

Univerzita Karlova v Praze  
2. lékařská fakulta

Studium modulace rekombinantních a  
nativních NMDA receptorů fyzikálními a  
chemickými faktory

Ondřej Cais

*Disertační práce*

Školitel: MUDr. Ladislav Vyklický ml., DrSc.

Praha 2009

Chci poděkovat svému školiteli, MUDr. Ladislavu Vyklickému ml., DrSc., za příležitost podílet se na projektech, jejichž výsledky jsou uvedeny v této disertační práci, za pečlivé odborné vedení při jejich řešení a za všechny cenné rady, kterých se mi od něj dostalo.

Děkuji i dalším lidem, kteří mi v průběhu mého postgraduálního studia pomohli s nejrůznějšími odbornými a technickými problémy: RNDr. Viktorii Vlachové, DrSc., Ing. Ivanu Dittertovi, CSc. a Ing. Janu Teisingerovi, CSc.

Za přípravu tkáňových kultur děkuji Magdě Kuntošové.

Všem kolegům z oddělení buněčné neurofyzologie Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. pak děkuji za příjemné a podnětné pracovní prostředí.

# OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>3</b>
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	5
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>8</b>
2.1. NMDA RECEPTORY - STRUKTURA A PODJEDNOTKOVÉ SLOŽENÍ.....	8
2.1.1. Typy podjednotek.....	8
2.1.2. Struktura podjednotek.....	10
2.1.3. Podjednotkové složení NMDA receptorů.....	10
2.1.4. Expresce podjednotek NMDA receptorů.....	11
2.2. MODULACE FUNKCE NMDA RECEPTORŮ.....	12
2.2.1. Fyzikální vlivy.....	12
2.2.1.1. Teplota.....	12
2.2.1.2. Mechanické vlivy.....	14
2.2.1.3. pH.....	14
2.2.2. Chemické vlivy (farmakologie NMDA receptorů).....	15
2.2.2.1. Agonisté.....	15
2.2.2.2. Antagonisté.....	16
2.2.2.2.1. Kompetitivní antagonisté.....	16
2.2.2.2.2. Akompetitivní antagonisté.....	17
2.2.2.2.3. Nekompetitivní antagonisté a další modulační látky.....	17
2.2.2.2.3.1. Ifenprodil.....	17
2.2.2.2.3.2. Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> .....	18
2.2.2.2.3.3. Polyaminy.....	19
2.3. NEUROSTEROIDY.....	19
2.3.1. Neurosteroidy v CNS - syntéza a výskyt.....	20
2.3.2. Neurosteroidy a NMDA receptory.....	22
2.3.2.1. Potenciace NMDA receptorů neurosteroidy.....	23
2.3.2.2. Inhibice NMDA receptorů neurosteroidy.....	25
2.3.3. Biologické účinky neuroaktivních steroidů.....	26
<b>3. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>28</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>29</b>
4.1. SLOŽENÍ ROZTOKŮ .....	29
4.2. POUŽITÉ GENY .....	30
4.3. PŘÍPRAVA PLASMIDOVÉ DNA .....	30
4.3.1. Transformace kompetentních buněk.....	30
4.3.2. Izolace plasmidu pomocí "Qiagen® Plasmid Mini Kit".....	30
4.3.3. Izolace plasmidu pomocí "Qiagen® Plasmid Midi Kit".....	31
4.4. TKÁŇOVÉ KULTURY .....	32
4.4.1. Lidské embryonální ledvinné (HEK) buňky.....	32
4.4.2. Primární kultury hipokampálních neuronů.....	32
4.5. TRANSFEKCE HEK BUNĚK .....	32
4.5.1. Transfekce pomocí Lipofectaminu 2000.....	32
4.5.2. Magnetická transfekce.....	33
4.6. SNÍMÁNÍ PROUDOVÝCH ODPOVĚDÍ NMDA RECEPTORŮ .....	33
4.6.1. Optická zařízení.....	33
4.6.2. Aplikace roztoků .....	33
4.6.2.1. Paralelní trubičky.....	33
4.6.2.2. Theta-trubička s kontrolou teploty.....	34
4.6.3. Snímání a úprava proudových odpovědí.....	35
4.7. ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT.....	36
4.8. POUŽITÉ ROVNICE .....	36
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>39</b>
5.1. TEPLOTNÍ ZÁVISLOST NMDA RECEPTORŮ .....	39

5.1.1. Vliv teploty na amplitudu makroskopických odpovědí NR1/NR2B receptorů.....	39
5.1.2. Kinetická charakterizace NMDA receptorů a její teplotní závislost.....	40
5.1.2.1. Model aktivace NMDA receptorů.....	40
5.1.2.2. Teplotní závislost kinetických charakteristik NMDA receptorů.....	42
5.1.2.3. Aktivace NMDA receptorů nízkou koncentrací glutamátu.....	46
5.1.3. Vliv teploty na průběh deaktivace NMDA receptorů.....	48
5.1.3.1. Rekombinantní NR1/NR2B receptory.....	48
5.1.3.2. Nativní NMDA receptory.....	50
5.1.4. Teplotní závislost desenzitizace NMDA receptorů.....	51
5.1.4.1. Rekombinantní NR1/NR2B receptory.....	51
5.1.4.2. Nativní NMDA receptory.....	52
5.2. MODULACE NMDA RECEPTORŮ DERIVÁTY NEUROSTEROIDŮ.....	53
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>61</b>
6.1. TEPLOTNÍ ZÁVISLOST AMPLITUDY ODPOVĚDÍ NMDA RECEPTORŮ.....	61
6.2. TEPLOTNÍ ZÁVISLOST KINETICKÝCH CHARAKTERISTIK NR1/NR2B RECEPTORU.....	62
6.3. VLIV DESENZITIZACE NA DEAKTIVACI - DALŠÍ EXPERIMENTÁLNÍ MODELY.....	63
6.4. TEPLOTNÍ ZÁVISLOST DEAKTIVACE NMDA RECEPTORŮ - SROVNÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍCH MODELŮ.....	65
6.5. FAKTORY URČUJÍCÍ PRŮBĚH EPSC.....	68
6.6. AKTIVACE NÍZKOU KONCENTRACÍ GLUTAMÁTU - MOŽNOST ALTERNATIVNÍHO OTEVŘENÍ IONTOVÉHO KANÁLU?.....	70
6.7. VZTAH STRUKTURY A FUNKCE DERIVÁTŮ NEUROSTEROIDŮ.....	71
6.7.1. Substituce na C3 - sukcinát místo sulfátu.....	71
6.7.2 Vliv substituce na C7.....	73
6.7.3. Vliv délky řetězce C3-substituentu.....	74
6.7.4. Stereospecifita účinku steroidů.....	75
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>77</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>78</b>

## Seznam použitých zkratek

3 $\alpha$ 5 $\beta$ HS	pregnanolonhemisukcinát; 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ylhemisukcinát
3 $\alpha$ 5 $\beta$ S	pregnanolonsulfát; 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ylsulfát
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa
AMPA	kyselina ( $\pm$ )- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
ATP	adenosintrifosfát
CNQX	6-cyano-7-nitro-quinoxalin-2,3-dion
CNS	centrální nervový systém
D,L-APV	D,L-2-amino-5-fosfonopentanová kyselina
D-AP5	kyselina D(-)-2-amino-5-fosfonopentanová
D-AP7	kyselina D(-)-2-amino-7-fosfonoheptanová
D-CPP	kyselina D-3-(2-karboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-fosfonová
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHEAS	dehydroepiandrosteronsulfát
DMSO	dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	koncentrace účinné látky, při níž je dosaženo poloviny maximálního účinku
EDTA	kyselina ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraoctová
EGTA	kyselina 1,2-di(2-aminoethoxy)ethan- N,N,N',N'-tetraoctová
EPSC	excitační postsynaptický proud
FCS	fetální telecí sérum
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GFP	zelený fluorescenční protein
HEK	lidská embryonální ledvinná (buňka)
HEPES	kyselina N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonová]
IC <sub>50</sub>	koncentrace účinné látky, při níž je dosaženo 50% inhibice
LB	Luria-Bertani (médiu)
LTP	dlouhodobá potenciace
MK-801	(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyklohepten-5,10-iminmaleát
MNI	4-methoxy-7-nitroindol
NMDA	N-methyl-D-aspartát
P450scc	enzym štěpící postranní řetězec cholesterolu
PBS	solný roztok pufrovaný fosfáty
PCP	fencyklidin
PS	pregnenolonsulfát; 20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -ylsulfát
STS	steroidsulfatasa
SULF	sulfotransferasa
$\tau$	časová konstanta deaktivace či desenzitizace
TRP	transient receptor potential

# 1. ÚVOD

L-glutamát je nejrozšířenějším neurotransmiterem v savčí centrální nervové soustavě a zprostředkovává většinu excitačního synaptického přenosu. Na základě mechanismu účinku rozlišujeme dvě hlavní skupiny glutamátových receptorů: *ionotropní glutamátové receptory* jsou iontové kanály, které po aktivaci glutamátem přímo propouštějí kationty do buňky (Dingledine et al., 1999), zatímco *metabotropní glutamátové receptory* účinkují prostřednictvím G-proteinů, s nimiž jsou spřaženy (Pin a Acher, 2002). Iontropní glutamátové receptory se dále dělí do tří tříd nazvaných podle specifických agonistů –  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-propionátu (AMPA), kainátu a N-methyl-D-aspartátu (NMDA).

NMDA receptory mají několik vlastností, které je odlišují od ostatních ionotropních glutamátových receptorů, např. relativně velmi pomalou kinetiku aktivace/deaktivace nebo vysokou propustnost pro  $\text{Ca}^{2+}$ , která je propojuje s celou řadou intracelulárních signalizačních drah. Dále se vyznačují svým napětově závislým blokem extracelulárními  $\text{Mg}^{2+}$  při klidovém membránovém – k aktivaci NMDA receptorů je potřeba předchozí depolarizace buňky (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Vedle synaptického přenosu hrají NMDA receptory významnou roli i v dalších buněčných procesech, jako je např. excitotoxicita, definovaná jako buněčná smrt v důsledku nadměrné aktivace glutamátových receptorů a z ní plynoucího narušení  $\text{Ca}^{2+}$  homeostáze (Arundine a Tymianski, 2003). Kromě toho byl popsán klíčový význam NMDA receptorů pro synaptickou plasticitu, konkrétně v procesech dlouhodobé potenciace a deprese (LTP resp. LTD, z angl. „long-term potentiation/depression“), které jsou považované za buněčný korelát učení a tvorby paměti (Lynch, 2004).

Vedle výše zmíněných fyziologických rolí byla také popsána úloha NMDA receptorů při vzniku a průběhu řady chronických i akutních patologických jevů v CNS (ischemické poškození, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, schizofrenie), která z nich činí atraktivní cíl farmakologické intervence. Klinické testy látek ovlivňujících aktivitu NMDA receptorů však zatím většinou narážejí na problémy s nežádoucími vedlejšími účinky. K dokonalejšímu porozumění funkci těchto receptorů, a výhledově tak i k případnému lepšímu terapeutickému zásahu do jejich činnosti by měla sloužit i tato disertační práce, zaměřující se na dva

mechanismy, kterými je funkce těchto iontových kanálů modulována: teplotní závislost NMDA receptorů a ovlivnění jejich funkce steroidními látkami odvozenými od endogenního neurosteroidu pregnanolonsulfátu.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. NMDA receptory - struktura a podjednotkové složení

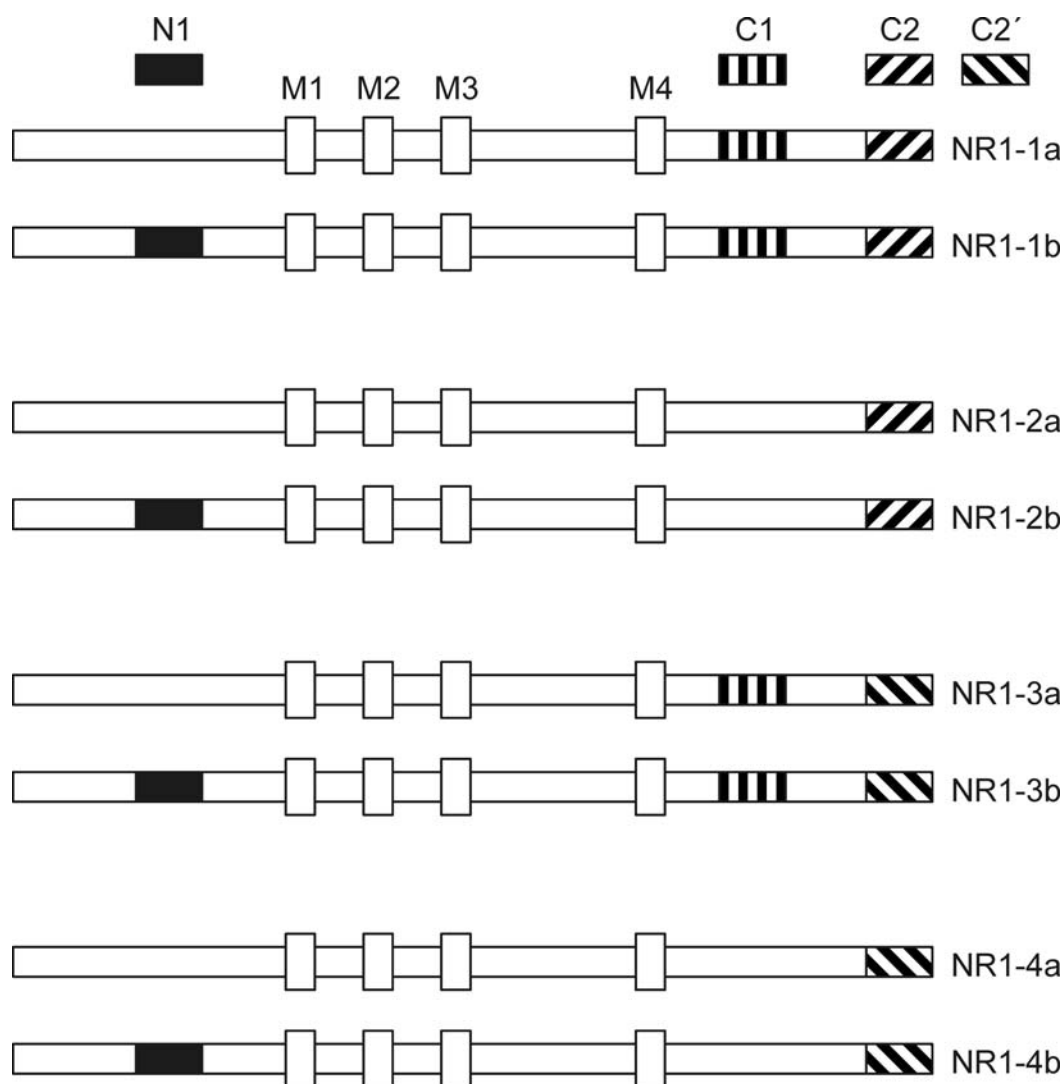
#### 2.1.1. Typy podjednotek

Ionotropní glutamátové receptory byly původně rozděleny do skupin podle svých specifických agonistů, tj. na AMPA, kainátové a NMDA receptory. Pozdější molekulárně-biologické studie na základě aminokyselinového složení toto rozdělení potvrdily, zjistily však také, že každá skupina obsahuje proteiny kódované více než jedním genem, které se ještě v důsledku posttranslačních úprav mohou dále dělit na podjednotky mnoha typů (Monyer et al., 1992; Ishii et al., 1993). V případě NMDA receptorů rozlišujeme na základě sekvenční homologie tři genové rodiny: NR1, NR2 a NR3 (Dingledine et al., 1999).

Podjednotky skupiny NR1 jsou kódovány jediným genem, různé typy podjednotek NR1 však vznikají díky alternativnímu sestřihu (Hollmann et al., 1993; Zukin a Bennett, 1995). K tomu dochází celkem na třech místech (exon 5 na N-konci (též označován jako N1 doména) a exony 21 a 22 na C-konci (domény C1 a C2), čímž vzniká osm různých sestřihových variant (NR1-1a až NR1-4b, viz Obr. 2.1).

Druhá skupina zahrnuje produkty čtyř různých genů, podjednotky NR2A-D. Ty se od NR1 podjednotek liší jednak svou velikostí (1250-1482 aminokyselin proti 938 u NR1), jednak aminokyselinovým složením, kdy sekvenční homologie mezi NR1 a libovolnou NR2 podjednotkou dosahuje jen asi 15 % (Ishii et al., 1993). Naproti tomu jednotlivé typy NR2 podjednotek jsou identické přibližně z 50 %, přičemž největší shoda panuje v oblasti transmembránových segmentů (80-90 %), zatímco N- a C-konce jsou méně konzervované (45-60 %, resp. 20-30 % homologie) (Ishii et al., 1993). Alternativní sestřih byl popsán pouze u NR2C a NR2D podjednotky (Ishii et al., 1993; Daggett et al., 1998). Na základě podobnosti v primární struktuře lze NR2 podjednotky dále rozdělit do dvou dvojic, přičemž tato příbuznost není pouze strukturní, ale projevuje se i funkčně: receptory obsahující podjednotky NR2A a/nebo NR2B se od těch, které obsahují podjednotky NR2C nebo NR2D, liší např. vyšší jednotkovou vodivostí, citlivostí k  $Mg^{2+}$  a dalším blokátorům otevřeného iontového kanálu (Monyer et al., 1994) nebo třeba odlišnou modulací neurosteroidy (Malayev et al., 2002; Horak et al., 2006).





**Obr. 2.1.** Alternativní sestřih podjednotky NR1. Schematické znázornění jednotlivých sestřihových variant a míst alternativního sestřihu v rámci molekuly (M1-M4 představují jednotlivé membránové segmenty) (upraveno podle (Dingledine et al., 1999)).

Poslední skupina obsahuje dva zástupce. Podjednotka NR3A je tvořena 1115 aminokyselinami a s NR1 (stejně jako s NR2) podjednotkami se shoduje přibližně z 27 % (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995). Jako zatím poslední pak byla klonována podjednotka NR3B (Nishi et al., 2001; Matsuda et al., 2002), která se skládá z 1003 aminokyselin a vykazuje homologii 51 % k NR3A (Nishi et al., 2001), ale jen 17-21 % k zástupcům skupin NR1 a NR2 (Chatterton et al., 2002).

### **2.1.2. Struktura podjednotek**

Původně se předpokládalo, že všechny ionotropní receptory mají podobnou strukturu. Postupem času se však ukazovalo, že glutamátové receptory se od nikotinických acetylcholinových receptorů, považovaných za prototyp celé superrodiny ionotropních receptorů, v tomto ohledu významně liší (Mayer a Armstrong, 2004). Jsou větší (100-150 kDa vs. ~50 kDa) a jejich membránová topologie je odlišná: zatímco nikotinické (nebo např. GABA<sub>A</sub>) receptory mají čtyři transmembránové domény a extracelulárně lokalizovaný N- i C-konec, u ionotropních glutamátových receptorů je extracelulární pouze N-konec a transmembránové segmenty v pravém slova smyslu jsou tři. Úsek označovaný jako TM2 („transmembránový úsek č. 2“) se do membrány pouze vnořuje, ale neprochází skrz. Intracelulárně lokalizovaný C-konec molekuly pak může interagovat s celou řadou proteinů a zapojovat se do různých signalizačních drah v buňce (pro přehled Dingledine et al., 1999).

### **2.1.3. Podjednotkové složení NMDA receptorů**

Všechny funkční ionotropní glutamátové receptory jsou oligomery. O počtu podjednotek, z nichž se skládají, se nějaký čas debatovalo, než bylo prokázáno, že se jedná o tetramery (Laube et al., 1998; Schorge a Colquhoun, 2003). Funkční NMDA receptor je typicky tvořen dvěma podjednotkami NR1, z nichž každá obsahuje vazebné místo pro koagonistu glycin, a dvěma podjednotkami NR2 s vazebnými místy pro glutamát. Na jeden NMDA receptor se tak při aktivaci vážou dvě molekuly glycinu a dvě molekuly glutamátu (Benveniste a Mayer, 1991b). Přítomnost funkčních kanálů v oocytech (*Xenopus laevis*) exprimujících pouze NR1 podjednotku (Moriyoshi et al., 1991) naznačovala možnost existence homomerních NMDA receptorů. Tato hypotéza však byla později vyvrácena a popisované receptory charakterizovány jako kombinace endogenních NR2 podjednotek s heterologními NR1 (Schmidt a Hollmann, 2008).

Role NR3 podjednotek zatím není přesvědčivě objasněna. V kombinaci s NR1 podjednotkami (exprese v oocytech) sice tvoří nezvyklé excitační receptory aktivované pouze glycinem (Chatterton et al., 2002), zda však takové receptory existují in vivo, zůstává otázkou. V kultivovaných kortikálních neuronech, prokazatelně exprimujících NR3A, sice byl popsán excitační účinek (salvy akčních

potenciálů) aplikace glycinu, přičemž farmakologický profil tohoto efektu odpovídal (alespoň v některých případech) rekombinantním NR1/NR3 receptorům (Chatterton et al., 2002), podobná aktivita však byla pozorována i u neuronů z NR1<sup>-/-</sup> myši (Matsuda et al., 2003), což nasvědčuje jinému mechanismu. Obecně se NR3 podjednotkám přisuzuje spíše regulační význam; koexprese NR3 podjednotek s NR1 a NR2 v oocytech vedla ke snížení jednotkové vodivosti a relativní Ca<sup>2+</sup> propustnosti (Das et al., 1998; Perez-Otano et al., 2001), což bylo tradičně přisuzováno vzniku triheteromerních NR1/NR2/NR3 receptorů. Nedávná studie sledující kolokalizaci fluorescenčně značených podjednotek v membráně nicméně existenci takových receptorů zpochybňuje, resp. považuje za vysoce nepravděpodobnou (Ulbrich a Isacoff, 2008).

#### **2.1.4. Exprese podjednotek NMDA receptorů**

Úroveň exprese podjednotek NMDA receptorů v nervové soustavě je různá. Zatímco NR1 podjednotka je coby nezbytná součást funkčního receptoru všudypřítomná, přítomnost jednotlivých typů NR2 podjednotek je často jasně omezena v prostoru či v čase (Cull-Candy et al., 2001). V embryonálním stádiu jsou přítomny pouze NR2B a NR2D, krátce po narození však jejich exprese začne klesat a objevují se podjednotky NR2A a NR2C (Watanabe et al., 1992; Monyer et al., 1994; Wenzel et al., 1996). Zatímco exprese NR2C je omezena především na mozeček (Wenzel et al., 1997), NR2A postupně přebírá od NR2B roli dominantní NR2 podjednotky. K této výměně dochází i na úrovni jednotlivých neuronů, kde jsou receptory obsahující NR2B podjednotky nahrazovány v synapsích novými NR1/NR2A receptory (Townsend et al., 2003). NR2B podjednotky jsou pak v pozdějších fázích postnatálního vývoje především součástí extrasynaptických NMDA receptorů, nikoliv však výlučně, podobně jako se výskyt NR2A podjednotek neomezuje pouze na synaptické receptory (Thomas et al., 2006).

Zástupci skupiny NR3 podjednotek se svými expresními vzorci též velmi liší: zatímco výskyt ubikvitní NR3A dosahuje maxima přibližně během prvního týdne postnatálního vývoje (Sucher et al., 1995; Nishi et al., 2001), exprese NR3B zůstává i v dospělosti na stejně vysoké úrovni (Matsuda et al., 2002), je však striktně omezena na motoneurony míchy a mozkového kmene (Nishi et al., 2001; Chatterton et al., 2002).

## 2.2. Modulace funkce NMDA receptorů

### 2.2.1. Fyzikální vlivy

#### 2.2.1.1. Teplota

NMDA receptory jsou exprimovány v nervovém systému široké škály živočichů, od jednoduchých bezobratlých (Pierobon et al., 2004) až po vyšší obratlovce, jak homoiothermní, tak poikilothermní (Davies et al., 1979; Dale a Roberts, 1984). Zatímco u bezobratlých a nižších obratlovců tak musejí neurony pracovat ve velkém teplotním rozpětí (od teplot těsně nad bodem mrazu po teploty přesahující 40°C), savčí nervové buňky jsou uzpůsobeny k fungování v poměrně úzkém rozmezí teplot, zpravidla mezi 35°C a 40°C (Ederstrom, 1973; Samis et al., 1973; Simmonds, 1973).

Většina buněčných dějů je závislá na teplotě. Platí to i pro činnost iontových kanálů, která vykazuje vyšší míru teplotní závislosti než prostá difuze v roztocích elektrolytů (Kuyucak a Chung, 1994). Míru této závislosti názorně vyjadřuje koeficient  $Q_{10}$ , udávající, kolikrát se sledovaná veličina zvýší, stoupne-li teplota o 10°C. Hodnoty  $Q_{10}$  se u charakteristik iontových kanálů nejčastěji pohybují okolo dvou (Ascher et al., 1988; Stiles et al., 1999; Postlethwaite et al., 2007), byly však zaznamenány i výrazně teplotně citlivější procesy s  $Q_{10} \sim 10$  (DeCoursey a Cherny, 1998; Mathews et al., 1998), příp. tuto hodnotu i několikrát přesahující (Pusch et al., 1997; Peloquin et al., 2008). Zvláštní kapitolu pak tvoří skupina tzv. TRP receptorů, zahrnující iontové kanály aktivované vedle specifických chemických agonistů také fyzikálními podněty, jako jsou pH či vysoká, nebo naopak nízká teplota (Clapham et al., 2001): TRPV1 receptor, nejdéle známý zástupce této skupiny, je např. aktivován teplotami přesahujícími 42°C (Caterina et al., 1997), zatímco receptor TRPM8 reaguje na teploty nižší než 26°C (McKemy et al., 2002). Amplituda proudů vyvolaných zvýšením teploty vykazuje pro TRPV1 receptory hodnoty  $Q_{10} \sim 20$  (Vyklícky et al., 1999; Welch et al., 2000).

Přímé porovnávání hodnot  $Q_{10}$  publikovaných pro různé iontové kanály je nicméně poněkud obtížné, neboť se zpravidla jedná o pouhý popis časového průběhu komplexních událostí, např. miniaturních postsynaptických proudů (Harper et al., 1989), skládajících se z řady dílčích procesů (uvolnění agonisty z presynaptického neuronu, jeho difuze synaptickou štěrbinou, navázání na receptor a odstranění,

otevření iontového kanálu atd.). Tyto jednotlivé děje přitom vykazují různou teplotní citlivost a taktéž různou měrou přispívají k časovému průběhu celé synaptické události, jejich detailnější kinetická a teplotní charakterizace se však vyskytuje spíše výjimečně (Stiles et al., 1999), nepochybně i z důvodu složitosti takové analýzy.

Většina studií zabývajících se teplotní závislostí iontových kanálů zkoumá napěťově aktivované kanály, především pro  $\text{Ca}^{2+}$  (Nobile et al., 1990; Rosen, 1996; Iftinca et al., 2006; Peloquin et al., 2008), ale i pro  $\text{Na}^+$  (Rosen, 2001) a  $\text{Cl}^-$  (Pusch et al., 1997) ionty. Co se týče ligandem aktivovaných iontových kanálů, byly publikované práce popisující teplotní závislost nikotinických acetylcholinových (Dilger et al., 1991; Stiles et al., 1999), GABA<sub>A</sub> (Millingen et al., 2008) i AMPA receptorů (Silver et al., 1996a; Silver et al., 1996b; Postlethwaite et al., 2007). Závislostí funkce NMDA receptorů na teplotě se zatím přímo zabývala jediná studie (Chung a Kuyucak, 1995), jejíž autoři se navíc omezili pouze na měření aktivity jednotlivých kanálů. Okrajově se tohoto tématu dotkla také práce, zabývající se mechanismy zodpovědnými za dvouexponenciální časový průběh excitačních postsynaptických proudů (EPSC) (Hestrin et al., 1990). Její autoři analyzovali EPSC zprostředkované NMDA receptory při teplotách 26 a 34°C a z výsledků určili hodnotu  $Q_{10}$  pro dominantní rychlou složku ( $\tau_{\text{rychlé}}$ )  $3,5 \pm 0,9$ .

Přestože tedy teplotní závislosti NMDA receptorů dosud nebylo věnováno příliš pozornosti, potenciální význam takovéto studie je nesporný, a to přinejmenším ze dvou důvodů. Tím prvním je možné doplnění a případná korekce výsledků *in vitro* studií, prováděných dosud vesměs za pokojové teploty. Tímto způsobem např. Asztely et al. vysvětlili diskrepanci mezi podílem NMDA a AMPA receptorů na synaptickém přenosu v hipokampu pozorovanou v *in vitro* experimentech (Kullmann, 1994; Selig et al., 1995), která byla při fyziologické teplotě významně potlačena (Asztely et al., 1997).

Druhým důvodem pak je souvislost mezi teplotou a akutními mozkovými příhodami. Ty jsou provázeny hyperthermií, která pozitivně koreluje s velikostí a závažností následného poškození nervové tkáně (Zaremba, 2004). Pokusy na zvířecích modelech i zatím pouze předběžné klinické zkoušky zároveň naznačují, že uměle navozená hypothermie naopak tyto následky zmírňuje (Hemmen a Lyden, 2007). Přestože se jedná o komplexní a dosud nepřítis objasněný mechanismus, glutamátergní systém je zřejmě jednou z jeho součástí: bylo zjištěno, že teplota

ovlivňuje glutamátem zprostředkovanou neurotoxicitu (Suehiro et al., 1999) a že hypothermie zpomaluje uvolňování excitačních aminokyselin během ischemie (Nakashima a Todd, 1996).

#### 2.2.1.2. Mechanické vlivy

Funkce NMDA receptorů je dále ovlivňována působením mechanických sil: napnutí buněčné membrány zvyšuje pravděpodobnost otevření jejich iontových kanálů, zatímco stlačení membrány ji naopak snižuje (Paoletti a Ascher, 1994). Existují dvě základní hypotézy o přenosu mechanických sil na iontové kanály: v první z nich hraje klíčovou roli cytoskelet a jeho spojení s intracelulární částí kanálu, podle druhé se mechanické působení přenáší přímo prostřednictvím buněčné membrány (Guharay a Sachs, 1984; Martinac et al., 1990). C-konec NMDA receptorů interaguje mimo jiné i s cytoskeletem (Kornau et al., 1997), pro přenos mechanických sil však tyto vazby zřejmě rozhodující nebudou, vzhledem ke skutečnosti, že citlivost k mechanickým vlivům je zachována i u receptorů se zkráceným C-koncem a také ve vytržených membránových terčících, kde lze předpokládat vážné narušení podobných interakcí (Paoletti a Ascher, 1994; Casado a Ascher, 1998). Dalším argumentem pro klíčový význam buněčné membrány jakožto zprostředkovatele působení mechanických sil na činnost NMDA receptorů jsou výsledky pokusů využívajících amfifilní sloučeniny, jako jsou lysofosfolipidy či kyselina arachidonová. Aplikace těchto látek vyvolává podobný účinek jako přímá mechanická stimulace, přičemž tyto dva efekty nejsou aditivní (Casado a Ascher, 1998).

#### 2.2.1.3. pH

NMDA receptory jsou inhibovány protony, s  $IC_{50}$  odpovídající pH 6,9-7,3 (Giffard et al., 1990; Tang et al., 1990; Vyklicky et al., 1990b), tedy blízko fyziologickým hodnotám. Z toho vyplývá, že i malá změna pH významně ovlivní aktivitu NMDA receptorů, což se projevuje nižší neurotoxicitou zprostředkovanou těmito kanály při sníženém pH (Giffard et al., 1990). Předpokládá se rovněž, že tento efekt stojí za poněkud paradoxně neuroprotektivními účinky acidosis provázející ischemické příhody v nervové tkáni (Tombaugh a Sapolsky, 1993). Inhibice NMDA receptorů  $H^+$  je napětově nezávislá a není kompetitivní s působením NMDA, glycinu ani  $Zn^{2+}$  (viz kapitola 2.2.2) (Vyklicky et al., 1990b). Aminokyselinové zbytky,

jejichž mutace mění citlivost receptoru k  $H^+$ , byly nalezeny v oblasti spojující třetí a čtvrtou transmembránovou doménu s tzv. S1-S2 doménou, která váže ligand (Low et al., 2003). Tato oblast hraje klíčovou roli v otevírání iontového kanálu NMDA receptoru (tzv. „gating“) a právě narušení tohoto mechanismu je zřejmě podstatou inhibičního působení  $H^+$  (Banke et al., 2005; Dravid et al., 2007).

