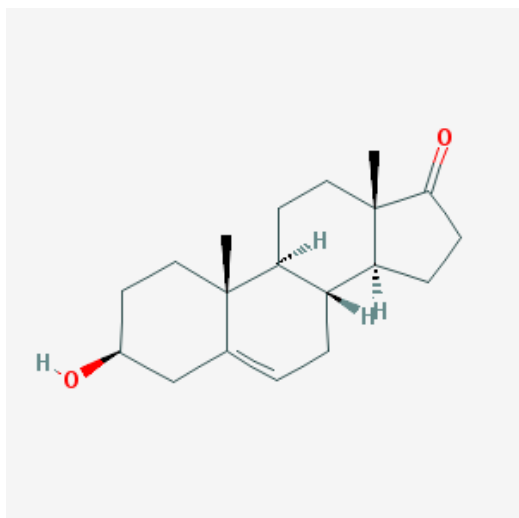
V současné době je PS vnímán jako slibný kandidát na zlepšení kognitivních funkcí, což je velmi žádoucí vzhledem k mnoha neurodegenerativním onemocněním, které mnohdy souvisí právě se zhoršující se schopností učit se. Zajímavá je též myšlenka, že by právě změna ve steroidogenezi mohla být jednou z příčin ztráty paměti, která doprovází mnoho neurodegenerativních onemocnění a stárnutí obecně. Konkrétně se nyní uvažuje o PS jako o potenciálním terapeutickém přípravku proti Alzheimerově chorobě a ke snížení příznaků podobných depresi (Smith et al. 2014).

**Pregnanolon sulfát**, byť se strukturně jen nepatrně liší od PS, má na NMDARs účinek inhibiční. Konkrétně působí jako nekompetitivní antagonist. Jeho účinek je však podmíněn přítomností agonisty (NMDA či glutamát), čili váže/odvazuje se jen tehdy, je-li receptor v aktivovaném stavu. Inhibičně na NMDARs působí snížením pravděpodobnosti otevření tohoto iontového kanálu a doby, po kterou je receptor v otevřené konformaci (Park-Chung et al. 1994; Park-Chung et al. 1997; Weaver et al. 2000; Petrovic 2005). Rovněž se zjistilo, že inhibice prostřednictvím PAS není závislá na napětí, a proto se předpokládá, že se jeho vazebné místo nachází mimo iontový kanál (Park-Chung et al. 1994; Abdrachmanova et al. 2001). Dalším výzkumem se zjistilo, že PAS snižuje pravděpodobnost otevření prodloužením doby, po kterou receptor zaujímá zavřenou konformaci, čili zvyšuje stabilitu zavřeného stavu daného receptoru, a tím způsobuje, že se receptory akumulují ve stavu desenzitizovaném. Konečným efektem tedy je, že se receptory dostávají do konformace desenzitizovaného stavu a to většinou na úkor otevřených stavů receptů, čímž dochází k inhibičnímu efektu (Kussius et al. 2009).

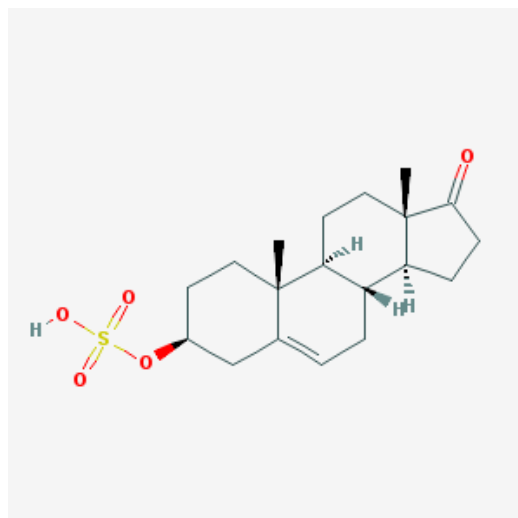
AMPARs a KARs nejsou z hlediska neurosteroidů tak dobře prozkoumané jako NMDARs, nicméně některé studie popisují účinek PS a PAS na některé z podtypů AMPARs a KARs. Zjistilo se, že oba tyto neurosteroidy působí na GluA1, GluA3 AMPARs a GluK2 KARs inhibičně. Tato inhibice je nekompetitivní a na napětí nezávislá (Yaghoubi et al. 1998; Shirakawa et al. 2005; Sedláček et al. 2008).

### 3.4.2. Dehydroepiandrosteron (DHEA) a dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS)

Tyto dva neurosteroidy jsou si svou strukturou velmi blízké, neboť se liší pouze přítomností sulfátové skupiny v případě DHEAS. Jejich struktury znázorňuje **obrázek č. 9**.



*DHEA*



*DHEAS*

**Obrázek č. 9: Chemické struktury neurosteroidů DHEA a DHEAS**

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Oba tyto neurosteroidy se nacházejí v různých částech mozku a modulují funkci několika receptorů. Koncentrace v různých částech mozku se ale liší. Například DHEA je hojně zastoupen v hypotalamu (kolem 90 nmol/kg) a méně v mozečku (kolem 30 nmol/kg). DHEAS je zastoupen v hypotalamu naopak méně (kolem 25 nmol/kg) a více v mozečku (kolem 65 nmol/kg). Koncentrací DHEA a DHEAS v dalších částech mozku zdravých jedinců ale i pacientů s Alzheimerovou demencí se více zabývá článek Sébastiena Weill-Engerera a jeho kolegů (Weill-Engerer et al. 2002).

DHEA i DHEAS mají funkci pozitivního alosterického modulátoru NMDARs a to už při koncentracích v rozmezí 1 pM – 1nM (Compagnone & Mellon 1998). Oproti tomu ve vysokých koncentracích (stovky až tisíce  $\mu$ M) DHEA i DHEAS inhibují proudy vyvolané agonistou u NMDARs, AMPARs i KARs (Yaghoubi et al. 1998). Tyto neurosteroidy by tedy mohly být slibnými preparáty pro ochranu proti NMDA indukované excitotoxicitě. (Kimonides et al. 1998). Dalšími výzkumy se zjistilo, že je DHEAS pozitivním modulátorem synaptické transmise v savčích mozcích a že indukuje krátkodobou potenciaci prostřednictvím aktivace mGluRs v potkaním hipokampu (Xu et al. 2012)

DHEA a DHEAS jsou u lidí nejvíce rozšířenými neurosteroidy v těle během vývoje a po adrenarche a jejich hladina pak klesá se stářím a také s některými nemocemi či stresem (Orentreich et al. 1992). Ukázalo se, že u akutních modelů míšňí a cerebrální ischemie DHEA redukuje neuronální i gliové poškození a to nejspíš skrze GABA(A) receptory (Lapchak et al. 2000). Také se prokázalo, že po podání či přidání DHEA v průběhu ischemického poškození, dochází k redukci poškození hipokampální CA1 oblasti (Li et al. 2001).

#### **4. Cíle diplomové práce**

- 1) Prohloubit znalosti o kinetice a farmakologii homomerních KARs a na základě toho vhodně sestavit parametry pokusů.
- 2) Zjistit, jaký účinek mají vybrané neurosteroidy (PS, PAS, DHEA, DHEAS) na homomerní typy KARs (GluK1, GluK2, GluK3) exprimované v HEK293T buňkách a následně je mezi sebou porovnat.
- 3) Prostudovat závislost inhibice na koncentraci PS u GluK2 receptoru pomocí metody terčíkového zámku a zároveň pomocí metody mikrospektrofluorimetrického zobrazování koncentrace volných vápenatých iontů (calcium imaging). Následně porovnat získané výsledky.
- 4) Popsat závislost inhibice na koncentraci glutamátu u GluK2 receptoru metodou terčíkového zámku. Následně výsledky porovnat

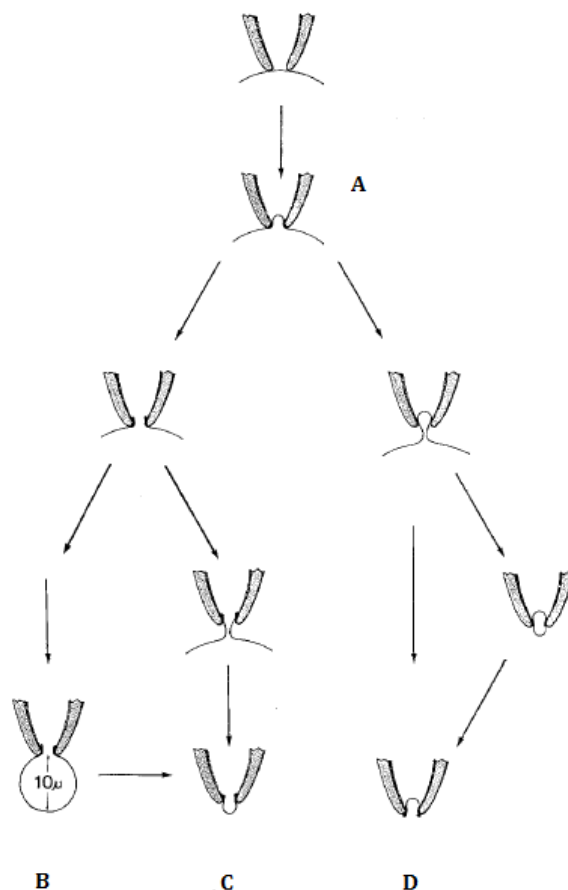
## 5. Materiály a metody

### 5.1. Elektrofyziologická měření

#### 5.1.1. Metoda terčíkového zámku

Pro snímání proudových odpovědí buněk HEK293T jsme v této práci použili metodu terčíkového zámku (patch clamp). Tuto techniku vyvinuli Erwin Neher a Bert Sakmann a v roce 1991 byli oceněni Nobelovou cenou za objevy související s touto metodou. Jedná se o elektrofyziologickou techniku, díky které lze studovat membránové iontové kanály prostřednictvím zaznamenávání proudových změn z celého povrchu buňky či z jednotlivých kanálů (Neher & Sakmann 1976; Hamill et al. 1981).

Princip spočívá v přisátí skleněné *mikroelektrody (ME)* o vhodném průměru k povrchu buňky. Tím se vytvoří pevné spojení mezi sklem ME a fosfolipidovou membránou, což vyvolá značný elektrický odpor ( $G\Omega$ ) mezi vnitřkem ME a vnějším roztokem, to se označuje jako „vytvoření gigasealu“. Následně lze měřit membránový proud při konstantním membránovém potenciálu. V případě této práce šlo o měření sumárního membránového proudu z celé buňky vyvolaného aplikací roztoku obsahujícího agonistu glutamát. Měřený proud můžeme obecně snímat z různých konfigurací ME s membránou, jak je znázorněno na **obrázku č. 10**. Pro naše experimenty jsme používali konfiguraci snímání z celé buňky.



**Obrázek č. 10: Konfigurace ME s membránou**

**A:** Znáznorňuje konfiguraci **přísátí elektrody k buňce (cell-attached configuration)**, která vzniká po přiblížení ME k buňce a následnou aplikací mírného podtlaku. Tím se vtáhne část membrány do ústí pipety a dojde k rapidnímu zvýšení odporu (gigaseal;  $G\Omega$ ). Tímto způsobem lze měřit aktivitu jednotlivých kanálů v terčiku při potenciálu, který je rozdílem membránového potenciálu buňky a vloženého potenciálu.

**B:** Znáznorňuje konfiguraci **snímání z celé buňky (whole-cell configuration)**, která vzniká, pakliže po vytvoření gigasealu aplikujeme další podtlak. Ten způsobí protržení membrány terčiku a vnitřek ME se tak vodivě propojí s vnitřkem buňky. Tímto způsobem se měří souhrnný proud vzniklý činností všech kanálů v membráně buňky.

**C:** Znáznorňuje konfiguraci **snímání z terčiku typu outside-out**, která vzniká, pokud po protržení membrány začneme jemně odtahovat ME od buňky. S tou se zároveň vytahuje i membrána dané buňky, do doby, kdy se tzv. krček přetrhne a membrána se poté zase spojí.

**D:** Znávorňuje konfiguraci **snímání z terčíku typu inside-out**, ke které dochází, pokud je po vytvoření gigasealu daný terčík odtrhnut. Vznikne tím měchýřek, který ale většinou sám rychle praskne a v takovém případě je pak intracelulární strana membrány natočena do vnějšího roztoku.

