

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Neurovědy



**RNDr. Vojtěch Vyklícký**

**Studium funkčních a molekulárních vlastností NMDA receptorů**

The study of functional and molecular properties of NMDA receptors

**Disertační práce**

Pracoviště: Fyziologický ústav Akademie věd České republiky v.v.i.

Oddělení buněčné neurofyzologie

Školitel: Doc. MUDr. Ladislav Vyklícký, DrSc.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 11.6.2015

Jméno a příjmení: Vojtěch Vyklický

Podpis:

## PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svému otci, doc. MUDr. Ladislavu Vyklickému, DrSc., za podmínky, volnost a cenné rady, které mi poskytl po dobu vypracovávání mé dizertační práce. Dále bych rád poděkoval Ing. Ivanu Dittertovi, CSc. za jeho excelentní technickou podporu a Magdě Kuntošové za přípravu tkáňových kultur. Děkuji také všem členům oddělení Buněčné neurofyzologie za vstřícné a přátelské prostředí. V neposlední řadě chci poděkovat Lence, zbytku mé rodiny a přátelům za podporu.

# OBSAH

PODĚKOVÁNÍ .....	3
OBSAH .....	4
SEZNAM ZKRATEK.....	6
ABSTRAKT.....	7
ABSTRACT .....	8
1 LITERÁRNÍ ÚVOD .....	9
1.1 Objev glutamátových receptorů .....	9
1.2 Fyziologická funkce NMDA receptorů.....	10
1.3 Struktura NMDA receptorů.....	10
1.4 Kinetické schéma aktivace NMDA receptorů.....	14
1.5 Farmakologie NMDA receptorů .....	17
1.5.1 Kompetitivní antagonisté .....	18
1.5.2 Blokátory otevřeného kanálu .....	19
1.5.3 Allosterické modulátory.....	21
1.6 Neurosteroidy .....	24
1.6.1 Syntéza neurosteroidů .....	24
1.6.2 Efekt neurosteroidů v CNS .....	24
1.6.3 Vazebné místo inhibičních neurosteroidů na NMDA receptoru.....	26
1.6.4 Inhibiční neurosteroidy v behaviorálních pokusech .....	26
2 CÍLE STUDIE.....	28
2.1 Vztah mezi strukturou $3\alpha5\beta S$ derivátů a jejich schopností modulovat NMDA receptory.....	28
2.2 Úloha interakce neuroaktivních steroidů s cytoplazmatickou membránou buněk při modulaci NMDA receptorů .....	28
2.3 Molekulární mechanismus působení neurosteroidů na NMDA receptory ....	29
3 MATERIÁL A METODY .....	30
3.1. Chemikálie a roztoky .....	30
3.1 cDNA klony .....	32
3.2 Tkáňové kultury a transfekce .....	32
3.3 Metoda terčíkového zámku („Patch clamp“) .....	34
4 VÝSLEDKY .....	38
4.1 Vztah mezi strukturou $3\alpha5\beta S$ derivátů a jejich schopností modulovat NMDA receptor.....	38
4.2 Úloha interakce neuroaktivních steroidů s cytoplazmatickou membránou buněk při modulaci NMDA receptorů .....	43
4.3 Molekulární mechanismus působení neurosteroidů na NMDA receptorech.	47

5	DISKUZE.....	52
5.1	Vztah mezi strukturou $3\alpha5\beta$ S derivátů a jejich schopností modulovat NMDA receptor.....	52
5.2	Úloha interakce neuroaktivních steroidů s cytoplazmatickou membránou buněk při modulaci NMDA receptorů .....	55
5.3	Molekulární mechanismus působení neurosteroidů na NMDA receptorech. ....	56
6	SOUHRN .....	62
6.1	Vztah mezi strukturou $3\alpha5\beta$ S derivátů a jejich schopností modulovat NMDA receptor.....	62
6.2	Úloha interakce neuroaktivních steroidů s cytoplazmatickou membránou buněk při modulaci NMDA receptorů .....	63
6.3	Molekulární mechanismus působení neurosteroidů na NMDA receptorech. ....	64
7	ZÁVĚR .....	65
7.1	Vztah mezi strukturou $3\alpha5\beta$ S derivátů a jejich schopností modulovat NMDA receptor.....	66
7.2	Úloha interakce neuroaktivních steroidů s cytoplazmatickou membránou buněk při modulaci NMDA receptorů .....	66
7.3	Molekulární mechanismus působení neurosteroidů na NMDA receptorech. ....	66
8	SEZNAM PUBLIKACÍ.....	67
9	LITERATURA.....	71
10	PŘÍLOHY .....	78