### **2.2.2. Chemické vlivy (farmakologie NMDA receptorů)**

#### 2.2.2.1. Agonisté

Jak již bylo uvedeno, molekula NMDA receptoru obsahuje dvě vazebná místa pro glutamát a dvě pro glycin, který zde působí coby koagonista (Kleckner a Dingledine, 1988). Fyziologickým agonistou glutamátového místa je rovněž L-aspartát, dalšími látkami schopnými aktivovat NMDA receptor jsou např. L-cysteinát, L-homocysteinát či L-serin-O-sulfát (Mayer et al., 1992). Z hlediska struktury je pro optimální účinek vhodné, aby molekula obsahovala dvě záporně nabitě skupiny vzdálené tři až čtyři C-C vazby a  $\alpha$ -uhlík v konfiguraci S (resp. L-), když D-glutamát aktivuje NMDA s afinitou o dva řády nižší než u L-glutamátu (Laube et al., 2004).

Zajímavá je situace ohledně vazebného místa pro koagonistu na podjednotce NR1. Toto místo je tradičně označované jako glycinové podle předpokládaného fyziologického ligandu (Johnson a Ascher, 1987; Kleckner a Dingledine, 1988), aktivované však může být i jinými malými neutrálními aminokyselinami, jako jsou např. D-alanin nebo D-serin (McBain et al., 1989; Furukawa a Gouaux, 2003). Tato skutečnost nabyla na zajímavosti po objevu překvapivě vysoké hladiny D-serinu v mozku (23 % celkového serinu) (Hashimoto et al., 1992) a od té doby se objevila řada argumentů podporujících hypotézu, že D-serin je fyziologickým koagonistou NMDA receptorů (Wolosker et al., 2008): deplece D-serinu vedla k selektivnímu snížení aktivity NMDA receptorů v hipokampálních kulturách (Mothet et al., 2000) a gangliových buňkách sítnice (Stevens et al., 2003) a působila i proti NMDA receptory-zprostředkované cytotoxicitě v organotypických hipokampálních a kortikálních kulturách (Katsuki et al., 2007; Wolosker et al., 2008). Důležitý byl také objev serinracemasy, jejíž výskyt v mozku odpovídá výskytu D-serinu, což potvrzuje klíčovou roli tohoto enzymu v syntéze D-serinu v nervové tkáni (Wolosker et al., 1999). Knock-out serinracemasy pak (zatím pouze podle předběžných výsledků)

vede ke snížení NMDA receptory-zprostředkovaného synaptického přenosu a dlouhodobé potenciace (LTP) v hipokampu (Wolosker et al., 2008).

Zařazení D-serinu mezi neurotransmitery tak brání především fakt, že jeho syntéza je podle některých studií omezena pouze na astrocyty (Schell et al., 1995; Wolosker et al., 2002), odkud je  $\text{Ca}^{2+}$ -závislým způsobem uvolňován (Mothet et al., 2005) - jde tedy o gliotransmitter. Novější práce však detekovaly D-serin i serinracemasu i v neuronech (Yasuda et al., 2001; Puyal et al., 2006), v některých případech dokonce především v neuronech (Yoshikawa et al., 2007; Miya et al., 2008). Dá se tedy předpokládat, že naše vědomosti o fyziologické roli D-serinu v nervové tkáni se budou i nadále rozrůstat. Navíc studium této otázky přispívá k lepšímu pochopení fungování celé nervové soustavy, když přiznává gliím, u nichž se dosud předpokládala spíše podpůrná funkce, přímou roli při přenosu nervového signálu (Oliet a Mothet, 2009).

#### 2.2.2.2. Antagonisté

##### 2.2.2.2.1. Kompetitivní antagonisté

Klasickými kompetitivními agonisty glutamátového vazebného místa na NMDA receptoru jsou fosfoderiváty aminokyselin s krátkým (5-7 atomů uhlíku) řetězcem, jako je např. kyselina D-2-amino-5-fosfopentanová (D-AP5, též D-APV) nebo D-2-amino-5-fosfoheptanová (D-AP7), příp. kyselina D-3-(2-karboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-fosfonová (D-CPP) (Davies et al., 1981; Davies et al., 1986). Byla syntetizována celá řada sloučenin odvozených z těchto inhibitorů - liší se účinností a především kinetickými parametry (Benveniste a Mayer, 1991a).

Nejnámějším antagonistou vazebného místa pro koagonistu je kyselina kynurenová (Perkins a Stone, 1982; Kessler et al., 1989). Tento metabolit tryptofanu vykazuje dva různé účinky: ve vysoké koncentraci chrání před excitotoxicitou tím, že nespecificky inhibuje širší škálu ionotropních receptorů (Perkins a Stone, 1982; Foster et al., 1984), v nižší koncentraci pak působí jako kompetitivní inhibitor NMDA receptorů (Kessler et al., 1989) a nekompetitivní inhibitor  $\alpha 7$ -nikotinických acetylcholinových receptorů (Hilmas et al., 2001). Chemické modifikace vedly k vývoji antagonistů s vyšší afinitou a selektivitou pro glycinové místo NMDA receptoru; typickým příkladem, dnes rutinně experimentálně používaným, je kyselina 7-chlorkynurenová (Kemp et al., 1988; Foster et al., 1992).



#### 2.2.2.2. Akompetitivní antagonisté

Za akompetitivní antagonisty NMDA receptoru jsou označovány látky, které se vážou přímo do jeho iontového kanálu, kde brání průchodu  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. Působení těchto sloučenin je napětově závislé (vyšší účinek na zápornějších membránových potenciálech) a tzv. „use-dependentní“, což znamená, že aby se mohly do iontového kanálu navázat, musí být receptor nejprve aktivován.

Fyziologicky nejvýznamnějším zástupcem této skupiny jsou  $\text{Mg}^{2+}$ . Tyto kationty, na rozdíl od  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{K}^+$ , mohou jen velmi obtížně procházet do buňky, pravděpodobně kvůli svému pevněji vázanému hydratačnímu obalu (Ascher a Nowak, 1988), a kanál naopak blokuje. Díky tomu je odpověď NMDA receptorů na aktivaci při klidovém membránovém potenciálu jen limitovaná. Tato napětově závislá blokáce NMDA receptorů prostřednictvím  $\text{Mg}^{2+}$  je příčinou charakteristického průběhu jejich I/V závislosti ve tvaru písmene „J“. Plné aktivaci NMDA receptoru tak musí předcházet depolarizace buňky zprostředkovaná jinými iontovými kanály. To propůjčuje NMDA receptoru vlastnosti „koincidenčního detektoru“, ve kterém mnozí autoři vidí naplnění Hebbova principu učení (Hebb, 1949).

K dalším látkám vázajícím se do otevřeného iontového kanálu NMDA receptoru patří např. MK-801 (dizocilpin), fencyklidin (PCP) či memantin. Tyto sloučeniny měly slibný neuroprotektivní účinek v různých *in vitro* i *in vivo* modelech, jejich terapeutickému využití však vesměs brání vážné vedlejší efekty, zahrnující kognitivní poruchy, halucinace, příp. až komatické stavy (Kemp a McKernan, 2002). Z celé skupiny tak je klinicky využíván pouze memantin, schválený pro léčbu Alzheimerovy demence, který díky své nižší afinitě a rychlé kinetice vazby selektivněji blokuje patologicky nadměrnou aktivaci NMDA receptorů, aniž by přitom vážně narušoval jejich běžnou funkci (Chen et al., 1992; Lipton, 2007).

#### 2.2.2.3. Nekompetitivní antagonisté a další modulační látky

##### 2.2.2.3.1. Ifenprodil

Další látky, které ovlivňují aktivitu NMDA receptorů, se nevážou do iontového kanálu ani do žádného vazebného místa pro agonistu. Patří mezi ně např. ifenprodil (2-(4-benzylpiperidino)-1-(4-hydroxyfenyl)-1-propanol), původně popsáný jako

vazodilatační činidlo (Carron et al., 1971), u kterého však byly objeveny neuroprotektivní účinky (Gotti et al., 1988; Tamura et al., 1993). Na nativních NMDA receptorech byly pozorovány dva mechanismy účinku ifenprodilu: vysokoafinitní s pomalou kinetikou a nízkoafinitní, jehož kinetika byla rychlá (Legendre a Westbrook, 1991). Pozdější pokusy využívající rekombinantních receptorů pak tyto odlišné účinky přisoudily NMDA receptorům složeným z různých podjednotek (Williams, 1993), když popsaly podjednotkovou specifitu ifenprodilu: zatímco NR1/NR2B receptory jsou ifenprodilem inhibovány s  $IC_{50}$  0,34  $\mu$ M, a to napětově nezávislým způsobem, afinita NR1/NR2A receptorů k ifenprodilu je 400x nižší ( $IC_{50}$  = 146  $\mu$ M) a inhibice zde má dvě složky, z nichž ta rychlejší je napětově závislá, což naznačuje, že ifenprodil tu působí i jako blokátor otevřeného iontového kanálu (Williams, 1993). Receptory obsahující NR2C a NR2D podjednotky vykazují podobně malou citlivost k nízkým koncentracím ifenprodilu jako NR1/NR2A receptory (Williams, 1995), díky čemuž bývá ifenprodil používán jako relativně NR2B-specifický inhibitor. Tuto specifitu dále potvrdily studie, které identifikovaly doménu vázající ifenprodil na N-konci NR2B podjednotky (Perin-Dureau et al., 2002; Rosahl et al., 2006).

#### 2.2.2.2.3.2. $Zn^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Cu^{2+}$

Kromě  $Mg^{2+}$  ovlivňují aktivitu NMDA receptorů i kationty jiných kovů -  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  - překvapivě však odlišným mechanismem.  $Zn^{2+}$  inhibují odpovědi nativních NMDA receptorů napětově nezávislým způsobem s  $IC_{50}$  12  $\mu$ M (Westbrook a Mayer, 1987; Legendre a Westbrook, 1990), podobně jako  $Cd^{2+}$ , jejichž afinita k NMDA receptorům je ovšem 4x nižší než v případě  $Zn^{2+}$  ( $K_d$  = 48  $\mu$ M vs. 13  $\mu$ M) (Mayer et al., 1989b). Kromě tohoto vysokoafinitního účinku inhibují ve vyšších koncentracích  $Zn^{2+}$  NMDA receptory také napětově závislým způsobem, podobně jako  $Mg^{2+}$  (Christine a Choi, 1990). Studie na rekombinantních receptorech potvrdily tento dvojí účinek u NR1/NR2A receptorů, zatímco NR1/NR2B receptory vykazovaly zdánlivě pouze vysokoafinitní napětově nezávislou inhibici  $Zn^{2+}$  (Williams, 1996; Chen et al., 1997). Napětově závislou blokaci však ani zde nelze vyloučit, neboť NR1/NR2B receptory jsou při příslušně vysokých koncentracích  $Zn^{2+}$  (desítky  $\mu$ M) již zcela inhibovány napětově nezávislým mechanismem, a další inhibiční efekt se tudíž v pokusech neprojeví. Byly identifikovány tři histidinové zbytky v molekule NR2A (H42, H44 a H128),

jejichž mutace významně (100-700x) sníží afinitu receptoru k  $Zn^{2+}$  (Low et al., 2000). Obdobnou roli hrají tři páry cysteinových zbytků (dva na NR1, jeden na NR2A) (Choi et al., 2001), které jsou kromě toho důležité pro modulaci NMDA receptorů oxidačně-redukčními činidly (pro přehled viz (Choi a Lipton, 2000)).

Vliv  $Cu^{2+}$  iontů na aktivitu NMDA receptorů byl zatím studován pouze v omezené míře na nativních receptorech (Vlachova et al., 1996; Weiser a Wienrich, 1996), kde byl popsán jako napěťově nezávislá inhibice, jejíž míra závisí na koncentraci agonisty, s nímž tvoří neaktivní komplexy (Vlachova et al., 1996). Poruchy  $Cu^{2+}$  homeostáze přitom mají vážné neurologické důsledky a dosavadní výsledky naznačují spojení těchto jevů s aktivitou NMDA receptorů (Schlief et al., 2006). Pro fyziologický význam  $Cu^{2+}$  a  $Zn^{2+}$  coby neuromodulátorů hovoří i jejich přítomnost ve váčcích v synaptických zakončeních, odkud jsou při depolarizaci uvolňovány (Assaf a Chung, 1984; Kardos et al., 1989).

#### 2.2.2.2.3.3. Polyaminy

Tato skupina obsahuje endogenní alifatické aminy, jako jsou např. spermin a spermidin, které se v mozku vyskytují v relativně vysoké koncentraci a bylo zde také pozorováno jejich uvolňování i zpětné vychytávání (Harman a Shaw, 1981b; 1981a). Tyto látky moduluje aktivitu NMDA receptorů pozitivně i negativně (Yamakura a Shimoji, 1999), a to min. čtyřmi různými mechanismy: stimulace nezávislá na glycinu, stimulace závislá na glycinu (zvýšení afinity ke glycinu), napěťově závislá inhibice a snížení afinity k NMDA a glutamátu (Williams, 1995). Výsledný efekt pak záleží na podjednotkovém složení receptoru: stimulace nezávislá na glycinu a snížení afinity k agonistům se projevuje pouze u NR1/NR2B, ostatní účinky i u NR1/NR2A receptorů (Williams, 1994). U receptorů obsahujících NR2C a NR2D podjednotky modulace polyaminy zaznamenána nebyla (Williams, 1995).

Mezi nekompetitivní modulátory NMDA receptorů patří také neurosteroidy, kterým však bude, vzhledem k jejich významu pro tuto disertační práci, věnována samostatná kapitola.

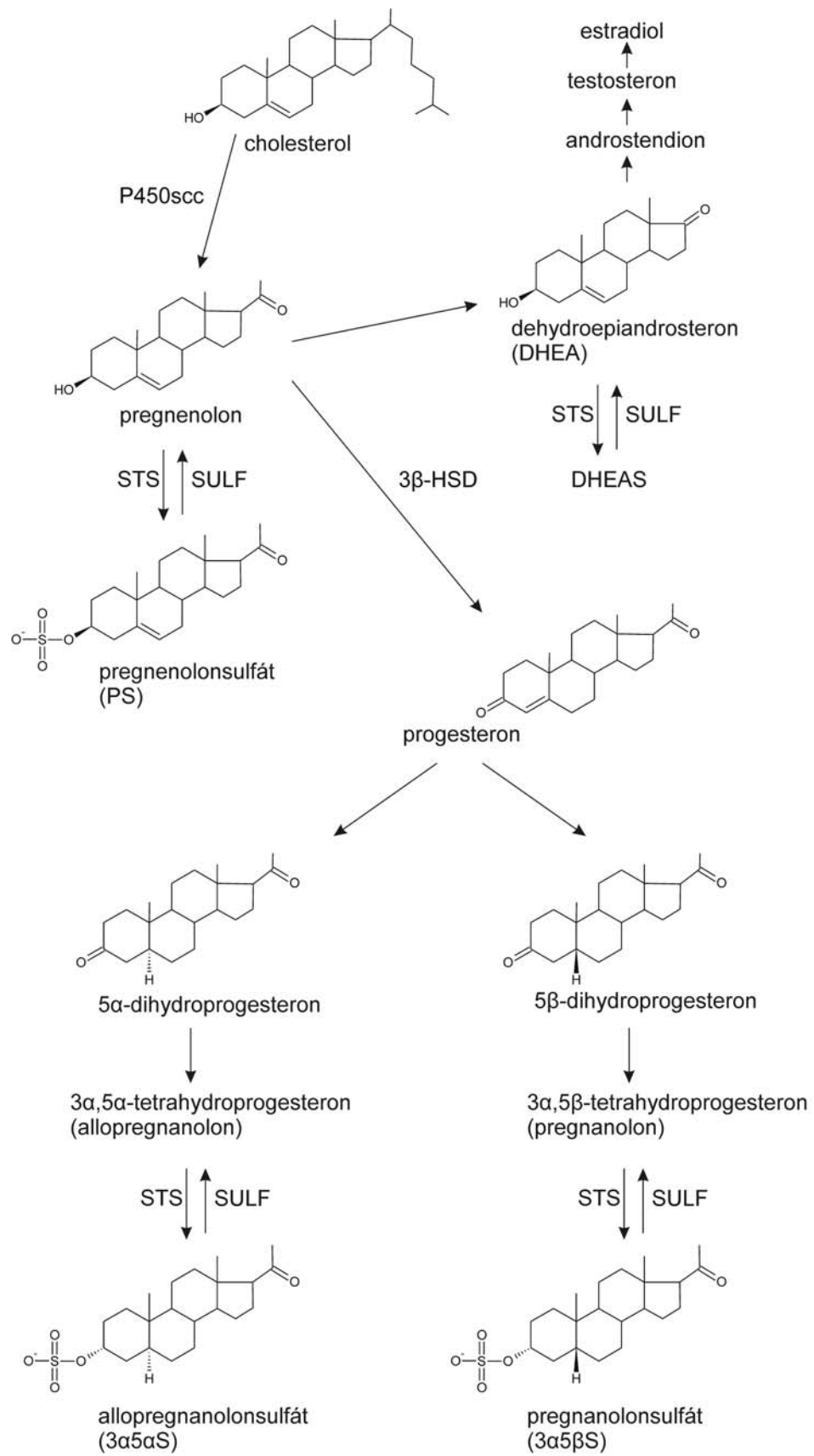
### 2.3. Neurosteroidy

Termín neurosteroidy označuje skupinu steroidních látek syntetizovaných přímo v nervové tkáni z cholesterolu nebo jiných steroidních prekursorů a do značné míry se překrývá s jiným používaným pojmem, a sice neuroaktivní steroidy (Paul a

Purdy, 1992). Tento výraz definuje tyto steroidy z hlediska jejich funkce, která spočívá v ovlivnění funkce nervového systému v řádu sekund, ba dokonce milisekund, tedy evidentně jiným než klasickým mechanismem funkce steroidních hormonů na úrovni genomu. Třebaže byl tento bezprostřední vliv steroidů na nervový systém pozorován již v první polovině minulého století (Selye, 1941), jeho molekulární mechanismy zůstávaly dlouho neznámé. Až v osmdesátých letech byl popsán přímý účinek steroidních látek na membránové receptory, a to nejprve u GABA<sub>A</sub> receptorů (Harrison a Simmonds, 1984), později pak i u dalších ligandem aktivovaných iontových kanálů: glutamátových, glycinových a nikotinických acetylcholinových receptorů (Wu et al., 1990, 1991; Bullock et al., 1997) (pro přehled (Sedlacek et al., 2008)).

### **2.3.1. Neurosteroidy v CNS - syntéza a výskyt**

Prvním krokem *de novo* syntézy steroidů je přeměna cholesterolu na pregnenolon. Tato konverze, tvořená třemi dílčími reakcemi (20 $\alpha$ -hydroxylace, 22-hydroxylace a štěpení vazby C20-C22), je katalyzována mitochondriálním enzymem P450<sub>scc</sub> (z angl. „cholesterol side chain cleavage“), který byl detekován ve většině oblastí mozku i v míše, a to jak u potkana (Le Goascogne et al., 1987; Mellon et al., 2001; Patte-Mensah et al., 2003), tak u člověka (Inoue et al., 2002; Yu et al., 2002). Totéž platí pro enzym katalyzující vznik progesteronu z pregnenolonu, 3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasu (3 $\beta$ -HSD), která se také hojně vyskytuje v potkaním (Guennoun et al., 1995; Coirini et al., 2002) i lidském (Inoue et al., 2002; Yu et al., 2002) mozku a míše.



**Obr. 2.2.** Schéma syntézy a struktura vybraných steroidních látek.

Pro účinek neurosteroidu na NMDA receptor je nezbytná přítomnost sulfátové skupiny na C3 (Weaver et al., 2000) (viz kapitola 2.3.2.1). Zatímco odstranění této skupiny zajišťuje jediná steroidsulfatasa (STS) (Li et al., 1996; Salido et al., 1996), reakci v opačném směru, tj. přenos sulfátu na hydroxyskupinu steroidů (ze kterých tak vznikají estery rozpustné ve vodě), katalyzují cytosolické sulfotransferasy (SULT) kódované osmnácti geny a tvořící nejméně 47 savčích isoform (Blanchard et al., 2004). Za sulfataci 3-hydroxysteroidů zodpovídají sulfotransferasy ze skupiny SULT2, čítající (u lidí) tři enzymy: SULT2A, běžně zvanou též DHEA-sulfotransferasa, ačkoliv její substrátová specifita je široká, a nověji objevené SULT2B1a a SULT2B1b, působící výhradně na 3 $\beta$ -hydroxysteroidy (Meloche a Falany, 2001). Zatímco u myši a potkanů byla potvrzena exprese SULT2B1a v mozku (Shimizu et al., 2003; Kohjitani et al., 2006), přítomnost některé ze SULT2 transferas v lidském mozku se dosud prokázat nepodařilo ani na úrovni mRNA, ani co se týče enzymové aktivity (Steckelbroeck et al., 2004; Falany et al., 2006). Navíc byly nedávno zpochybněny dřívější zprávy o vysoké hladině sulfatovaných neurosteroidů (pregnenolonsulfát (PS), dehydroepiandrosteronsulfát (DHEAS)) v mozku, založené na nepřímých metodách detekce (Corpechot et al., 1981; Corpechot et al., 1983) - podle nových měření nepřevyšuje koncentrace těchto látek v potkaním a myším mozku 0,3 ng/g tkáně (Liere et al., 2004; Schumacher et al., 2008). Paradoxně však byly zjištěny vyšší koncentrace PS a DHEAS (v řádu ng/g tkáně - srovnatelné s dřívějšími studiemi (Lanthier a Patwardhan, 1986)) v lidském mozku (Liere et al., 2004).

### **2.3.2. Neurosteroidy a NMDA receptory**

Prvním neurosteroidem, u něhož byl pozorován vliv na funkci NMDA receptorů, byl PS, který zvyšoval (v koncentraci 300  $\mu$ M) proudové odpovědi kultivovaných neuronů z míchy kuřecích embryí na aplikaci NMDA až o 197% (v závislosti na koncentraci agonisty) (Wu et al., 1991). Naopak pregnanolonsulfát (3 $\alpha$ 5 $\beta$ S), lišící se od PS absencí jedné dvojně vazby a odlišnou konfigurací na C3, odpovědi NMDA receptorů u stejného experimentálního modelu inhiboval, a to o 66% (100  $\mu$ M 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S) (Park-Chung et al., 1994). Následující pokusy ukázaly, že to, jakým způsobem neurosteroid ovlivní funkci NMDA receptoru, závisí mj. i na podjednotkovém složení receptoru (Malayev et al., 2002; Horak et al., 2006) a

samozřejmě také na struktuře steroidu - další příbuzné stereoisomery allopregnanolonsulfát ( $3\alpha5\alpha S$ ) a epipregnanolonsulfát ( $3\beta5\beta S$ ) odpovědi podobně jako  $3\alpha5\beta S$  inhibovaly, zatímco isopregnanolonsulfát ( $3\beta5\alpha S$ ) a DHEAS je potenciovaly (Park-Chung et al., 1997).

#### 2.3.2.1. Potenciace NMDA receptorů neurosteroidy

První zpráva o potenciaci NMDA receptorů prostřednictvím PS (Wu et al., 1991) byla postupně potvrzena dalšími studii jak na nativních (hipokampální či kortikální neurony potkanů) (Bowlby, 1993; Wong a Moss, 1994; Horak et al., 2004), tak na rekombinantních receptorech exprimovaných v oocytech či v lidských embryonálních ledvinných (HEK) buňkách (Yaghoubi et al., 1998; Malayev et al., 2002; Horak et al., 2004). Zjištěná úroveň potenciace se ovšem v jednotlivých pracích významně liší, což lze částečně přisuzovat různému podjednotkovému složení receptorů a odlišné citlivosti jednotlivých typů NR2 podjednotky k PS (Malayev et al., 2002; Horak et al., 2006), je však třeba zvažovat i jiná vysvětlení, neboť se výsledky liší i u receptorů o stejném složení: NR1/NR2A exprimované v oocytech reagovaly na přítomnost  $100 \mu M$  PS zvýšením odpovědi na NMDA cca o 300% (Yaghoubi et al., 1998), zatímco u stejných receptorů v HEK buňkách tatáž koncentrace PS žádnou potenciaci odpovědi na NMDA nevyvolala (Ceccon et al., 2001). Výsledky z naší laboratoře ukazují, že míra potenciace velmi závisí na pořadí aplikace steroidu a agonisty: největší potenciace (+382 %) bylo dosaženo, když po preaplikaci PS následovala aplikace samotného glutamátu. Preaplikace PS a jeho následná koaplikace s glutamátem vedla k nižší potenciaci (+271 %) a ještě menší efekt (+38 %) vyvolala samotná koaplikace (všechna čísla platí pro NR1/NR2B receptory v HEK buňkách,  $300 \mu M$  PS a  $1 mM$  glutamát) (Horak et al., 2004). Jako vysvětlení se zde nabízí možnost, že navázání glutamátu snižuje afinitu receptoru k PS, což potvrzují i výsledky kinetického modelování (Horak et al., 2004).

Důležitou roli pro potenciaci NMDA receptorů PS hraje jeho sulfátový zbytek na C3, pravděpodobně hlavně jakožto nositel záporného náboje. O tom svědčí skutečnost, že potenciační účinek PS je částečně zachován, nahradí-li se sulfátová skupina v jeho molekule hemisukcinátovou, nikoliv však jejím (nenabitým) methylesterem (Park-Chung et al., 1997). Podobně mohou roli sulfátu suplovat i jiné záporně nabitě zbytky, samotný pregnenolon účinný není (Weaver et al., 2000).

Účinek PS závisí na podjednotkovém složení NMDA receptoru. Současná aplikace PS a glutamátu vedla u rekombinantních NR1/NR2A a NR1/NR2B receptorů exprimovaných v oocytech či HEK buňkách k potenciaci proudové odpovědi, zatímco u NR1/NR2C a NR1/NR2D receptorů vyvolala její inhibici (Malayev et al., 2002; Horak et al., 2006). Preaplikace PS následovaná aplikací samotného glutamátu však vedla vždy k potenciaci, byť u receptorů obsahujících podjednotky NR2C a NR2D výrazně nižší než u NR1/NR2A resp. NR1/NR2B receptorů (Horak et al., 2006). Byl navržen model, podle kterého PS působí na NMDA receptory jak potenciačně, tak inhibičně, s různou účinností pro jednotlivé kombinace podjednotek, která pak určuje výsledný efekt tohoto steroidu na funkci receptoru (Horak et al., 2006).

Podjednotkové specifity účinku PS bylo využito při hledání vazebného místa pro neurosteroidy na molekule NMDA receptoru, o němž bylo už předtím známo, že je lokalizováno extracelulárně a neshoduje se s vazebnými místy jiných modulátorů NMDA receptorů (polyaminy, kyselina arachidonová, redox látky) (Park-Chung et al., 1997). Pokusy s chimerickými receptory ukázaly klíčový význam extracelulární smyčky spojující třetí a čtvrtou transmembránovou doménu NR2 podjednotky. Když byla tato část NR2A podjednotky nahrazena odpovídajícím úsekem NR2C, odpovídala reakce receptoru obsahujícího tuto chimerickou podjednotku na PS právě NR1/NR2C receptorům (Horak et al., 2006). Tento závěr potvrzují i výsledky další práce, jejíž autoři navrhli (jako dosud jediní) vazebné místo pro PS na NMDA receptoru (Jang et al., 2004). Pomocí homologního modelování, bodových mutací a NR2B/NR2D chimér identifikovali místo kritické pro působení PS na výše zmíněné extracelulární klíče NR2B podjednotky, v oblasti důležité též pro inhibici NMDA receptorů protony, s níž však působení PS funkčně spjata není (Jang et al., 2004). Jelikož působí PS na funkci NMDA receptorů více způsoby a s různou afinitou (Horak et al., 2006; Johansson et al., 2007), zdá se být pravděpodobné, že i vazebných míst pro neurosteroidy bude na molekule NMDA receptoru více, podobně jako je tomu zřejmě v případě GABA<sub>A</sub> receptorů (Hosie et al., 2007). Potvrzuje to i skutečnost, že potenciace NMDA receptorů prostřednictvím PS a jejich inhibice vyvolaná 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S nejsou navzájem kompetitivní (Park-Chung et al., 1997).



### 2.3.2.2. Inhibice NMDA receptorů neurosteroidy

Nejdéle známým a nejlépe popsáným neurosteroidem inhibujícím NMDA receptory je  $3\alpha5\beta S$  (Park-Chung et al., 1994; Petrovic et al., 2005). Podobné účinky byly později popsány i pro jeho stereoisomery  $3\alpha5\alpha S$  a  $3\beta5\beta S$ , nejúčinnějším inhibitorem NMDA receptorů z této trojice však je právě  $3\alpha5\beta S$ : inhibice o 66% oproti 25, resp. 50% (100  $\mu M$  steroid, 30  $\mu M$  NMDA, membránový potenciál -70 mV; kultivované embryonální míšní kuřecí neurony) (Park-Chung et al., 1997; Abdrachmanova et al., 2001).

Stejně jako v případě PS je pro působení  $3\alpha5\beta S$  na NMDA receptory klíčová přítomnost sulfátové nebo jiné záporně nabitě skupiny na C3 (Weaver et al., 2000). Dalším společným rysem působení PS a  $3\alpha5\beta S$  je způsob, jakým se projevují v záznamech aktivity jednotlivých iontových kanálů NMDA: přítomnost neurosteroidu zvyšuje, resp. snižuje frekvenci otevírání kanálu, ale nemá vliv na průměrnou dobu jeho otevření, ani na jeho vodivost (Bowlby, 1993; Petrovic et al., 2005).

V dalších ohledech se však modulace NMDA receptorů prostřednictvím PS a  $3\alpha5\beta S$  liší, což je v souladu s představou, že oba steroidy působí přes různá místa na receptoru, jak nasvědčuje vzájemná nekompetitivnost jejich efektů (Park-Chung et al., 1997). Zatímco PS je nejúčinnější, pokud jeho preaplikaci následuje aplikace samotného agonisty (Horak et al., 2004), aplikace  $3\alpha5\beta S$  podle stejného protokolu nevyvolá vůbec žádný efekt (Petrovic et al., 2005). Výsledky z naší laboratoře ukazují, že se  $3\alpha5\beta S$  váže pouze na NMDA receptor, který byl již aktivován agonistou (Petrovic et al., 2005). V tomto ohledu se podobá akompetitivním antagonistům (viz kapitola 2.2.2.2.2), na rozdíl od nich však účinek  $3\alpha5\beta S$  není napětově závislý - míra inhibice zůstává stejná v rozmezí membránových potenciálů -80 až +60 mV (Park-Chung et al., 1994; Petrovic et al., 2005).

Zajímavé je, že zatímco rekombinantní a nativní NMDA receptory z kultivovaných hipokampálních neuronů jsou vyšší koncentrací  $3\alpha5\beta S$  téměř kompletně inhibovány, synaptický přenos zprostředkovaný NMDA receptory v akutních potkaních kortikálních či míšních řízcích je inhibován méně (Petrovic et al., 2005), příp. vůbec (Abdrachmanova et al., 2001). To může být způsobeno výše zmiňovanou schopností  $3\alpha5\beta S$  vázat se pouze na aktivovaný receptor - tento stav během synaptického přenosu trvá jen několik milisekund, což nestačí k plné inhibici,

pozorované při několikasekundové koaplikaci  $3\alpha5\beta\text{S}$  a agonisty (Petrovic et al., 2005).

### **2.3.3. Biologické účinky neuroaktivních steroidů**

Poznatky o molekulárním působení neurosteroidů na ionotropní receptory (kromě NMDA především  $\text{GABA}_A$  receptory - pro přehled (Belelli a Lambert, 2005)) implikují jejich fyziologický a potenciálně terapeutický význam. Ten byl potvrzen řadou behaviorálních studií, jež ukázaly, že tyto látky ovlivňují např. reakci na stres, agresivitu, úzkost či paměť a schopnost učení. Stres u pokusných zvířat a pravděpodobně i u lidí způsobuje rychlý a reversibilní pokles aktivity  $\text{GABA}_A$  receptorů (Barbaccia et al., 2001). Tento pokles je provázen zvýšením hladiny neurosteroidů pozitivně modulujících  $\text{GABA}_A$  receptory, jako je např. allopregnanolon ( $3\alpha5\alpha$ ), v plazmě i mozku (Barbaccia et al., 1996). Tento zdánlivý paradox může být vysvětlen odlišným časovým průběhem obou událostí, kdy nárůst koncentrace  $3\alpha5\alpha$  probíhá pomaleji a déle (maximum po třiceti minutách, odezní po hodině a půl) než snížení počtu  $\text{GABA}_A$  receptorů (s maximumem do pěti minut, po hodině odezní) (Barbaccia et al., 1996). Zvýšení hladiny  $3\alpha5\alpha$  (příp. dalších neurosteroidů s podobným účinkem) by tak mohlo představovat obranný mechanismus zmírňující účinky stresu. Tuto hypotézu podporují i výsledky dalších studií, podle nichž aplikace tetrahydrodeoxykortikosteronu (potencuje  $\text{GABA}_A$  receptory *in vitro*) účinně blokuje některé neurochemické změny spojené s reakcí na stres (Grobin et al., 1992; Dazzi et al., 1996).