Převzato a upraveno z (Hamill et al. 1981)

### 5.1.2. Aparatura pro elektrofyziologická měření

Aparatura, na které jsme prováděli měření, je složena ze zesilovače Axopatch 200A (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA), který je napojen na převodník Digidata 1440A (Axon Instruments). Ten umožňuje propojení s osobním počítačem s nainstalovaným programem pClamp 10 (Axon Instruments), pomocí kterého jsme experimenty řídili a digitalizovaná data následně ukládali. Aparaturu dále tvoří aplikační systém s paralelními trubičkami řízený mikroprocesorem (Dittert et al. 2006). Tato aplikace je řízená prostřednictvím elektricky ovládaných ventilů, které ovládají průtok roztoku ze zásobníku do svazku dvanácti křemenných trubiček (Polymicro Technologies, USA) o průměru 400  $\mu\text{m}$ . U těchto trubiček se dá pomocí krokového motoru nastavit poloha tak, aby ústí požadované trubičky směřovalo na měřenou buňku (Dittert et al. 1998)

Nedílnou součástí aparatury je též antivibrační stůl (TMC), kompresor, Faradayova klec, mikroskop (CKX 41 Olympus, Japonsko) a mikromanipulátor MP-225 (Sutter Instrument Company).

### 5.1.3. Postup měření

Nejprve jsme si připravili aplikační roztoky podle toho, jaký druh experimentu jsme v daný den chtěli měřit. To zahrnovalo i přípravu daného neurosteroidu. Příprava spočívala v navážení neurosteroidu ve formě prášku a jeho následném rozpuštění v DMSO, které jsme usnadňovali vortexem (Heidolph reax top, Německo) a sonikací, což je štěpení pomocí ultrazvuku (BANDELIN Sonorex Digitec, Berlín, Německo).

Do zkumavek jsme si pak rozpipetovali aplikační roztok a dle potřeby i agonistu a rozpuštěný neurosteroid. Do každého roztoku, kam jsme nepřidávali neurosteroid, jsme přidali stejnou dávku DMSO, ve kterém jsme neurosteroidy rozpouštěli, abychom snížili chybu měření. Tyto roztoky jsme pak včetně *extracelulárního roztoku (ECS)* umístili do injekčních stříkaček, které jsou ovládány pomocí aplikačního systému. ECS byl pak během pokusu použit k tomu, aby se k povrchu buňky dostávaly studované látky jen ve



stanovených časech. Zároveň jsme si nechali rozpustit ConA v ECS bez glukózy, do kterého jsme dávali inkubovat buňky vždy na 10 minut před samotným měřením.

Po inkubaci v ConA jsme buňky na krycím sklíčku vložili do plastové mističky, kterou jsme naplnili ECS a následně vložili do invertovaného optického mikroskopu (Olympus CKX 41, Japonsko). Na závěr jsme do mističky přidali odsávací trubičku, abychom mohli udržovat konstantní hladinu roztoku v misce a argentchloridovou elektrodu, která zde sloužila jako elektroda referenční.

Dále bylo vždy potřeba si připravit ME (tlustostěnné z borosilikátového skla). Vytáhli jsme je na horizontálním tahači P-1000 (Sutter Instrument Company) nastaveným programem tak, aby se jejich odpor pohyboval mezi 3 – 6 M $\Omega$ . Tyto ME je vhodné ještě otavit, aby se ME zbavila případných nečistot, upravil se její odpor na požadovanou hodnotu a zaobličily se ostré hrany. Takto připravené ME jsme naplnili *intracelulárním roztokem (ICS)* a vložili dovnitř argentchloridovou elektrodu, která byla tvořena stříbrným drátkem pokrytým chloridem stříbrným. Tato elektroda pak vodivě spojovala vnitřek ME se vstupem hybridního vstupního zesilovače. Během pokusu jsme s připravenou ME manipulovali pomocí manipulátoru MP-225 (Sutter Instrument Company).

Samotné měření poté probíhalo na vybraných buňkách z daného sklíčka. V ideálním případě jsme vybírali buňky, které exprimovaly GFP a nebyly obklopeny dalšími buňkami. Následně jsme se k dané buňce přiblížili skleněnou ME naplněnou intracelulárním roztokem a prováděli snímání z celé buňky tak, jak je popsáno a znázorněno obrázkem v předchozí kapitole. Buňky jsme měřili pod napětím o hodnotě -60 mV za pokojové teploty, sériový odpor mikroelektrody jsme kompenzovali ze 70 – 90 %. Signál jsme filtrovali analogovým filtrem na 2 kHz a vzorkování jsme měli nastavené na 5 kHz.

#### **5.1.4. Zpracování naměřených dat**

Během měření se digitalizovaná data ukládala na disk v podobě časového záznamu membránového proudu. Z takového záznamu pak bylo možné v programu Clampfit 10.2 odečíst klidový membránový proud i proud tekoucí membránou během aplikace daných roztoků. Při vyhodnocování jsme se zaměřili především na porovnávání proudové odpovědi v ustáleném stavu na roztok s agonistou vzhledem proudové odpovědi na roztok s agonistou + daným neurosteroidem. Tyto analýzy jsme dělali s pomocí programu Clampfit 10.2, který je součástí balíku programů pro snímání a vyhodnocování

elektrofyzilogických dat pClamp (Molecular Devices, USA). K dalšímu zpracování výsledků jsme dále používali programy Microsoft Excel (Microsoft, USA), SigmaPlot (Systat Software, USA), SigmaStat (Systat Software, USA), Power Point (Microsoft, USA) a Malování.

## **5.2. Mikrospektrofluorimetrická metoda měření koncentrace volných vápenatých kationtů v cytoplasmě (calcium imaging)**

### **5.2.1. Mikrospektrofluorimetrická metoda**

Při vypracování této práce jsme použili metodu měření změn koncentrace volných vápenatých kationtů v cytoplasmě jako míru aktivace receptorů. Jedná se o metodu, která pomocí fluorescenčního mikroskopu zobrazuje změny intracelulární koncentrace vápenatých kationtů v buňkách obarvených na kalciové ionty citlivou fluorescenční sondou. Při měření touto metodou jsme použili fluorescenční barvivo fura-2 AM, které ve své nenabitě formě acetoxymetylésteru prochází membránou do buněk. Tam je hydrolyzován na svou aktivní formu pomocí endogenních esteráz. Aktivní forma tohoto barviva má vazebné místo pro vápenaté kationty. Po navázání  $\text{Ca}^{2+}$  do tohoto vazebného místa dochází k posunu excitačního spektra sondy směrem k nižším vlnovým délkám (340 nm pro obsazenou sondu proti 380 nm pro volnou sondu). Výsledkem je, že intenzita fluorescence vyvolaná excitací vlnovou délkou 380 nm ( $F_{380}$ ) klesá se zvyšující se koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  a při excitaci zářením o vlnové délce 340 nm intenzita fluorescence ( $F_{340}$ ) sondy stoupá. Změny poměru těchto dvou intenzit fluorescence pak korespondují se změnami koncentrace vápenatých kationtů.

### **5.2.2. Aparatura pro mikrospektrofluorimetrickou metodu**

Změny intenzity fluorescenčního záření jsme měřili na aparatuře postavené na invertovaném fluorescenčním mikroskopu Olympus IX81 (Olympus, Center Valley, Japonsko), který je vybavený chlazenou CCD kamerou Orca – ER (Hamamatsu Photonics K. K., Shizuoka, Japonsko). Pro pozorování buněk jsme používali objektiv UIS2 UPLSAPO (Olympus, Japonsko) se zvětšením 20×. Jako zdroj záření jsme používali počítačem řízený polychromátor Polychrome V (TILL Photonic, Mnichov, Německo). Buňky pak byly střídavě excitovány zářením o vlnových délkách 340 a 380 nm pomocí sady filtrů pro barvivo fura-2 (excitační filtr SP410, dichroické zrcadlo DCLP410, emisní filtr LP440; Olympus, Japonsko) a CCD kamerou jsme detekovali fluorescenční záření s vlnovou délkou nad 440 nm. Při excitační vlnové délce 340 nm byl signál snímán po dobu 300 ms a při excitační vlnové délce 380 nm byl snímán 100 ms, aby byly kompenzovány rozdílné optické vlastnosti objektivu při různých vlnových délkách. Získané dvojice obrazů byly

ukládány na disk počítače pro další zpracování. Od naměřených intenzit fluorescence při obou vlnových délkách jsme odečetli hodnoty intenzity pozadí, které jsme si určili pro každý záznam podle intenzity z oblasti zorného pole bez buněk po excitaci 340 i po excitaci 380 nm. Poměr těchto intenzit jsme po ukončení měření vyhodnocovali programem CellR (Olympus, Japonsko).

Aparatura je vybavena aplikačním systémem, který se ale liší od aplikačního systému na aparatuře pro metodu terčíkového zámku. Zde je sestaven z deseti trubiček, které vedou do jednoho společného vyústění („manifold“), které tvoří křemenná trubička o průměru 400  $\mu\text{m}$ . Koncovka aplikačního systému je umístěna na mikromanipulátoru, který slouží k přesnému nastavení polohy tak, aby proud roztoku spolehlivě omýval buňky v zorném poli mikroskopu. Všechny trubičky jsou propojené teflonovými hadičkami se zásobníky, do kterých jsme vždy připravili roztoky, se kterými jsme chtěli měřit. Samotnou aplikaci roztoků jsme pak ovládali pomocí mikroprocesoru, který řídí otevírání ventilů regulujících průtok roztoků na měřené buňky. Nástup koncentrace aplikované látky je pomalejší než u trubiček na aparatuře pro metodu terčíkového zámku, kde je jiný typ aplikačního systému.

### 5.2.3. Postup měření

Nejprve jsme si museli obarvit transfekované buňky fluorescenční sondou fura-2-AM (Molecular Probes, Eugene, USA), která je citlivá na vápenaté kationty. Barvicí roztok (1 ml) obsahoval 1  $\mu\text{M}$  sondu (přidáno ze zásobního 1 mM roztoku v DMSO, uchovávaného při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). V takto připraveném roztoku jsme buňky nechali inkubovat hodinu ve tmě při pokojové teplotě. Poté jsme přemístili sklíčko s buňkami do ECS roztoku, aby se odmylo fluorescenční barvivo, které nevstoupilo do buněk. Následovala desetiminutová inkubace střípku z takto připraveného sklíčka v ConA rozpuštěném v bezglukózovém ECS. Potom jsme mohli přistoupit k samotnému měření, v průběhu kterého jsme měřili změny intenzity fluorescenčního záření za současné aplikace námi připravených roztoků. Oproti metodě terčíkového zámku jsme zde používali jiný aplikační systém, který je pomalejší. Důvodem k použití statického aplikačního systému se společným vyústěním byly optické artefakty způsobené pohybem trubiček a odrazy od hladiny roztoku, které také způsobovaly pohybující se trubičky. Hladinu roztoku v misce s buňkami jsme udržovali konstantní pomocí odsávacího zařízení stejně tak jako v případě měření metodou terčíkového zámku.

#### 5.2.4. Zpracování naměřených dat

Naměřená data jsme pak analyzovali v programech CellR (Olympus), Microsoft Excel (Microsoft, USA) a Clampfit 10.2 (Molecular Devices, USA).

#### 5.3. Statistické zpracování výsledků

Výsledky jsme zpracovávali prostřednictvím programů Microsoft Excel (Microsoft, USA), SigmaPlot (Systat Software, USA) a SigmaStat (Systat Software, USA). Konkrétně jsme používali aritmetický průměr a směrodatnou odchylku, přičemž nejnižší počet naměřených buněk bylo  $n = 3$ . Pouze v případě koncentračních křivek neurosteroidu PS jsme používali místo směrodatné odchylky směrodatnou chybu. Významnost změn jsme hodnotili pomocí t-testu.