## SEZNAM ZKRATEK

3 $\alpha$ 5 $\beta$ S	pregnanolon sulfát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát)
ATD	amino-terminální doména
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátová kyselina
BAPTA	1,2-bis(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
bp	páry bazí („base pair“)
C3	uhlík číslo 3 steroidního jádra
C17	uhlík číslo 17 steroidního jádra
CD	cyklodextrin
CNS	centrální nervová soustava
CTD	C-terminální doména
D-APV	D-2-amino-5-fosfovalerová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
<i>EC</i> <sub>50</sub>	poloviční účinná koncentrace
ECS	extracelulární roztok
EDTA	ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
EPSC	excitační postsynaptický proud
HEK293T	lidské embryonální ledvinné buňky 293T
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
<i>IC</i> <sub>50</sub>	poloviční účinná inhibiční koncentrace
ICS	intracelulární roztok
KYNA	5,7-dichlorokynurenová kyselina
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
NMDA	N-methyl-D-aspartátová kyselina
LBD	ligand vázající doména („ligand binding domain“)
LDP	dlouhodobá deprese („long term depression“)
LTP	dlouhodobá potenciace („long term potentiation“)
PA-A	5 $\beta$ -pregnan-20-on 3 $\alpha$ -yl-[(2-trimethylammonio)-ethanoát] chlorid
PA-hPim	5 $\beta$ -pregnan-20-on 3 $\alpha$ -yl-hemipimelát
<i>P</i> <sub>o</sub>	pravděpodobnost otevření
SD	směrodatná odchylka
TMD	transmembránová doména

## ABSTRAKT

N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory patří mezi ionotropní glutamátové receptory, které zprostředkovávají rychlý synaptický přenos v centrální nervové soustavě savců a hrají klíčovou roli v synaptické plasticitě. Jejich nadměrná aktivace vede k buněčné smrti, která je příčinou vzniku řady závažných neurologických a psychiatrických onemocnění. Cílem našeho výzkumu bylo nalézt nové látky, které by zabránily dlouhodobé a nadměrné aktivaci NMDA receptorů.

Testováním nově syntetizovaných steroidních látek na rekombinantních receptorech jsme ukázali vztah mezi strukturou derivátů přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu pregnanolon sulfátu a jejich schopností modulovat NMDA receptory. Výsledky našich pokusů ukazují, že sulfátová a acetylová skupina na molekule pregnanolon sulfátu hrají významnou roli v jeho inhibičním působení. Analýzou proudových odpovědí jsme ukázali, že náhradou substituentů na C3 a C17 uhlíkatého skeletu steroidního jádra lze výrazně zvýšit účinnost steroidních látek a příznivě ovlivnit poměr mezi inhibicí receptorů, které jsou ve stacionárním a nestacionárním stavu aktivace. Tyto dva stavy odrážejí situaci, kdy jsou receptory aktivovány dlouhodobě (tonicky) a synapticky (fazicky).

Pomocí elektrofyziologických a optických metod v kombinaci s metodami matematického modelování jsme ukázali, že cytoplazmatická membrána buněk hraje důležitou roli pro působení neurosteroidů na NMDA receptorech. Navrhli jsme model, který ukazuje, že na povrchu plazmatické membrány dochází k lokálnímu zvýšení koncentrace volného steroidu nad kritickou micelární koncentraci. Dále se nám podařilo identifikovat vazebné místo přirozeně se vyskytujícího inhibičního neurosteroidu pregnanolon sulfátu na NMDA receptoru. Toto místo se nachází ve vnějším ústí póru ve vysoce konzervované části tzv. SYTANLAAF motivu. Pomocí analýzy proudově-napěťových závislostí mutovaných NMDA receptorů v přítomnosti neurosteroidů a molekulárního modelování jsme navrhli model otevřeného stavu NMDA receptoru.