Biologické vlastnosti sulfatovaných neurosteroidů byly zkoumány především ve dvou oblastech, kde se předpokládá klíčová úloha NMDA receptorů, jejichž aktivitu tyto steroidy modulují: neuroprotektivní účinky a zlepšení kognitivních schopností. Možnost ochrany před neurodegenerací způsobenou nadměrnou aktivací NMDA receptorů slibují inhibiční neuroaktivní steroidy, jako je např. pregnanolonhemisukcinát ( $3\alpha5\beta\text{HS}$ ), syntetický analog  $3\alpha5\beta\text{S}$  odolný proti odbourávání endogenními sulfatasami (Weaver et al., 1997). Podání  $3\alpha5\beta\text{HS}$  potkanům či králíkům významně snížilo následky mozkové či míšní ischemie (Weaver et al., 1997; Lapchak, 2004, 2006). O klinickém testování těchto látek zatím žádné zprávy nejsou, při pokusech na králících (Lapchak, 2006) však byly zaznamenány podobné nežádoucí vedlejší účinky (ospalost až koma) jako u

vysokoafinitních antagonistů NMDA receptorů (MK-801), jejichž terapeutickému využití právě tyto závažné vedlejší efekty brání (Lipton, 2004).

V procesech učení a tvorby paměti hrají NMDA receptory kladnou roli (Tsien et al., 1996), proto se zde výzkum soustředí na účinek potencujících neurosteroidů, jako jsou PS či DHEAS. Četné studie na zvířecích modelech ukázaly, že podání těchto látek významně zlepšuje kognitivní schopnosti (Flood a Roberts, 1988; Mayo et al., 1993; Isaacson et al., 1995). Navíc byla popsána korelace mezi nižší hladinou PS v hipokampu starších potkanů a jejich horšími výkony v paměťových testech (Vallee et al., 1997), přičemž injekce PS či DHEAS výsledky těchto starších potkanů i myši přechodně zlepšily (Vallee et al., 1997; Reddy a Kulkarni, 1998). Otázkou zůstává, do jaké míry jsou tyto efekty zprostředkovány NMDA receptory - svou roli zde totiž nepochybně hraje i GABA<sub>A</sub> systém: 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ , pozitivní modulátor GABA<sub>A</sub> receptorů (na NMDA receptorech neúčinný), kognitivní schopnosti experimentálních zvířat zhoršuje, zatímco steroid UC1011 (inhibitor GABA<sub>A</sub> receptorů - stejně jako PS či DHEAS) je opět zlepšuje (Turkmen et al., 2004).

Zmíněné účinky neurosteroidů na animálních modelech již inspirovaly mnoho klinických studií, zaměřených vesměs na DHEA a DHEAS. Plasmatická koncentrace těchto steroidů s věkem významně klesá (Orentreich et al., 1984; Sulcova et al., 1997), což vybízí ke spekulacím o možném vztahu hladiny těchto látek k některým neurodegenerativním poruchám, jež se vyskytují v pokročilém věku. Dosavadní výsledky však takovou souvislost jednoznačně nepotvrdily: některé práce zjistily sníženou hladinu DHEAS u pacientů s Alzheimerovou chorobou, příp. jinou formou demence (Nasman et al., 1991; Yanase et al., 1996; Hillen et al., 2000), a byly pozorovány i příznivé účinky podávání DHEA (Azuma et al., 1999), častěji však žádný vztah mezi hladinou DHEA či DHEAS v plasmě a výskytem demence ani terapeutický efekt těchto steroidů prokázán nebyl (Legrain et al., 1995; Wolkowitz et al., 2003; Bo et al., 2006) (pro přehled (Wolf a Kirschbaum, 1999)). Hodnocení klinického významu DHEA(S) je tedy poněkud problematické, mj. i proto, že CNS je schopna neuroaktivní steroidy sama syntetizovat, takže informace o hladině těchto látek v plasmě neposkytuje příliš spolehlivou informaci o jejich koncentraci na místě účinku, tj. v mozku.

### 3. CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce bylo přispět k současným znalostem o tom, jakým způsobem je modulována funkce NMDA receptorů jednak v závislosti na teplotě, jednak působením neurosteroidů a látek od nich odvozených. Za tím účelem byly stanoveny následující experimentální úkoly:

1. Kineticky charakterizovat mechanismus aktivace NR1/NR2B receptorů a určit teplotní závislost rychlostních konstant jednotlivých částí tohoto procesu v rozmezí teplot 25 - 45°C.
2. Popsat teplotní závislost deaktivace a desenzitizace rekombinantních NR1/NR2B a nativních NMDA receptorů.
3. Na základě zjištěných teplotních závislostí diskutovat, jaké děje ovlivňují průběh excitačních postsynaptických proudů zprostředkovaných NMDA receptory.
4. Otestovat skupinu steroidních látek odvozených od neurosteroidu  $3\alpha,5\beta$ S a na základě jejich vlivu na funkci NMDA receptorů popsat vztah mezi strukturou steroidu a jeho modulačním účinkem na NMDA receptory.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1. Složení roztoků

Není-li uvedeno jinak, byly všechny použité chemikálie zakoupeny u firmy Sigma.

Pro přípravu všech roztoků byla používána deionizovaná voda přečištěná přístrojem Simplicity 185 (Millipore) na principu membránové filtrace.

LB médium: 10 g pepton (Serva), 5 g kvasničný extrakt (Serva), 10 g NaCl, 1 l H<sub>2</sub>O; sterilizováno v autoklávu 20 minut při 115°C, po vychladnutí event. přidán ampicilin (Krka) 100 µg/ml

živný agar: 40 g živný agar (Imuna)/1 l H<sub>2</sub>O, rozvařeno v mikrovlnné troubě a sterilizováno v autoklávu 20 minut při 115°C, po ochlazení na cca 50°C přidán ampicilin (Krka) 100 µg/ml a nalito na misky

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,3

Versenův roztok s trypsinem: 0,2% trypsin, 10 mg EDTA v 50 ml PBS; pH 7,3

kultivační médium pro HEK buňky: 5% fetální telecí sérum (FCS) v médiu Opti-MEM<sup>®</sup> I (Invitrogen)

kultivační médium pro transfekované HEK buňky: 6 ml Opti-MEM<sup>®</sup> I, 600 µl roztoku 10 mM D,L-APV + 30 mM kyselina kynurenová, 60 µl FCS, 120 µl 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 24 µl roztoku ketaminu (Narketan 10 (Vétoquinol), ředěno 1:1 s vodou)

kultivační médium pro hipokampální kultury: Neurobasal<sup>™</sup>-A (Invitrogen) médium + glutamin (0,5 mM) a B-27 Serum-Free Supplement (Gibco) (0,4 ml na 20 ml média)

promývací extracelulární roztok: 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glukosa, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,3 upraveno pomocí NaOH)

aplikační extracelulární roztok: 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glukosa, 0,2 mM EDTA, 0,7 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7,3 upraveno pomocí NaOH); před pokusem přidán glycin (10 µM)

intracelulární roztok: 125 mM D-glukonolakton, 15 mM CsCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP (Mg<sup>2+</sup> sůl) (pH 7,2 upraveno pomocí CsOH)

#### **4.2. Použité geny**

NR1-1a podjednotka (GenBank accession no. U08261) (Hollmann et al., 1993) v pcDNA I/AMP vektoru (Invitrogen)

NR2B podjednotka (GenBank accession no. M91562) (Monyer et al., 1992) v RK7 vektoru

Zelený fluorescenční protein (GFP) v pQBI 25 vektoru od firmy Takara (Otsu, Japonsko).

#### **4.3. Příprava plasmidové DNA**

##### ***4.3.1. Transformace kompetentních buněk***

Do vychlazených plastových mikrozkušavek bylo odpipetováno 45 µl kompetentních buněk (XL10-Gold<sup>®</sup>) a přidány 2 µl směsi β-merkptoethanolu (vše součástí QuikChange<sup>®</sup> XL Site-Directed Mutagenesis Kit (La Jolla, USA)). Obsah zkumavky byl inkubován na ledu po dobu 10 minut a každé 2 minuty byl jemně promíchán. K této směsi byly přidány 2-10 µl roztoku DNA (podle odhadované koncentrace). Obsah zkumavky byl jemně promíchán a inkubován na ledu po dobu 30 min. Poté byl proveden teplotní šok při teplotě 42°C po dobu 30 s a následně znovu inkubováno na ledu po dobu 2 minut. Po přidání 0,5 ml LB média předeřhátého na 42°C byly kompetentní buňky kultivovány 1 hod v třepačce při teplotě 37°C. Poté byly buňky nasazeny na agarové plotny s ampicilinem (max. 200 µl buněčné kultury na jednu misku), které byly ponechány v termostatu při teplotě 37°C přes noc (14-18 hod.). Dobře izolované kolonie byly pak použity pro namnožení bakterií a následnou izolaci plasmidové DNA.

##### ***4.3.2. Izolace plasmidu pomocí "Qiagen® Plasmid Mini Kit"***

Použité roztoky a pufrы byly součástí Qiagen® Plasmid Mini Kit (Qiagen). Bakterie (izolované kolonie nebo 50 µl z bakteriální konzervy) byly zaočkovány do 5 ml LB média s ampicilinem a kultivovány na třepačce při 37°C přes noc (12-16 hod).

Poté byla kultura centrifugována 1 min při 8600 g v centrifuze Mikro 120 (Hettich, Tuttlingen, Německo). Pelet byl resuspendován v 250 µl roztoku I a přenesen do mikrocentrifugační zkumavky. Ke směsi bylo přidáno 250 µl roztoku II. Po promíchání otáčením zkumavky bylo k suspenzi přidáno 350 µl roztoku III, směs byla opět promíchána otáčením zkumavky a 10 minut centrifugována při 17 900 g ve stolní mikrocentrifuze. Supernatant byl nanesen na QIAprep centrifugační kolonu a 60 s centrifugován při 17 900 g. Kolona byla promyta 0,75 ml pufru PE a centrifugována 2 x 60 s. Poté byla přemístěna do sterilní mikrozukumavky. DNA byla eluována 30-50 µl deionizované vody. Přibližně po minutě byla kolona krátce (1 min) centrifugována a koncentrace získaného roztoku DNA byla stanovena na spektrofotometru BioPhotometer 6131 (Eppendorf) nebo NanoDrop (NanoDrop Technologies, Delaware, USA) programem dsDNA.

#### ***4.3.3. Izolace plasmidu pomocí "Qiagen® Plasmid Midi Kit"***

Použité roztoky a pufrы byly součástí Qiagen® Plasmid Midi Kit (Qiagen, Valencia, USA). Bakterie byly zaočkovány do 200 ml LB média s ampicilinem a následně aerobně kultivovány 12-16 hod v třepačce při 37°C. Poté byla kultura centrifugována 15 min při 6000 g a 4°C v centrifuze Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed (GMI, Ramsey, USA), pelet byl resuspendován ve 4 ml roztoku I. K suspenzi byly přidány 4 ml roztoku II, roztoky byly důkladně promíchány otáčením zkumavky a inkubovány 5 min při pokojové teplotě. Dále byly přidány 4 ml roztoku III vychlazeného na 4°C. Směs byla promíchána a inkubována 15 min na ledu. Sraženina byla odstraněna 30 min centrifugací při 20 000 g a 4°C. Supernatant byl aplikován na kolonu QIAGEN-tip 100 ekvilibrovanou 4 ml pufru QBT. Poté byla navázaná DNA na QIAGEN-tip 100 2-krát promývána 10 ml pufru QC a následně uvolněna z kolony pomocí 5 ml elučního pufru QF. K DNA v elučním pufru byly přidány 3,5 ml isopropylalkoholu. Po 10 min inkubaci při pokojové teplotě byla směs centrifugována 30 min při 15 000 g a 4°C, pelet byl promyt 2 ml 70 % etanolu, vysušen při laboratorní teplotě a resuspendován v H<sub>2</sub>O. Vzorek DNA byl skladován při -80°C. Koncentrace DNA byla měřena na spektrofotometru BioPhotometer 6131 nebo NanoDrop programem dsDNA.

## **4.4. Tkáňové kultury**

### **4.4.1. Lidské embryonální ledvinné (HEK) buňky**

Pro expresi rekombinantních NMDA receptorů byla používána stabilní buněčná linie lidských embryonálních ledvinných (HEK293) buněk (American Type Culture Collection, ATTC No. CRL1573, Rockville, USA). Buňky byly kultivovány v polystyrenových Petriho miskách o průměru 35 mm, jejichž dno bylo potaženo kolagenem, při teplotě 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> nasycené vodními parami v inkubátoru MCO-17AIC (SANYO, San Diego, USA). Po dosažení konfluence byly buňky pasážovány: médium bylo odsáto, buňky opláchnuty PBS a uvolněny z povrchu misky pomocí Versenova roztoku s trypsinem. Poté byly buňky resuspendovány v kultivačním médiu pro HEK buňky a naředěny do Petriho misek nebo na čtyřiadvacetijamkovou destičku (TPP, Biotech).

### **4.4.2. Primární kultury hipokampálních neuronů**

Novorození potkani (1-2 dny) byli usmrceni dekapitací, jejich hipokampy byly sterilně vyjmuty a inkubovány 20 min v 0,2 % trypsinu v PBS při teplotě 37°C. Poté byly hipokampy mechanicky disociovány na jednotlivé buňky a přeneseny do kultivačního média pro hipokampální kultury. Tato suspenze byla nasazena v hustotě 500 000 buněk/cm<sup>2</sup> na krycí sklíčka pokrytá kolagenem a polylysinem (průměr 31 mm nebo 12 mm) v kultivačních miskách (Nunclon) a dále inkubována při teplotě 37°C. Médium bylo měněno každé 3 dny. Pro elektrofyziologická měření byly používány neurony z kultur starých 5-10 dní.

## **4.5. Transfekce HEK buněk**

### **4.5.1. Transfekce pomocí Lipofectaminu 2000**

2 µl Lipofectaminu<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) byly smíchány s 50 µl Opti-MEM I. V jiné mikrozkušavce bylo k 50 µl Opti-MEM I přidáno 0,9 µg DNA (GFP, NR1 a NR2B po 0,3 µg). Po 5 minutách inkubace byly roztoky smíchány a inkubovány dalších 20 minut při pokojové teplotě. Tato směs Lipofectaminu 2000 s DNA byla přidána ke konfluentním HEK buňkám na čtyřiadvacetijamkové destičce. Buňky byly poté 5 hodin inkubovány při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> a následně rozpasážovány na 4 Petriho misky (ø 35 mm), do kterých bylo předem vloženo sklíčko s naneseným



kolagenem a poly-L-lysinem. Pasážování probíhalo stejně, jako bylo popsáno v odstavci 4.4.1, s tím rozdílem, že buňky byly resuspendovány v médiu pro HEK buňky po transfekci (tj. obsahujícím inhibitory NMDA receptorů). Elektrofyziologické pokusy byly prováděny 24-48 hodin po skončení transfekce na buňkách exprimujících GFP.

#### **4.5.2. Magnetická transfekce**

0,9 µg DNA (GFP, NR1 a NR2B po 0,3 µg) a 0,9 µl transfekčního činidla Matra-A (IBA, Göttingen, SRN) bylo smícháno s 50 µl Opti-MEM I v mikrozkuhavce a inkubováno 20 min při pokojové teplotě. Poté byl obsah mikrozkuhavky přidán ke konfluentním HEK buňkám na čtyřiadvacetijamkové destičce, destička byla umístěna na silný magnet a inkubována 15 min při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Buňky pak byly rozpasážovány stejně jako u transfekce využívající Lipofectaminu 2000.

### **4.6. Snímání proudových odpovědí NMDA receptorů**

#### **4.6.1. Optická zařízení**

Pokusy byly prováděny pod přímou zrakovou kontrolou při 100- a 400-násobném zvětšení pomocí invertovaného mikroskopu (Nikon). Na stolku mikroskopu byla umístěna kultivační miska s transfekovanými HEK293 buňkami nebo s hipokampálními neurony v promývacím roztoku, jehož hladina byla udržována na konstantní výši. Mikroskop, aplikační zařízení a část snímacího zařízení byly umístěny v uzemněné Faradayově kleci.

#### **4.6.2. Aplikace roztoků**

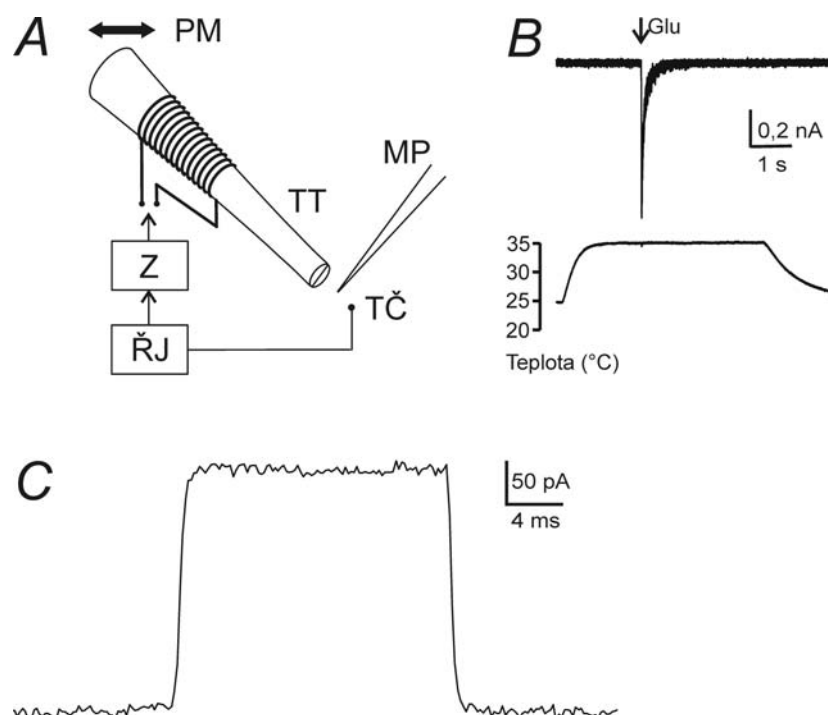
##### 4.6.2.1. Paralelní trubičky

Roztoky byly na měřené buňky aplikovány prostřednictvím sestavy deseti paralelně seřazených silikátových trubiček o vnitřním průměru 300 µm a tloušťce stěny 50 µm, jejichž laterální posuv (a tedy i aplikaci příslušného roztoku) zajišťoval krokový motorek. Ten byl řízen mikroprocesorem, jenž zároveň ovládal i otevírání solenoidových ventilů (General Valves, Fairfield, USA), přes které byly pomocí teflonových hadiček roztoky přiváděny samospádem ze zásobních nádob. Ústí trubiček bylo nastavováno ve vzdálenosti ~200 µm od měřené buňky. Čas výměny

roztoků na povrchu buňky se u tohoto aplikačního systému pohybuje kolem 10 ms (Vyklíčky et al., 1990a).

#### 4.6.2.2. Theta-trubička s kontrolou teploty

Pro velmi rychlou ( $<1$  ms) výměnu roztoků byla používána tzv. „theta-trubička“. Jde o skleněnou trubičku o vnějším průměru 1,5 mm a tloušťce stěny 0,16 mm uvnitř podélně rozdělenou na dva kanály, takže průřez připomíná řecké písmeno  $\theta$ . Tato trubička byla vytažena do špičky o vnějším průměru  $\sim 300$   $\mu\text{m}$  a na její zužující se část byl navinut odporový drátek sloužící k řízení teploty aplikovaných roztoků, podobně, jak bylo popsáno v dřívější publikaci z naší laboratoře (Dittert et al., 2006). Tento topný měděný drátek o průměru 20  $\mu\text{m}$  (Elektrisola GmbH, Eckenhagen, SRN) byl navinut  $\sim 1,9$ - $6,9$  mm od ústí trubičky, celkem 27 závitů. Teplota aplikačních roztoků byla měřena termočlánkem umístěným  $\sim 1,5$  mm nad dnem misky. Typická vzdálenost mezi ústím trubičky a termočlánkem byla  $\sim 300$   $\mu\text{m}$ , přičemž měřená buňka byla umístěna mezi ně, do proudu kontrolního roztoku (během experimentu proudily roztoky oběma oddíly theta-trubičky kontinuálně). Aplikace agonisty byla realizována rychlým horizontálním posunem theta-trubičky, připevněné na manipulátor vybavený piezo elementem (EXFO, Mississauga, Kanada). Při měření při vyšší teplotě než pokojové byly roztoky ohřívány vždy jen na nezbytně dlouhou dobu (viz Obr. 4.1 B). Rychlost výměny roztoků (10-90% nárůst za  $0,60 \pm 0,16$  ms ( $n = 6$ )) byla kontrolována po snímání proudových odpovědí každé buňky měřením změny proudu, kterou tato výměna vyvolá na volné špičce elektrody. Jeden z roztoků byl pro tento účel o 4% zředěný (viz Obr. 4.1 C).



**Obr. 4.1.** Aplikační systém pro rychlou výměnu roztoků o řízené teplotě. **(A)** Schematický náčrt aplikačního systému. Roztoky byly aplikovány prostřednictvím skleněné theta-trubičky (TT), ovinuté měděným drátkem připojeným ke zdroji napětí (Z), ovládaným řídicí jednotkou (ŘJ). Mikropipeta (MP) s buňkou či terčíkem byla umísťována mezi ústí trubičky a termočlánek (TČ) registrující aktuální teplotu aplikovaného roztoku. **(B)** Příklad proudové odpovědi HEK buňky exprimující NR1 a NR2B podjednotky na 2 ms aplikaci 1 mM glutamátu (naznačena šipkou). Teplota aplikovaných roztoků znázorněna ve spodní části záznamu. **(C)** Kontrola rychlosti výměny roztoků prostřednictvím 20 ms aplikace roztoku o nižší iontové síle. Oba přechody (10-90% změny) se odehrály v čase <1 ms.

#### 4.6.3. Snímání a úprava proudových odpovědí

Proudové odpovědi NMDA receptorů vyvolané rychlou aplikací agonistů byly snímány technikou terčíkového zámku (Hamill et al., 1981) pomocí zesilovače Axopatch-1D (Axon Instruments, USA). Měření byla prováděna za konstantního napětí (tzv. „voltage clamp“) -60 mV. Snímány byly odpovědi celé buňky, nebo pouze receptorů obsažených v terčíku vytrženém z buněčné membrány, orientovaným vnější stranou membrány ven (tzv. „outside-out“ konfigurace). Hodnota sériového odporu byla zpravidla <10 M $\Omega$  a byla kompenzována z 80-90%. Analyzovány byly odpovědi buněk, jejichž kapacitance byla <30 pF a hodnota sériového odporu <20 M $\Omega$ . Není-li uvedeno jinak, byly pokusy prováděny při pokojové teplotě (23-26°C).

Odpovědi NMDA receptorů byly snímány pomocí mikropipet připravených z trubiček z borosilikátového skla o vnějším průměru 1,6 mm a vnitřním průměru 1,2 mm (Rückl Glass, Otovice). Mikropipety byly z trubiček vyráběny na horizontálním tahači (P-97, Sutter Instruments) obvykle ve 4 krocích. Pro měření v konfiguraci „whole-cell“ byly používány mikropipety, jejichž odpor po naplnění intracelulárním roztokem byl 3-6 M $\Omega$ , pro snímání odpovědí „outside-out“ terčů 5-10 M $\Omega$ .

Jemná manipulace mikropipety byla prováděna mikromanipulátorem (MP-225, Sutter Instruments). Elektrické spojení mezi intracelulárním roztokem v mikropipetě a převodníkem bylo umožněno Ag/AgCl elektrodou. Referenční Ag/AgCl elektroda byla umístěna v komůrce v extracelulárním roztoku spojené prostřednictvím agarového můstku s roztokem ve snímací misce.

Výstupní signál z převodníku byl zesílen, filtrován Besselovým filtrem na 1 kHz a uložen na pevný disk osobního počítače pomocí programového souboru pClamp verze 9.2 (Axon Instruments). Vzorkovací frekvence byla 5 kHz.

#### **4.7. Zpracování naměřených dat**

Odpovědi NMDA receptorů byly analyzovány pomocí programu Clampfit, který je součástí pClamp verze 9.2, a dále pomocí programů Sigma Plot a SigmaStat (Jandel Scientific), příp. Microsoft Excel. Kinetické modelování bylo prováděno pomocí programu Gepasi verze 3.21 (Mendes, 1993, 1997; Mendes a Kell, 1998).

Výsledky v této dizertační práci jsou ukázány ve formě aritmetických průměrů a směrodatných odchylek. Statistická významnost byla hodnocena párovým nebo nepárovým Studentovým t-testem nebo pomocí ANOVA testu (Sigma Plot, Jandel Scientific). Hladina statistické významnosti ( $\alpha$ ) byla stanovena na hodnotu 0,05.

#### **4.8. Použité rovnice**

Rychlostní konstanta zavírání iontového kanálu NMDA receptoru ( $k_c$ ) byla stanovena z průměrné doby jeho otevření ( $\tau_0$ ):

$$(I) \quad k_c = 1 / \tau_0$$

Rychlostní konstanta otevírání NMDA receptoru ( $k_o$ ) pak byla počítána z definice pravděpodobnosti otevření ( $P_o$ ) iontového kanálu:

$$(II) \quad P_o = k_o / (k_o + k_c)$$

Časový průběh deaktivace, příp. desenzitizace NMDA receptorů byl fitován buď jedno-, nebo dvouexponenciální funkcí:

$$(III) \quad I(t) = A \exp (-t / \tau) + C$$

$$(IV) \quad I(t) = A_{\text{rychlé}} \exp (-t / \tau_{\text{rychlé}}) + A_{\text{pomalé}} \exp (-t / \tau_{\text{pomalé}}) + C$$

kde  $\tau$  ( $\tau_{\text{rychlé}}$ ,  $\tau_{\text{pomalé}}$ ) představuje časovou konstantu poklesu proudové odpovědi ( $I(t)$ ),  $A$  ( $A_{\text{rychlé}}$ ,  $A_{\text{pomalé}}$ ) amplitudu příslušné složky exponenciální funkce a  $C$  absolutní člen.

Teplotní závislost rychlostních konstant ( $k(T)$ ) může být vyjádřena pomocí koeficientu  $Q_{10}$  nebo aktivační energie ( $E_a$ ), která je definována Arrheniovou rovnicí:

$$(V) \quad k(T) = A \exp (-E_a / RT)$$

kde  $A$  je konstanta,  $R$  univerzální plynová konstanta ( $R = 8,3145 \text{ J}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) a  $T$  absolutní teplota. Hodnota  $E_a$  je pak vypočítána z tzv. Arrheniova grafu ( $\ln k$  proti  $1/T$ ):

$$(VI) \quad E_a = -\text{směrnice} \times R$$

V případě určování teplotní závislosti časových konstant ( $\tau$ ) bylo místo rychlostní konstanty „ $k$ “ do Arrheniovy rovnice dosazeno a pro sestrojení Arrheniova grafu použito  $1 / \tau$ .

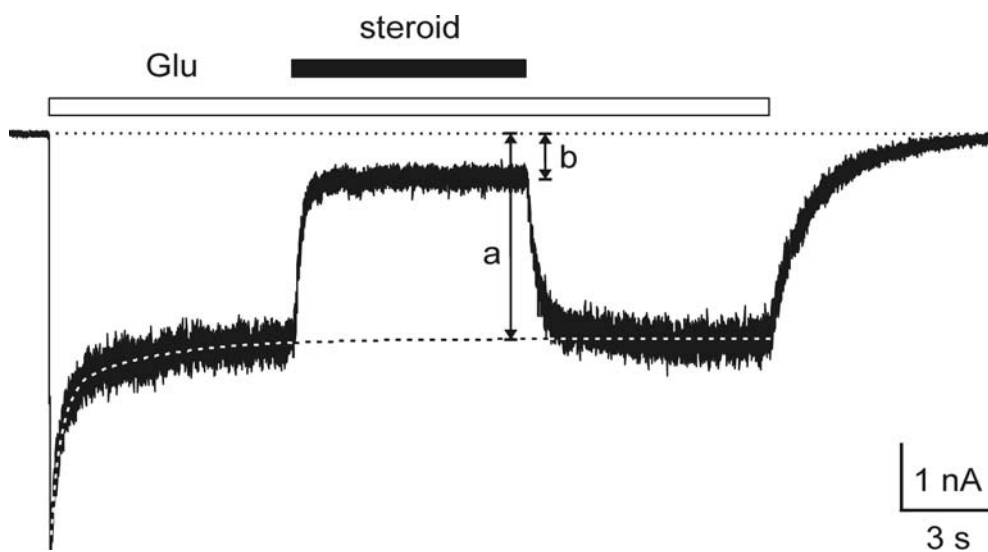
Koeficient  $Q_{10}$  byl počítán z hodnot, které pro dané teploty udával Arrheniův graf, následovně:

$$(VII) \quad Q_{10}(T) = k(T + 10) / k(T)$$

Při analýze inhibičního účinku steroidních látek byla počítána hodnota  $IC_{50}$  (tj. koncentrace steroidu vyvolávající 50% inhibici) z rovnice:

$$(VIII) \quad \text{relativní odpověď} (= 1 - \text{relativní inhibice}) = 1 / (1 + ([\text{steroid}] / IC_{50})^h)$$

kde relativní odpověď byla určena z poklesu proudové odpovědi po aplikaci steroidu (jak ukazuje Obr. 4.2) a  $h$  je Hillův koeficient.



**Obr. 4.2.** Stanovení inhibičního účinku steroidů. Míra inhibice byla počítána z hodnot znázorněných v obrázku šipkami: relativní inhibice =  $(1 - b/a) * 100 \%$ .

## 5. VÝSLEDKY

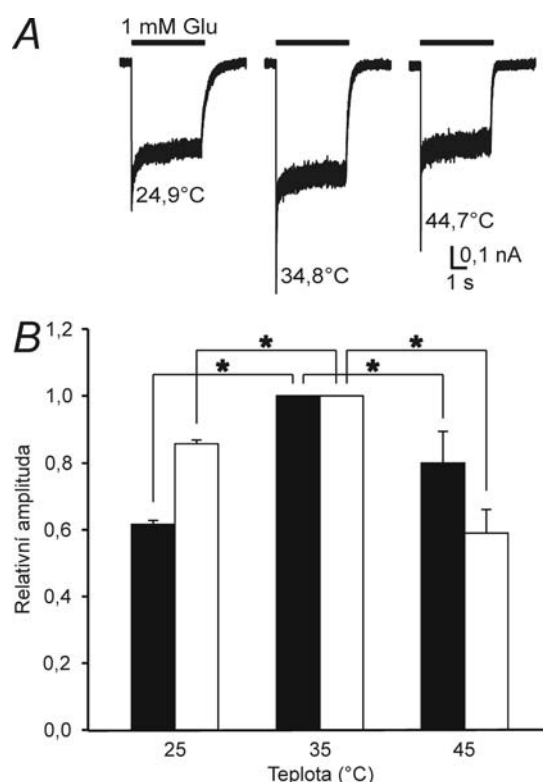
### 5.1. Teplotní závislost NMDA receptorů

Experimenty byly prováděny na HEK293 buňkách exprimujících rekombinantní NMDA receptory o podjednotkovém složení NR1-1a/NR2B a na kultivovaných hipokampálních neuronech. Receptory byly aktivovány krátkou (2 ms) či dlouhou (3-5 s) aplikací glutamátu (1 mM, příp. 1  $\mu$ M) a jejich proudové odpovědi snímány elektrofyziologickou metodou terčíkového zámku. Snímány byly buď odpovědi celé buňky, nebo receptorů obsažených v terčíku vytrženém z buněčné membrány. Pro dosažení nejlepší možné kontroly nad teplotou aplikovaných roztoků (minimalizace možných teplotních ztrát v místech kontaktu s podložkou) byly v těchto pokusech buňky mikropipetou vyzvednuty ze dna snímací misky a umístěny přímo do proudu kontrolního extracelulárního roztoku vytékajícího z aplikační theta-trubičky (viz Obr. 4.1 A). Všechna měření probíhala v aplikačním extracelulárním roztoku bez  $Mg^{2+}$ , obsahujícím 0,5 mM  $Ca^{2+}$  (0,7 mM  $CaCl_2$  + 0,2 mM EDTA) a 10  $\mu$ M glycin.