#### 5.4. Rovnice použité k výpočtům

Pro výpočet  $IC_{50}$  neurosteroidu pregnenolon sulfát jsme použili následující rovnici.

$$y = \frac{ax^h}{c^h + x^h} \quad (1)$$

$a$  = hodnota maximální inhibice;  $h$  = Hillův koeficient;  $c$  = hodnota  $IC_{50}$

#### 5.5. Buněčné linie HEK293T

Jedná se o linii lidských embryonálních ledvinných buněk. HEK293T (American Type Culture Collection, ATTC No. CRL1573, Rockville, MD, USA) jsme pěstovali v médiu Opti-MEM I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) s 5% fetálním bovinním sérem (FBS) v 37 °C. Pro účely transfekce jsme tyto buňky nasadili na 24-jamkové kultivační plato.

##### 5.5.1. Transfekce

Plasmidy s vybranými podjednotkami kainátových receptorů (Severine Deforges, PhD., Bordeaux, Francie) jsme do buněk HEK293T vnášeli pomocí transfekčního činidla Matra-A Reagent (IBA, Göttingen, Německo) a silného neodymového magnetu. Zároveň jsme přidali i plasmid fluorescenčního proteinu GFP (green fluorescent protein; pQBI 25, Takara, Tokyo, Japonsko), abychom po transfekci mohli detekovat její úspěšnost. Buňky, ve kterých transfekce úspěšně proběhla, jsme identifikovali díky expresi GFP viditelné pod fluorescenčním mikroskopem. Buňky transfekované plasmidem pro GluK1 a GluK2 byly vhodné pro elektrofyziologická měření následující den po transfekci, buňky transfekované plasmidem pro GluK3 až o den později.

Postup:

- 1) Do mikrozkušavky jsme napipetovali 50  $\mu$ l kultivačního média Opti-MEM I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1  $\mu$ l eGFP, 0.6  $\mu$ l činidla Matra-A Reagent (IBA, Göttingen, Německo) a 150 – 400 ng cDNA (v závislosti na podjednotkovém podtypu receptoru).
- 2) Takto připravenou mikrozkušavku jsme inkubovali 20 minut v pokojové teplotě. Během této doby jsme si připravili médium pro buňky, které se skládá z kultivačního média Opti-MEM I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1.5% FTS a 1  $\mu$ M blokátoru kainátových receptorů CNQX. Připravené médium jsme rozlili do plastových kultivačních misek, které obsahovaly předem připravená skleněná krycí sklíčka pokrytá kolagenem a poly-L-lysinem a uložili do termostatu (37 °C), aby získaly správnou teplotu a procentuální zastoupení CO<sub>2</sub>.
- 3) Po zmíněných dvaceti minutách jsme obsah mikrozkušavky přepipetovali do jamky s buňkami na zmiňované 24-jamkové destičce a umístili ji do termostatu na magnet, kde se buňky inkubovaly po dobu 15 minut.
- 4) Po těchto patnácti minutách jsme odsáli obsah z jamky, vypláchli ji roztokem PBS, který jsme následně také odsáli a aplikovali na buňky trypsin. Potom jsme umístili 24-jamkovou destičku opět do termostatu na dobu tří minut. Během toho trypsin způsobil uvolnění buněk ze dna jamky, takže jsme je pak mohli nasadit na předem připravené misky s již optimalizovaným médiem. Krycí sklíčka z těchto misek jsme pak už přímo používali k elektrofyziologickým měřením.

## 5.6. Použité chemikálie, roztoky a média

### 5.6.1. Roztoky pro elektrofyziologická měření

**Extracelulární roztok (ECS)** jsme používali především na omývání buněk během elektrofyziologického měření i během měření pomocí mikrospektrofluorimetrické metody. V některých případech jsme ECS používali i jako roztok aplikační. Pro jeho přípravu jsme použili 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glukózu, 10 mM HEPES a deionizovanou přečištěnou vodu. Po smíchání všech potřebných látek jsme dorovnali pH na hodnotu 7,3 pomocí NaOH. Roztok jsme skladovali při -20 °C a rozmrazili těsně před experimentem. Stejný roztok, ale bez glukózy, jsme používali pro rozpouštění ConA.

**Aplikační roztok se sníženým obsahem dvojmocných kationtů** jsme používali pro elektrofyziologická měření společně s látkami, které jsme chtěli na buňky aplikovat

(agonisté, neurosteroidy, případně antagonisté). Tyto látky jsme však přidávali do roztoku až těsně před daným experimentem. Pro jeho přípravu jsme použili 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glukózu, 10 mM HEPES, 0.2 mM EDTA a deionizovanou přečištěnou vodu. Po smíchání všech potřebných látek jsme dorovnali pH na hodnotu 7,3 pomocí NaOH. Roztok jsme skladovali při -20 °C a rozmrazili těsně před experimentem.

**Aplikační roztok upravený pro GluK2 receptor** jsme používali pro elektrofyziologická měření na zkoušku při optimalizaci metod společně s látkami, které jsme chtěli na buňky aplikovat (agonisté, neurosteroidy, případně antagonisté). Tyto látky jsme však přidávali do roztoku až těsně před daným experimentem. Pro jeho přípravu jsme použili 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glukózu, 10 mM HEPES a deionizovanou přečištěnou vodu. Po smíchání všech potřebných látek jsme dorovnali pH na hodnotu 7,3 pomocí NaOH. Roztok jsme skladovali při -20 °C a rozmrazili těsně před experimentem.

**Intracelulární roztok (ICS)** jsme používali k plnění ME. Tento roztok obsahoval 120 mM Cs glukonát, 15 mM CsCl, 10 mM BAPTA, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> a 2 mM ATP-Mg sůl (pH bylo upraveno pomocí CsOH na hodnotu 7,2).

**Neurosteroidy:** pregnenolon sulfát (PS), pregnanolon sulfát (PAS), dehydroepiandrosteron (DHEA), dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS); všechny rozpuštěné v DMSO (RNDr. Hana Chodounská, CSc; Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky)

**Další používané látky:** glutamát, concanavalin A, fura-2 AM (SIGMA); všechny chemikálie pro přípravu roztoků byly také od firmy SIGMA

## 6. Výsledky

### 6.1. Optimalizace metod

Před měřením vlivu vybraných neurosteroidů na homomerní typy KARs jsme optimalizovali podrobnosti metody přípravy buněk a měření. Oddělení buněčné neurofyziologie totiž zkoumá především NMDARs, a tak bylo nutné zjistit, jak některé roztoky či metody upravit tak, aby lépe vyhovovaly vlastnostem a potřebám KARs.

#### 6.1.1. Transfekce

V případě GluK1 a GluK2 receptorů bylo vhodné měřit hned následující den po transfekci. Naproti tomu v případě GluK3 bylo ideální provádět měření na transfekovaných HEK293T buňkách až druhý den po transfekci, aby byla exprese receptorů dostatečná.

#### 6.1.2. Aplikační roztok

Z literatury jsme zjistili, že na práci s KARs byly používány tři typy roztoků. Rozhodli jsme se tedy vyzkoušet všechny a následně vybrat ten nejvhodnější. Pokusy jsme prováděli na receptorech GluK1(Q) a GluK2 v přítomnosti agonisty glutamátu v koncentraci podle  $EC_{50}$  pro jednotlivé podtypy a 100  $\mu$ M pregnenolon sulfátu.

Vyzkoušené aplikační roztoky:

- a) **Extracelulární roztok (ECS):** 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $CaCl_2$ , 10 mM glukóza, 10 mM HEPES a deionizovaná přečištěná voda; pH 7,3
- b) **Aplikační roztok se sníženým obsahem dvojmocných kationtů** (běžně používaný pro pokusy s NMDARs): 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.7 mM  $CaCl_2$ , 10 mM glukóza, 10 mM HEPES, 0.2 mM EDTA a deionizovaná přečištěná voda; pH 7,3
- c) **Aplikační roztok upravený pro GluK2 receptor:** 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM  $CaCl_2$ , 10 mM glukóza, 10 mM HEPES a deionizovaná přečištěná voda.

U buněk měřených v roztoku **b** jsme pozorovali větší proudovou odpověď na agonistu než u buněk měřených v roztoku **c** či roztoku **a**, ve kterém jsme u buněk pozorovali proudovou odpověď nejmenší.

Na základě tohoto výsledku jsme se rozhodli používat pro elektrofyziologické pokusy roztok **b**, protože u receptorů GluK1 a GluK3 se často stávalo, že byly proudové odpovědi velice malé (desítky pA), a proto bylo žádoucí, aby byly proudové odpovědi co možná největší a zlepšila se tak přesnost měření u těchto receptorů. Protože ale buňky není možné po celou dobu experimentu uchovávat v roztoku bez hořčnatých iontů, bylo

nutné mezi aplikacemi buňky omývat roztokem **a**. Také pro měření změn intracelulárního vápníku jsme používali roztok **a**, protože v roztoku **b** s 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> byly odpovědi příliš malé.

### 6.1.3. Lektin Concanavalin A

Na základě informací z několika článků (např. (Everts et al. 1997), (Fay & Bowie 2006), (Frydenvang et al. 2009)) jsme, před každým měřením jednotlivých buněk, inkubovali střípek s narostlými buňkami po dobu deseti minut v roztoku bezglukózového ECS s rozpuštěným ConA v 10 μM koncentraci. Tento lektin inhibuje silnou desensitizaci receptoru, a tím zvyšuje proudy v ustáleném stavu (steady-state). Pokusy na GluK2 receptoru ukázaly, že se bez použití ConA dostaneme na proudovou odpověď po aplikaci agonisty v řádu desítek pA. Oproti tomu při měření po inkubaci v ConA se pohybovaly proudové odpovědi v řádu tisíců pA, jak je možné vidět na **obrázku č. 15**.

## 6.2. Účinek PS, PAS, DHEA a DHEAS na GluK1, GluK2 a GluK3 receptory

Nejprve jsme zjišťovali, jak tyto čtyři neurosteroidy ovlivňují odpovědi homomerních kainátových receptorů, abychom zjistili, na který neurosteroid by případně bylo vhodné se zaměřit detailněji. Jelikož jsme z literatury věděli, že jsou KARs mnohdy ovlivňovány neurosteroidy mnohem méně než NMDARs, zvolili jsme pro své pokusy vysokou výchozí koncentraci měřených neurosteroidů (100 μM). Koncentraci glutamátu jsme používali pro každý receptor jinou, podle EC<sub>50</sub> pro každý z nich. Rozhodli jsme se použít tyto koncentrace glutamátu proto, abychom byli schopni odhalit případný potenciační efekt neurosteroidů na tyto receptory. Jednotlivé roztoky jsme pak ve všech případech aplikovali v rámci trojskoku, což znamená, že po aplikování roztoku s agonistou jsme aplikovali roztok s agonistou + neurosteroidem a následně opět roztok s agonistou. Potom jsme porovnávali rozdíly mezi těmito odpověďmi.