Neurosteroidy a jejich deriváty jsou vzhledem k svému mechanismu působení na NMDA receptorech nadějnou skupinou antagonistů. Práce odhaluje strukturální determinanty přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu a jeho syntetických analogů, které jsou důležité pro jejich inhibiční účinek a dále objasňuje molekulární mechanismus jakým steroidy modulují aktivitu NMDA receptorů. Jsme přesvědčeni, že tyto poznatky mohou v budoucnu přispět k nalezení nových účinných látek využitelných v klinické praxi pro léčbu chorob spojených s poruchami funkce NMDA receptorů.

## ABSTRACT

N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are a subtype of ionotropic glutamate receptors, which mediate fast synaptic transmission in the vertebrate central nervous system and play a key role in synaptic plasticity. NMDA receptor overexcitation leads to cell death that underlies many serious neurological and psychiatric disorders. The aim of our research was to characterize novel drugs that modulate NMDAR activity.

We have tested a series of newly synthesized steroidal compounds for their activity on recombinant receptors. We have demonstrated a relationship between the structure of the analogues of a naturally occurring neurosteroid pregnanolone sulfate and their ability to modulate NMDA receptors. The results of our experiments characterize the role of substituents at the steroid A and D ring. We have found specific substituents on carbons C3 and C17 of the steroidal skeleton that lead to a substantial increase of steroid efficacy and the ability to positively affect the ratio between the inhibition of stationary and non-stationary receptor activation. These two states represent receptors long-term activated (tonically) and synaptically activated (phasically), respectively.

Using electrophysiological and optical methods in combination with mathematical modeling we have shown that the plasma membrane plays an important role in the steroid access to the NMDA receptor. We have proposed a model which indicates that there is a local increase in the concentration of steroid monomers on the surface of the plasma membrane that can exceed the critical micellar concentration.

We have identified the binding site of inhibitory steroids at the NMDA receptor. The binding site is located in the extracellular vestibule of the ion channel pore in the highly conserved SYTANLAAF motif. We have proposed a model of the open ion channel configuration of the NMDA receptor by taking advantage of the current-voltage relationship of mutated NMDA receptors in the presence of neurosteroids, in combination with molecular modeling methods.

Neurosteroids and their synthetic derivatives are a promising class of NMDA antagonists. We reveal structural determinants of the steroid molecule that are crucial for the inhibitory effect and furthermore elucidate the molecular mechanism of the steroid modulation of NMDA receptors. We are convinced that these findings will lead to the design and characterization of new efficacious drugs that will prove to be useful in clinical practice for the treatment of diseases linked to NMDA receptor dysfunction.



# 1 LITERÁRNÍ ÚVOD

## 1.1 Objev glutamátových receptorů

Úloha L-glutamátu jako hlavního excitačního neuropřenašeče zprostředkovávajícího rychlý synaptický přenos v centrální nervové soustavě (CNS) savců je dnes všeobecně přijímána (Traynelis *et al.* 2010). Cesta k tomuto poznání byla však komplikovaná faktem, že tato aminokyselina má vedle specifické úlohy v nervové tkáni též obecnou úlohu v metabolismu a proteosyntéze každé somatické buňky. Již ve třicátých letech minulého století bylo zjištěno, že glutamát je v mozku přítomen ve vysokých koncentracích. To následně přineslo spekulace o jeho úloze v CNS, nicméně první vážné úvahy o roli glutamátu jako neuropřenašeče se začaly rozvíjet až po experimentech Hayashiho v padesátých letech minulého století, který ukázal, že aplikace glutamátu přímo do mozku má konvulzivní účinky (HAYASHI 1954). Existence specifických receptorů pro glutamát byla pak prokázána v 80. letech minulého století a došlo k jejich rozdělení podle selektivních agonistů do tří hlavních skupin: N-methyl-D-aspartátové (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátové (AMPA) a kainátové receptory (Watkins and Evans 1981). Tyto ligandem aktivované iontové kanály, tzv. *ionotropní glutamátové receptory*, jsou transmembránové proteiny ukotvené v cytoplazmatické membráně buněk. Při jejich aktivaci dochází k otevření s nimi spřaženého iontového kanálu, kterým mohou následně procházet ionty po spádu elektrochemického potenciálu. Ionotropní glutamátové receptory tedy velmi rychle převádějí chemický signál na depolarizaci postsynaptických neuronů.