#### 5.1.1. Vliv teploty na amplitudu makroskopických odpovědí NR1/NR2B receptorů

Proudové odpovědi rekombinantních NR1/NR2B receptorů na 5 s aplikaci 1 mM glutamátu byly snímány při teplotách přibližně 25, 35 a 45°C vždy na téže buňce. Zvýšení teploty vyvolalo tři zřejmé efekty: změnu amplitudy proudové odpovědi (zvýšení při 35°C a následný pokles při 45°C), zrychlení desenzitizace a taktéž zrychlení deaktivace odpovědí NMDA receptorů (Obr. 5.1 A). Pokles amplitudy při 45°C byl reversibilní (ověřováno opětovným měřením při 25°C), a nebyl tudíž způsoben denaturací proteinů, internalizací receptorů či jinými nežádoucími nespecifickými důsledky zvýšené teploty. Graf na Obr. 5.1 B shrnuje výsledky z pěti buněk vyjádřené jako relativní amplituda - vztaženo k amplitudě odpovědi dané buňky při 35°C. Rozdíly mezi amplitudami při 25 a 35°C, stejně jako při 35 a 45°C byly statisticky významné, a to i po normalizaci na zvyšující se jednotkovou vodivost NMDA receptorů (bílé sloupce v Obr. 5.1 B), která byla určena analýzou amplitud odpovědí jednotlivých iontových kanálů (viz Obr. 5.3 A, C). Průběh teplotní závislosti amplitudy odpovědí NMDA receptorů je tedy ovlivňován více faktory: kromě teplotní závislosti jednotkové vodivosti zřejmě také

kinetickými charakteristikami funkce těchto iontových kanálů a jejich různou citlivostí na změny teploty.



**Obr. 5.1.** Teplotní závislost amplitudy odpovědi NMDA receptorů. (A) Proudové odpovědi HEK293 buňky exprimující NR1/NR2B receptory na aplikaci 1 mM glutamátu při uvedených teplotách. Doba aplikace (5 s) je vyznačena černým obdélníkem. Všechny uvedené záznamy pocházejí z téže buňky. (B) Graf závislosti relativní amplitudy (vztaženo k hodnotě při 35°C) maxima proudové odpovědi NR1/NR2B receptorů na teplotě. Bílé sloupce znázorňují hodnoty relativní amplitudy dále normalizované s ohledem na jednotkovou vodivost NMDA receptorů, rostoucí s teplotou (viz Obr. 5.3 A, C). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly (párový t-test,  $P < 0,01$ ).

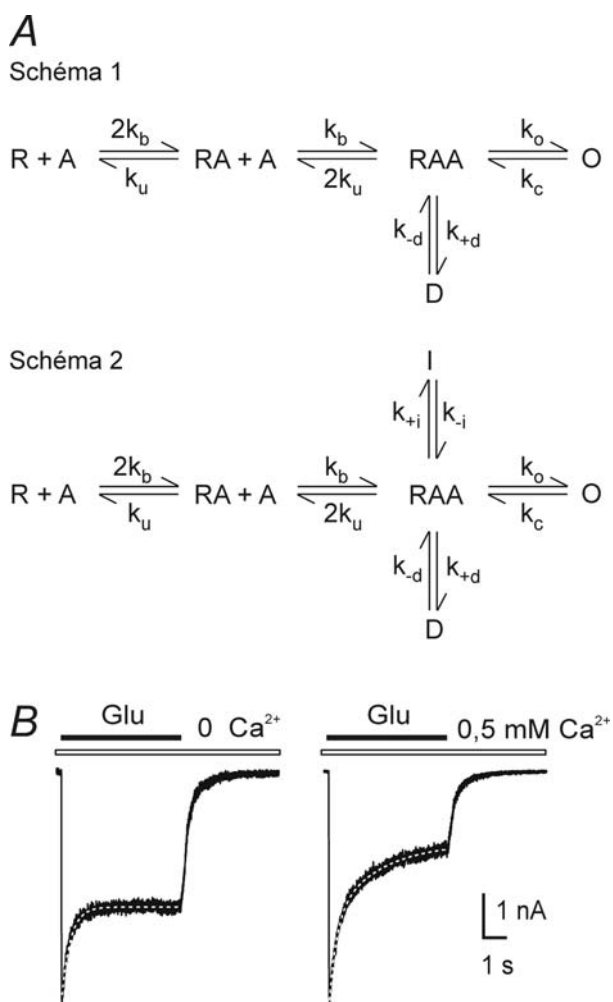
### 5.1.2. Kinetická charakterizace NMDA receptorů a její teplotní závislost

#### 5.1.2.1. Model aktivace NMDA receptorů

Při popisu mechanismu aktivace NMDA receptorů bylo jako výchozí model použito schéma navržené Lesterem a Jahrem (Lester a Jahr, 1992). Tento model (viz Obr. 5.2 A, Schéma 1) počítá se dvěma navzájem nezávislými vazebnými místy pro agonistu (glutamát), po jejichž obsazení může receptor buď otevřít iontový kanál, nebo vstoupit do desenzitizovaného stavu. V této podobě se však model ukázal pro interpretaci naměřených dat jako nevyhovující, neboť nepopisoval dobře průběh



desenzitizace. Pokles proudové odpovědi během přetrvávající aplikace agonisty je způsoben vstupem receptorů do desenzitizovaného stavu: kdyby tento stav byl skutečně jediný, jak tvrdí výše uvedený model, musel by časový průběh desenzitizace být popsateľný jednoexponenciální funkcí, ve skutečnosti však byl dvouexponenciální. Tento problém byl vyřešen zavedením druhého desenzitizovaného stavu do používaného schématu (viz Obr. 5.2 A, Schéma 2). Navíc bylo zjištěno, že pomalá složka desenzitizace je závislá na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  (viz Obr. 5.2 B), a nejedná se tudíž o desenzitizaci receptoru v užším slova smyslu, ale o  $\text{Ca}^{2+}$ -závislou inaktivaci (Vyklícky, 1993; Krupp et al., 1996) - proto byl příslušný stav označen písmenem „I“.



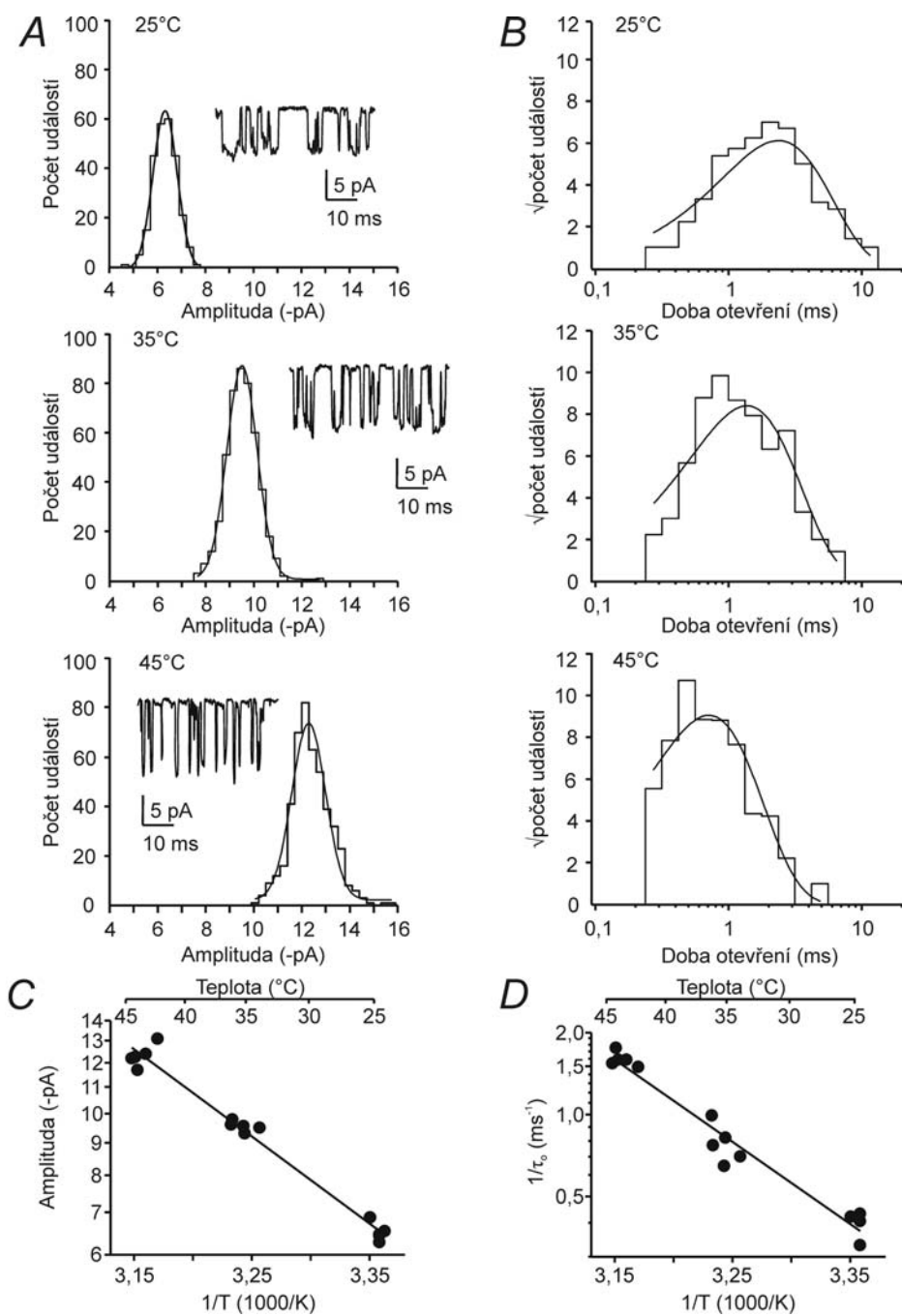
**Obr. 5.2.** Kinetické schéma aktivace NMDA receptoru. (A) A označuje agonistu (glutamát), ostatní písmena pak receptor samotný (R), s jednou navázanou molekulou glutamátu (RA), se dvěma molekulami glutamátu (RAA), v otevřeném (O), desenzitizovaném (D) a inaktivovaném (I) stavu. (B) Odpověď téže buňky na

aktivaci 1 mM glutamátem v roztoku neobsahujícím  $\text{Ca}^{2+}$  (0  $\text{Ca}^{2+}$ ) a ve standardně užívaném aplikačním roztoku, obsahujícím 0,7 mM  $\text{CaCl}_2$  a 0,2 mM EDTA (0,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ). Desenzitizace v nepřítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  byla fitována (bílá přerušovaná čára) jednoexponenciální funkcí ( $\tau = 365$  ms), zatímco v jejich přítomnosti funkcí dvouexponenciální ( $\tau_{\text{rychlé}} = 297$  ms,  $\tau_{\text{pomalé}} = 1914$  ms,  $A_{\text{rychlé}} = 50\%$ ).

#### 5.1.2.2. Teplotní závislost kinetických charakteristik NMDA receptorů

Mechanismus zvolený pro popis aktivace NMDA receptorů obsahuje pět stavových přechodů charakterizovaných celkem osmi rychlostními konstantami: rychlostní konstantou vazby ( $k_b$ ) a odvazování ( $k_u$ ) glutamátu, otevírání ( $k_o$ ) a zavírání ( $k_c$ ) iontového kanálu, desenzitizace ( $k_{+d}$ ), resenzitizace ( $k_{-d}$ ), inaktivace ( $k_{+i}$ ) a návratu z inaktivovaného stavu ( $k_{-i}$ ) NMDA receptoru. Dalším úkolem bylo pomocí kinetické analýzy odpovědi rekombinantních NR1/NR2B receptorů stanovit hodnoty těchto rychlostních konstant při různých teplotách (cca 25, 35 a 45°C) a zjistit tak teplotní závislost dílčích procesů v mechanismu aktivace NMDA receptorů.

Rychlostní konstanty otevírání a zavírání iontového kanálu NMDA receptoru byly určeny analýzou doby otevření jednotlivých kanálů. Ta byla pro každý analyzovaný terčík znázorněna pomocí kumulativního grafu distribuce, který byl proložen exponenciální funkcí, jejíž maximum představovalo hodnotu průměrné doby otevření ( $\tau_o$ ). Tyto hodnoty pak byly vyneseny do Arrheniova grafu ( $\ln(1/\tau_o)$  proti  $1/T$ ), který určil následující hodnoty  $\tau_o$ : 2,60 ms pro 25°C, 1,22 ms pro 35°C a 0,60 ms pro 45°C (aktivační energie  $E_a = 58 \pm 3$  kJ mol<sup>-1</sup>, koeficient  $Q_{10} = 1,4$ ). Rychlostní konstanta zavírání iontového kanálu ( $k_c = 1/\tau_o$ ) pak pro 25, 35 a 45°C nabývá hodnot 385,0 s<sup>-1</sup>, 820,8 s<sup>-1</sup> a 1668,6 s<sup>-1</sup> a rychlostní konstanta otevírání ( $k_o$ ), spočítaná pomocí definičního vztahu pro pravděpodobnost otevření ( $P_o = k_o / (k_o + k_c)$ ), hodnot 42,8 s<sup>-1</sup> pro 25°C, 91,2 s<sup>-1</sup> pro 35°C a 185,4 s<sup>-1</sup> pro 45°C (v souladu s literaturou (Chen et al., 1999; Petrovic et al., 2005) použita hodnota  $P_o = 10\%$ ).



**Obr. 5.3.** Teplotní závislost odpovědi jednotlivých iontových kanálů rekombinantních NR1/NR2B receptorů v membránových terčících vytržených z HEK293 buněk. **(A)** Rozdělení amplitud odpovědi jednotlivých NR1/NR2B receptorů na aplikaci 0,5  $\mu\text{M}$  glutamátu při 25, 35 a 45°C, proloženo Gaussovou křivkou. Vložené obrázky ukazují příklady elektrofyziologických záznamů. **(B)** Histogram dob otevření iontových kanálů (na svislé ose odmocnina z počtu událostí dané doby trvání) proloženo jednoexponenciální funkcí. Data prezentovaná v **(A)** a **(B)** pocházejí ze stejných terčičků. **(C)**, **(D)** Arrheniovy grafy popisující teplotní závislost amplitudy **(C)** a průměrné doby otevření **(D)**.

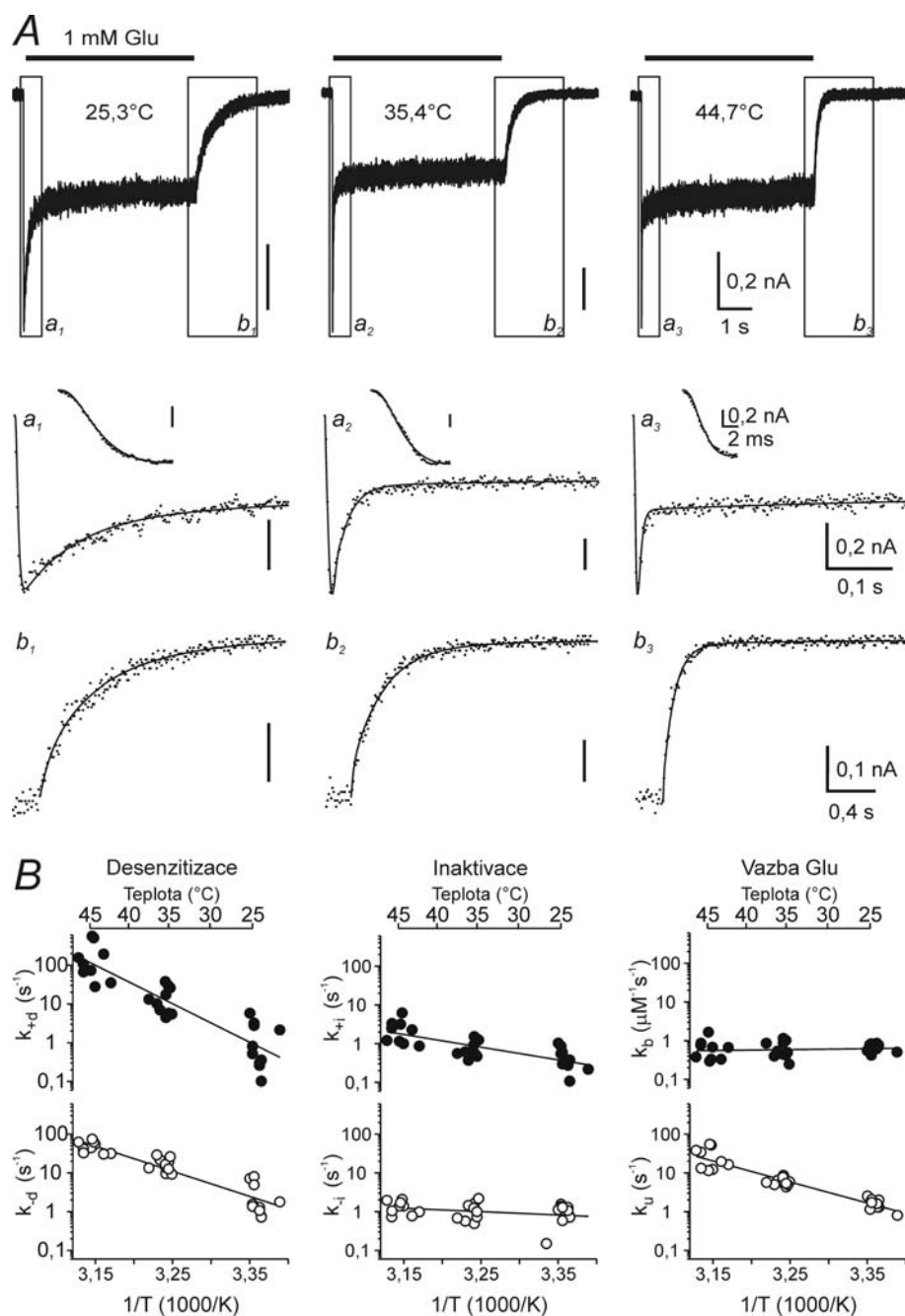
Ostatní rychlostní konstanty byly stanoveny kinetickou analýzou odpovědi celých HEK293 buněk exprimujících NR1/NR2B receptory na několikasekundovou aplikaci 1 mM glutamátu (Obr. 5.4 A). Záznamy těchto odpovědí (resp. jejich části - viz dále) byly fitovány pomocí počítačového programu Gepasi ve třech po sobě jdoucích krocích:

Nejprve byla fitována část odpovědi během aplikace agonisty za účelem stanovení rychlostních konstant charakterizujících desenzitizaci a inaktivaci, tj.  $k_{+d}$ ,  $k_{-d}$ ,  $k_{+i}$  a  $k_{-i}$ . Konstanty  $k_o$  a  $k_c$  byly známé (viz výše),  $k_u$  a  $k_b$  byly nastaveny fixně na hodnoty  $k_b = 0,65 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $k_u = 5, 7$  a  $22 \text{ s}^{-1}$  pro 25, 35 a 45°C. Vzhledem k suprasaturující koncentraci glutamátu (1 mM; více než o tři řády vyšší než  $\text{EC}_{50}$ ) byly hodnoty konstant  $k_{+d}$ ,  $k_{-d}$ ,  $k_{+i}$  a  $k_{-i}$  určené tímto způsobem relativně nezávislé na nastavených hodnotách  $k_b$  a  $k_u$ , což bylo ověřeno zpětně opakováním tohoto kroku s dosazenými hodnotami  $k_b$  a  $k_u$  určenými v dalších fázích analýzy. Obr. 5.4 A  $a_1$ - $a_3$  ukazuje, že jak nástup, tak časový průběh poklesu proudové odpovědi v důsledku desenzitizace a inaktivace byly modelem dobře popsány.

Poté byla určena rychlostní konstanta od vazování glutamátu ( $k_u$ ), a sice analýzou deaktivace receptorů, tedy poklesu proudové odpovědi po ukončení aplikace agonisty. Konstanty  $k_o$ ,  $k_c$ ,  $k_{+d}$ ,  $k_{-d}$ ,  $k_{+i}$  a  $k_{-i}$  byly fixovány na hodnotách určených v dřívějších krocích,  $k_b$  nebyla vzhledem k absenci agonisty nutná. Na Obr. 5.4 A  $b_1$ - $b_3$  je patrné zrychlení deaktivace při vyšších teplotách.

Posledním krokem bylo fitování nástupu odpovědi za účelem stanovení rychlostní konstanty vazby glutamátu ( $k_b$ ), která byla v této fázi ponechána jako jediný volný parametr (ostatní kinetické konstanty již byly známé). Rychlost nástupu se s rostoucí teplotou zvyšovala (viz vložené obrázky v Obr. 5.4 A  $a_1$ - $a_3$ ): čas potřebný k 10-90% nárůstu byl  $6,76 \pm 0,53 \text{ ms}$  při 25°C,  $3,87 \pm 0,59 \text{ ms}$  při 35°C a  $2,53 \pm 0,43 \text{ ms}$  pro 45°C (přibližné teploty).

Hodnoty  $k_{+d}$ ,  $k_{-d}$ ,  $k_{+i}$ ,  $k_{-i}$ ,  $k_b$  a  $k_u$  získané fitováním odpovědi jednotlivých buněk byly vyneseny do Arrheniových grafů:  $\ln k$  jako lineární funkce  $1/T$ , jejíž směrnice slouží k výpočtu aktivační energie ( $E_a$ ) - míry teplotní citlivosti jednotlivých procesů (Obr. 5.4 B). Hodnoty  $E_a$ , jakož i teplotního koeficientu  $Q_{10}$  a jednotlivých rychlostních konstant, jak je pro 35°C určuje příslušný Arrheniův graf, jsou uvedeny v Tabulce 1.



**Obr. 5.4.** Vliv teploty na průběh odpovědi vyvolaných vysokou koncentrací glutamátu. (**A**) Proudové odpovědi HEK293 buněk exprimujících NR1/NR2B receptory na aplikaci 1 mM glutamátu při různých teplotách byly použity pro kinetické modelování. Proudů předpovězené modelem jsou zobrazeny v obrázcích  $a_1$ - $a_3$  a  $b_1$ - $b_3$  jako plné čáry superponované na experimentální data (znázorněná tečkami). Výřezy v  $a_1$ - $a_3$  ukazují nástup odpovědi na detailnější časové škále. Zobrazené záznamy pocházejí z různých buněk. (**B**) Arrheniovy grafy teplotní závislosti rychlostních konstant desenzitizace ( $k_{+d}$ ), resenzitizace ( $k_{-d}$ ), inaktivace ( $k_{+i}$ ), návratu z inaktivovaného stavu ( $k_{-i}$ ), vazby ( $k_b$ ) a odvazování glutamátu ( $k_u$ ) pro 9-10 buněk analyzovaných při každé teplotě (přibližně 25, 35 a 45°C). Stejně měřítko grafů umožňuje přímé vizuální porovnání teplotní závislosti jednotlivých rychlostních konstant (hodnoty  $E_a$  a  $Q_{10}$  viz Tabulka 1).

**Tabulka 1.** Teplotní závislost rychlostních konstant mechanismu aktivace NMDA receptorů.

	hodnota při 35°C	$E_a$ (kJ/mol)	$Q_{10}$ pro 35°C
$k_{+d}$ ( $s^{-1}$ )	11,4	$190,2 \pm 18,5$	10,31
$k_{-d}$ ( $s^{-1}$ )	11,8	$124,1 \pm 10,2$	4,58
$k_{+i}$ ( $s^{-1}$ )	0,80	$62,9 \pm 10,5$	2,16
$k_{-i}$ ( $s^{-1}$ )	1,01	$16,7 \pm 9,1$	1,23
$k_b$ ( $\mu M^{-1} s^{-1}$ )	0,58	$-4,4 \pm 7,8$	0,95
$k_u$ ( $s^{-1}$ )	6,19	$103,7 \pm 7,0$	3,57

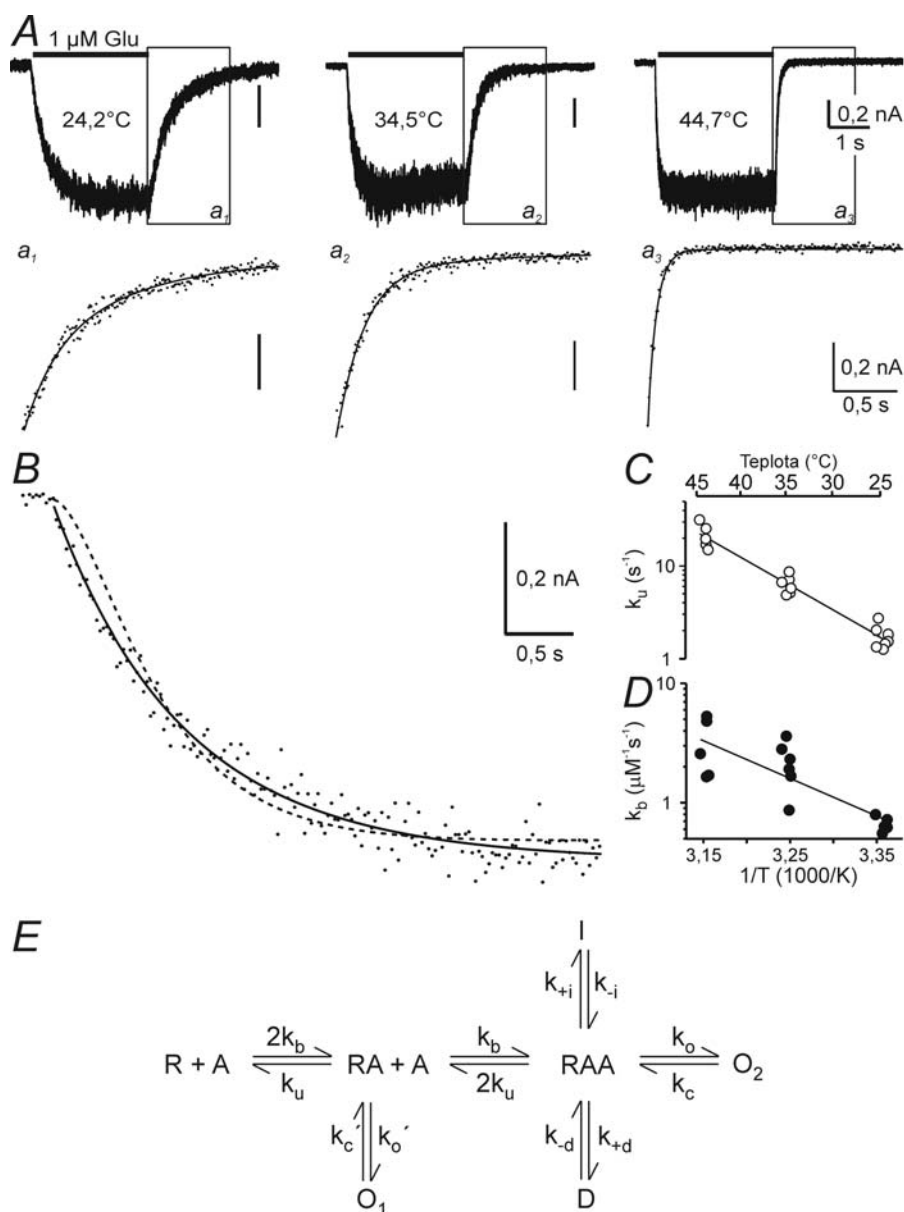
### 5.1.2.3. Aktivace NMDA receptorů nízkou koncentrací glutamátu

Přestože odpovědi rekombinantních NR1/NR2B receptorů na aktivaci 1 mM glutamátem byly v předchozí kapitole zvoleným modelem dobře popsány, byla provedena další série experimentů a analýz, pro účely citlivější charakterizace vazby agonisty tentokrát používající nižší koncentraci glutamátu, konkrétně 1  $\mu$ M. Jinak byla strategie obdobná: proudové odpovědi NR1/NR2B receptorů v HEK buňkách na několikasekundovou aplikaci 1  $\mu$ M glutamátu při teplotách přibližně 25, 35 a 45°C (Obr. 5.5 A) byly analyzovány s využitím programu Gepasi. Rychlostní konstanta  $k_u$  byla stanovena fitováním deaktivace (Obr. 5.5 A  $a_1$ - $a_3$ ),  $k_b$  fitováním nástupu odpovědi. Konstanty  $k_o$ ,  $k_c$ ,  $k_{+d}$ ,  $k_{-d}$ ,  $k_{+i}$  a  $k_{-i}$  byly spočítány z příslušných Arrheniových grafů vždy pro danou teplotu.

Analýza deaktivace vedla k následujícím charakteristikám teplotní závislosti rychlostní konstanty odnavazování glutamátu ( $k_u$ ):  $E_a = 103,0 \pm 5,7$  kJ mol<sup>-1</sup>,  $Q_{10}(35^\circ C) = 3,54$  a  $k_u(35^\circ C) = 6,56$  s<sup>-1</sup> (Obr. 5.5 C). Tyto hodnoty se významně neliší od těch získaných analýzou odpovědi na 1 mM glutamát (viz Tabulka 1).

Složitější se ukázala být analýza nástupu odpovědi, který se fitováním podle dosud užívaného modelu nedařilo dobře vystihnout (viz přerušovaná čára v Obr. 5.5 B). Skutečný nástup měl ve všech případech ostřejší začátek, než předpovídal model. Proto byl použit pozměněný model, který počítá s možností otevření iontového kanálu NMDA receptoru už po navázání jedné molekuly glutamátu (viz Obr. 5.5 E). Toto alternativní otevírání bylo kineticky charakterizováno tak, že  $k_c$  byla použita stejná jako u přechodu O → RAA, protože graf distribuce dob otevření byl fitován jednoexponenciální funkcí (viz Obr. 5.3 B), a  $k_o$  byla ponechána jako volný parametr tak, aby celková pravděpodobnost otevření byla 10 %. Tento model poskytl

statisticky významně lepší fit (plná čára v Obr. 5.5 B) než předchozí (srovnání součtů druhých mocnin odchylek předpovězených odpovědí od naměřených). Arrheniův graf pro takto stanovenou  $k_b$  (Obr. 5.5 D) určil následující charakteristiky:  $E_a = 60,1 \pm 11,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $Q_{10}(35^\circ\text{C}) = 2,09$  a  $k_b(35^\circ\text{C}) = 1,66 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .



**Obr. 5.5.** Teplotní závislost NR1/NR2B receptorů aktivovaných nízkou koncentrací glutamátu. (A) Proudové odpovědi HEK293 buněk exprimujících NR1/NR2B receptory na aplikaci 1  $\mu\text{M}$  glutamátu při různých teplotách byly použity pro kinetické modelování. Proudů předpovězené modelem jsou zobrazeny v obrázcích  $a_1$ - $a_3$  jako plné čáry superponované na experimentální data (znázorněná tečkami). Zobrazené záznamy pocházejí z různých buněk. (B) Nástup proudové odpovědi na 1  $\mu\text{M}$  glutamát znázorněný tečkami, na které jsou superponovány výsledky fitování

vycházejících z tradičního (Schéma 2 v Obr. 5.2; přerušovaná čára) a alternativního (dvě otevření; viz (E)) modelu aktivace NMDA receptorů. (C, D) Arrheniovy grafy teplotní závislosti rychlostních konstant vazby ( $k_b$ ) a odvazování glutamátu ( $k_u$ ) pro 5-7 buněk analyzovaných při každé teplotě (přibližně 25, 35 a 45°C). (E) Schéma alternativního modelu aktivace NMDA receptorů užitého v této kapitole.

### 5.1.3. Vliv teploty na průběh deaktivace NMDA receptorů

Další pokusy byly zaměřeny na charakterizaci teplotní závislosti deaktivace NMDA receptorů po velmi krátké (2 ms) aplikaci glutamátu. Ta představuje jakýsi model synaptického přenosu zprostředkovaného NMDA receptory, jelikož synaptické NMDA receptory jsou působení glutamátu vystaveny po podobně krátkou dobu (odhaduje se ~1 ms, s maximální koncentrací ~1 mM) (Clements et al., 1992). Deaktivace nativních NMDA receptorů po takto krátké aktivaci má dvouexponenciální průběh, což bylo vysvětlováno vlivem desenzitizace, která má pokles proudové odpovědi v časné fázi deaktivace zrychlovat a v pozdější naopak zpomalovat (Lester a Jahr, 1992). Bylo tedy otázkou, jakým způsobem se vysoká míra teplotní citlivosti desenzitizace zjištěná v předchozí analýze ( $Q_{10}$  pro  $k_{+d}$  a  $k_{-d}$  nabývá hodnot 10,3 resp. 4,6) projeví na teplotní závislosti deaktivace NMDA receptorů.