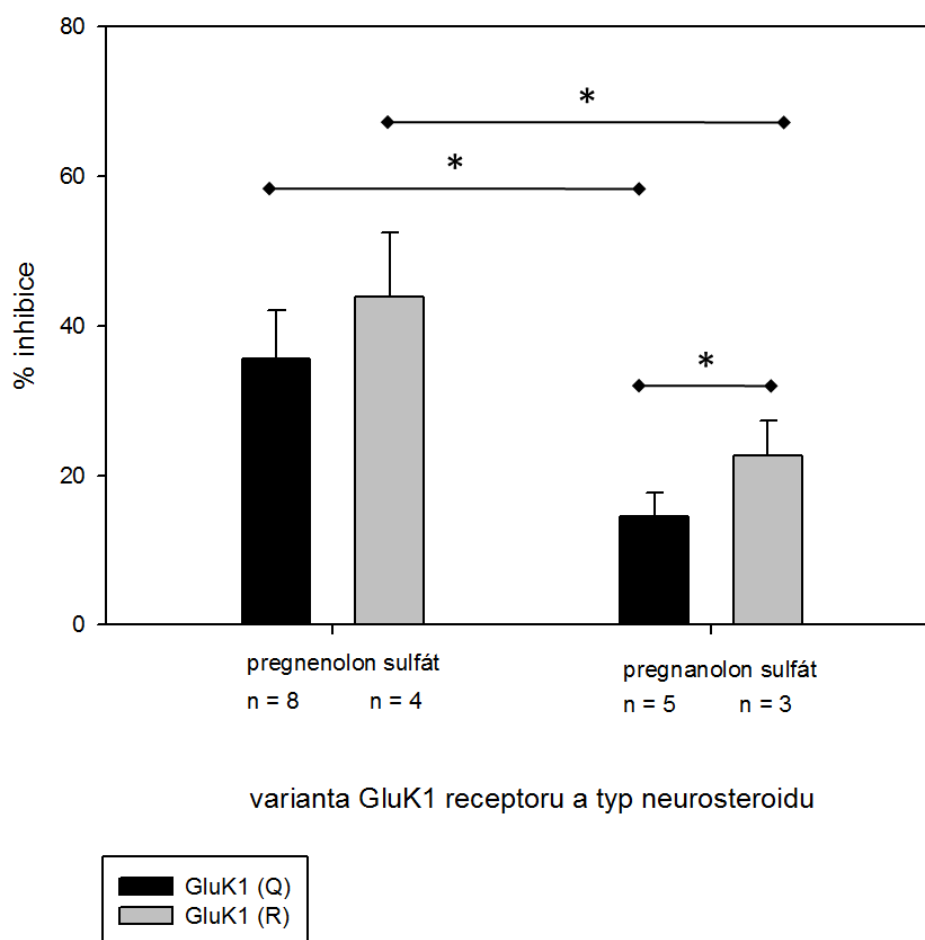
### 6.2.1. GluK1 receptor

Námi vybrané neurosteroidy jsme společně s glutamátem (c = 50 μM) aplikovali na GluK1 receptory v rámci trojskoku, přičemž jsme měli k dispozici 2 varianty GluK1 receptoru. Běžně se vyskytující variantu Q a její editační variantu R. GluK1(Q) je receptor, který má v M II oblasti TMD aminokyselinu glutamin (bez náboje) a je propustný pro vápník. GluK1(R) je receptor, který má v M II oblasti TMD aminokyselinu arginin (kladný náboj) a není propustný pro vápník (Wilding 2005). Kromě výše zmíněných cílů v této sadě pokusů nás tedy rovněž zajímalo, zda budou dané neurosteroidy působit stejně či odlišně na tyto dvě varianty receptorů.



Výsledkem této sady pokusů bylo, že neurosteroidy DHEA a DHEAS nikterak neměnily odpověď vyvolanou glutamátem u GluK1(Q) receptorů. U GluK1(R) receptorů jsme pozorovali nepatrný inhibiční účinek těchto dvou neurosteroidů, který se pohyboval v rozmezí 0 – 10 %.

V případě neurosteroidů PS a PAS jsme pozorovali větší změnu mezi odpovědí receptoru na aplikační roztok s glutamátem oproti odpovědi na aplikační roztok s glutamátem + PS/PAS, kdy odpověď v přítomnosti neurosteroidu byla nižší. Znamená to tedy, že PS a PAS způsobují inhibici GluK1(Q) a GluK1(R) receptorů. Míra inhibic a porovnání účinku PS a PAS na GluK1(Q) a GluK1(R) receptory jsou znázorněny v **grafu č. 1**.



p < 0.05; t-test

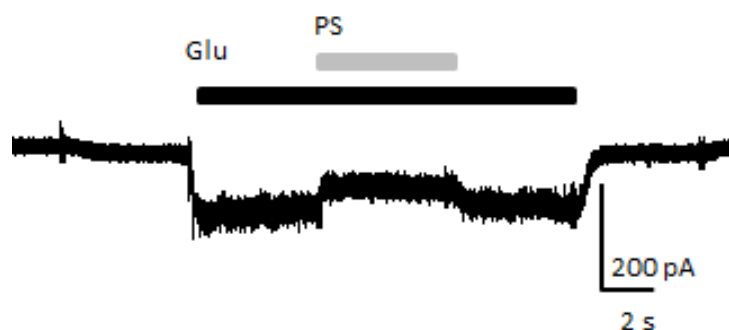
**Graf č. 1: Graf inhibice GluK1receptoru neurosteroidy PS a PAS**

Oba typy neurosteroidů (100 μM) jsme aplikovali společně s Glu (50 μM) na obě varianty receptoru (odlišeny barevně; GluK1(Q) černě a GluK1(R) šedě). Jednotlivé úsečky spojují

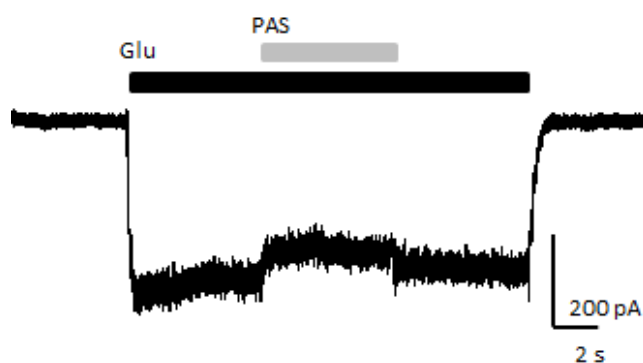
*data, které jsme mezi sebou porovnávali. Hvězdičky pak značí signifikantní rozdíl mezi porovnávanými hodnotami.*

Z **grafu č. 1** je patrné, že neurosteroidy PS a PAS neinhibují Q a R variantu GluK1 receptoru stejnou měrou. V případě PAS je dokonce rozdíl v inhibici mezi GluK1(Q) a GluK1(R) signifikantní. Dále je z grafu zřejmé, že PS způsobuje na Q variantě GluK1 receptoru signifikantně vyšší inhibici než PAS. Stejně je tomu tak i v případě R varianty GluK1 receptoru.

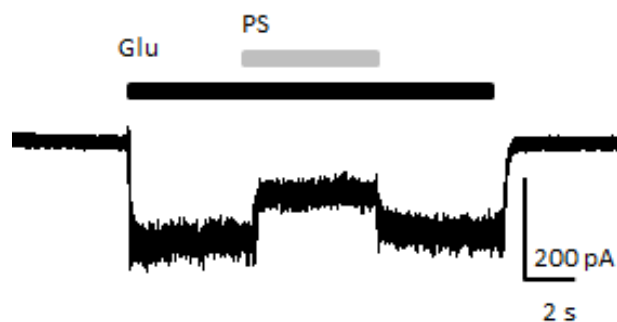
Na **obrázcích č. 11 - 14** jsou ukázky záznamů z trojskoků s PS a PAS na Q a R variantě GluK1 receptorů.



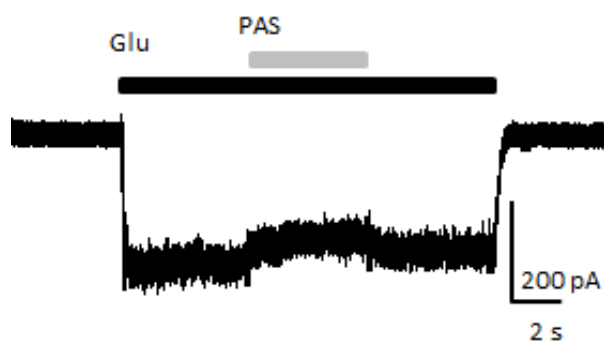
**Obrázek č. 11** znázorňuje záznam z měření vlivu PS (100  $\mu\text{M}$ ) na GluK1(Q) receptor, kdy Glu (50  $\mu\text{M}$ ) značí agonistu glutamát. Obdélníky pod zkratkami znázorňují dobu, po kterou jsme danou látku aplikovali.



**Obrázek č. 12** znázorňuje záznam z měření vlivu PAS (100  $\mu\text{M}$ ) na GluK1(Q) receptor, kdy Glu (50  $\mu\text{M}$ ) značí agonistu glutamát. Obdélníky pod zkratkami znázorňují dobu, po kterou jsme danou látku aplikovali.



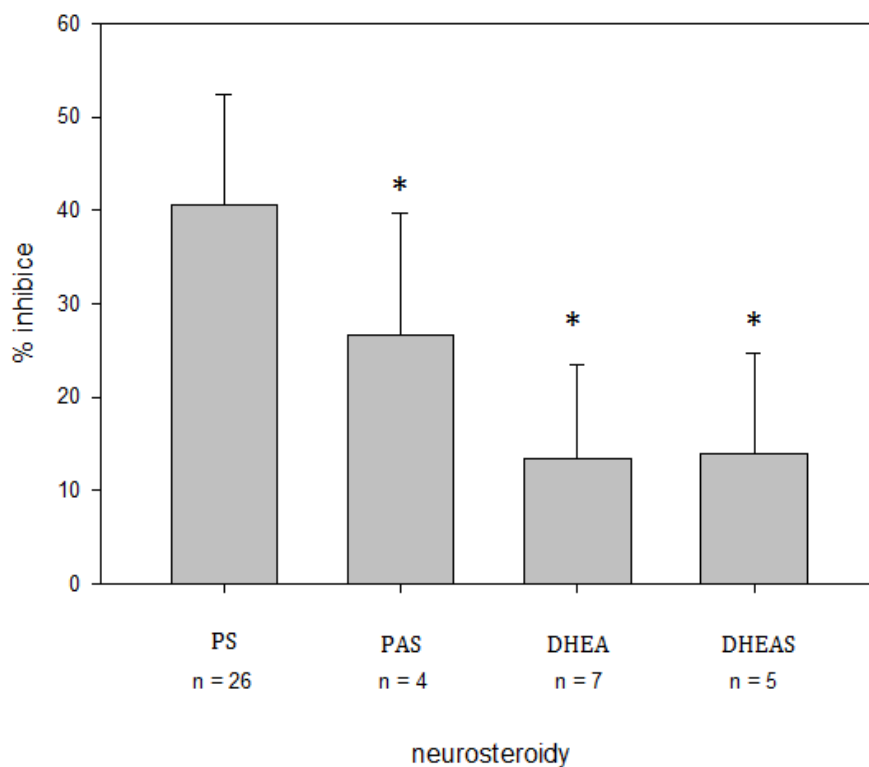
**Obrázek č. 13** znázorňuje záznam z měření vlivu PS (100  $\mu\text{M}$ ) na GluK1(R) receptor, kdy Glu (50  $\mu\text{M}$ ) značí agonistu glutamát. Obdélníky pod zkratkami znázorňují dobu, po kterou jsme danou látku aplikovali.



**Obrázek č. 14** znázorňuje záznam z měření vlivu PAS (100  $\mu\text{M}$ ) na GluK1(R) receptor, kdy Glu (50  $\mu\text{M}$ ) značí agonistu glutamát. Obdélníky pod zkratkami znázorňují dobu, po kterou jsme danou látku aplikovali.

### 6.2.2. GluK2 receptor

Námi vybrané neurosteroidy jsme společně s glutamátem ( $c = 10 \mu\text{M}$ ) aplikovali také na GluK2 receptory a opět v rámci trojskoku. Výsledkem této sady pokusů bylo, že všechny zkoušené neurosteroidy inhibují odpověď aktivovanou glutamátem na tomto receptoru. Každý z nich ale inhibuje jinou měrou. Rozdíly v míře inhibice mezi PS, PAS, DHEA a DHAES jsou znázorněny v **grafu č. 2**.



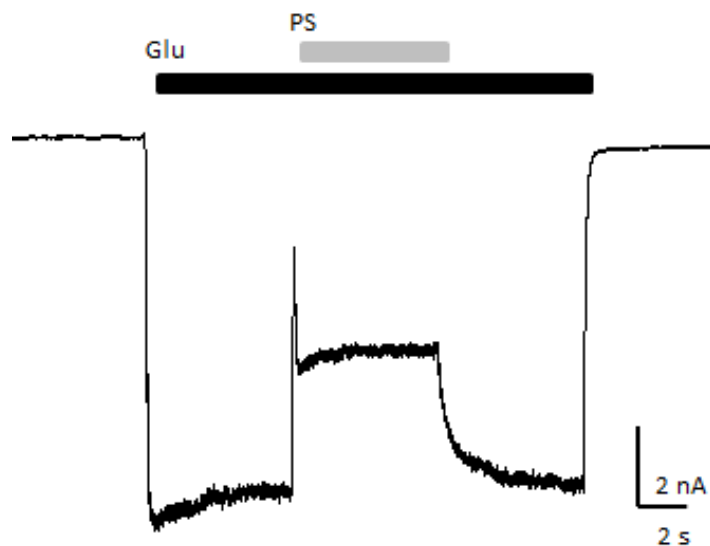
$p < 0.05$ ; t-test

**Graf č. 2: Graf inhibice GluK2 receptoru neurosteroidy PS, PAS, DHEA a DHEAS**

Jednotlivé sloupce grafu zastupují dané neurosteroidy, které byly aplikovány společně s Glu ( $10 \mu\text{M}$ ). Účinek neurosteroidů PAS ( $100 \mu\text{M}$ ), DHEA ( $100 \mu\text{M}$ ) a DHEAS ( $100 \mu\text{M}$ ) jsme porovnávali vůči inhibičnímu účinku neurosteroidu PS ( $100 \mu\text{M}$ ) a ve všech případech byl rozdíl v míře inhibice signifikantní, což je označeno hvězdičkou.