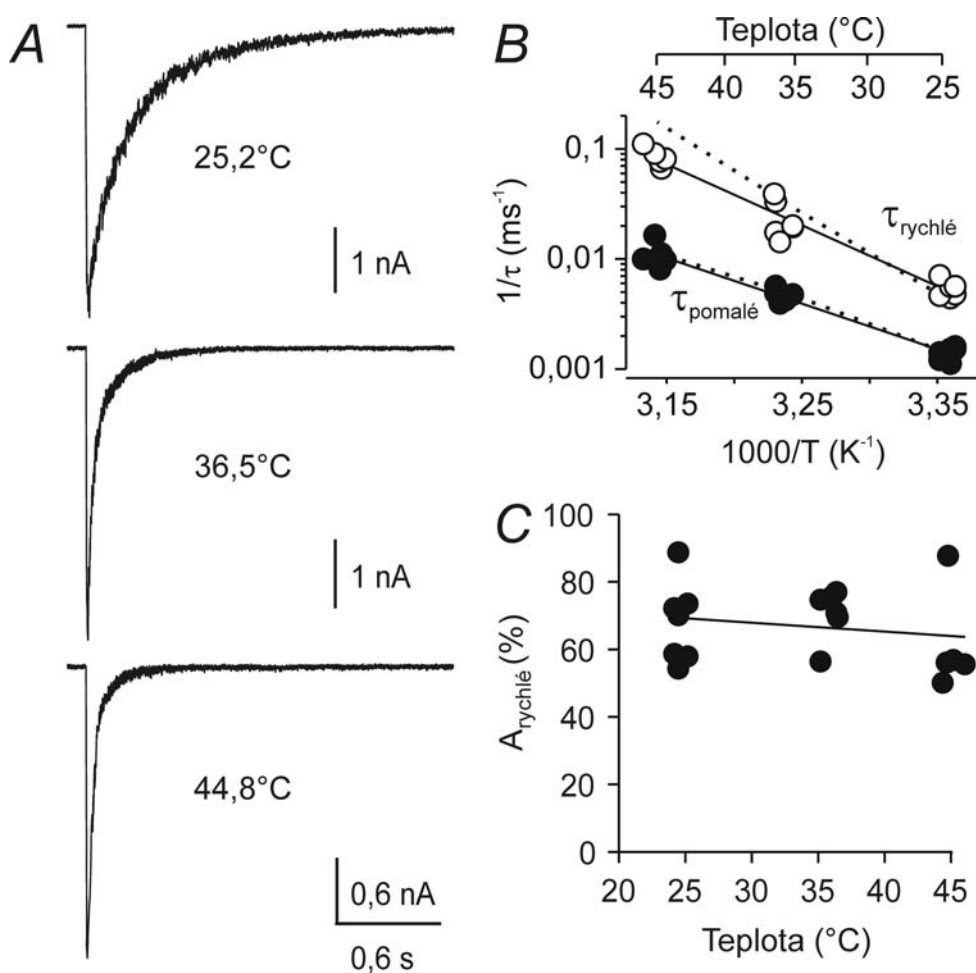
#### 5.1.3.1. Rekombinantní NR1/NR2B receptory

Proudové odpovědi HEK293 buněk exprimujících NR1/NR2B receptory na 2 ms aplikaci glutamátu při teplotách přibližně 25, 35 a 45°C (Obr. 5.6 A) byly snímány stejným způsobem jako v kapitole 5.1.2.2 - jediný rozdíl byl v délce aplikace agonisty (v některých případech byla stejná buňka testována postupně podle obou protokolů - krátká i dlouhá aplikace). Časový průběh deaktivace byl fitován v programu Clampfit dvouexponenciální funkcí, jejíž časové konstanty nabývaly těchto průměrných hodnot:  $\tau_{\text{rychlé}} = 192 \pm 29$  ms pro 24,2-25,2°C,  $47 \pm 17$  ms pro 35,2-36,5°C a  $12 \pm 2$  ms pro 44,4-46,1°C, zatímco  $\tau_{\text{pomalé}} = 731 \pm 98$  ms,  $216 \pm 28$  ms a  $95 \pm 23$  ms. Hodnoty  $E_a$  a  $Q_{10}$  vypočtené z Arrheniova grafu pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  a  $\tau_{\text{pomalé}}$  (Obr. 5.6 B) jsou uvedeny v Tabulce 2. Relativní zastoupení rychlé a pomalé složky vykazovalo jen nepatrnou teplotní závislost (Obr. 5.6 C).

Výsledky těchto pokusů posloužily pro ověření validity použitého modelu aktivace NMDA receptorů: hodnoty rychlostních konstant určené získanými Arrheniovými grafy (viz Obr. 5.4 B a Tabulka 1) pro 25, 35 a 45°C byly dosazeny do



programu Gepasi a použity pro simulaci odpovědí NMDA receptorů na 2 ms aplikaci 1 mM glutamátu. Průběh deaktivace těchto simulovaných odpovědí pak byl fitován v programu Clampfit stejným způsobem jako reálné odpovědi, tj. dvouexponenciální funkcí s následujícími časovými konstantami:  $\tau_{\text{rychlé}}(25^{\circ}\text{C}) = 219$  ms,  $\tau_{\text{rychlé}}(35^{\circ}\text{C}) = 35$  ms a  $\tau_{\text{rychlé}}(45^{\circ}\text{C}) = 6$  ms, zatímco  $\tau_{\text{pomalé}}(25^{\circ}\text{C}) = 691$  ms,  $\tau_{\text{pomalé}}(35^{\circ}\text{C}) = 217$  ms a  $\tau_{\text{pomalé}}(45^{\circ}\text{C}) = 88$  ms.



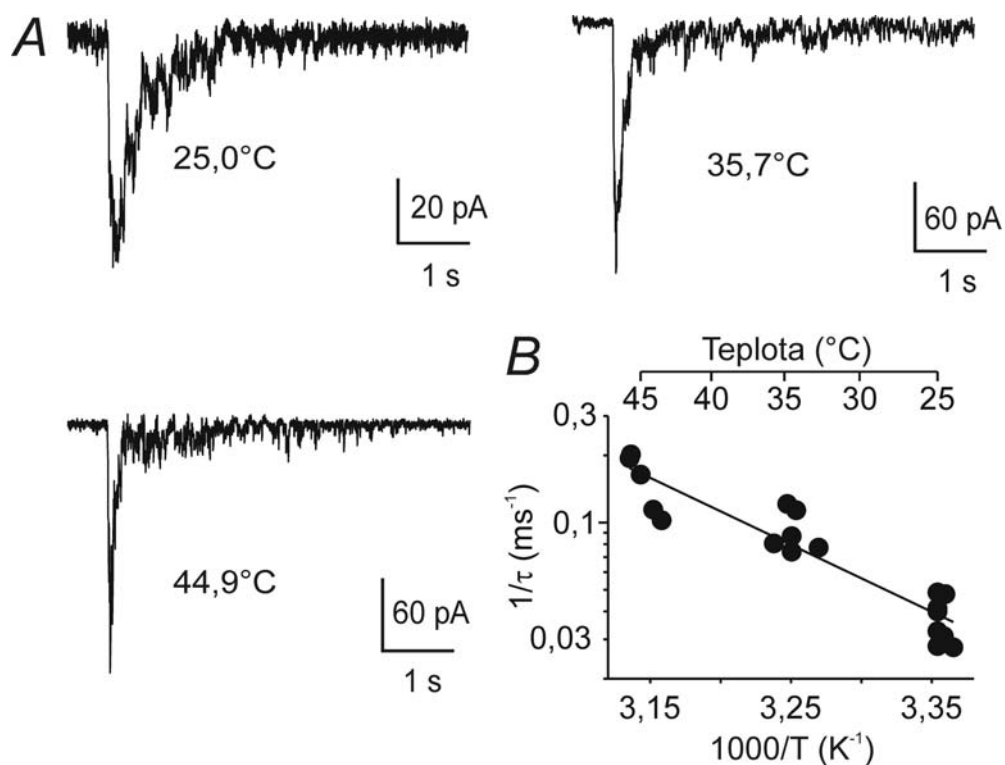
**Obr. 5.6.** Teplotní závislost deaktivace rekombinantních NR1/NR2B receptorů aktivovaných krátkou aplikací glutamátu. (A) Příklady proudových odpovědí HEK293 buněk exprimujících NR1/NR2B receptory na 2 ms aplikaci 1 mM glutamátu při různých teplotách. Zobrazené záznamy pocházejí z různých buněk. (B) Arrheniův graf časových konstant dvouexponenciální funkce popisující průběh deaktivace a srovnání naměřených hodnot (plná čára;  $n = 5-7$ ) s hodnotami předpovězenými modelem v kapitole 5.1.2.2 (přerušovaná čára). (C) Relativní podíl rychlé složky (spočítáno jako  $(A_{\text{rychlé}} / (A_{\text{rychlé}} + A_{\text{pomalé}})) \times 100\%$ ) a jeho závislost na teplotě.

### 5.1.3.2. Nativní NMDA receptory

Cílem dalších pokusů bylo porovnat výše popsanou teplotní závislost deaktivace rekombinantních NR1/NR2B receptorů s deaktivací nativních NMDA receptorů z kultivovaných hipokampálních neuronů. Jelikož však není technicky možné opakovat s těmito neurony identické experimenty jako s HEK buňkami (neurony nelze vyzvedávat ze dna kultivační misky), byly místo odpovědi celých buněk zaznamenávány odpovědi membránových terčů z těchto neuronů vytržených. Pro zajištění výhradní aktivace NMDA receptorů byl do aplikačního roztoku přidán 10  $\mu\text{M}$  CNQX (inhibitor AMPA/kainátových receptorů) a koncentrace glutamátu byla snížena na 100  $\mu\text{M}$ . Proudové odpovědi vytržených terčů na 2 ms aplikaci glutamátu byly opět snímány při teplotách přibližně 25, 35 a 45°C (Obr. 5.7 A) a následně fitovány v programu Clampfit dvouexponenciální funkcí, přičemž k fitování byl vždy použit proudový záznam vzniklý zprůměrováním nejméně tří odpovědí příslušného terče. Časová konstanta  $\tau_{\text{rychlé}}$  nabývala hodnot 25,2  $\pm$  6,3 ms pro 24,0-25,0°C, 11,2  $\pm$  2,2 ms pro 32,7-35,7°C a 6,9  $\pm$  2,2 ms pro 43,5-45,7°C. Pomalá složka se na amplitudě dvouexponenciální funkce podílela jen málo (většinou <10 %), což spolu s nízkou amplitudou odpovědi (desítky pA) neumožnilo získat konzistentní hodnoty  $\tau_{\text{pomalé}}$ .  $E_a$  a  $Q_{10}$  vypočtené z Arrheniova grafu pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  (Obr. 5.7 B) jsou uvedeny v Tabulce 2.

**Tabulka 2.** Teplotní závislost časových konstant deaktivace NMDA receptorů.

	<b>hodnota při 35°C</b>	<b><math>E_a</math> (kJ/mol)</b>	<b><math>Q_{10}</math> pro 35°C</b>
NR1/NR2B:			
$\tau_{\text{rychlé}}$ (ms)	46,4	106,1 $\pm$ 5,4	3,68
$\tau_{\text{pomalé}}$ (ms)	243,1	79,3 $\pm$ 4,1	2,65
nativní:			
$\tau_{\text{rychlé}}$ (ms)	12,2	57,4 $\pm$ 5,3	2,02



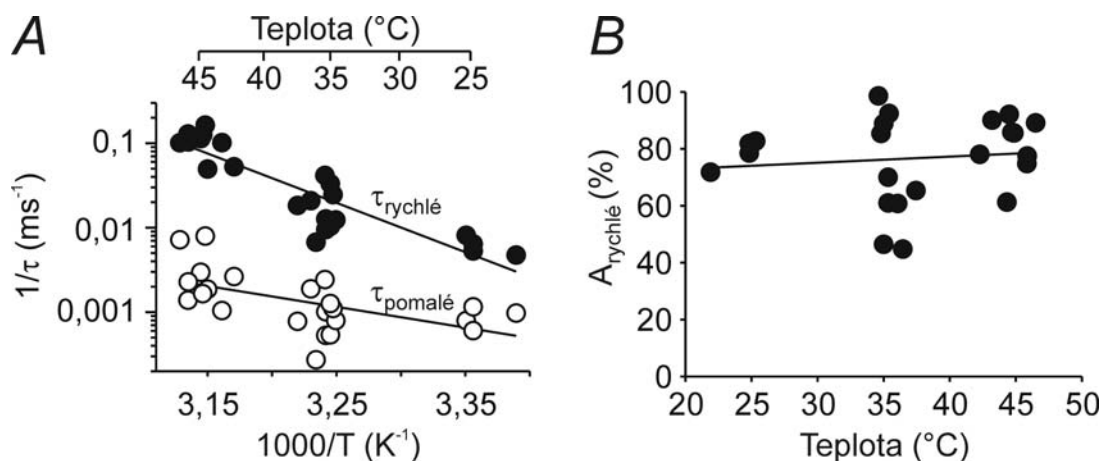
**Obr. 5.7.** Teplotní závislost deaktivace nativních NMDA receptorů aktivovaných krátkou aplikací glutamátu. (A) Příklady proudových odpovědí membránových terčůk vytržených z kultivovaných hipokampálních neuronů na 2 ms aplikaci 100  $\mu$ M glutamátu při různých teplotách. Zobrazené záznamy pocházejí z různých terčůk. (B) Arrheniův graf časové konstanty  $\tau_{\text{rychlé}}$  dvouexponenciální funkce popisující průběh deaktivace ( $n = 5-8$ ).

#### 5.1.4. Teplotní závislost desenzitizace NMDA receptorů

##### 5.1.4.1. Rekombinantní NR1/NR2B receptory

Výsledky kinetického modelování v kapitole 5.1.2.2 zjistily nejvyšší míru teplotní závislosti u rychlostních konstant popisujících přechod NMDA receptoru do desenzitizovaného stavu:  $k_{+d}$  ( $Q_{10} = 10,3$ ) a  $k_{-d}$  ( $Q_{10} = 4,6$ ). Nabízí se tedy otázka, jakým způsobem se toto projeví na časovém průběhu desenzitizace a jeho teplotní závislosti. Pro analýzu byly použity stejné odpovědi HEK293 buněk exprimujících NR1/NR2B receptory na 1 mM glutamát jako pro kinetické modelování v kapitole 5.1.2.2 (viz Obr. 5.4 A). Průběh desenzitizace byl fitován dvouexponenciální funkcí a její časové konstanty pak vyneseny do Arrheniova grafu (Obr. 5.8 A). Průměrné hodnoty  $\tau_{\text{rychlé}}$  a  $\tau_{\text{pomalé}}$  pro přibližně 25, 35 a 45°C byly následující:  $\tau_{\text{rychlé}} = 170 \pm 38$

ms,  $71 \pm 39$  ms a  $11 \pm 5$  ms,  $\tau_{\text{pomalé}} = 1202 \pm 343$  ms,  $1357 \pm 948$  ms a  $471 \pm 269$  ms ( $n = 4-10$ ). Hodnoty  $E_a$  a  $Q_{10}$  jsou uvedeny v Tabulce 3, závislost podílu rychlé složky ( $A_{\text{rychlé}}$ ) na teplotě v Obr. 5.8 B.



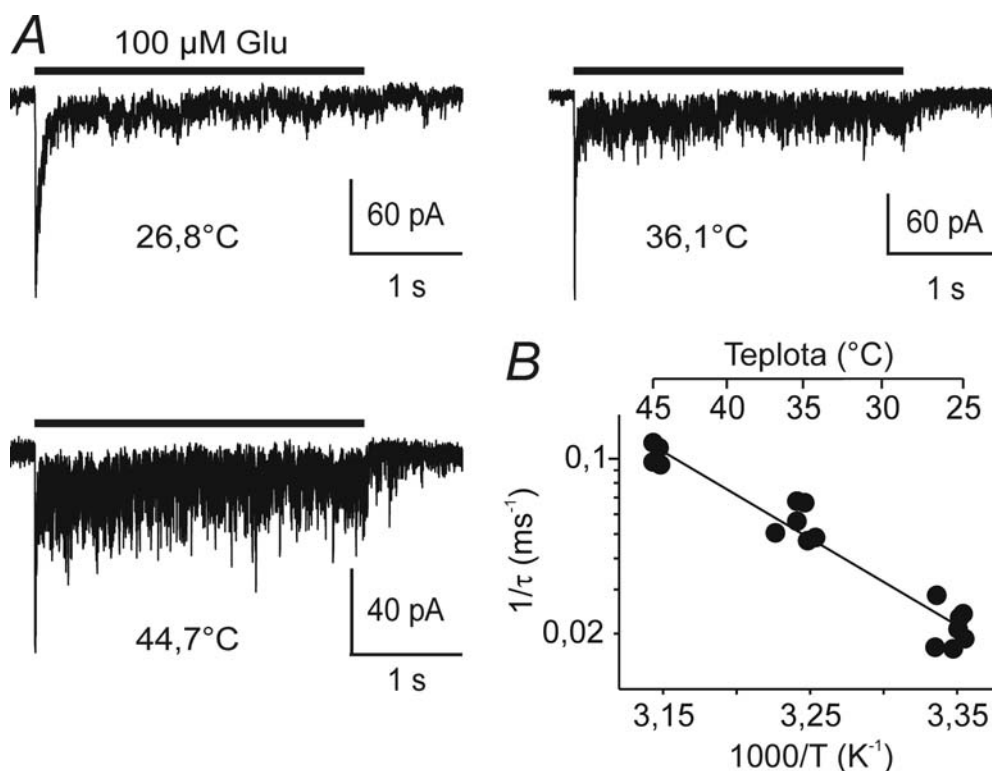
**Obr. 5.8.** Teplotní závislost desenzitizace rekombinantních NR1/NR2B receptorů. (A) Arrheniův graf časových konstant dvouexponenciální funkce popisující průběh desenzitizace ( $n = 4-10$ ). (B) Relativní podíl rychlé složky a jeho závislost na teplotě.

#### 5.1.4.2. Nativní NMDA receptory

Pro srovnání byl analyzován časový průběh desenzitizace nativních NMDA receptorů v membránových terčících vytržených z kultivovaných hipokampálních neuronů. Obdobně jako při studiu deaktivace (kapitola 5.1.3.2) byl na terčiky aplikován 100 mM glutamát v přítomnosti CNQX, tentokrát po dobu 3 s. Příklady proudových odpovědí ukazuje Obr. 5.9 A. Ve srovnání s odpověďmi celé buňky (Obr. 5.4 A) vykazují terčiky výrazně vyšší míru desenzitizace, blížíci se až sto procentům. Průběh desenzitizace (průměr min. ze tří odpovědí) byl fitován dvouexponenciální funkcí, z jejichž časových konstant  $\tau_{\text{rychlé}}$  a  $\tau_{\text{pomalé}}$  byla však pro další analýzy použita pouze první jmenovaná.  $\tau_{\text{pomalé}}$  nebylo možné spolehlivě stanovit, ze stejných důvodů jako v případě deaktivace (nízký podíl pomalé komponenty + nízká amplituda odpovědí - viz kapitola 5.1.3.2). Konstanta  $\tau_{\text{rychlé}}$  nabývala průměrných hodnot  $47,8 \pm 8,3$  ms pro teploty  $24,9-26,7^{\circ}\text{C}$ ,  $18,2 \pm 2,8$  ms pro  $34,2-36,8^{\circ}\text{C}$  a  $9,6 \pm 0,9$  ms pro  $44,5-45,0^{\circ}\text{C}$  ( $n = 4-7$ ). Hodnoty  $E_a$  a  $Q_{10}$  vypočtené z Arrheniova grafu pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  (Obr. 5.9 B) jsou uvedeny v Tabulce 3.

**Tabulka 3.** Teplotní závislost časových konstant desenzitizace NMDA receptorů.

	hodnota při 35°C	$E_a$ (kJ/mol)	$Q_{10}$ pro 35°C
NR1/NR2B:			
$\tau_{\text{rychlé}}$ (ms)	47,7	$111,8 \pm 12,2$	3,94
$\tau_{\text{pomalé}}$ (ms)	841,7	$47,1 \pm 15,2$	1,78
nativní:			
$\tau_{\text{rychlé}}$ (ms)	20,0	$66,4 \pm 4,4$	2,26



**Obr. 5.9.** Teplotní závislost desenzitizace nativních NMDA receptorů. (A) Příklady proudových odpovědí membránových terčůk vytržených z kultivovaných hipokampálních neuronů na 3 s aplikaci 100 μM glutamátu při různých teplotách. Zobrazené záznamy pocházejí z různých terčůk. (B) Arrheniův graf časové konstanty  $\tau_{\text{rychlé}}$  dvouexponenciální funkce popisující průběh desenzitizace ( $n = 4-7$ )

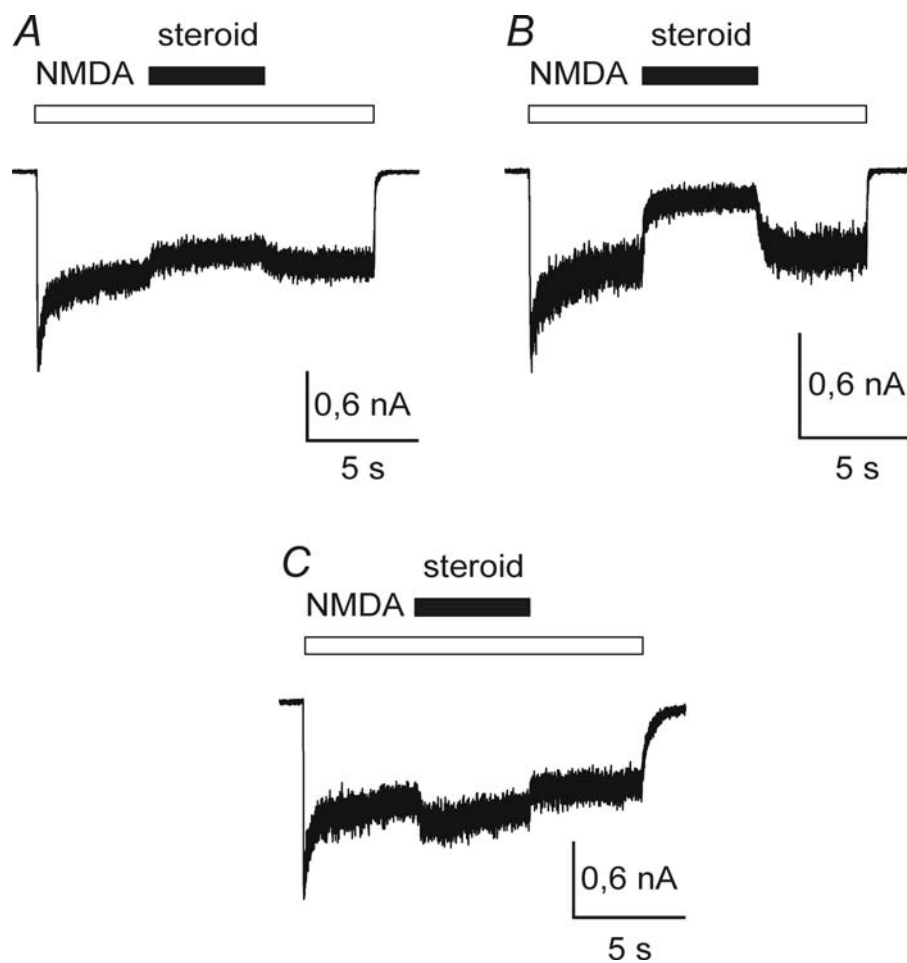
## 5.2. Modulace NMDA receptorů deriváty neurosteroidů

Modulace aktivity NMDA receptorů steroidními látkami, z nichž některé jsou syntetizovány přímo v nervové tkáni, představuje podle dosud známých údajů (viz kapitola 2.3.2) komplexní mechanismus, jehož zákonitosti nejsou ještě zcela známy. Struktura steroidu je však nesporně klíčovým faktorem pro jeho účinek na NMDA receptor, o čemž svědčí už samotný fakt, že dva nejtypičtější zástupci potenciačních,

resp. inhibičních neurosteroidů, PS a  $3\alpha5\beta S$  (Wu et al., 1991; Park-Chung et al., 1994), se liší pouze jednou dvojnou vazbou a konfigurací na uhlíku C3. Další část této disertační práce se zabývá vztahem struktury steroidu a jeho efektu na funkci NMDA receptorů. Za tímto účelem byly na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. syntetizovány deriváty  $3\alpha5\beta S$ , jejichž účinek na odpovědi NMDA receptorů byl následně testován.

Testování probíhalo tak, že na neuron či HEK293 buňku exprimující NR1/NR2B receptory byl nejprve aplikován samotný agonista (100  $\mu M$  NMDA v případě neuronů, 1 mM glutamát pro HEK buňky), poté agonista (stejná koncentrace) společně se steroidem a nakonec opět samotný agonista. Každá z těchto fází trvala typicky pět vteřin, přičemž v případě pomalé vazby či odvazování steroidu byl příslušný krok podle potřeby prodloužen, aby vždy bylo dosaženo „ustáleného“ stavu (viz Obr. 4.2). Proudové odpovědi nativních či rekombinantních NMDA receptorů (příklady viz Obr. 5.10) byly snímány elektrofyzilogickou metodou terčíkového zámku (snímání z celé buňky) a následně vyhodnocovány pomocí programu Clampfit. Určení míry inhibice způsobené aplikací steroidu je popsáno v kapitole 4.8; zjištěné hodnoty pak byly použity pro orientační výpočet  $IC_{50}$  podle rovnice (VIII), kam byla dosazena koncentrace steroidu použitá v pokusu a Hillův koeficient: 1,2 pro neurony a 1,5 pro rekombinantní NR1/NR2B receptory - hodnoty již dříve v naší laboratoři stanovené pro  $3\alpha5\beta S$  na buňkách příslušného typu (Petrovic et al., 2005).

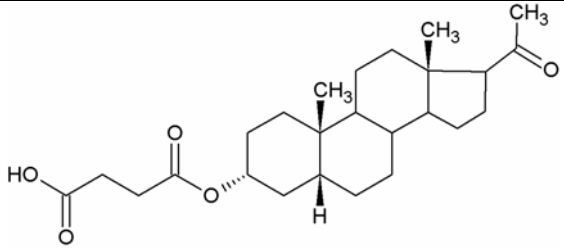
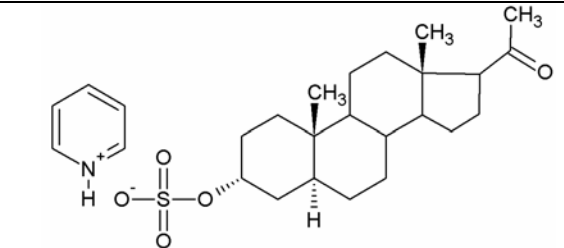
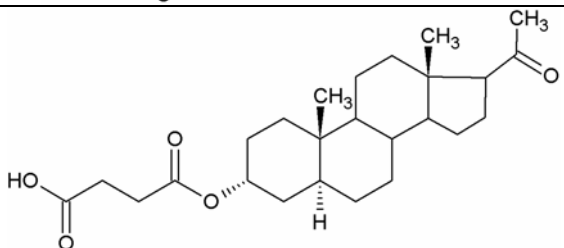
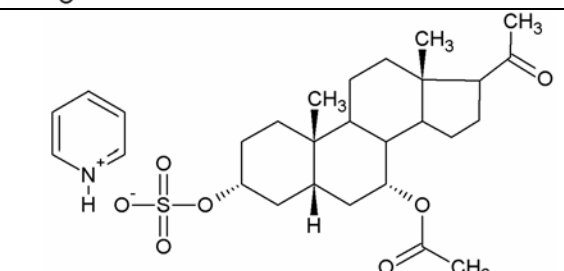
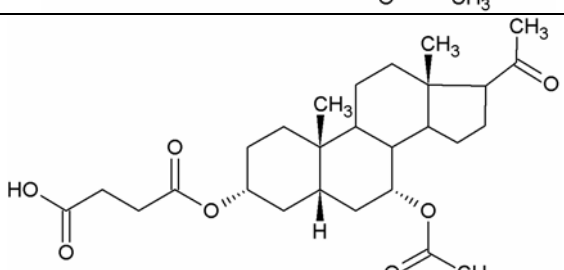
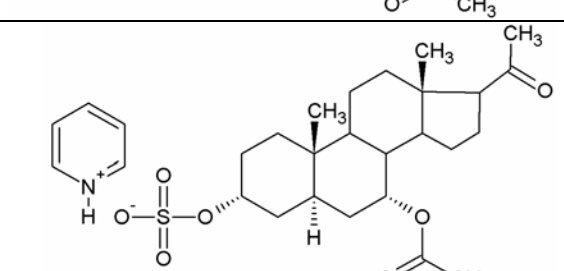
Tabulka 4 ukazuje přehled derivátů  $3\alpha5\beta S$ , různě substituovaných na C3, příp. i na C7, které byly testovány na kultivovaných hipokampálních neuronech. Koncentrace steroidu byla 100  $\mu M$ .



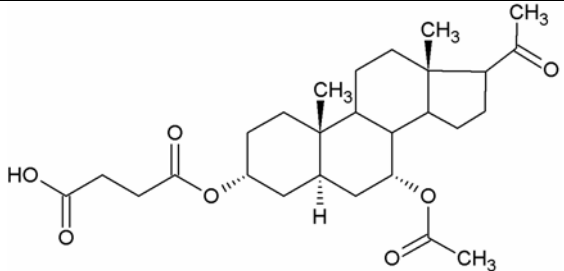
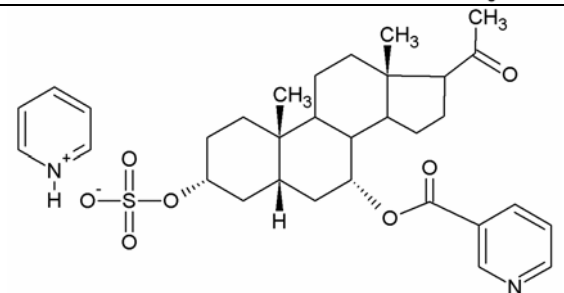
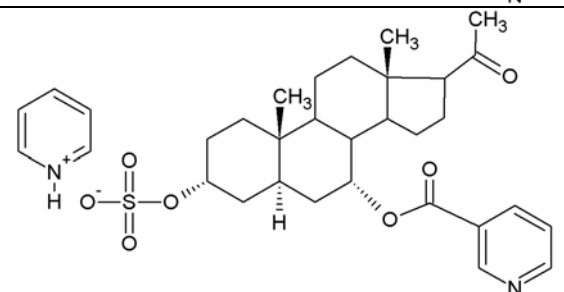
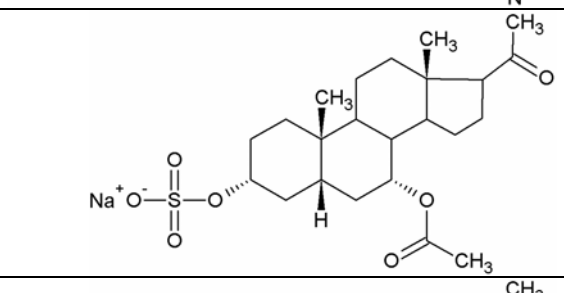
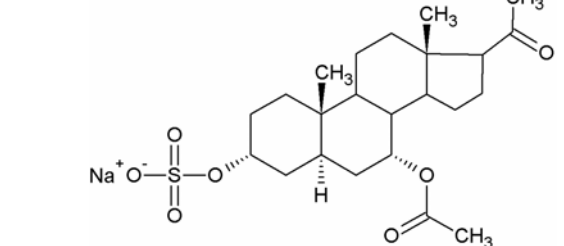
**Obr. 5.10.** Příklady testování účinku steroidních látek na funkci NMDA receptorů. Proudové odpovědi kultivovaných hipokampálních neuronů na aplikaci 100  $\mu\text{M}$  NMDA a 100  $\mu\text{M}$  steroidu. Zobrazené záznamy pocházejí z testování steroidu č. **8** (**A**), **1** (**B**) a **21** (**C**).

**Tabulka 4.** Struktura a inhibiční účinek steroidů testovaných na kultivovaných hipokampálních neuronech.

		inhibice (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	n
<b>1</b>		71,3 $\pm$ 5,0	47,2 $\pm$ 9,9	5

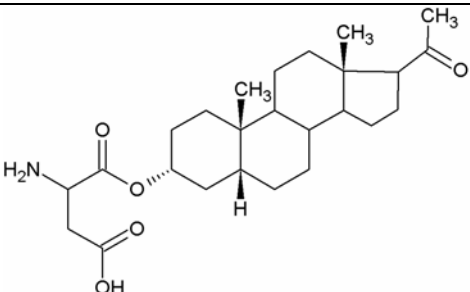
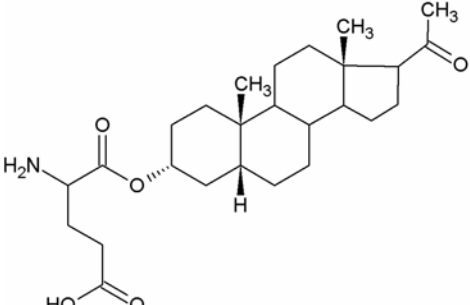
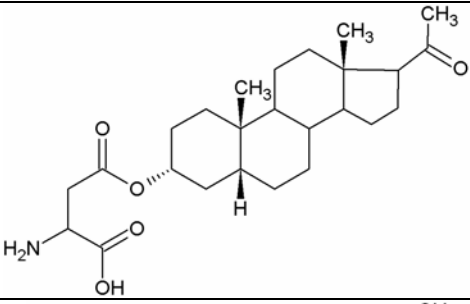
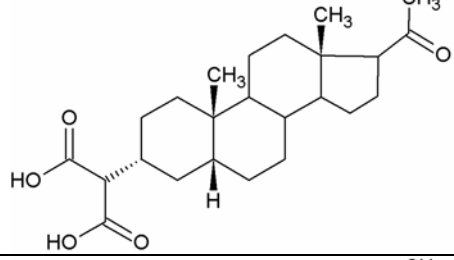
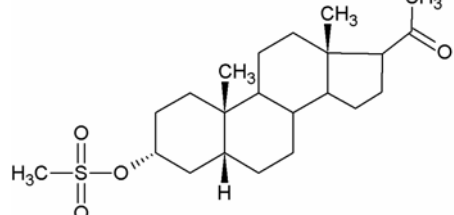
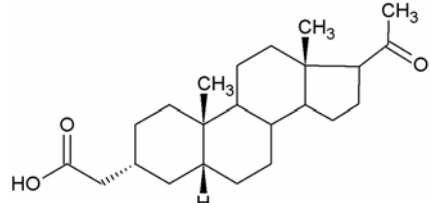
<u>2</u>		$69,2 \pm 7,0$	$51,9 \pm 14,2$	6
<u>3</u>		$56,8 \pm 2,3$	$79,8 \pm 6,1$	6
<u>4</u>		$35,1 \pm 2,6$	$167,6 \pm 15,5$	5
<u>5</u>		$34,1 \pm 10,2$	$185,8 \pm 61,1$	5
<u>6</u>		$21,4 \pm 2,7$	$299,9 \pm 40,9$	6
<u>7</u>		$35,2 \pm 2,7$	$167,2 \pm 16,3$	5

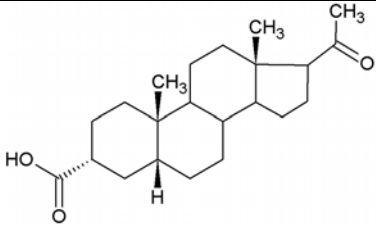
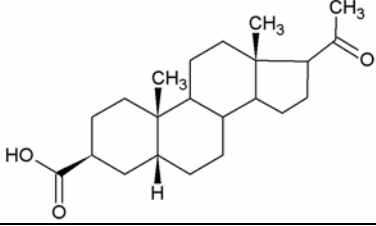
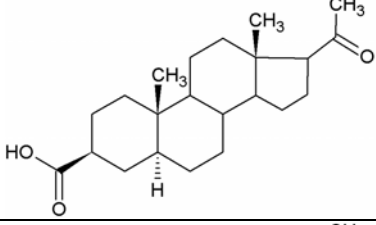
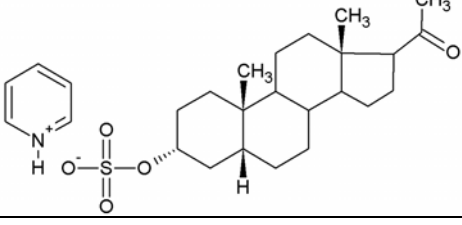


<b><u>8</u></b>		$17,4 \pm 4,3$	$383,5 \pm 93,5$	5
<b><u>9</u></b>		$46,9 \pm 9,7$	$116,0 \pm 36,5$	5
<b><u>10</u></b>		$37,8 \pm 4,7$	$153,8 \pm 25,0$	6
<b><u>11</u></b>		$25,5 \pm 9,7$	$376,3 \pm 109,7$	7
<b><u>12</u></b>		$29,8 \pm 3,6$	$206,4 \pm 31,1$	4

Další série steroidů odvozených od  $3\alpha,5\beta$ BS byla testována na rekombinantních NR1/NR2B receptorech exprimovaných v HEK293 buňkách. Koncentrace steroidu v těchto pokusech byla  $200 \mu\text{M}$  (není-li uvedeno jinak). Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 5.

**Tabulka 5.** Struktura a inhibiční účinek steroidů testovaných na HEK293 buňkách exprimujících NR1/NR2B receptory.

		inhibice (%)	IC <sub>50</sub> (μM)	n
<b><u>13</u></b>		83,6 ± 2,7	67,6 ± 8,9	5
<b><u>14</u></b>		77,1 ± 5,2	89,4 ± 17,6	5
<b><u>15</u></b>		36,3 ± 3,2	292,3 ± 25,5	5
<b><u>16</u></b>		43,4 ± 3,4	239,3 ± 21,3	4
<b><u>17</u></b>		precipitoval	-	-
<b><u>18</u></b>		63,6 ± 21,1	154,3 ± 106,3	5

<b><u>19</u></b>		$64,7 \pm 5,9$	$134,5 \pm 23,5$	5
<b><u>20</u></b>		$40,1 \pm 7,0^*$	$133,2 \pm 26,8$	5
<b><u>21</u></b>		$-31,1 \pm 5,7^{*+}$	-	4
<b><u>1</u></b>		$67,2 \pm 8,2^*$	$57,6 \pm 13,0$	6

\* koncentrace steroidu 100  $\mu\text{M}$

+ potenciace

Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  jednotlivých steroidů byly navzájem porovnány pomocí ANOVA testu pro nalezení statisticky významných ( $P < 0,05$ ) rozdílů. Výsledky shrnuje Tabulka 6 (v kapitole 6.7).

Výsledky prezentované v této disertační práci jsou obsaženy v následujících publikacích:

Cais O, Sedlacek M, Horak M, Dittert I, Vyklicky L, Jr. Temperature dependence of NR1/NR2B NMDA receptor channels. *Neuroscience* 2008; 151:428-438.

Stastna E, Chodounska H, Pouzar V, Kapras V, Borovska J, Cais O, Vyklicky L, Jr. Synthesis of C3, C5, and C7 pregnane derivatives and their effect on NMDA receptor responses in cultured rat hippocampal neurons. *Steroids* 2009; 74:256-263.

Petrovic M, Sedlacek M, Cais O, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. Pregnenolone sulfate modulation of N-methyl-D-aspartate receptors is phosphorylation dependent. *Neuroscience* 2009; 160:616-628.

Korinek M, Sedlacek M, Cais O, Dittert I, Vyklicky L, Jr. Temperature dependency of NMDA receptor channels and NMDA receptor EPSCs. (připravováno pro publikaci)

## 6. DISKUSE

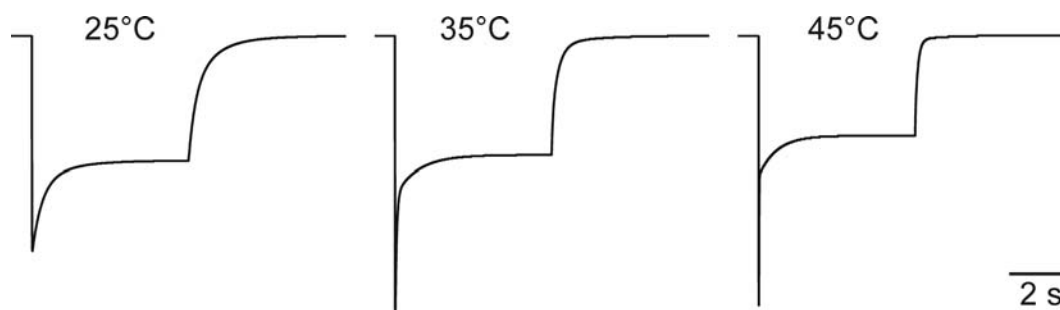
V této disertační práci jsme studovali závislost funkce NMDA receptorů na teplotě. Elektrofyzilogickou metodou terčického zámku byly měřeny proudové odpovědi rekombinantních NR1/NR2B receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách a nativních NMDA receptorů z kultivovaných potkaních hipokampálních neuronů na aplikaci glutamátu při různých teplotách v rozmezí 25-45°C. Tyto odpovědi byly poté podrobeny kinetické analýze. Další část disertační práce se zabývala modulací funkce NMDA receptorů steroidními látkami odvozenými od neurosteroidu pregnanolonsulfátu (3 $\alpha$ 5 $\beta$ S).

### 6.1. Teplotní závislost amplitudy odpovědi NMDA receptorů

Naše výsledky ukazují, že amplituda odpovědi jednotlivých iontových kanálů NR1/NR2B receptorů v rozmezí teplot 25-45°C monotónně stoupá (viz Obr. 5.3). Zjištěná hodnota koeficientu  $Q_{10}$  1,4 se dobře shoduje s hodnotou naměřenou pro NMDA receptory v terčících z kultivovaných myších neuronů v teplotním rozmezí 14-24°C ( $Q_{10} = 1,6$ ) (Ascher et al., 1988). Obdobná shoda s citovanou studií panuje ohledně teplotní závislosti průměrné doby otevření: Ascher et al. (1988) uvádějí  $Q_{10}$  „blízké dvěma“, výsledky v této disertační práci hodnotu 2,0.

Naproti tomu amplituda makroskopických odpovědí celých buněk exprimujících NR1/NR2B receptory vykazuje složitější průběh teplotní závislosti: zvýšení teploty z 25°C na 35°C provází nárůst amplitudy odpovědi, další zvýšení na 45°C pak její pokles (viz Obr. 5.1). Jako vysvětlení tohoto jevu se nabízí možnost snížení amplitudy odpovědi v důsledku desenzitizace receptoru, u které byla zjištěna vysoká míra teplotní závislosti (viz Tabulka 1). Tato hypotéza byla testována simulováním odpovědi na 5 s aplikaci 1 mM glutamátu v programu Gepasi podle modelu užitého ke kinetickému modelování v kapitole 5.1.2.2, do něhož byly dosazeny rychlostní konstanty vypočítané pro danou teplotu z příslušných Arrheniových grafů (viz Obr. 5.4 B). Výsledky simulací (Obr. 6.1) ukazují, že zrychlení desenzitizace při vyšší teplotě skutečně může vyvolat pokles amplitudy obdobný tomu pozorovanému u proudových odpovědí v experimentech (viz Obr. 5.1): ze srovnání s hypotetickými odpověďmi nedesenzitizujících buněk vyplývá, že

zatímco při 25°C snižuje desenzitizace amplitudu odpovědi pouze o 2 % a při 35°C o 8 %, při 45°C je to o 32 %.



**Obr. 6.1.** Simulované odpovědi HEK293 buněk exprimujících NR1/NR2B receptory na 5 s aplikaci 1 mM glutamátu. Výsledky simulací byly upraveny s ohledem na jednotkovou vodivost při různých teplotách a mohou tak být srovnány se záznamy ze skutečných buněk (Obr. 5.1 A).

## 6.2. Teplotní závislost kinetických charakteristik NR1/NR2B receptoru

Z výsledků kinetické analýzy proudových odpovědí NR1/NR2B receptorů vyplývá, že jednotlivé kroky v mechanismu aktivace NMDA receptorů vykazují značně odlišnou míru teplotní závislosti. Nejvíce teplotně citlivými se ukázaly být rychlostní konstanty desenzitizace ( $k_{+d}$ ;  $Q_{10} = 10,3$ ), resenzitizace ( $k_{-d}$ ;  $Q_{10} = 4,6$ ) a odvazování glutamátu ( $k_u$ ;  $Q_{10} = 3,6$ ). Naopak jako zcela nezávislá na teplotě se projevila rychlostní konstanta vazby glutamátu ( $k_b$ ;  $Q_{10} = 1,0$ ) (viz Obr. 5.4 a Tabulka 1). Těmito rozdíly v teplotních koeficientech se NMDA receptory liší od AMPA receptorů z Heldova kalichu potkanů, u nichž prosté vynásobení všech rychlostních konstant mechanismu aktivace zjištěných pro 25°C jednotným koeficientem ( $Q_{10} = 2,4$ ) stačilo k tomu, aby model správně předpovídal průběh odpovědi při 35°C (Postlethwaite et al., 2007).

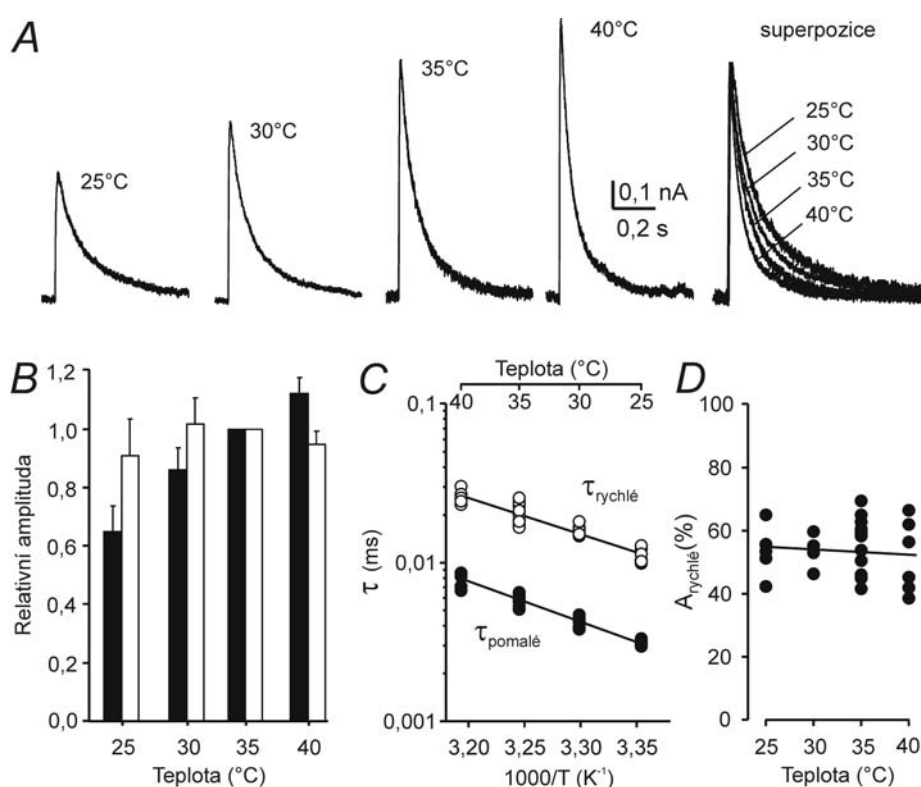
Vedle právě zmíněné studie je naše práce zatím pravděpodobně jedinou zabývající se teplotní závislostí rychlostních konstant mechanismu aktivace chemicky aktivovaného iontového kanálu. Ostatní dosud uveřejněné studie uvádějí pouze  $Q_{10}$  časových konstant průběhu makroskopických proudových odpovědí ( $\tau$ ). To je ovšem komplexní proces, který není snadné přímo interpretovat z hlediska

jednotlivých rychlostních konstant ( $k$ ), jak ukazují i výsledky této disertační práce: pro rychlostní konstanty popisující desenzitizaci a  $\text{Ca}^{2+}$ -závislou inaktivaci NMDA receptorů byly určeny následující hodnoty  $Q_{10}$ :  $k_{+d}$  10,3;  $k_{-d}$  4,6;  $k_{+i}$  2,2 a  $k_{-i}$  1,2. Analýzou totožných záznamů proudových odpovědí HEK293 buněk exprimujících NR1/NR2B receptory byly pro časové konstanty poklesu proudu během aplikace agonisty nicméně nalezeny tyto hodnoty  $Q_{10}$ :  $\tau_{\text{rychlé}}$  3,9;  $\tau_{\text{pomalé}}$  1,8. Vysoká míra teplotní citlivosti  $k_{+d}$  a  $k_{-d}$  se tedy v  $Q_{10}$  pro  $\tau$  desenzitizace přímo neodrazila.

### 6.3. Vliv desenzitizace na deaktivaci - další experimentální modely

Otázka, zda NMDA receptory během synaptického přenosu desenzitizují, nebyla dosud uspokojivě zodpovězena. Podle jedné teorie je právě desenzitizace příčinou dvouexponenciálního průběhu excitačních postsynaptických proudů (EPSC) zprostředkovaných NMDA receptory, když v jejich první části vstup receptorů do desenzitizovaného stavu pokles procházejícího proudu urychluje a v pozdější fázi naopak resenzitizující receptory, které ještě před odvázním agonisty otevřou svůj iontový kanál, proudový pokles zpomalí (Lester a Jahr, 1992). Pokud by tomu skutečně tak bylo, dalo by se předpokládat, že se vysoká míra teplotní citlivosti desenzitizace NMDA receptorů, zjištěná v této disertační práci, projeví i na teplotní závislosti EPSC. Proto byla v naší laboratoři provedena série pokusů, zkoumajících vliv teploty na amplitudu a průběh EPSC v neuronech z akutních kortikálních řízků potkana. Tyto pokusy prováděl kolega Mgr. Miloslav Sedláček, Ph.D. a jejich výsledky shrnuje Obr. 6.2. V teplotním rozmezí 25-40°C nebyly mezi amplitudami EPSC (po normalizaci na jednotkovou vodivost) statisticky významné rozdíly (viz Obr. 6.2 B) – na rozdíl od rekombinantních NR1/NR2B receptorů, amplituda jejichž odpovědí byla desenzitizací výrazně ovlivněna (viz kapitola 6.1). Časový průběh EPSC byl fitován dvouexponenciální funkcí, jejíž časové konstanty byly následně vyneseny do Arrheniových grafů (Obr. 6.2 C). Hodnoty  $Q_{10}$  byly 1,71 pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  a 1,82 pro  $\tau_{\text{pomalé}}$ , tedy překvapivě nízké oproti hodnotám  $Q_{10}$  pro  $\tau$  deaktivace rekombinantních NR1/NR2B receptorů (3,7 resp. 2,7; viz Tabulka 2) i ve srovnání s publikovanými daty pro NMDA složku EPSC v hipokampálních řezech, kde bylo pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  zjištěno  $Q_{10}$  3,5 (Hestrin et al., 1990). Naopak velmi dobře se naše výsledky shodují se studií zkoumající teplotní závislost EPSC zprostředkovaných AMPA/kainátovými receptory, kde byla pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  naměřena rovněž hodnota 1,7

(Silver et al., 1996a). Za zmínku stojí, že se uvedená studie zabývala také teplotní závislostí kinetiky deaktivace a desenzitizace AMPA/kainátových receptorů ve vytržených terčících a i v těchto případech autoři dospěli k hodnotám  $Q_{10}$  přesně odpovídajícím výsledkům v této disertační práci: 2,0 pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  deaktivace a 2,3 pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  desenzitizace (Silver et al., 1996a).



**Obr. 6.2.** Teplotní závislost excitačních postsynaptických proudů (EPSC) zprostředkovaných NMDA receptory. (A) Příklady EPSC snímaných v akutním řízku mozkové kůry (vrstva II/III) potkana při teplotách 25, 30, 35 a 40°C a jejich superpozice se sjednocenou amplitudou pro demonstraci rozdílů v kinetice. Záznamy pocházejí ze stejného neuronu. (B) Graf teplotní závislosti amplitudy EPSC vyjádřené relativně vzhledem k amplitudě při 35°C (černé sloupce) a normalizované s ohledem na jednotkovou vodivost rostoucí s teplotou (viz Obr. 5.3) (bílé sloupce). (C) Arrheniův graf časových konstant dvouexponenciální funkce popisující průběh EPSC (n = 7-13). (D) Relativní podíl rychlé složky a jeho závislost na teplotě.

Teplotní závislost EPSC zprostředkovaných NMDA receptory a rekombinantních NR1/NR2B receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách se tedy výrazně lišila. Tyto dva experimentální modely ovšem představují značně odlišné

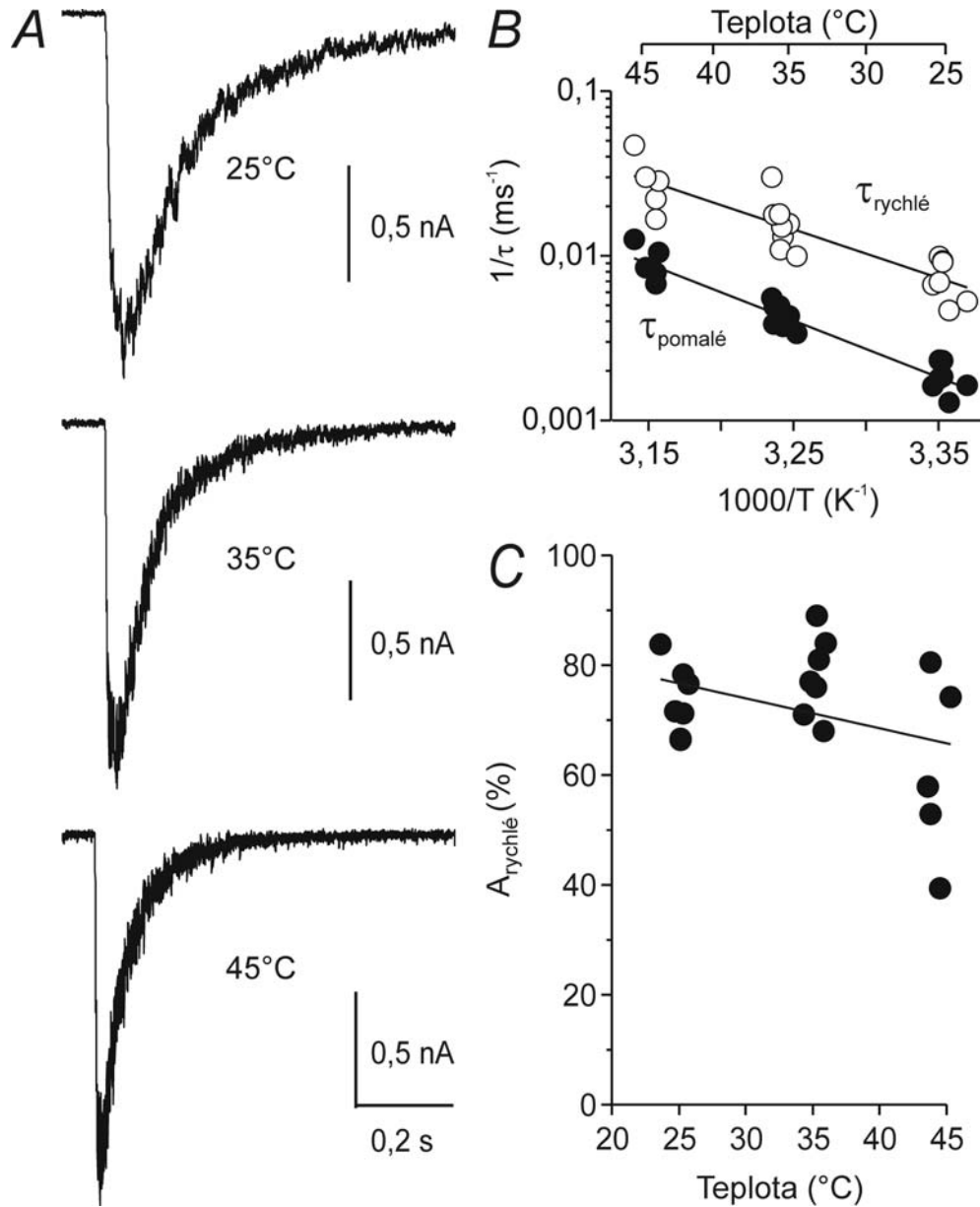


systemy: heterologní exprese v HEK buňkách zasazuje NMDA receptory do zcela jiného buněčného prostředí než jsou neurony, což se může na jejich funkci projevit, u EPSC je kromě tohoto dále třeba vzít v potaz mj. i různé presynaptické faktory. Jako mezičlánek mezi těmito dvěma modely byly proto provedeny pokusy mapující teplotní závislost nativních NMDA receptorů z kultivovaných hipokampálních neuronů. Kromě sledování deaktivace a desenzitizace v terčících vytržených z buněčné membrány těchto neuronů (viz kapitoly 5.1.3.2 a 5.1.4.2) byla zkoumána i teplotní závislost deaktivace odpovědi celých buněk. Krátká aplikace agonisty byla v tomto případě realizována fotolýzou MNI-glutamátu, tj. glutamátu, který byl „maskován“ v komplexu s molekulou MNI a jako takový na NMDA receptorech neaktivní. Po ozáření proudem aplikačního roztoku laserem o vlnové délce 405 nm (1 ms puls) došlo k rozštěpení tohoto komplexu a uvolnění glutamátu, jehož maximální koncentraci odhadujeme v rozmezí 100-200  $\mu\text{M}$ . Tyto pokusy prováděl kolega Mgr. Miloslav Kořínek, Ph.D. a jejich výsledky shrnuje Obr. 6.3. Hodnoty  $Q_{10}$  spočítané z Arrheniových grafů (Obr. 6.3 B) jsou 2,08 pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  a 2,17 pro  $\tau_{\text{pomalé}}$ .

#### **6.4. Teplotní závislost deaktivace NMDA receptorů - srovnání experimentálních modelů**

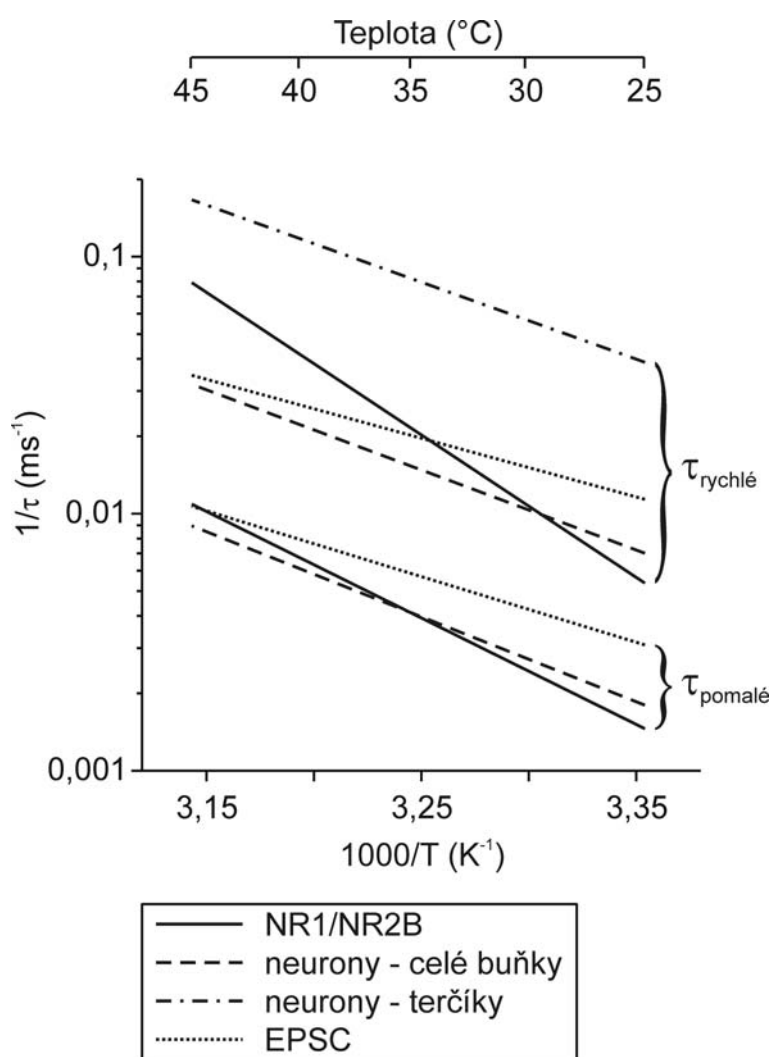
Kinetika deaktivace NMDA receptorů a její teplotní závislost byly v naší laboratoři studovány na několika experimentálních modelech: rekombinantní NR1/NR2B receptory exprimované v HEK293 buňkách, nativní NMDA receptory z kultivovaných hipokampálních neuronů (odpovědi celých buněk nebo vytržených membránových terčů) a excitační postsynaptické proudy (EPSC) zprostředkované NMDA receptory v akutních kortikálních řízcích. Průběh deaktivace byl fitován vždy dvouexponenciální funkcí, jejíž časové konstanty  $\tau_{\text{rychlé}}$  a  $\tau_{\text{pomalé}}$  byly pak vyneseny do Arrheniových grafů, které shrnuje Obr. 6.4. Z tohoto srovnání vyplývá, že největší teplotní závislost rychlosti deaktivace vykazují rekombinantní NR1/NR2B receptory, jejichž  $\tau_{\text{rychlé}}$  i  $\tau_{\text{pomalé}}$  deaktivace mají vyšší hodnotu  $Q_{10}$  (3,7 resp. 2,7) než všechny ostatní modely, založené na nativních receptorech. Příčinou může být různé podjednotkové složení těchto receptorů. Výrazně odlišná míra teplotní citlivosti v závislosti na typu podjednotek byla zaznamenána např. u inaktivace napětěově

závislých  $\text{Ca}^{2+}$ -kanálů typu L, kde  $Q_{10}$  pro inaktivaci  $\text{Ca}_V1.4$  kanálu nabývá hodnoty 18,8, zatímco u  $\text{Ca}_V1.2$  pouze 3,3 ( $\tau_{\text{rychlé}}$ ), resp. 3,2 ( $\tau_{\text{pomalé}}$ ) (Peloquin et al., 2008).



**Obr. 6.4.** Teplotní závislost deaktivace nativních NMDA receptorů aktivovaných krátkou aplikací glutamátu. (A) Příklady proudových odpovědí kultivovaných hipokampálních neuronů na krátkou aplikaci glutamátu realizovanou fotolýzou „maskovaného“ glutamátu při různých teplotách. Zobrazené záznamy pocházejí z různých buněk. (B) Arrheniův graf časových konstant dvouexponenciální funkce popisující průběh deaktivace ( $n = 5-9$ ). (C) Relativní podíl rychlé složky a jeho závislost na teplotě.

$Q_{10}$  pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  deaktivace proudových odpovědí terčičků z neuronů (2,0) se dobře shoduje s hodnotou tohoto koeficientu zjištěnou pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  deaktivace odpovědí celých buněk (2,1), vlastní hodnoty těchto časových konstant jsou však u terčičků výrazně nižší: při teplotě 35°C 12 ms pro terčičky oproti 65 ms pro celé buňky (viz Obr. 6.4). Příčiny tohoto rozdílu nejsou zcela jasné, svou roli zde však může hrát desenzitizace receptorů. Její míra totiž okamžitě po vytržení terčičku začne narůstat, až dosáhne během několika desítek sekund téměř 100 % (viz též Obr. 5.9), přičemž snímání proudových odpovědí v pokusech popisovaných v této disertační práci probíhalo v čase >1 min po izolaci terčičku. Zrychlení deaktivace proudových odpovědí NMDA receptorů, jakož i nárůst a zrychlení desenzitizace po vytržení terčičku z kultivovaných neuronů již byly popsány (Sather et al., 1992; Lester et al., 1993).



**Obř. 6.4.** Srovnání Arrheniových grafů pro  $\tau_{\text{rychlé}}$  a  $\tau_{\text{pomalé}}$  získané fitováním deaktivace rekombinantních NR1/NR2B receptorů, nativních NMDA receptorů z kultivovaných hipokampálních neuronů (odpovědi celých buněk nebo vytržených membránových terčiků) a EPSC. Statistická analýza ukázala, že mezi všemi dvojicemi Arrheniových grafů zde zobrazených jsou statisticky významné rozdíly (analýza kovariance,  $P < 0,05$ ).

## 6.5. Faktory určující průběh EPSC

Výsledky měření z různých oblastí CNS se shodují na tom, že excitační postsynaptické proudy (EPSC) zprostředkované NMDA receptory mají dvouexponenciální časový průběh (Hestrin et al., 1990; Carmignoto a Vicini, 1992; Lester a Jahr, 1992; Spruston et al., 1995). Z toho vyplývá, že tento průběh nemůže být určován jedinou rychlostní konstantou disociace agonisty, neboť v tom případě by byl pouze jednoexponenciální.