V grafu č. 2 je znázorněná míra inhibice pro každý námi měřený neurosteroid. Je zde vidět, že pregnenolon sulfát způsobuje signifikantně vyšší inhibici než ostatní neurosteroidy.

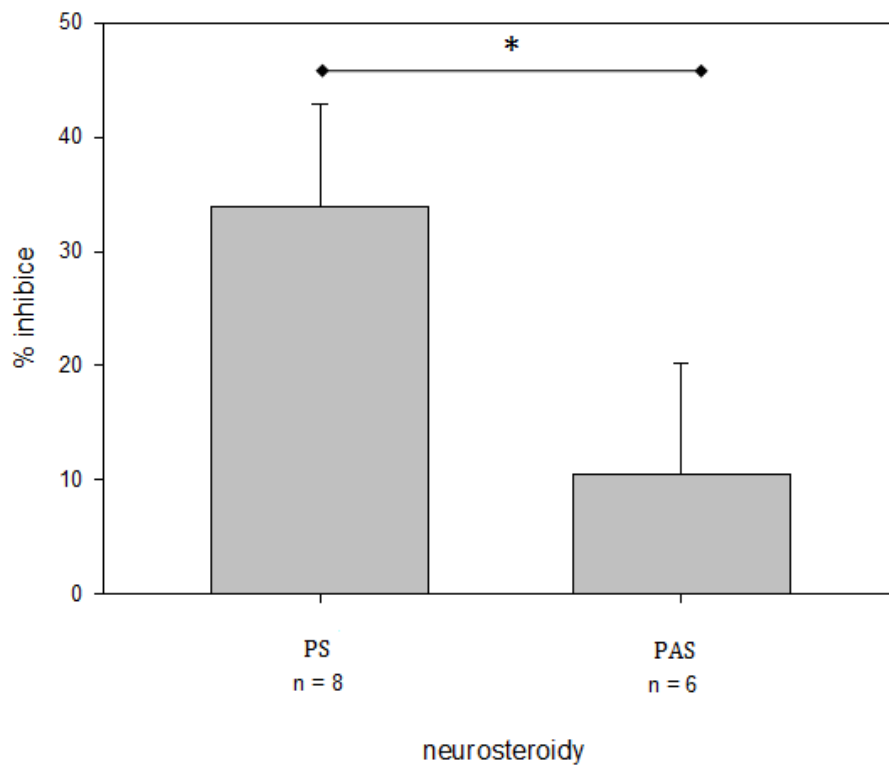
Na obrázku č. 15 je znázorněna ukázka záznamu z trojskoku s PS na GluK2 receptorech.



**Obrázek č. 15** znázorňuje záznam z měření vlivu PS (100) na GluK2 receptor, kdy Glu (10  $\mu\text{M}$ ) značí agonistu glutamát. Obdélníky pod zkratkami znázorňují dobu, po kterou jsme danou látku aplikovali.

### 6.2.3. GluK3 receptor

V poslední sadě pokusů jsme námi vybrané neurosteroidy aplikovali společně s glutamátem ( $c = 6 \text{ mM}$ ) na GluK3 receptory. Opět se jednalo o pokusy v rámci trojskoku. Výsledkem těchto pokusů bylo zjištění, že neurosteroidy DHEA a DHEAS nikterak neovlivňují odpověď aktivovanou glutamátem, zatímco neurosteroidy PS a PAS způsobují její inhibici. Rozdíly v míře inhibice mezi PS a PAS jsou znázorněny v **grafu č. 3**.



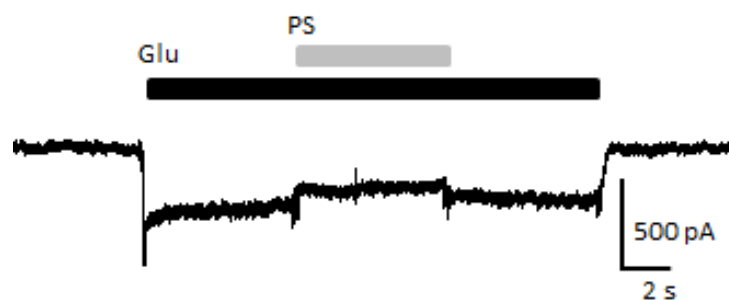
$p < 0.05$ ; t-test

**Graf č. 3: Graf inhibice GluK3 receptoru neurosteroidy PS a PAS**

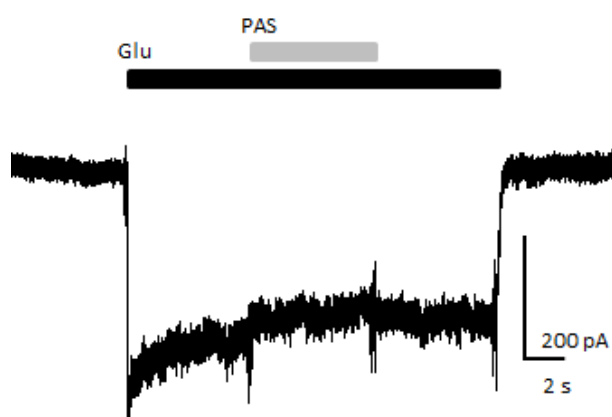
Sloupce grafu zastupují dané neurosteroidy (100  $\mu$ M), které byly aplikovány společně s Glu (6 mM). Míry jejich inhibice jsme porovnali a označili hvězdičkou, jelikož byl rozdíl mezi nimi signifikantní.

Z grafu č. 3 je patrné, že pregnenolon sulfát inhibuje GluK3 receptor v mnohem větší míře než pregnanolon sulfát.

Na obrázcích č. 16 a 17 jsou znázorněny ukázky záznamů z trojskoků s PS a PAS na GluK3 receptorech.

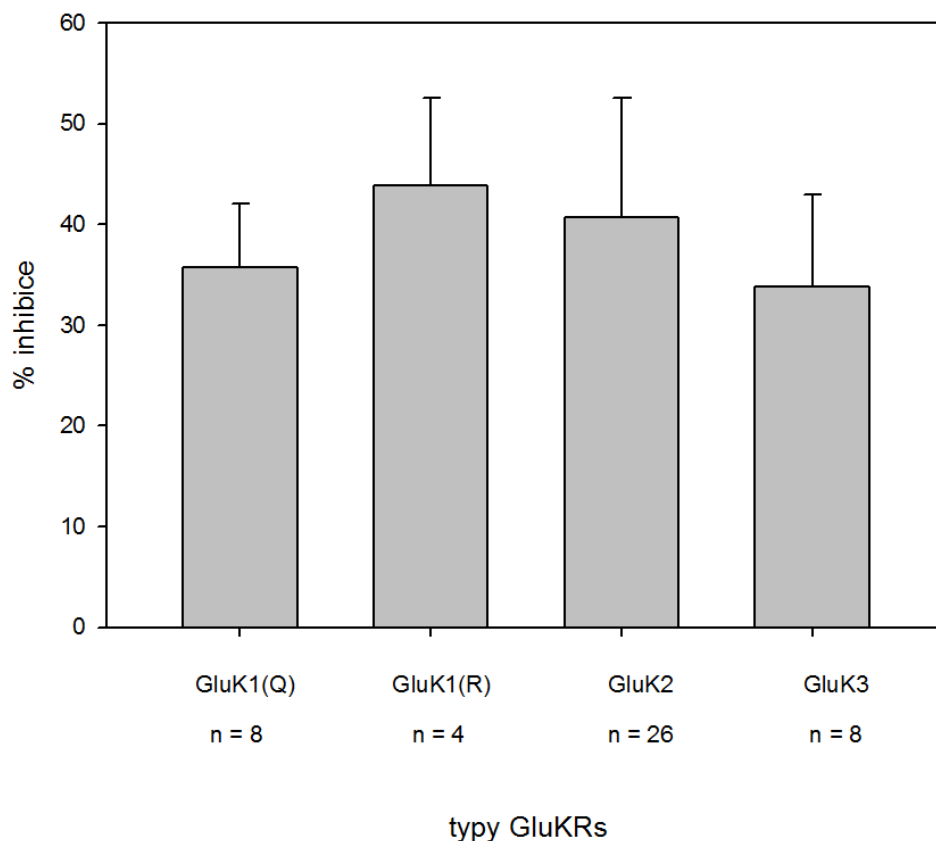


**Obrázek č. 16** znázorňuje záznam z měření vlivu PS (100  $\mu$ M) na GluK3 receptor, kdy Glu (6 mM) značí agonistu glutamát. Obdélníky pod zkratkami znázorňují dobu, po kterou jsme danou látku aplikovali.



**Obrázek č. 17** znázorňuje záznam z měření vlivu PAS (100  $\mu$ M) na GluK3 receptor, kdy Glu (6 mM) značí agonistu glutamát. Obdélníky pod zkratkami znázorňují dobu, po kterou jsme danou látku aplikovali.

Z této části výsledku je patrné, že největší inhibici na všech homomerních KARs receptorech způsobuje pregnenolon sulfát. Sumarizace míry inhibice neurosteroidem PS na receptorech GluK1(Q), GluK1(R), GluK2 a GluK3 je znázorněna v **grafu č. 4**.



**Graf č. 4: Sumarizace míry inhibice neurosteroidu PS u jednotlivých typů homomerních KARs**

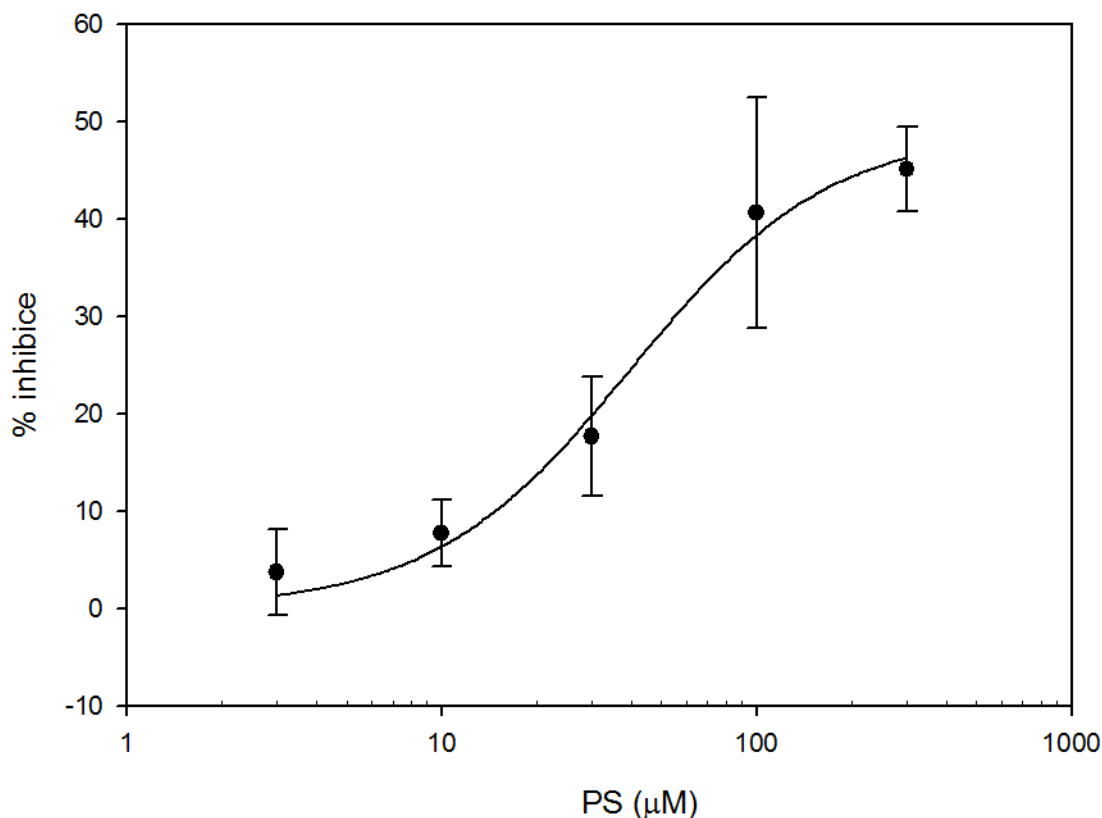
Sloupce značí jednotlivé typy homomerních KARs a míru, do jaké pregnenolon sulfát (100  $\mu$ M) inhibuje jejich odpovědi na Glu (podle  $EC_{50}$  pro každý receptor).

Na základě výše uvedených pokusů jsme se rozhodli dále detailněji prostudovat vliv pregnenolon sulfátu na GluK2 receptorech. Receptory GluK2 jsme si pro další pokusy vybrali proto, že odpovídají na glutamát v rozumném proudovém rozmezí (kolem 2 nA), zatímco u GluK1 a GluK3 receptorů byl mnohdy problém s malou velikostí odpovědí (10 – 500 pA), a tudíž menší přesností měření. Neurosteroid PS jsme si vybrali proto, že ovlivňoval proudovou odpověď všech receptorů nejvíce, a tak bylo možné naměřit jeho koncentrační závislost, která je popsána v následující kapitole.



### 6.3. Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci PS

Další sadu pokusů jsme postavili na koncentrační řadě PS. Zvolili jsme koncentrace 3, 10, 30, 100 a 300  $\mu\text{M}$  PS v kombinaci s 10  $\mu\text{M}$  glutamátem v rámci trojskoků jako v předešlých pokusech. V **grafu č. 5** je znázorněna koncentrační křivka této inhibice.

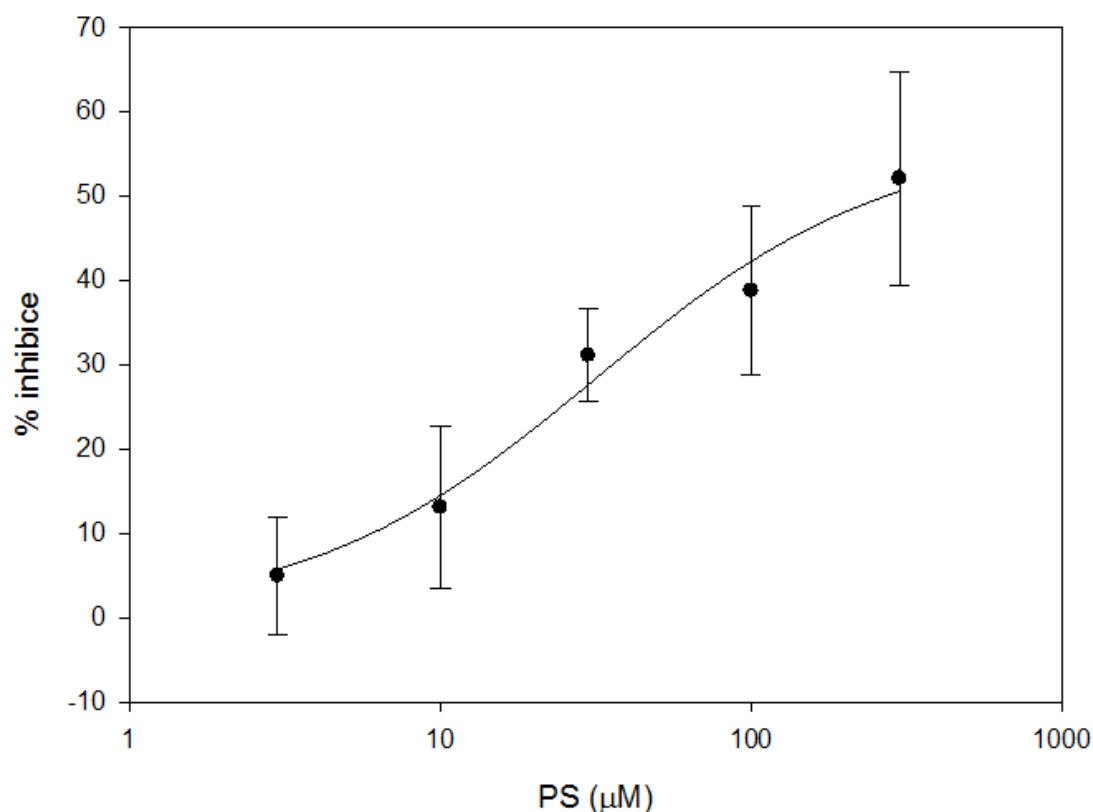


**Graf č. 5: Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci PS**

Pro zhotovení této křivky jsme použili Glu (10  $\mu\text{M}$ ) a 5 různých koncentrací PS (3, 10, 30, 100 a 300  $\mu\text{M}$ ).  $n$  pro jednotlivé koncentrace se lišily a pohybovaly se od 3 až po 26 buněk. Jednotlivými body jsme proložili **rovnici č. 1**.

Z **grafu č. 5** lze vyčíst, že 3  $\mu\text{M}$  koncentrace PS nepůsobí žádnou nebo jen velmi slabou inhibicí a že ani 300  $\mu\text{M}$  koncentrace PS nezpůsobila stoprocentní inhibici. Dále je také patrné, že největší rozdíl v míře inhibice byl mezi koncentracemi 30 a 100  $\mu\text{M}$ . Podle rovnice (1) jsme v programu SigmaStat vypočítali hodnotu  $\text{IC}_{50}$ , která je v tomto případě pro PS  $40 \pm 11 \mu\text{M}$ .

Stejný pokus jsme měřili i pomocí mikrospektrofluorimetrické metody a výsledky z tohoto měření jsou shrnuty v **grafu č. 6**



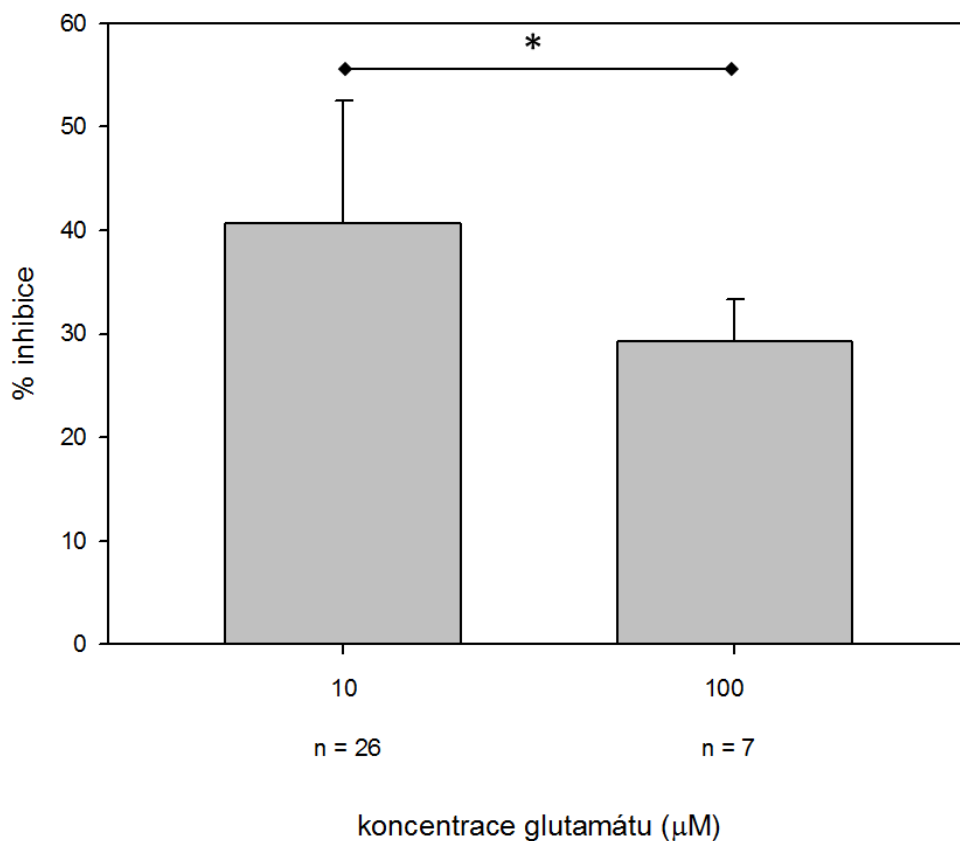
**Graf č. 6: Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci PS měřená mikrospektrofluorimetrickou metodou**

*Pro zhotovení této křivky jsme použili Glu (10 μM) a 5 různých koncentrací PS (3, 10, 30, 100 a 300 μM). n= 9 buněk. Jednotlivými body jsme proložili **rovnici č. 1**.*

**V grafu č. 6** je znázorněná křivka závislosti inhibice GluK2 receptoru na koncentraci neurosteroidu PS, která je srovnatelná s křivkou naměřenou pomocí metody terčíkového zámku a znázorněnou v **grafu č. 5**. Podle rovnice (1) jsme v programu SigmaStat vypočítali hodnotu  $IC_{50}$ , která je v tomto případě pro PS  $32 \pm 16 \mu M$ .

#### **6.4. Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci glutamátu**

V této sadě pokusů jsme zjišťovali, zda bude inhibice prostřednictvím 100 μM PS ovlivněná různou koncentrací glutamátu. Koncentrace glutamátu jsme zvolili 10, 100 a 1000 μM. V **grafu č. 7**. Jsou mezi sebou porovnány míry inhibice v přítomnosti 10 a 100 μM PS.



$p < 0.05$ ; t-test

**Graf č. 7: Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci glutamátu**

Sloupce znázorňují dvě různé koncentrace glutamátu, se kterými jsme měřili a následně mezi nimi porovnali účinek inhibice prostřednictvím neurosteroidu PS (100 μM). Rozdíl v inhibici byl signifikantní, což jsme označili hvězdičkou.

Z grafu č. 7 je vidět, že při nižší koncentraci glutamátu má PS vyšší inhibiční účinek, zatímco při vyšší koncentraci glutamátu je účinek PS signifikantně menší.

## 7. Diskuse

### 7.1. Optimalizace metod – Concanavalin A

Na začátku vypracování této diplomové práce jsme nejprve museli optimalizovat metody, jak jsem již popsala v kapitole Výsledky. Optimalizovali jsme použití lektinu ConA za účelem odstranění silné desensitizace homomerních KARs. Nejvíce údajů z literatury podávalo informace o použití ConA na GluK2 receptory a i z našeho zkušebního porovnávání měření s a bez použití ConA na GluK2 receptorech vzešlo, že bez použití ConA jsou odpovědi natolik malé a variabilní, že se nedají spolehlivě kvantifikovat. Variabilita mohla být způsobena silnou závislostí velikosti a tvaru odpovědi na rychlosti aplikace agonisty. Používali jsme proto inkubaci v ConA na GluK1, GluK2 i GluK3 receptory, abychom zachovali stejné parametry pokusů, a zároveň abychom zvýšili pravděpodobnost lepších záznamů, přestože některé práce potvrzují vliv ConA na GluK1 a GluK2 receptory, ale jeho vliv na receptory GluK3 zpochybňují (Veran et al. 2012).

### 7.2. Účinek PS, PAS, DHEA a DHEAS na GluK1, GluK2 a GluK3 receptory

V další části práce jsme se zabývali účinkem vybraných neurosteroidů na homomerní KARs.

V případě **GluK1** receptorů se jako významnější neurosteroidy ukázaly PS a PAS, které oba ve vyšší míře inhibovaly GluK1(R) variantu, jak je vidět v **grafu č. 1**. Konkrétně PS způsoboval na tomto receptoru inhibici průměrně  $44 \% \pm 9$  a PAS  $23 \% \pm 5$ . Z **obrázků č. 11 - 14** je pak vidět, že se proudové odpovědi GluK1 receptorů pohybovaly mezi desítkami až stovkami pA.