Jako jedno z možných vysvětlení existence rychlé a pomalé složky EPSC zprostředkovaných NMDA receptory bylo zvažováno různé podjednotkové složení synaptických NMDA receptorů. Tato hypotéza je založena na skutečnosti, že kinetika deaktivace různých kombinací podjednotek NMDA receptorů se významně liší (Monyer et al., 1994; Vicini et al., 1998):  $\tau_{\text{vážené}}$  deaktivace (spočítané jako vážený průměr  $\tau_{\text{rychlé}}$  a  $\tau_{\text{pomalé}}$  při zohlednění relativního podílu amplitud pomalé a rychlé složky deaktivace) má pro NR1/NR2A receptory exprimované v HEK293 buňkách hodnotu 54 ms, zatímco pro kombinaci NR1/NR2B 287 ms (Vicini et al., 1998). Navíc byla pozorována pozitivní korelace mezi podílem NR2A podjednotky a zrychlující se deaktivací EPSC (Flint et al., 1997), zatímco přítomnost podjednotky NR2C, vyznačující se pomalejší deaktivační kinetikou, rychlost EPSC naopak snižovala (Ebralidze et al., 1996; Takahashi et al., 1996). Přesto však nelze rychlou a pomalou složku EPSC přisuzovat NMDA receptorům o různém podjednotkovém složení, jak ukázaly i naše pokusy využívající NR2B-specifických inhibitorů ifenprodilu a Ro 25–6981. Jejich přítomnost snížila amplitudu EPSC přibližně o polovinu ( $47 \pm 4\%$  při teplotě 25°C a  $65 \pm 11\%$  při 35°C; 10  $\mu\text{M}$  ifenprodil), hodnoty  $\tau_{\text{rychlé}}$  ani  $\tau_{\text{pomalé}}$  však ovlivněny nebyly a poměr rychlé a pomalé složky se změnil jen nepatrně. Stejný účinek, tj. stejnou míru inhibice pomalé i rychlé složky EPSC bez vlivu na jejich délku, měl ifenprodil i v hipokampálních řezech v pokusech prováděných při pokojové teplotě (Kirson a Yaari, 1996).

Nejčastěji je dvouexponenciální průběh deaktivace NMDA receptorů a EPSC zprostředkovaných těmito receptory zdůvodňován desenzitizací (viz kapitola 6.3). Ta byla u těchto receptorů dobře popsána v pokusech s dlouhou aplikací agonisty (Mayer et al., 1989a; Sather et al., 1990; Legendre et al., 1993; Vyklicky, 1993), o jejím významu během krátké synaptické aktivace se však zatím spíše diskutuje (Tong et al., 1995; Jones a Westbrook, 1996). Výsledky této disertační práce popisují desenzitizaci NR1/NR2B receptorů jako vysoce teplotně závislý proces ( $Q_{10}$  rychlostní konstanty desenzitizace  $\sim 10$ ), na zjištěné teplotní závislosti deaktivační kinetiky EPSC ( $Q_{10} < 2$ ) se však vliv žádného podobně teplotně citlivého mechanismu neprojevuje. Další způsob, jakým by desenzitizace mohla ovlivnit EPSC, je snížení jejich amplitudy při vyšších teplotách (viz kapitola 6.1). Bohužel však z technických důvodů nebylo možné snímat EPSC při 45°C, kde by toto snížení bylo nejmarkantnější - mezi 35°C a 40°C dojde podle našeho modelu vlivem desenzitizace ke snížení amplitudy pouze o 10 %, což na základě našich výsledků (Obr. 6.2 B) nelze potvrdit ani vyloučit. Argumentem pro desenzitizaci jakožto činitele zodpovědného za pomalou složku deaktivace NMDA receptorů jsou nicméně výsledky našeho kinetického modelování: pro tyto účely byly vždy ze stejné HEK293 buňky exprimující NR1/NR2B receptory snímány odpovědi na dlouhou (3 s) i krátkou ( $\sim 1$  ms) aplikaci glutamátu, pro zjednodušení kinetického mechanismu a minimalizaci míry desenzitizace v nepřítomnosti  $Ca^{2+}$ . Z odpovědi na dlouhou aplikaci agonisty byly stanoveny rychlostní konstanty (postup viz kapitola 5.1.2.2) a ty následně použity pro simulaci odpovědí na krátkou aplikaci. Shoda těchto modelových odpovědí se skutečnými byla u většiny buněk dobrá a i u buněk vykazujících nízkou míru desenzitizace ( $< 20$  %) model předpovídal odpověď na krátkou aktivaci správně a s patřičným zastoupením pomalé složky. U několika měřených buněk se nicméně skutečné odpovědi od těch předpovídaných modelem lišily, což svědčí o tom, že námi užívaný model nemá univerzální platnost a je třeba zvážit i jiné mechanismy.

Kromě výše uvedených, tj. od vazování agonisty a desenzitizace receptorů, přichází v úvahu ještě jeden faktor potenciálně ovlivňující deaktivaci NMDA receptorů, a sice tzv. „modální aktivace“ (Popescu a Auerbach, 2003). Tento jev byl popsán na základě různých vzorců chování NMDA receptorů pozorovaných při snímání aktivity jednotlivých iontových kanálů a jeho podstatou je složitější schéma

aktivace NMDA receptorů se dvěma různými otevřenými a třemi zavřenými stavy receptoru s plně obsazenými vazebnými místy pro agonistu. Tyto stavy jsou pak v jednotlivých „módech“ aktivity NMDA receptorů různě propojeny. Podle této teorie má desenzitizace, ale i disociace agonisty na průběh deaktivace jen malý vliv a pokles proudové odpovědi je určován rychlostí přechodů mezi jednotlivými otevřenými a zavřenými stavy definovanými tímto mechanismem.

#### **6.6. Aktivace nízkou koncentrací glutamátu - možnost alternativního otevření iontového kanálu?**

Účelem pokusů využívajících aktivaci nízkou ( $1 \mu\text{M}$ ) koncentrací glutamátu bylo získat odpovědi s pomalejším nástupem pro citlivější analýzu vazby glutamátu. Překvapivě však byl modelem lépe popsán nástup odpovědi na suprasaturující koncentraci glutamátu ( $1 \text{ mM}$  - o tři řády vyšší než  $\text{EC}_{50}$  (Patneau a Mayer, 1990)). U nízké koncentrace docházelo k tomu, že odpovědi měly ostřejší nástup, než předpovídal i ten nejlepší fit podle použitého modelu (viz přerušovaná čára v Obr. 5.5 B). K řešení tohoto problému byl navržen alternativní model aktivace NMDA receptoru, podle něž by se iontový kanál mohl otevírat už po navázání jedné molekuly glutamátu (viz Obr. 5.5 E). Takováto aktivace sice ještě u NMDA receptorů popsána nebyla - maximálně bylo o této možnosti uvažováno v diskusi (Dzubay a Jahr, 1996) - ale u jiných ionotropních receptorů ano: při nízké koncentraci agonisty docházelo k otevření iontového kanálu nikotinických acetylcholinových (Colquhoun a Sakmann, 1985) a  $\text{GABA}_A$  (Twyman et al., 1990) receptorů i v případě, že bylo obsazeno pouze jedno vazebné místo pro agonistu.

Použití alternativního modelu vedlo ke statisticky významně lepším výsledkům fitování odpovědi NR1/NR2B receptorů na aplikaci  $1 \mu\text{M}$  glutamátu. Zároveň však jeho výsledkem byly odlišné hodnoty  $k_b$  ( $Q_{10} = 2,09$  oproti  $0,95$  podle standardního modelu). To naznačuje, že uvedené alternativní schéma aktivace (Obr. 5.5 E) nelze považovat za definitivní - bylo by např. třeba zvážit možnost navázání druhé molekuly glutamátu na receptor s otevřeným iontovým kanálem a jednou navázanou molekulou agonisty, tj. přímý přechod mezi stavy  $O_1$  a  $O_2$ . Testování těchto hypotéz by ovšem vyžadovalo detailní analýzu odpovědi jednotlivých iontových kanálů (Colquhoun a Sakmann, 1985; Twyman et al., 1990), která nebyla cílem této práce.

## 6.7. Vztah struktury a funkce derivátů neurosteroidů

V této části disertační práce byl testován účinek steroidních látek odvozených od pregnanolonsulfátu ( $3\alpha5\beta\text{S}$ ) na proudové odpovědi nativních a rekombinantních NMDA receptorů. Výsledky měření, tj. relativní míra inhibice vyvolaná aplikací steroidu a z ní orientačně vypočítaná  $\text{IC}_{50}$ , jsou shrnuty v Tabulkách 4 a 5.

Inhibiční účinek  $3\alpha5\beta\text{S}$  na funkci NMDA receptorů byl poprvé popsán na kultivovaných kuřecích embryonálních míšních neuronech, jejichž odpověď na aplikaci  $30\ \mu\text{M}$  NMDA inhiboval  $100\ \mu\text{M}$   $3\alpha5\beta\text{S}$  o  $66 \pm 3\%$  (Park-Chung et al., 1994). Tento výsledek je v dobré shodě s našimi, naměřenými na kultuře hipokampálních neuronů, jejichž odpovědi na  $100\ \mu\text{M}$  NMDA byly aplikací  $100\ \mu\text{M}$   $3\alpha5\beta\text{S}$  (v tabulce označen číslem **1**) inhibovány o  $71 \pm 5\%$ , což odpovídá  $\text{IC}_{50}$   $48 \pm 10\ \mu\text{M}$ . Odpověď rekombinantních NR1/NR2B receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách na  $1\ \text{mM}$  glutamát byla stejnou koncentrací  $3\alpha5\beta\text{S}$  inhibována o  $67 \pm 8\%$  ( $\text{IC}_{50}$   $58 \pm 13\ \mu\text{M}$ ), což ukazuje, že oba modely použité pro testování steroidů (nativní a rekombinantní NMDA receptory) poskytují srovnatelné výsledky.

Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  vypočtené pro testované steroidy byly porovnány pomocí ANOVA testu (hladina významnosti  $95\%$ ), aby byly určeny statisticky významné rozdíly mezi účinky jednotlivých látek. Výsledky statistické analýzy shrnuje Tabulka 6.

### 6.7.1. Substituce na C3 - sukcinát místo sulfátu

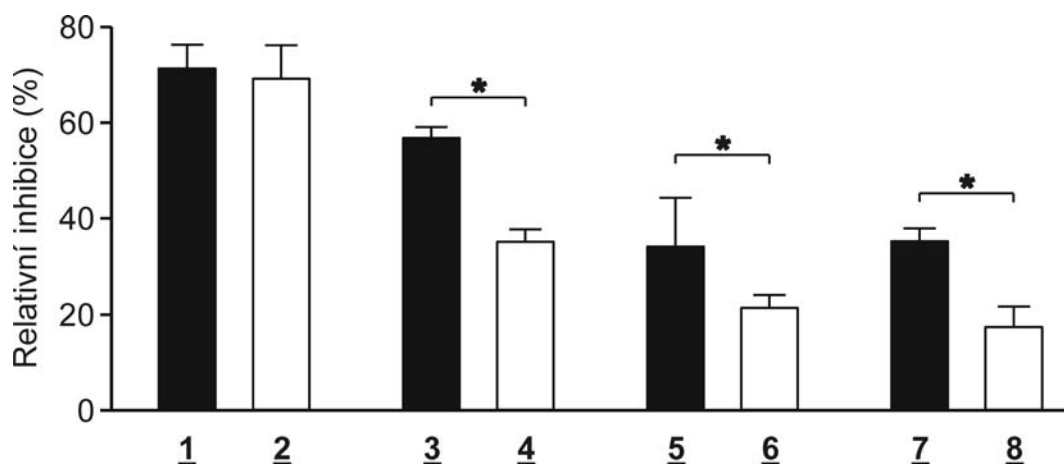
Z výsledků vyplývá, že žádná z testovaných látek není účinnějším inhibitorem NMDA receptorů než  $3\alpha5\beta\text{S}$  (označen číslem **1**), pro jehož působení byla stanovena  $\text{IC}_{50}$   $47 \pm 10\ \mu\text{M}$ . Prakticky totožná hodnota  $\text{IC}_{50}$ , konkrétně  $52 \pm 14\ \mu\text{M}$ , byla nicméně naměřena pro pregnanolonhemisukcinát (**2**). U této látky byly již popsány neuroprotektivní účinky *in vitro* i *in vivo* (Weaver et al., 1997; Weaver et al., 2000) a kromě toho se ukázala být stejně účinnou jako  $3\alpha5\beta\text{S}$  v inhibici vtoku  $\text{Ca}^{2+}$  (vyvolaného aplikací NMDA) do hipokampálních neuronů v kultuře (Weaver et al., 2000). Výsledky elektrofyzilogických měření proudových odpovědí na NMDA ovšem hovoří o snížení inhibice, provázející výměnu sulfátového zbytku  $3\alpha5\beta\text{S}$  za hemisukcinátový, z  $66\%$  na  $31\%$  (Park-Chung et al., 1997). Naše měření toto nepotvrzují, podobné snížení nicméně zaznamenávají u analogické dvojice steroidů, lišících se od výše uvedených konfigurací na C5, tj.  $3\alpha5\alpha\text{S}$  (steroid č. **3**) a  $3\alpha5\alpha\text{HS}$

**(4)**. U těchto látek vedla záměna sulfátového zbytku za hemisukcinátový ke snížení relativní inhibice z  $57 \pm 2 \%$  ( $IC_{50} 80 \pm 6 \mu M$ ) na  $35 \pm 3 \%$  ( $IC_{50} 168 \pm 16 \mu M$ ). Statisticky významné zvýšení  $IC_{50}$  bylo zaznamenáno i u zbývajících dvojic testovaných látek lišících se pouze tím, zda je na C3 navázán sulfátový nebo hemisukcinátový zbytek: u dvojice steroidů **5** a **6** se relativní inhibice snížila z  $34 \pm 10 \%$  na  $21 \pm 3 \%$ , u sloučenin **7** a **8** z  $35 \pm 3 \%$  na  $17 \pm 4 \%$ . Výsledky shrnuje Obr. 6.5.

**Tabulka 6.** Srovnání účinků testovaných látek na odpověď NMDA receptorů pomocí ANOVA testu. „\*“ označuje statisticky významný ( $P < 0,05$ ) rozdíl mezi  $IC_{50}$  příslušných látek, „-“ jeho absenci. Číslování steroidů odpovídá Tabulce 4 a 5.

<b>2</b>	-																		
<b>3</b>	-	-																	
<b>4</b>	*	*	-																
<b>5</b>	*	*	*	-															
<b>6</b>	*	*	*	*	*														
<b>7</b>	*	*	-	-	-	*													
<b>8</b>	*	*	*	*	*	*	*												
<b>9</b>	-	-	-	-	-	*	-	*											
<b>10</b>	*	*	-	-	-	*	-	*	-										
<b>11</b>	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*									
<b>12</b>	*	*	*	-	-	*	-	*	-	-	*								
<b>13</b>	-	-	-	-	*	*	-	*	-	-	*	*							
<b>14</b>	-	-	-	-	-	*	-	*	-	-	*	*	-						
<b>15</b>	*	*	*	*	*	-	*	*	*	*	*	*	*	*					
<b>16</b>	*	*	*	-	-	-	-	*	*	-	*	-	*	*	-				
<b>18</b>	*	*	-	-	-	*	-	*	-	-	*	-	-	-	*	-			
<b>19</b>	-	-	-	-	-	*	-	*	-	-	*	-	-	-	*	-	-		
<b>20</b>	-	-	-	-	-	*	-	*	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	





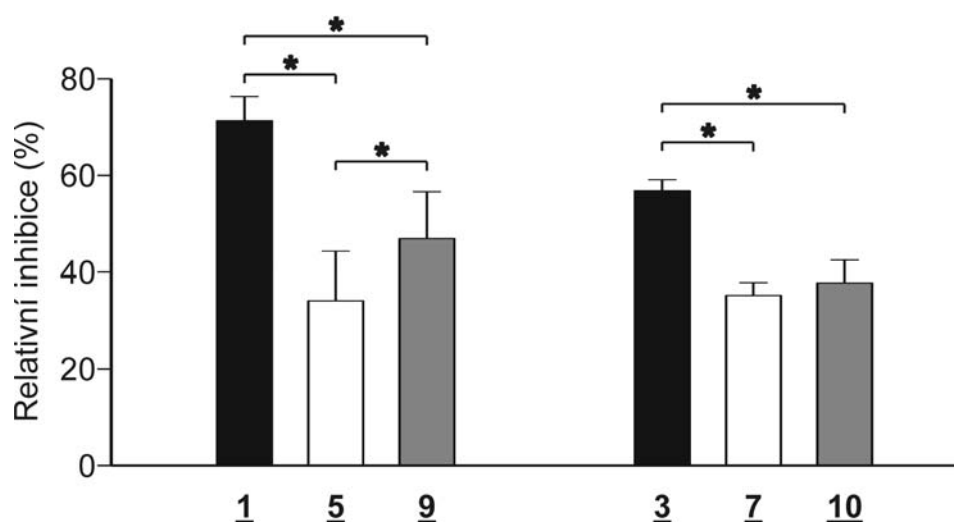
**Obr. 6.5.** Vliv substituce na C3 na inhibiční účinek steroidu. Srovnání relativní inhibice vyvolané dvojicemi jinak totožných steroidů, z nichž jeden má v poloze C3 navázanou sulfátovou (černé sloupce) a druhý hemisukcinátovou (bílé sloupce) skupinu. Struktura steroidů viz Tabulka 4, odkud bylo převzato číslování jednotlivých látek. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné rozdíly (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

#### 6.7.2 Vliv substituce na C7

Dále jsme zkoumali, jakým způsobem ovlivní inhibiční účinnost steroidu substituce na C7. Testovány byly deriváty  $3\alpha5\beta S$ , které měly na tomto uhlíku navázaný zbytek kyseliny octové (**5**) nebo nikotinové (**9**). Analogicky byl modifikován i  $3\alpha5\alpha S$  (steroidy **7** a **10**). Všechny zmíněné deriváty inhibovaly odpovědi NMDA receptorů s nižší účinností než neurosteroidy, od nichž byly odvozeny (viz Obr. 6.6): acetylace  $3\alpha5\beta S$  na pozici C7 (**5**) vedla ke snížení míry inhibice na  $34 \pm 10 \%$  ( $IC_{50} 186 \pm 61 \mu M$ ), nikotinylace tamtéž (**9**) na  $47 \pm 10 \%$  ( $IC_{50} 116 \pm 37 \mu M$ ). Deriváty  $3\alpha5\alpha S$  vykazovaly inhibici  $35 \pm 3 \%$  ( $IC_{50} 167 \pm 16 \mu M$ ; **7**), resp.  $38 \pm 5 \%$  ( $IC_{50} 154 \pm 25 \mu M$ ; **10**). Snížení inhibiční účinnosti steroidu v důsledku substituce na C7 bylo poměrně očekávané, o něco méně pak skutečnost, že toto snížení nebylo větší, nýbrž naopak menší (u steroidů **5** a **9** statisticky významně) v případě, že zde byl navázán objemnější zbytek kyseliny nikotinové. To naznačuje, že velikost substituentu není rozhodujícím kritériem a že zde hrají roli i jiné faktory než stericke omezení - pravděpodobně nekovalentní interakce mezi navázanou skupinou a molekulou receptoru.

Výše uvedené steroidy v dosavadních studiích na NMDA receptorech testovány nebyly. Jediným C7-substituovaným derivátem neurosteroidů, jehož

účiněk na funkci NMDA receptorů byl zkoumán, je 7-oxopregnenolonsulfát. Navázání ketoskupiny na C7 pregnenolonsulfátu (PS) mělo za následek úplnou ztrátu jeho potenciačního účinku na NMDA receptory (Wu et al., 1991): elektrofyziologické pokusy nezaznamenaly žádný účinek 7-oxo-PS (Park-Chung et al., 1997), při měření nárůstu intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  se tento steroid projevoval dokonce jako slabý negativní modulátor (inhibice o  $12 \pm 2\%$ ) (Irwin et al., 1994). Skutečnost, že účinek zde testovaných C7-substituovaných steroidů není stejným způsobem zcela zrušen, může být důsledkem a zároveň dalším potvrzením obecně přijímaného faktu, že potenciace NMDA receptorů PS a jejich inhibice prostřednictvím  $3\alpha5\beta\text{S}$  jsou navzájem nezávislé (Park-Chung et al., 1997).



**Obr. 6.6.** Vliv substituce na C7 na inhibiční účinek steroidu. Srovnání relativní inhibice vyvolané trojicemi jinak totožných steroidů, z nichž jeden má v poloze C7 navázaný pouze vodíkový atom (černé sloupce), druhý zbytek kyseliny octové (bílé sloupce) a třetí zbytek kyseliny nikotinové (šedé sloupce). Struktura steroidů viz Tabulka 4, odkud bylo převzato číslování jednotlivých látek. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné rozdíly (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

### 6.7.3. Vliv délky řetězce C3-substituentu

Již dříve bylo prokázáno, že přítomnost záporně nabitě skupiny na C3 steroidu je pro jeho účinek na NMDA receptorech nezbytná (Park-Chung et al., 1997; Weaver et al., 2000). Za účelem potvrzení platnosti tohoto pravidla i v našich experimentálních podmínkách byl syntetizován derivát  $3\alpha5\beta\text{S}$ , jehož sulfátová skupina byla metylovaná (**17**). Eliminace záporného náboje však bohužel zásadním způsobem ovlivnila rozpustnost steroidu, takže v roztoku precipitoval. Další otázkou

nicméně bylo, do jaké míry závisí účinek steroidu na délce řetězce mezi záporně nabitou skupinou a steroidním jádrem. Pokud by totiž byly zjištěny striktní požadavky na délku tohoto řetězce, dalo by se z toho usuzovat, že nositel záporného náboje interaguje s nějakým konkrétním místem na molekule receptoru (třeba i s jediným aminokyselinovým zbytkem). Takový poznatek by pak mohl významně pomoci při hledání dosud neznámého vazebného místa pro neurosteroidy na NMDA receptorech. Co se tedy délky postranního řetězce týče, Weaver et al. (2000) zjistili, že s jejím nárůstem vzrůstá účinek derivátů PS lišících se vždy o jednu metylenovou skupinu v pořadí pregnenolonhemioxalát < pregnenolonhemisukcinát < pregnenolonhemiglutarát. U analogických derivátů 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S však podobný trend ani statisticky významné rozdíly zaznamenány nebyly (Weaver et al., 2000). To odpovídá i výsledkům v této disertační práci, kde nebyly zjištěny významné rozdíly mezi účinky steroidů **13** („3 $\alpha$ 5 $\beta$ -aspartát“; IC<sub>50</sub> 68 ± 9  $\mu$ M) a **14** („3 $\alpha$ 5 $\beta$ -glutamát“; IC<sub>50</sub> 89 ± 18  $\mu$ M), ani mezi dvojicí **18** („3 $\alpha$ 5 $\beta$ -CH<sub>2</sub>-COOH“; IC<sub>50</sub> 154 ± 106  $\mu$ M) a **19** („3 $\alpha$ 5 $\beta$ -COOH“; IC<sub>50</sub> 135 ± 24  $\mu$ M). Zajímavý ovšem je rozdíl v účinku mezi steroidy **13** (inhibice o 84 ± 3 %) a **15** (inhibice o 36 ± 3 %). Obě tyto látky přitom lze pojmenovat „3 $\alpha$ 5 $\beta$ -aspartát“ - jediný rozdíl mezi nimi je v tom, že aspartátový zbytek je v případě steroidu **13** navázán přes svou  $\alpha$ -karboxylovou skupinu, zatímco u steroidu **15** přes  $\beta$ -karboxyl.

#### **6.7.4. Stereospecifita účinku steroidů**

Dřívější studie zkoumající účinek steroidu na funkci NMDA receptoru v závislosti na jeho struktuře dospěly pro čtveřici stereoisomerů 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ S, 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S, 3 $\beta$ 5 $\alpha$ S a 3 $\beta$ 5 $\beta$ S k podobným závěrům: jak elektrofyzilogická měření proudových odpovědí kultivovaných neuronů (Park-Chung et al., 1997), tak sledování ochranných účinků steroidu před neurotoxicitou vyvolanou NMDA u neuronů v kultuře (Weaver et al., 2000) zjistila následující: 1) 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ S je méně účinným inhibítozem NMDA receptorů než 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S; 2) inhibiční účinek 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S a 3 $\beta$ 5 $\beta$ S je srovnatelný; 3) 3 $\beta$ 5 $\alpha$ S odpovědi NMDA receptorů naopak potenceje.

Výsledky této disertační práce jsou ve shodě se všemi uvedenými body. Inhibiční účinek 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ S (**3**; inhibice o 57 ± 2 %, IC<sub>50</sub> = 80 ± 6  $\mu$ M) je statisticky významně nižší než v případě 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S (**1**; 71 ± 5 %, IC<sub>50</sub> = 47 ± 10  $\mu$ M). 3 $\beta$ -

sulfatované steroidy k dispozici nebyly, byly však testovány jejich deriváty, které měly místo sulfátové skupiny navázanou skupinu karboxylovou. Z těchto látek měly steroidy **19** (lze nazvat jako „3 $\alpha$ 5 $\beta$ -COOH“) a **20** („3 $\beta$ 5 $\beta$ -COOH“) prakticky totožnou účinnost inhibice (IC<sub>50</sub> 135  $\pm$  24  $\mu$ M, resp. 133  $\pm$  27  $\mu$ M), zatímco steroid **21** („3 $\beta$ 5 $\alpha$ -COOH“) odpovědi NMDA receptorů potencionoval o 31  $\pm$  6 %.

## 7. ZÁVĚR

Tato disertační práce se zabývá studiem účinků aplikace tepla a steroidních látek na funkci NMDA receptorů. Dosažené výsledky je možné shrnout do následujících bodů:

1. Z rychlostních konstant mechanismu aktivace NMDA receptorů vykazovaly nejvyšší míru teplotní závislosti rychlostní konstanty desenzitizace ( $Q_{10} = 10,3$ ), resenzitizace ( $Q_{10} = 4,6$ ) a odvazování glutamátu ( $Q_{10} = 3,6$ ). Naopak nezávislá na teplotě je rychlostní konstanta vazby glutamátu ( $Q_{10} = 1,0$ ).
2. Teplotní závislost časových konstant deaktivace byla nejvyšší u rekombinantních NR1/NR2B receptorů ( $Q_{10} = 3,7$  resp.  $2,7$ ) a nejnižší pro excitační postsynaptické proudy (EPSC) zprostředkované NMDA receptory ( $Q_{10} = 1,7-1,8$ ).
3. Časové konstanty deaktivace NMDA receptorů v terčících vytržených z kultivovaných neuronů jsou nižší než u odpovědí celých buněk, jejich teplotní závislost je však stejná ( $Q_{10} = 2,0$ ).
4. Amplituda proudových odpovědí HEK293 buněk exprimujících NR1/NR2B receptory neroste s teplotou monotónně - její snížení při  $45^{\circ}\text{C}$  je patrně způsobeno zrychlenou desenzitizací.
5. Žádná z testovaných steroidních látek není účinnějším inhibitorem NMDA receptorů než neurosteroid  $3\alpha 5\beta\text{S}$ , od něhož byly odvozeny.
6. Výměna sulfátového zbytku v poloze C3 za sukcinátový vedla (s jednou výjimkou) ke snížení inhibičního účinku steroidu. Obdobný efekt mělo též navázání substituentu (zbytku kyseliny octové či nikotinové) na C7.
7. Nebyl pozorován žádný vztah mezi délkou substituentu na C3 a inhibiční účinností steroidu.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdrachmanova, G., Chodounska, H., Vyklicky, L., Jr. (2001) Effects of steroids on NMDA receptors and excitatory synaptic transmission in neonatal motoneurons in rat spinal cord slices. *Eur J Neurosci* 14:495-502.
- Arundine, M., Tymianski, M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325-337.
- Ascher, P., Nowak, L. (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol Lond* 399:247-266.
- Ascher, P., Bregestovski, P., Nowak, L. (1988) N-methyl-D-aspartate-activated channels of mouse central neurones in magnesium-free solutions. *J Physiol Lond* 399:207-226.
- Assaf, S. Y., Chung, S. H. (1984) Release of endogenous Zn<sup>2+</sup> from brain tissue during activity. *Nature* 308:734-736.
- Asztely, F., Erdemli, G., Kullmann, D. M. (1997) Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: dependence on temperature and the role of active glutamate uptake. *Neuron* 18:281-293.
- Azuma, T., Nagai, Y., Saito, T., Funachi, M., Matsubara, T., Sakoda, S. (1999) The effect of dehydroepiandrosterone sulfate administration to patients with multi-infarct dementia. *J Neurol Sci* 162:69-73.
- Banke, T. G., Dravid, S. M., Traynelis, S. F. (2005) Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *J Neurosci* 25:42-51.
- Barbaccia, M. L., Roscetti, G., Trabucchi, M., Mostallino, M. C., Concas, A., Purdy, R. H., Biggio, G. (1996) Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABA<sub>A</sub> receptor function after acute stress. *Neuroendocrinology* 63:166-172.
- Barbaccia, M. L., Serra, M., Purdy, R. H., Biggio, G. (2001) Stress and neuroactive steroids. *Int Rev Neurobiol* 46:243-272.
- Belelli, D., Lambert, J. J. (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* 6:565-575.

- Benveniste, M., Mayer, M. L. (1991a) Structure-activity analysis of binding kinetics for NMDA receptor competitive antagonists: the influence of conformational restriction. *Br J Pharmacol* 104:207-221.
- Benveniste, M., Mayer, M. L. (1991b) Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine. *Biophys J* 59:560-573.
- Blanchard, R. L., Freimuth, R. R., Buck, J., Weinshilboum, R. M., Coughtrie, M. W. (2004) A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics* 14:199-211.
- Bo, M., Massaia, M., Zannella, P., Cappa, G., Ferrario, E., Rainero, I., Arvat, E., Giordano, R., Molaschi, M. (2006) Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and Alzheimer's dementia in older subjects. *Int J Geriatr Psychiatry* 21:1065-1070.
- Bowlby, M. R. (1993) Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 43:813-819.
- Bullock, A. E., Clark, A. L., Grady, S. R., Robinson, S. F., Slobe, B. S., Marks, M. J., Collins, A. C. (1997) Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes. *J Neurochem* 68:2412-2423.
- Cais, O., Sedlacek, M., Horak, M., Dittert, I., Vyklicky, L., Jr. (2008) Temperature dependence of NR1/NR2B NMDA receptor channels. *Neuroscience* 151:428-438.
- Carmignoto, G., Vicini, S. (1992) Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex. *Science* 258:1007-1011.
- Carron, C., Jullien, A., Bucher, B. (1971) Synthesis and pharmacological properties of a series of 2-piperidino alkanol derivatives. *Arzneimittelforschung* 21:1992-1998.
- Casado, M., Ascher, P. (1998) Opposite modulation of NMDA receptors by lysophospholipids and arachidonic acid: common features with mechanosensitivity. *J Physiol (Lond)* 513:317-330.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.

- Ceccon, M., Rumbaugh, G., Vicini, S. (2001) Distinct effect of pregnenolone sulfate on NMDA receptor subtypes. *Neuropharmacology* 40:491-500.
- Ciabarra, A. M., Sullivan, J. M., Gahn, L. G., Pecht, G., Heinemann, S., Sevarino, K. A. (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15:6498-6508.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., Strubing, C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387-396.
- Clements, J. D., Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E., Westbrook, G. L. (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258:1498-1501.
- Coirini, H., Guezou, M., Liere, P., Delespierre, B., Pianos, A., Eychenne, B., Schumacher, M., Guennoun, R. (2002) 3 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in rat spinal cord. *Neuroscience* 113:883-891.
- Colquhoun, D., Sakmann, B. (1985) Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J Physiol Lond* 369:501-557.
- Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjoval, J., Baulieu, E. E. (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4704-4707.
- Corpechot, C., Synguelakis, M., Talha, S., Axelson, M., Sjoval, J., Vihko, R., Baulieu, E. E., Robel, P. (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res* 270:119-125.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.
- Daggett, L. P., Johnson, E. C., Varney, M. A., Lin, F. F., Hess, S. D., Deal, C. R., Jachec, C., Lu, C. C., Kerner, J. A., Landwehrmeyer, G. B., Standaert, D. G., Young, A. B., Harpold, M. M., Velicelebi, G. (1998) The human N-methyl-D-aspartate receptor 2C subunit: genomic analysis, distribution in human brain, and functional expression. *J Neurochem* 71:1953-1968.
- Dale, N., Roberts, A. (1984) Excitatory amino acid receptors in *Xenopus* embryo spinal cord and their role in the activation of swimming. *J Physiol* 348:527-543.



- Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., Dikkes, P., Conner, D. A., Rayudu, P. V., Cheung, W., Chen, H. S., Lipton, S. A., Nakanishi, N. (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393:377-381.
- Davies, J., Evans, R. H., Francis, A. A., Watkins, J. C. (1979) Excitatory amino acid receptors and synaptic excitation in the mammalian central nervous system. *J Physiol (Paris)* 75:641-654.
- Davies, J., Francis, A. A., Jones, A. W., Watkins, J. C. (1981) 2-Amino-5-phosphonovalerate (2APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neurosci Lett* 21:77-81.
- Davies, J., Evans, R. H., Herrling, P. L., Jones, A. W., Olverman, H. J., Pook, P., Watkins, J. C. (1986) CPP, a new potent and selective NMDA antagonist. Depression of central neuron responses, affinity for [3H]D-AP5 binding sites on brain membranes and anticonvulsant activity. *Brain Res* 382:169-173.
- Dazzi, L., Sanna, A., Cagetti, E., Concas, A., Biggio, G. (1996) Inhibition by the neurosteroid allopregnanolone of basal and stress-induced acetylcholine release in the brain of freely moving rats. *Brain Res* 710:275-280.
- DeCoursey, T. E., Cherny, V. V. (1998) Temperature dependence of voltage-gated H<sup>+</sup> currents in human neutrophils, rat alveolar epithelial cells, and mammalian phagocytes. *J Gen Physiol* 112:503-522.
- Dilger, J. P., Brett, R. S., Poppers, D. M., Liu, Y. (1991) The temperature dependence of some kinetic and conductance properties of acetylcholine receptor channels. *Biochim Biophys Acta* 1063:253-258.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- 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. *J Neurosci Methods* 151:178-185.
- Dravid, S. M., Erreger, K., Yuan, H., Nicholson, K., Le, P., Lyuboslavsky, P., Almonte, A., Murray, E., Mosely, C., Barber, J., French, A., Balster, R., Murray, T. F., Traynelis, S. F. (2007) Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *J Physiol* 581:107-128.

- Dzubay, J. A., Jahr, C. E. (1996) Kinetics of NMDA channel opening. *J Neurosci* 16:4129-4134.
- Ebraldze, A. K., Rossi, D. J., Tonegawa, S., Slater, N. T. (1996) Modification of NMDA receptor channels and synaptic transmission by targeted disruption of the NR2C gene. *J Neurosci* 16:5014-5025.
- Falany, C. N., He, D., Dumas, N., Frost, A. R., Falany, J. L. (2006) Human cytosolic sulfotransferase 2B1: isoform expression, tissue specificity and subcellular localization. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:214-221.
- Flint, A. C., Maisch, U. S., Weishaupt, J. H., Kriegstein, A. R., Monyer, H. (1997) NR2A Subunit Expression Shortens NMDA Receptor Synaptic Currents in Developing Neocortex. *J Neurosci* 17:2469-2476.
- Flood, J. F., Roberts, E. (1988) Dehydroepiandrosterone sulfate improves memory in aging mice. *Brain Res* 448:178-181.
- Foster, A. C., Vezzani, A., French, E. D., Schwarcz, R. (1984) Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett* 48:273-278.
- Foster, A. C., Kemp, J. A., Leeson, P. D., Grimwood, S., Donald, A. E., Marshall, G. R., Priestley, T., Smith, J. D., Carling, R. W. (1992) Kynurenic acid analogues with improved affinity and selectivity for the glycine site on the N-methyl-D-aspartate receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 41:914-922.
- Furukawa, H., Gouaux, E. (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *Embo J* 22:2873-2885.
- Giffard, R. G., Monyer, H., Christine, C. W., Choi, D. W. (1990) Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res* 506:339-342.
- Gotti, B., Duverger, D., Bertin, J., Carter, C., Dupont, R., Frost, J., Gaudilliere, B., MacKenzie, E. T., Rousseau, J., Scatton, B., et al. (1988) Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. I. Evidence for efficacy in models of focal cerebral ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 247:1211-1221.
- Grobin, A. C., Roth, R. H., Deutch, A. Y. (1992) Regulation of the prefrontal cortical dopamine system by the neuroactive steroid 3 $\alpha$ ,21-dihydroxy-5 $\alpha$ -pregnane-20-one. *Brain Res* 578:351-356.

- Guennoun, R., Fiddes, R. J., Guezou, M., Lombes, M., Baulieu, E. E. (1995) A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase (3 beta-HSD), is expressed in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 30:287-300.
- Guharay, F., Sachs, F. (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* 352:685-701.
- 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. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Harman, R. J., Shaw, G. G. (1981a) The spontaneous and evoked release of spermine from rat brain in vitro. *Br J Pharmacol* 73:165-174.
- Harman, R. J., Shaw, G. G. (1981b) High-affinity uptake of spermine by slices of rat cerebral cortex. *J Neurochem* 36:1609-1615.
- Harper, A. A., Shelton, J. R., Watt, P. W. (1989) The temperature dependence of the time course of growth and decay of miniature end-plate currents in carp extraocular muscle following thermal acclimation. *J Exp Biol* 147:237-248.
- Harrison, N. L., Simmonds, M. A. (1984) Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* 323:287-292.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T., Fujii, N., Harada, K., Oka, T., Takahashi, K. (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett* 296:33-36.
- Hebb, D. O. (1949) *The organization of behavior*. New York: Wiley.
- Hemmen, T. M., Lyden, P. D. (2007) Induced hypothermia for acute stroke. *Stroke* 38:794-799.
- Hestrin, S., Sah, P., Nicoll, R. A. (1990) Mechanisms generating the time course of dual component excitatory synaptic currents recorded in hippocampal slices. *Neuron* 5:247-253.
- Hillen, T., Lun, A., Reischies, F. M., Borchelt, M., Steinhagen-Thiessen, E., Schaub, R. T. (2000) DHEA-S plasma levels and incidence of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 47:161-163.
- Hilmas, C., Pereira, E. F., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., Albuquerque, E. X. (2001) The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci* 21:7463-7473.

- Hollmann, M., Boulter, J., Maron, C., Beasley, L., Sullivan, J., Pecht, G., Heinemann, S. (1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10:943-954.
- Horak, M., Vlcek, K., Petrovic, M., Chodounska, H., Vyklicky, L., Jr. (2004) Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *J Neurosci* 24:10318-10325.
- Horak, M., Vlcek, K., Chodounska, H., Vyklicky, L., Jr. (2006) Subtype-dependence of N-methyl-d-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* 137:93-102.
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., Smart, T. G. (2007) Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* 116:7-19.
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., Zhang, D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798.
- Chen, H. S., Pellegrini, J. W., Aggarwal, S. K., Lei, S. Z., Warach, S., Jensen, F. E., Lipton, S. A. (1992) Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 12:4427-4436.
- Chen, N., Moshaver, A., Raymond, L. A. (1997) Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol Pharmacol* 51:1015-1023.
- Chen, N., Luo, T., Raymond, L. A. (1999) Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J Neurosci* 19:6844-6854.
- Choi, Y., Chen, H. V., Lipton, S. A. (2001) Three pairs of cysteine residues mediate both redox and zn<sup>2+</sup> modulation of the nmda receptor. *J Neurosci* 21:392-400.
- Choi, Y. B., Lipton, S. A. (2000) Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell Mol Life Sci* 57:1535-1541.
- Christine, C. W., Choi, D. W. (1990) Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci* 10:108-116.

- Chung, S. H., Kuyucak, S. (1995) Changes in the kinetics and conductance of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-receptor activated single channels with temperature. *Neurosci Lett* 187:181-184.
- Iftinca, M., McKay, B. E., Snutch, T. P., McRory, J. E., Turner, R. W., Zamponi, G. W. (2006) Temperature dependence of T-type calcium channel gating. *Neuroscience* 142:1031-1042.
- Inoue, T., Akahira, J., Suzuki, T., Darnel, A. D., Kaneko, C., Takahashi, K., Hatori, M., Shirane, R., Kumabe, T., Kurokawa, Y., Satomi, S., Sasano, H. (2002) Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5325-5331.
- Irwin, R. P., Lin, S. Z., Rogawski, M. A., Purdy, R. H., Paul, S. M. (1994) Steroid potentiation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated intracellular Ca<sup>++</sup> responses: structure-activity studies. *J Pharmacol Exp Ther* 271:677-682.
- Isaacson, R. L., Varner, J. A., Baars, J. M., De Wied, D. (1995) The effects of pregnenolone sulfate and ethylestrenol on retention of a passive avoidance task. *Brain Res* 689:79-84.
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M., Nakanishi, S. (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 268:2836-2843.
- Jang, M. K., Mierke, D. F., Russek, S. J., Farb, D. H. (2004) A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8198-8203.
- Johansson, T., Frandberg, P. A., Nyberg, F., Le Greves, P. (2007) Molecular mechanisms for nanomolar concentrations of neurosteroids at NR1/NR2B receptors. *J Pharmacol Exp Ther*.
- Johnson, J. W., Ascher, P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
- Jones, M. V., Westbrook, G. L. (1996) The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 19:96-101.

- Kardos, J., Kovacs, I., Hajos, F., Kalman, M., Simonyi, M. (1989) Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. *Neurosci Lett* 103:139-144.
- Katsuki, H., Watanabe, Y., Fujimoto, S., Kume, T., Akaike, A. (2007) Contribution of endogenous glycine and d-serine to excitotoxic and ischemic cell death in rat cerebrocortical slice cultures. *Life Sci* 81:740-749.
- Kemp, J. A., Foster, A. C., Leeson, P. D., Priestley, T., Tridgett, R., Iversen, L. L., Woodruff, G. N. (1988) 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6547-6550.
- Kemp, J. A., McKernan, R. M. (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 Suppl:1039-1042.
- Kessler, M., Terramani, T., Lynch, G., Baudry, M. (1989) A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem* 52:1319-1328.
- Kirson, E. D., Yaari, Y. (1996) Synaptic NMDA receptors in developing mouse hippocampal neurones: functional properties and sensitivity to ifenprodil. *J Physiol Lond* 497:437-455.
- Kleckner, N. W., Dingledine, R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241:835-837.
- Kohjitani, A., Fuda, H., Hanyu, O., Strott, C. A. (2006) Cloning, characterization and tissue expression of rat SULT2B1a and SULT2B1b steroid/sterol sulfotransferase isoforms: divergence of the rat SULT2B1 gene structure from orthologous human and mouse genes. *Gene* 367:66-73.
- Kornau, H. C., Seeburg, P. H., Kennedy, M. B. (1997) Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol* 7:368-373.
- Krupp, J. J., Vissel, B., Heinemann, S. F., Westbrook, G. L. (1996) Calcium-dependent inactivation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is NR2 subunit specific. *Mol Pharmacol* 50:1680-1688.
- Kullmann, D. M. (1994) Amplitude fluctuations of dual-component EPSCs in hippocampal pyramidal cells: implications for long-term potentiation. *Neuron* 12:1111-1120.

- Kuyucak, S., Chung, S. H. (1994) Temperature dependence of conductivity in electrolyte solutions and ionic channels of biological membranes. *Biophys Chem* 52:15-24.
- Lanthier, A., Patwardhan, V. V. (1986) Sex steroids and 5-en-3 beta-hydroxysteroids in specific regions of the human brain and cranial nerves. *J Steroid Biochem* 25:445-449.
- Lapchak, P. A. (2004) The neuroactive steroid 3-alpha-ol-5-beta-pregnan-20-one hemisuccinate, a selective NMDA receptor antagonist improves behavioral performance following spinal cord ischemia. *Brain Res* 997:152-158.
- Lapchak, P. A. (2006) 3alpha-OL-5-beta-pregnan-20-one hemisuccinate, a steroidal low-affinity NMDA receptor antagonist improves clinical rating scores in a rabbit multiple infarct ischemia model: synergism with tissue plasminogen activator. *Exp Neurol* 197:531-537.
- Laube, B., Kuhse, J., Betz, H. (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-2961.
- Laube, B., Schemm, R., Betz, H. (2004) Molecular determinants of ligand discrimination in the glutamate-binding pocket of the NMDA receptor. *Neuropharmacology* 47:994-1007.
- Le Goascogne, C., Robel, P., Guezou, M., Sananes, N., Baulieu, E. E., Waterman, M. (1987) Neurosteroids: cytochrome P-450scc in rat brain. *Science* 237:1212-1215.
- Legendre, P., Westbrook, G. L. (1990) The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. *J Physiol Lond* 429:429-449.
- Legendre, P., Westbrook, G. L. (1991) Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. *Mol Pharmacol* 40:289-298.
- Legendre, P., Rosenmund, C., Westbrook, G. L. (1993) Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium. *J Neurosci* 13:674-684.
- Legrain, S., Berr, C., Frenoy, N., Gourlet, V., Debuire, B., Baulieu, E. E. (1995) Dehydroepiandrosterone sulfate in a long-term care aged population. *Gerontology* 41:343-351.

- Lester, R. A., Jahr, C. E. (1992) NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *J Neurosci* 12:635-643.
- Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E. (1993) Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor. *J Neurosci* 13:1088-1096.
- Li, X. M., Salido, E. C., Gong, Y., Kitada, K., Serikawa, T., Yen, P. H., Shapiro, L. J. (1996) Cloning of the rat steroid sulfatase gene (Sts), a non-pseudoautosomal X-linked gene that undergoes X inactivation. *Mamm Genome* 7:420-424.
- Liere, P., Pianos, A., Eychenne, B., Cambourg, A., Liu, S., Griffiths, W., Schumacher, M., Sjoval, J., Baulieu, E. E. (2004) Novel lipoidal derivatives of pregnenolone and dehydroepiandrosterone and absence of their sulfated counterparts in rodent brain. *J Lipid Res* 45:2287-2302.
- Lipton, S. A. (2004) Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* 1:101-110.
- Lipton, S. A. (2007) Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat Rev Neurosci* 8:803-808.
- Low, C. M., Zheng, F., Lyuboslavsky, P., Traynelis, S. F. (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11062-11067.
- Low, C. M., Lyuboslavsky, P., French, A., Le, P., Wyatte, K., Thiel, W. H., Marchan, E. M., Igarashi, K., Kashiwagi, K., Gernert, K., Williams, K., Traynelis, S. F., Zheng, F. (2003) Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. *Mol Pharmacol* 63:1212-1222.
- Lynch, M. A. (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.
- 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. *Br J Pharmacol* 135:901-909.
- Martinac, B., Adler, J., Kung, C. (1990) Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *Nature* 348:261-263.
- Mathews, C. J., Tabcharani, J. A., Hanrahan, J. W. (1998) The CFTR chloride channel: nucleotide interactions and temperature-dependent gating. *J Membr Biol* 163:55-66.



- Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S., Yuzaki, M. (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100:43-52.
- Matsuda, K., Fletcher, M., Kamiya, Y., Yuzaki, M. (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* 23:10064-10073.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Guthrie, P. B. (1984) Voltage-dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
- Mayer, M. L., Vyklicky, L., Jr., Clements, J. (1989a) Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* 338:425-427.
- Mayer, M. L., Vyklicky, L., Jr., Westbrook, G. L. (1989b) Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurones. *J Physiol Lond* 415:329-350.
- Mayer, M. L., Benveniste, M., Patneau, D. K., Vyklicky, L., Jr. (1992) Pharmacologic properties of NMDA receptors. *Ann N Y Acad Sci* 648:194-204.
- Mayer, M. L., Armstrong, N. (2004) Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* 66:161-181.
- Mayo, W., Dellu, F., Robel, P., Cherkaoui, J., Le Moal, M., Baulieu, E. E., Simon, H. (1993) Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Res* 607:324-328.
- McBain, C. J., Kleckner, N. W., Wyrick, S., Dingledine, R. (1989) Structural requirements for activation of the glycine coagonist site of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 36:556-565.
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M., Julius, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52-58.
- Mellon, S. H., Griffin, L. D., Compagnone, N. A. (2001) Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev* 37:3-12.

- Meloche, C. A., Falany, C. N. (2001) Expression and characterization of the human 3 beta-hydroxysteroid sulfotransferases (SULT2B1a and SULT2B1b). *J Steroid Biochem Mol Biol* 77:261-269.
- Mendes, P. (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput Appl Biosci* 9:563-571.
- Mendes, P. (1997) Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem Sci* 22:361-363.
- Mendes, P., Kell, D. (1998) Non-linear optimization of biochemical pathways: applications to metabolic engineering and parameter estimation. *Bioinformatics* 14:869-883.
- Millingen, M., Bridle, H., Jesorka, A., Lincoln, P., Orwar, O. (2008) Ligand-specific temperature-dependent shifts in EC50 values for the GABAA receptor. *Anal Chem* 80:340-343.
- Miya, K., Inoue, R., Takata, Y., Abe, M., Natsume, R., Sakimura, K., Hongou, K., Miyawaki, T., Mori, H. (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J Comp Neurol* 510:641-654.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354:31-37.
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O., Jr., Linden, D. J., Ferris, C. D., Rogawski, M. A., Snyder, S. H. (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4926-4931.
- Mothet, J. P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., Baux, G. (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and

- SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5606-5611.
- Nakashima, K., Todd, M. M. (1996) Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke* 27:913-918.
- Nasman, B., Olsson, T., Backstrom, T., Eriksson, S., Grankvist, K., Viitanen, M., Bucht, G. (1991) Serum dehydroepiandrosterone sulfate in Alzheimer's disease and in multi-infarct dementia. *Biol Psychiatry* 30:684-690.
- Nishi, M., Hinds, H., Lu, H. P., Kawata, M., Hayashi, Y. (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21:RC185.
- Nobile, M., Carbone, E., Lux, H. D., Zucker, H. (1990) Temperature sensitivity of Ca currents in chick sensory neurones. *Pflugers Arch* 415:658-663.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.
- Oliet, S. H., Mothet, J. P. (2009) Regulation of N-methyl-d-aspartate receptors by astrocytic d-serine. *Neuroscience* 158:275-283.
- Orentreich, N., Brind, J. L., Rizer, R. L., Vogelman, J. H. (1984) Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 59:551-555.
- Paoletti, P., Ascher, P. (1994) Mechanosensitivity of NMDA receptors in cultured mouse central neurons. *Neuron* 13:645-655.
- 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. *Mol Pharmacol* 46:146-150.
- 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. *Mol Pharmacol* 52:1113-1123.
- Patneau, D. K., Mayer, M. L. (1990) Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci* 10:2385-2399.
- Patte-Mensah, C., Kappes, V., Freund-Mercier, M. J., Tsutsui, K., Mensah-Nyagan, A. G. (2003) Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic

- enzyme, cytochrome P450 side chain cleavage, in sensory neural pathways. *J Neurochem* 86:1233-1246.
- Paul, S. M., Purdy, R. H. (1992) Neuroactive steroids. *Faseb J* 6:2311-2322.
- Peloquin, J. B., Doering, C. J., Rehak, R., McRory, J. E. (2008) Temperature dependence of Cav1.4 calcium channel gating. *Neuroscience* 151:1066-1083.
- Perez-Otano, I., Schulteis, C. T., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J. S., Sucher, N. J., Heinemann, S. F. (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 21:1228-1237.
- Perin-Dureau, F., Rachline, J., Neyton, J., Paoletti, P. (2002) Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* 22:5955-5965.
- Perkins, M. N., Stone, T. W. (1982) An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res* 247:184-187.
- Petrovic, M., Sedlacek, M., Horak, M., Choudounska, H., Vyklicky, L., Jr. (2005) 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *J Neurosci* 25:8439-8450.
- Pierobon, P., Sogliano, C., Minei, R., Tino, A., Porcu, P., Marino, G., Tortiglione, C., Concas, A. (2004) Putative NMDA receptors in Hydra: a biochemical and functional study. *Eur J Neurosci* 20:2598-2604.
- Pin, J. P., Acher, F. (2002) The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:297-317.
- Popescu, G., Auerbach, A. (2003) Modal gating of NMDA receptors and the shape of their synaptic response. *Nat Neurosci* 6:476-483.
- Postlethwaite, M., Hennig, M. H., Steinert, J. R., Graham, B. P., Forsythe, I. D. (2007) Acceleration of AMPA receptor kinetics underlies temperature-dependent changes in synaptic strength at the rat calyx of Held. *J Physiol* 579:69-84.
- Pusch, M., Ludewig, U., Jentsch, T. J. (1997) Temperature dependence of fast and slow gating relaxations of ClC-0 chloride channels. *J Gen Physiol* 109:105-116.

- Puyal, J., Martineau, M., Mothet, J. P., Nicolas, M. T., Raymond, J. (2006) Changes in D-serine levels and localization during postnatal development of the rat vestibular nuclei. *J Comp Neurol* 497:610-621.
- Reddy, D. S., Kulkarni, S. K. (1998) Possible role of nitric oxide in the nootropic and anti-amnesic effects of neurosteroids on aging- and dizocilpine-induced learning impairment. *Brain Res* 799:215-229.
- Rosahl, T. W., Wingrove, P. B., Hunt, V., Fradley, R. L., Lawrence, J. M., Heavens, R. P., Treacey, P., Usala, M., Macaulay, A., Bonnert, T. P., Whiting, P. J., Wafford, K. A. (2006) A genetically modified mouse model probing the selective action of ifenprodil at the N-methyl-D-aspartate type 2B receptor. *Mol Cell Neurosci* 33:47-56.
- Rosen, A. D. (1996) Temperature modulation of calcium channel function in GH3 cells. *Am J Physiol* 271:C863-868.
- Rosen, A. D. (2001) Nonlinear temperature modulation of sodium channel kinetics in GH(3) cells. *Biochim Biophys Acta* 1511:391-396.
- Salido, E. C., Li, X. M., Yen, P. H., Martin, N., Mohandas, T. K., Shapiro, L. J. (1996) Cloning and expression of the mouse pseudoautosomal steroid sulphatase gene (Sts). *Nat Genet* 13:83-86.
- Sather, W., Johnson, J. W., Henderson, G., Ascher, P. (1990) Glycine-insensitive desensitization of NMDA responses in cultured mouse embryonic neurons. *Neuron* 4:725-731.
- Sather, W., Dieudonne, S., MacDonald, J. F., Ascher, P. (1992) Activation and desensitization of N-methyl-D-aspartate receptors in nucleated outside-out patches from mouse neurones. *J Physiol Lond* 450:643-672.
- Sedlacek, M., Korinek, M., Petrovic, M., Cais, O., Adamusova, E., Chodounska, H., Vyklicky Jr, L. (2008) Neurosteroid modulation of ionotropic glutamate receptors and excitatory synaptic transmission. *Physiol Res*.
- Selig, D. K., Hjelmstad, G. O., Herron, C., Nicoll, R. A., Malenka, R. C. (1995) Independent mechanisms for long-term depression of AMPA and NMDA responses. *Neuron* 15:417-426.
- Selye, H. (1941) Anesthetic Effect of Steroid Hormones. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 46:116-121.

- Shimizu, C., Fuda, H., Yanai, H., Strott, C. A. (2003) Conservation of the hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1 gene structure in the mouse: pre- and postnatal expression, kinetic analysis of isoforms, and comparison with prototypical SULT2A1. *Endocrinology* 144:1186-1193.
- Schell, M. J., Molliver, M. E., Snyder, S. H. (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3948-3952.
- Schlieff, M. L., West, T., Craig, A. M., Holtzman, D. M., Gitlin, J. D. (2006) Role of the Menkes copper-transporting ATPase in NMDA receptor-mediated neuronal toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14919-14924.
- Schmidt, C., Hollmann, M. (2008) Apparent homomeric NR1 currents observed in *Xenopus* oocytes are caused by an endogenous NR2 subunit. *J Mol Biol* 376:658-670.
- Schorge, S., Colquhoun, D. (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23:1151-1158.
- Schumacher, M., Liere, P., Akwa, Y., Rajkowski, K., Griffiths, W., Bodin, K., Sjoval, J., Baulieu, E. E. (2008) Pregnenolone sulfate in the brain: a controversial neurosteroid. *Neurochem Int* 52:522-540.
- Silver, R. A., Colquhoun, D., Cull Candy, S. G., Edmonds, B. (1996a) Deactivation and desensitization of non-NMDA receptors in patches and the time course of EPSCs in rat cerebellar granule cells [published erratum appears in *J Physiol (Lond)* 1996 Nov 1;496(Pt 3):891]. *J Physiol Lond* 493:167-173.
- Silver, R. A., Cull Candy, S. G., Takahashi, T. (1996b) Non-NMDA glutamate receptor occupancy and open probability at a rat cerebellar synapse with single and multiple release sites. *J Physiol Lond* 494:231-250.
- Spruston, N., Jonas, P., Sakmann, B. (1995) Dendritic glutamate receptor channels in rat hippocampal CA3 and CA1 pyramidal neurons. *J Physiol Lond* 482:325-352.
- Steckelbroeck, S., Nassen, A., Ugele, B., Ludwig, M., Watzka, M., Reissinger, A., Clusmann, H., Lutjohann, D., Siekmann, L., Klingmuller, D., Hans, V. H. (2004) Steroid sulfatase (STS) expression in the human temporal lobe: enzyme activity, mRNA expression and immunohistochemistry study. *J Neurochem* 89:403-417.

- Stevens, E. R., Esguerra, M., Kim, P. M., Newman, E. A., Snyder, S. H., Zahs, K. R., Miller, R. F. (2003) D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6789-6794.
- Stiles, J. R., Kovyazina, I. V., Salpeter, E. E., Salpeter, M. M. (1999) The temperature sensitivity of miniature endplate currents is mostly governed by channel gating: evidence from optimized recordings and Monte Carlo simulations. *Biophys J* 77:1177-1187.
- Suehiro, E., Fujisawa, H., Ito, H., Ishikawa, T., Maekawa, T. (1999) Brain temperature modifies glutamate neurotoxicity in vivo. *J Neurotrauma* 16:285-297.
- Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., Wu, M. K., Yuan, J. P., Jones, E. G., Lipton, S. A. (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15:6509-6520.
- Sulcova, J., Hill, M., Hampl, R., Starka, L. (1997) Age and sex related differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects. *J Endocrinol* 154:57-62.
- Takahashi, T., Feldmeyer, D., Suzuki, N., Onodera, K., Cull Candy, S. G., Sakimura, K., Mishina, M. (1996) Functional correlation of NMDA receptor epsilon subunits expression with the properties of single-channel and synaptic currents in the developing cerebellum. *J Neurosci* 16:4376-4382.
- Tamura, Y., Sato, Y., Yokota, T., Akaike, A., Sasa, M., Takaori, S. (1993) Ifenprodil prevents glutamate cytotoxicity via polyamine modulatory sites of N-methyl-D-aspartate receptors in cultured cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1017-1025.
- Tang, C. M., Dichter, M., Morad, M. (1990) Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H<sup>+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6445-6449.
- Thomas, C. G., Miller, A. J., Westbrook, G. L. (2006) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 95:1727-1734.
- Tombaugh, G. C., Sapolsky, R. M. (1993) Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology. *J Neurochem* 61:793-803.

- Tong, G., Shepherd, D., Jahr, C. E. (1995) Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science* 267:1510-1512.
- Townsend, M., Yoshii, A., Mishina, M., Constantine-Paton, M. (2003) Developmental loss of miniature N-methyl-D-aspartate receptor currents in NR2A knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1340-1345.
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., Tonegawa, S. (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327-1338.
- Turkmen, S., Lundgren, P., Birzniece, V., Zingmark, E., Backstrom, T., Johansson, I. M. (2004) 3beta-20beta-dihydroxy-5alpha-pregnane (UC1011) antagonism of the GABA potentiation and the learning impairment induced in rats by allopregnanolone. *Eur J Neurosci* 20:1604-1612.
- Twyman, R. E., Rogers, C. J., Macdonald, R. L. (1990) Intraburst kinetic properties of the GABAA receptor main conductance state of mouse spinal cord neurones in culture. *J Physiol* 423:193-220.
- Ulbrich, M. H., Isacoff, E. Y. (2008) Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14163-14168.
- Vallee, M., Mayo, W., Darnaudery, M., Corpechot, C., Young, J., Koehl, M., Le Moal, M., Baulieu, E. E., Robel, P., Simon, H. (1997) Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14865-14870.
- Vicini, S., Wang, J. F., Li, J. H., Zhu, W. J., Wang, Y. H., Luo, J. H., Wolfe, B. B., Grayson, D. R. (1998) Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* 79:555-566.
- Vlachova, V., Zemkova, H., Vyklicky, L., Jr. (1996) Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 8:2257-2264.
- Vyklicky, L., Vlachova, V., Vitaskova, Z., Dittert, I., Kabat, M., Orkand, R. K. (1999) Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *J Physiol* 517 (Pt 1):181-192.



- Vyklicky, L., Jr., Benveniste, M., Mayer, M. L. (1990a) Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *J Physiol Lond* 428:313-331.
- Vyklicky, L., Jr., Vlachova, V., Krusek, J. (1990b) The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *J Physiol Lond* 430:497-517.
- Vyklicky, L., Jr. (1993) Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol Lond* 470:575-600.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishina, M. (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.
- 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<sup>2+</sup> accumulation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 293:747-754.
- Weaver, C. E., Jr., Marek, P., Park-Chung, M., Tam, S. W., Farb, D. H. (1997) Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10450-10454.
- Weiser, T., Wienrich, M. (1996) The effects of copper ions on glutamate receptors in cultured rat cortical neurons. *Brain Res* 742:211-218.
- Welch, J. M., Simon, S. A., Reinhart, P. H. (2000) The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13889-13894.
- Wenzel, A., Villa, M., Mohler, H., Benke, D. (1996) Developmental and regional expression of NMDA receptor subtypes containing the NR2D subunit in rat brain. *J Neurochem* 66:1240-1248.
- Wenzel, A., Fritschy, J. M., Mohler, H., Benke, D. (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 68:469-478.

- Westbrook, G. L., Mayer, M. L. (1987) Micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* 328:640-643.
- Williams, K. (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44:851-859.
- Williams, K. (1994) Mechanisms influencing stimulatory effects of spermine at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 46:161-168.
- Williams, K. (1995) Pharmacological properties of recombinant N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors containing the epsilon 4 (NR2D) subunit. *Neurosci Lett* 184:181-184.
- Williams, K. (1996) Separating dual effects of zinc at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosci Lett* 215:9-12.
- Wolf, O. T., Kirschbaum, C. (1999) Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animals and humans. *Brain Res Brain Res Rev* 30:264-288.
- Wolkowitz, O. M., Kramer, J. H., Reus, V. I., Costa, M. M., Yaffe, K., Walton, P., Raskind, M., Peskind, E., Newhouse, P., Sack, D., De Souza, E., Sadowsky, C., Roberts, E. (2003) DHEA treatment of Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 60:1071-1076.
- Wolosker, H., Blackshaw, S., Snyder, S. H. (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13409-13414.
- Wolosker, H., Panizzutti, R., De Miranda, J. (2002) Neurobiology through the looking-glass: D-serine as a new glial-derived transmitter. *Neurochem Int* 41:327-332.
- Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L., Foltyn, V. N. (2008) D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *Febs J* 275:3514-3526.
- Wong, M., Moss, R. L. (1994) Patch-clamp analysis of direct steroidal modulation of glutamate receptor-channels. *J Neuroendocrinol* 6:347-355.

- Wu, F. S., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1990) Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol Pharmacol* 37:597-602.
- Wu, F. S., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1991) Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D- aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40:333-336.
- Yaghoubi, N., Malayev, A., Russek, S. J., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1998) Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. *Brain Res* 803:153-160.
- Yamakura, T., Shimoji, K. (1999) Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59:279-298.
- Yanase, T., Fukahori, M., Taniguchi, S., Nishi, Y., Sakai, Y., Takayanagi, R., Haji, M., Nawata, H. (1996) Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEA-S) in Alzheimer's disease and in cerebrovascular dementia. *Endocr J* 43:119-123.
- Yasuda, E., Ma, N., Semba, R. (2001) Immunohistochemical evidences for localization and production of D-serine in some neurons in the rat brain. *Neurosci Lett* 299:162-164.
- Yoshikawa, M., Takayasu, N., Hashimoto, A., Sato, Y., Tamaki, R., Tsukamoto, H., Kobayashi, H., Noda, S. (2007) The serine racemase mRNA is predominantly expressed in rat brain neurons. *Arch Histol Cytol* 70:127-134.
- Yu, L., Romero, D. G., Gomez-Sanchez, C. E., Gomez-Sanchez, E. P. (2002) Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain. *Mol Cell Endocrinol* 190:9-17.
- Zaremba, J. (2004) Hyperthermia in ischemic stroke. *Med Sci Monit* 10:RA148-153.
- Zukin, R. S., Bennett, M. V. (1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 18:306-313.