**GluK2** receptory byly do určité míry ovlivněny všemi čtyřmi neurosteroidy, avšak v největší míře inhibovaly opět neurosteroidy PS a PAS, jak je vidět v **grafu č. 2**. PS způsoboval inhibici průměrně  $41 \% \pm 12$  a PAS  $27 \% \pm 13$ . Inhibici neurosteroidem PS ( $100 \mu\text{M}$ ) jsme pak používali jako kontrolu i v dalších pokusech. Z **obrázku č. 15** je vidět, že proudové odpovědi byly mnohem větší než v případě receptorů GluK1. Zde se odpovědi pohybovaly v rozsahu tisíců pA.

V případě **GluK3** receptorů jsme zjistili efekt pouze u neurosteroidů PS a PAS, přičemž významnější inhibici způsoboval PS, jak znázorňuje **graf č. 3**. Konkrétně byla inhibice způsobená tímto neurosteroidem průměrně  $34 \% \pm 9$ . Velká směrodatná odchylka u PAS je dána tím, že v některých případech nezpůsobovala žádnou viditelnou inhibici, a zároveň

maximální inhibice způsobená neurosteroidem PAS byla 21 %. Z **obrázků č. 16 a 17** je patrné, že byla velikost proudových odpovědí shodná s velikostí u GluK1 receptorů, čili se pohybovala mezi desítkami až stovkami pA.

Nejvýznamnější modulační efekt u všech typů homomerních kainátových receptorů způsoboval pregnenolon sulfát.

### **7.3. Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci PS**

V této sadě pokusů jsme měřili koncentrační řadu pregnenolon sulfátu. Na receptor GluK2 jsme aplikovali koncentrace 3, 10, 30, 100 a 300  $\mu\text{M}$  PS společně s 10  $\mu\text{M}$  glutamátem. Jako maximální koncentraci PS jsme zvolili 300  $\mu\text{M}$  proto, abychom si mohli být jistí, že se neurosteroid opravdu v DMSO rozpustil. Byli jsme upozorněni (Mgr. Barbora Krausová; ústní sdělení), že ačkoliv některé články uvádějí i použití 500  $\mu\text{M}$  koncentrace PS (Yaghoubi et al. 1998), může při těchto koncentracích už docházet k vysrážení steroidů ve formě mikrokrystallů. Abychom si tedy byli jistí, jakou koncentraci opravdu aplikujeme, nepoužívali jsme vyšší koncentrace než zmíněných 300  $\mu\text{M}$ . Z **grafu č. 5** je patrné, že při naší maximální koncentraci PS se pohybovala inhibice průměrně kolem 45 %  $\pm$  4, zatímco při té nejnižší průměrně kolem 4 %  $\pm$  4. Směrodatná odchylka je v případě 3  $\mu\text{M}$  koncentrace PS takto vysoká proto, že tato nízká koncentrace v některých případech vyvolala 8% inhibici, ale v případě jiných buněk žádnou.

Tento pokus jsme měřili také pomocí mikrospektrofluorimetrické metody, abychom ověřili, zda je tato metoda vhodná k odhadu inhibičních konstant. Po srovnání výsledků tohoto pokusu pomocí metody terčíkového zámku a pomocí mikrospektrofluorimetrické metody jsme došli k závěru, že i prostřednictvím mikrospektrofluorimetrické metody lze spolehlivě získat inhibiční konstanty. Je třeba si ale uvědomit rozdílný rozsah u obou těchto metod. Zatímco metoda terčíkového zámku umožňuje analyzovat větší rozsah amplitud odpovědí, u měření pomocí mikrospektrofluorimetrické metody musí být odpovědi v rozsahu citlivosti fluorescenční sondy.

### **7.4. Závislost inhibice GluK2 receptoru na koncentraci glutamátu**

V další části práce jsme si položili otázku, zda je inhibice pregnenolon sulfátem závislá na koncentraci glutamátu. Očekávali jsme, že inhibice není na koncentraci závislá, protože podle údajů z literatury je modulace pravděpodobně alosterická, nikoliv kompetitivní. Zkoušeli jsme původně tři různé koncentrace glutamátu (10, 100 a 1000  $\mu\text{M}$ ). Nakonec jsme ale zpracovali výsledky jen s koncentracemi 10 a 100  $\mu\text{M}$ , protože pro koncentraci 1000  $\mu\text{M}$  byly záznamy nedůvěryhodné (např. odpověď nedosáhla ustáleného stavu).

V jiných případech se nám nepodařilo naměřit 1000  $\mu\text{M}$  koncentraci glutamátu vůbec. Bylo to způsobené tím, že při tak vysoké koncentraci byly odpovědi větší, než je měřicí rozsah aparatury. Tento problém jsme neočekávali, neboť jsme podle údajů z literatury očekávali, že  $\text{EC}_{50}$  pro glutamát u GluK2 receptorů je kolem 10  $\mu\text{M}$  (Traynelis et al. 2010), a tak by měla být odpověď na saturující koncentraci glutamátu maximálně dvojnásobná. Kvalitní záznam se nám nakonec povedlo naměřit jen na jedné buňce a vykazoval 17% inhibici.

Z **grafu č. 7** je vidět, že byla inhibice signifikantně nižší při vyšší koncentraci glutamátu. Tento fakt lze vysvětlit hned několika způsoby.

Alosterický mechanismus účinku inhibitoru může zahrnovat i změnu afinity agonisty k receptoru. Pokud by inhibitor vyvolával mírné snížení afinity, pak by se největší inhibiční efekt projevil při koncentracích agonisty okolo hodnoty  $\text{EC}_{50}$ , zatímco při saturujících koncentracích agonisty by se nemusel projevit vůbec.

Vzhledem k tomu, jak významný je vliv desensitizace u kainátových receptorů, není možné ani vyloučit vliv PS na rychlost nebo míru desensitizace, nebo různou vazbu PS na klidový, aktivovaný a desensitizovaný receptor.

Lze uvažovat možnost, že by se sice nejednalo přímo o plný kompetitivní mechanismus, protože tento mechanismus literatura nepovažuje za pravděpodobný, ale o děj, kdy vazba PS nějakým způsobem ovlivňuje vazebné místo pro glutamát, což se více projeví při aplikaci nižší koncentrace agonisty. Možná je také opačná situace, kdy glutamát nějakým způsobem ovlivňuje vazebné místo pro PS. Nejednalo by se však přímo o kompetici v jednom vazebném místě.

Je třeba také uvážit variantu, že takový výsledek mohl být ovlivněn systematickou chybou měření, jelikož při vyšší proudové odpovědi je výsledek více zatížen chybou nedokonalé kompenzace sériového odporu mikroelektrody.

## 8. Závěr

V této diplomové práci jsme se zabývali interakcí homomerních kainátových receptorů s neurosteroidy PS, PAS, DHEA a DHEAS. Naše výsledky lze stručně shrnout následujícími body:

- Použitím metody terčíkového zámku jsme zjistili, že neurosteroidy PS a PAS mají inhibiční vliv na všechny homomerní kainátové receptory. Oproti tomu neurosteroidy DHEA a DHEAS způsobují inhibici jen v případě GluK2 a v malé míře u GluK1(R) receptorů. Největší míru inhibice způsobuje u všech typů homomerních kainátových receptorů neurosteroid PS.
- Podařilo se nám prostudovat koncentrační závislost inhibice PS na GluK2 receptoru jak metodou terčíkového zámku, tak pomocí mikrospektrofluorimetrické metody. Hodnota  $IC_{50}$  určená metodou terčíkového zámku je  $40 \pm 11 \mu\text{M}$ . Hodnota  $IC_{50}$  určená pomocí mikrospektrofluorimetrické metody je  $32 \pm 16 \mu\text{M}$ .
- Použitím metody terčíkového zámku jsme zkoumali míru inhibice PS na GluK2 receptoru při aplikaci různých koncentrací glutamátu a zjistili jsme, že v přítomnosti vyšší koncentrace glutamátu je inhibiční účinek PS nižší.

Vzhledem k nízkému inhibičnímu účinku vybraných neurosteroidů na homomerní kainátové receptory i přes jejich vysokou ( $100 \mu\text{M}$ ) koncentraci v průběhu našich pokusů je přímý fyziologický účinek na tyto receptory v mozku nepravděpodobný. V mozku se ale vyskytují homomerní i heteromerní kainátové receptory. Nejvíce rozšířenou variantou KARs v mozku jsou GluK2/GluK5 receptory, nicméně výskyt různých typů KARs se liší podle oblasti mozku. Například v hipokampálních synapsích se vyskytují především heteromerní KARs, zatímco v mozečku převažují KARs homomerní. Vzhledem k tomu, že mohou být heteromerní KARs modulovány těmito neurosteroidy jinou měrou či jiným způsobem, nedá se vyloučit, že by tyto neurosteroidy mohly mít významnější fyziologický efekt na heteromerních kainátových receptorech.

## 9. Literatura

### 9.1. Literární zdroje

- Abdrachmanova, G., Chodounská, H., Vyklický, L., 2001. Effects of steroids on NMDA receptors and excitatory synaptic transmission in neonatal motoneurons in rat spinal cord slices. *European Journal of Neuroscience*, 14(3), pp.495–502.
- Armstrong, N., Gouaux, E., 2000. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*, pp.165–181.
- Baulieu, E.E., Robel, P., 1990. Neurosteroids: A new brain function? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3), pp.395–403..
- Baulieu, E.E., 1998. Neurosteroids: A novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), pp.963–987.
- Bockaert, J., Pin, J.P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal*, 18(7), pp.1723–9.
- Brent Dawe, G., Musgaard, M., Andrews, E.D., Daniels, B.A., Aurousseau, M.R.P., Biggin, P.C., Bowie, D., 2013. Define the structural relationship between kainate receptor deactivation and desensitization. *Nat Struct Mol Biol.*, 20(9), pp.1054–1061.
- Compagnone, N.A., Mellon, S.H., 1998. Dehydroepiandrosterone: A potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Neurobiology*, 95(April 1998), pp.4678–4683.
- Corpéchet, C., Synguelakis, M., Talha, S., Axelson, M., Sjövall, J., Vihko, R., Baulieu, E.-E., Robel, P., 1983. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Research*, 270(1), pp.119–125.
- Das, U., Kumar, J., Mayer, M.L., Plested, A.J.R., 2010. Domain organization and function in GluK2 subtype kainate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), pp.8463–8.
- Dittert, I., Vlachova, V., Knotkova, H., Vitaskova, Z., Vyklicky, L., Kress, M., Reeh, P.W., 1998. A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured



neurones. *Journal of Neuroscience Methods*, 82(2), pp.195–201.

- Dittert, I., Benedikt, J., Vyklicky, L., Zimmermann, K., Reeh, P.W., Vlachova, V., 2006. Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *Journal of Neuroscience Methods*, 151(2), pp.178–185.
- Everts, I., Petroski, R., Kizelsztejn, P., Teichberg, V.I., Heinemann, S.F., Hollmann, M., 1999. Lectin-induced inhibition of desensitization of the kainate receptor GluR6 depends on the activation state and can be mediated by a single native or ectopic N-linked carbohydrate side chain. *The Journal of neuroscience*, 19(3), pp.916–927.
- Everts, I., Villmann, C., Hollmann, M., 1997. N-glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Molecular Pharmacology*, 52(5), pp.861–873.
- Fay, A.-M.L., Bowie, D., 2006. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. *The Journal of physiology*, 572(2006), pp.201–213.
- Fletcher, E.J., Lodge, D., 1996. New developments in the molecular pharmacology of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate and kainate receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 70(1), pp.65–89.
- Flood, J.F., Morley, J.E., Roberts, E., 1995. Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: the amygdala is by far the most sensitive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), pp.10806–10..
- Frydenvang, K., Lash, L.L., Naur, P., Postila, P.A., Pickering, D.S., Smith, C.M., Gajhede, M., Sasaki, M., Sakai, R., Pentikäinen, O.T., Swanson, G.T., Kastrup, J.S., 2009. Full domain closure of the ligand-binding core of the ionotropic glutamate receptor iGluR5 induced by the high affinity agonist dysiherbaine and the functional antagonist 8,9-dideoxyneodysiherbaine. *Journal of Biological Chemistry*, 284(21), pp.14219–14229.
- Fukushima, T., Shingai, R., Ogurusu, T., Ichinose, M., 2003. Inhibition of willardiine-induced currents through rat GluR6/KA-2 kainate receptor channels by Zinc and other divalent cations. *Neuroscience Letters*, 349(2), pp.107–110.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane

patches. *Pflügers Archiv*, 391(2), pp.85–100.

Hoo, K.H., Nutt, S.L., Fletcher, E.J., Elliott, C.E., Korczak, B., Deverill, R.M., Rampersad, V., Fantaske, R.P., Kamboj, R.K., 1994. Functional expression and pharmacological characterization of the human EAA4 (GluR6) glutamate receptor: a kainate selective channel subunit. *Receptors & channels*, 2(4), pp.327–337..

Horak, M., Vlcek, K., Chodounska, H., Vyklicky, L., Jr., 2006. Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience*, 137(1), pp.93–102..

Chatterton, J.E., Awobuluyi, M., Premkumar, L.S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K.A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S.A., Zhang, D., 2002. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415(6873), pp.793–798.

Chopra, D. A., Monaghan, D.T., Dravid, S.M., 2015. Bidirectional effect of pregnenolone sulfate on GluN1/GluN2A N-methyl-D-aspartate receptor gating depending on extracellular calcium and intracellular milieu. *Molecular Pharmacology*, 88(4), pp.650–659.

Kaczor, A.A., Wróbel, T., Kronbach, C., Unverferth, K., Stachal, T., Matosiuk, D., 2015. Synthesis and molecular docking of novel non-competitive antagonists of GluK2 receptor. *Medicinal Chemistry Research*, 24(2), pp.810–817.

Karakas, E., Simorowski, N., Furukawa, H., 2009. Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *The EMBO journal*, 28(24), pp.3910–20.

Kemp, J. A, McKernan, R.M., 2002. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature neuroscience*, 5 Suppl, pp.1039–1042.

Kimonides, V.G., Khatibi, N.H., Svendsen, C.N., Sofroniew, M.V., Herbert, J., 1998. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), pp.1852–7..

Kostakis, E., Jang, M.K., Russek, S.J., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 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), pp.486–496..

- Kostakis, E., Smith, C., Jang, M.K., Martin, S.C., Richards, K.G., Russek, S.J., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 2013. The neuroactive steroid pregnenolone sulfate stimulates trafficking of functional N-methyl D-aspartate receptors to the cell surface via a noncanonical, G protein, and Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. *Molecular pharmacology*, 84(2), pp.261–74.
- Kumar, J., Schuck, P., Jin, R., Mayer, M.L., 2009. The N-terminal domain of GluR6 subtype glutamate receptor ion channels. *Nature structural & molecular biology*, 16(6), pp.631–638.
- Kumar, J., Mayer, M.L., 2010. Crystal structures of the glutamate receptor ion channel GluK3 and GluK5 amino-terminal domains. *Journal of Molecular Biology*, 404(4), pp.680–696.
- Kussius, C.L., Kaur, N., Popescu, G.K., 2009. Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(21), pp.6819–6827.
- Kuusinen, A., Arvola, M., Keinänen, K., 1995. Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. *The EMBO journal*, 14(24), pp.6327–6332.
- Lapchak, P.A., Chapman, D.F., Nunez, S.Y., Zivin, J.A., 2000. Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: Possible involvement of GABA(A) receptors. *Stroke*, 31(8), pp.1953–1957.
- Li, H., Klein, G.M., Sun, P., Buchan, A.M., 2001. Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia. *Brain Research*, 888(2), pp.263–266.
- MacLean, D.M., Wong, A.Y.C., Fay, A.M., Bowie, D., 2011. Cations but not anions regulate the responsiveness of kainate receptors. *Journal of Neuroscience*, 31(6), pp.2136–2144.
- Madry, C., Betz, H., Geiger, J.R.P., Laube, B., 2008. Supralinear potentiation of NR1/NR3A excitatory glycine receptors by Zn<sup>2+</sup> and NR1 antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), pp.12563–12568.
- Malayev, A., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 2002. Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. *British Journal of Pharmacology*, 135(4), pp.901–909.
- Mayer, M.L., 2016. Structural biology of glutamate receptor ion channel complexes. *Current*

*Opinion in Structural Biology*, 41, pp.119–127.

- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie, P.B., 1984. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309(5965), pp.261–263.
- Mellon, S.H., Griffin, L.D., 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(1), pp.35–43.
- Meyerson, J.R., Chittori, S., Merk, A., Rao, P., Han, T.H., Serpe, M., Mayer, M.L., Subramaniam, S., 2016. Structural basis of kainate subtype glutamate receptor desensitization. *Nature*, 537(7621), pp.567–571.
- Meyerson, J.R., Kumar, J., Chittori, S., Rao, P., Pierson, J., Bartesaghi, A., Mayer, M.L., Subramaniam, S., 2014. Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization. *Nature*, 514(7522), pp.328–334.
- Møllerud, S., Frydenvang, K., Pickering, D.S., Kastrup, J.S., 2017. Lessons from crystal structures of kainate receptors. *Neuropharmacology*, 112, Part, pp.16–28.
- Mott, D.D., Washburn, M.S., Zhang, S., Dingledine, R.J., 2003. Subunit-dependent modulation of kainate receptors by extracellular protons and polyamines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(4), pp.1179–1188.
- Mott, D.D., Benveniste, M., Dingledine, R.J., 2008. pH-dependent inhibition of kainate receptors by zinc. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(7), pp.1659–71.
- Neher, E., Sakmann, B., 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), pp.799–802.
- Orentreich, N., Brind, J.L., Vogelman, J.H., Andreas, R., Baldwin, H., 1992. Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75(4), pp.1002–1004.
- Park-Chung, M., Wu, F.S., Purdy, R.H., Malayev, A.A., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 1997. Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Molecular pharmacology*, 52(1997), pp.1113–1123.
- Park-Chung, M., Wu, F.S., Farb, D.H., 1994. 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Molecular*

*Pharmacology*, 46(1), pp.146–150.

Partin, K.M., Patneau, D.K., Winters, C.A., Mayer, M.L., Buonanno, A., 1993. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron*, 11(6), pp.1069–1082.

Petrovic, M., Sedlacek, M., Horak, M., Chodounska, H., Vyklicky, L., Jr., 2005. 20-Oxo-5 - Pregnan-3 -yl Sulfate Is a Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor. *Journal of Neuroscience*, 25(37), pp.8439–8450.

Petrovic, M., Sedlacek, M., Cais, O., Horak, M., Chodounska, H., Vyklicky, L., Jr., 2009. Pregnenolone sulfate modulation of N-methyl-d-aspartate receptors is phosphorylation dependent. *Neuroscience*, 160(3), pp.616–628..

Pickard, B.S., Malloy, M.P., Christoforou, A., Thomson, P.A., Evans, K.L., Morris, S.W., Hampson, M., Porteous, D.J., Blackwood, D.H.R., Muir, W.J., 2006. Cytogenetic and genetic evidence supports a role for the kainate-type glutamate receptor gene, GRIK4, in schizophrenia and bipolar disorder. *Molecular psychiatry*, 11(9), pp.847–57.

Plested, A.J.R., Vijayan, R., Biggin, P.C., Mayer, M.L., 2009. Molecular basis of kainate receptor modulation by sodium. *Neuroscience Research*, 58(5), pp.720–735.

Plested, A.J.R., Mayer, M.L., 2007. Structure and Mechanism of Kainate Receptor Modulation by Anions. *Neuron*, 53(6), pp.829–841.

Reddy, D.S., 2010. Neurosteroids: Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res*, 186, pp.113–137.

Sedláček, M., Korinek, M., Petrovic, M., Cais, O., Adamusova, E., Chodounska, H., Vyklicky, L., Jr., 2008. Neurosteroid modulation of ionotropic glutamate receptors and excitatory synaptic transmission. *Sciences-New York*, 57, p.8628408.

Shirakawa, H., Katsuki, H., Kume, T., Kaneko, S., Akaike, A., 2005. Pregnenolone sulphate attenuates AMPA cytotoxicity on rat cortical neurons. *European Journal of Neuroscience*, 21(9), pp.2329–2335.

Schauder, D.M., Kuybeda, O., Zhang, J., Klymko, K., Bartesaghi, A., Borgnia, M.J., Mayer, M.L., Subramaniam, S., 2013. Glutamate receptor desensitization is mediated by changes in quaternary structure of the ligand binding domain. *Proceedings of the National Academy*

*of Sciences of the United States of America*, 110(15), pp.5921–6.

- Sköld, N., Nielsen, B., Olsen, J., Han, L., Olsen, L., Madsen, U., Kristensen, J.L., Pickering, D.S., Johansen, T.N., 2014. Design, synthesis and in vitro pharmacology of GluK1 and GluK3 antagonists. Studies towards the design of subtype-selective antagonists through 2-carboxyethyl-phenylalanines with substituents interacting with non-conserved residues in the GluK binding site. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(19), pp.5368–5377.
- Sliwinski, A., Monnet, F.P., Schumacher, M., Morin-Surun, M.P., 2004. Pregnenolone sulfate enhances long-term potentiation in CA1 in rat hippocampus slices through the modulation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Neuroscience Research*, 78(5), pp.691–701.
- Smith, C.C., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 2014. Pregnenolone sulfate as a modulator of synaptic plasticity. *Psychopharmacology*, 231(17), pp.3537–3556.
- Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P., Gouaux, E., 2009. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*, 462(7274), pp.745–56.
- Tobi, D., 2016. Dynamics and allostery of the ionotropic glutamate receptors and the ligand binding domain. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 84(2), pp.267–277.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R., 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 62(3), pp.405–96.
- Unno, M., Shinohara, M., Takayama, K., Tanaka, H., Teruya, K., Doh-ura, K., Sakai, R., Sasaki, M., Ikeda-Saito, M., 2011. Binding and selectivity of the marine toxin neodysierbaine A and its synthetic analogues to GluK1 and GluK2 kainate receptors. *Journal of Molecular Biology*, 413(3), pp.667–683.
- Veran, J., Kumar, J., Pinheiro, P.S., Athané, A., Mayer, M.L., Perrais, D., Mulle, C., 2012. Zinc potentiates GluK3 glutamate receptor function by stabilizing the ligand binding domain dimer interface. *Neuron*, 76(3), pp.565–578.
- Weaver, C.E., Land, M.B., Purdy, R.H., Richards, K.G., Gibbs, T.T., Farb, D.H. 2000. Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca(2+) accumulation and cell death. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 293(3), pp.747–54.

- Weill-Engerer, S., David, J.P., Sazdovitch, V., Liere, P., Eychenne, B., Pianos, A., Schumacher, M., Delacourte, A., Baulieu, E.E., Akwa, Y., 2002. Neurosteroid quantification in human brain regions: Comparison between alzheimer's and nondemented patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(11), pp.5138–5143.
- Wilding, T.J., Zhou, Y., Huettner, J.E., 2005. Q/R site editing controls kainate receptor inhibition by membrane fatty acids. *Journal of Neuroscience*, 25(41), pp.9470–9478.
- Wilding, T.J., Lopez, M.N., Huettner, J.E., 2014. Radial symmetry in a chimeric glutamate receptor pore. *Nature communications*, 5, p.3349.
- Xu, Y., Tanaka, M., Chen, L., Sokabe, M., 2012. DHEAS induces short-term potentiation via the activation of a metabotropic glutamate receptor in the rat hippocampus. *Hippocampus*, 22(4), pp.707–722.
- Yaghoubi, N., Malayev, A., Russek, S.J., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 1998. Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. *Brain Research*, 803(1–2), pp.153–160.
- Yuan, H., Hansen, K.B., Vance, K.M., Ogden, K.K., Traynelis, S.F., 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, pp.12045–12058.
- Zhu, S., Gouaux, E., 2017. Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 112, Part, pp.11–15.

## 9.2. Internetové zdroje

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=105074, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/105074> (accessed Apr. 27, 2017).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=44322229, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44322229> (accessed Apr. 27, 2017).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5881, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5881> (accessed Apr. 27, 2017).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=12594, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12594> (accessed Apr. 27, 2017)