Rozvoj molekulárně biologických technik na začátku 90. let minulého století pomohl prokázat existenci celé další skupiny glutamátových receptorů, tzv. *metabotropních glutamátových receptorů*, jejichž aktivací nedochází k přímému otevření iontového kanálu, ale ke spuštění signální kaskády zahrnující G-proteiny (Pin and Acher 2002). V neposlední řadě pak molekulárně biologické techniky začátkem 90. let minulého století umožnily naklonování glutamátových receptorů a pomohly tak výrazně urychlit další výzkum zaměřený především na jejich strukturu a podjednotkové složení (Moriyoshi *et al.* 1991; Monyer *et al.* 1992; Hollmann and Heinemann 1994; Sucher *et al.* 1996).

## 1.2 Fyziologická funkce NMDA receptorů

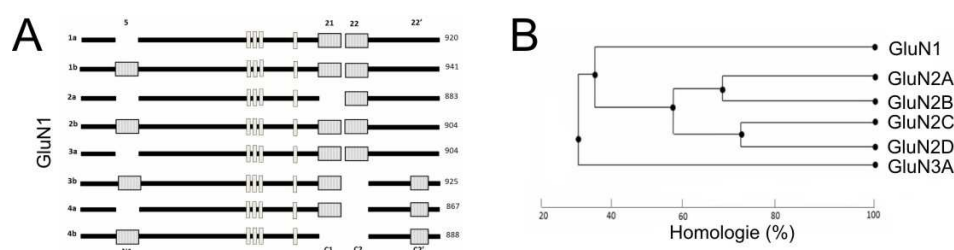
Pomocí metody *in situ* hybridizace se podařilo ukázat, že NMDA receptory jsou exprimovány v odlišné míře v různých strukturách mozku a míchy (Pellegrini-Giampietro *et al.* 1991; Tolle *et al.* 1993). Využitím imunohistochemických metod bylo ukázáno, že se tyto receptory vyskytují hlavně v postsynaptických denzitách excitačních synapsí (Petralia *et al.* 2005), ale nacházejí se i presynapticky, extrasynapticky a v gliových buňkách (VanDongen 2008). NMDA receptory hrají klíčovou roli v synaptické plasticitě, jako je dlouhodobá potenciace (LTP) a dlouhodobá deprese (LTD). Tyto procesy vedou k dlouhodobým změnám v síle synaptického přenosu a jsou považovány za jeden ze základních mechanismů učení a paměti (Lynch 2004). NMDA receptory se rovněž uplatňují i v krátkodobé plasticitě, která vede ke krátkodobým změnám v síle synaptického přenosu (Kauer *et al.* 1988; Volianskis *et al.* 2013).

Při některých patologických stavech dochází k dlouhodobému zvýšení extracelulární koncentrace glutamátu, který tonicky aktivuje NMDA receptory. Tím dochází k nadměrnému vtoku vápenatých iontů do buněk a následné aktivaci signálních kaskád, které mohou vést až k buněčné smrti. Tento proces nazýváme excitotoxicita (Choi 1992). Existuje řada experimentálních důkazů, které ukazují na významný podíl excitotoxicitou vyvolané neurodegenerace v mnoha závažných neurologických onemocněních a akutních neurologických stavech. Mezi hlavní onemocnění spojená s excitotoxicitou patří např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, epilepsie, neuropatická bolest, amyotrofická laterální skleróza, ale uplatňuje se i při akutních stavech jakými jsou mozková mrtvice nebo traumatickém poškození mozku (Dingledine *et al.* 1999).

## 1.3 Struktura NMDA receptorů

Funkční NMDA receptory jsou heterotetramery, které mohou být složené ze tří různých podjednotek označovaných GluN1, GluN2 a GluN3 (Monyer *et al.* 1992; Ulbrich and Isacoff 2008). Podjednotka GluN1 je kódována jediným genem, ale je exprimována v různých sestřihových variantách mRNA. Ty se liší přítomností nebo absencí čtyř krátkých exonů na N-terminálním (exon 5) a C-terminálním konci (exon 21, 22 a 22') receptoru (Zukin and Bennett 1995; Chandrasekar 2013). Různé exony

v genu pro jednotku GluN1 dávají vzniknout osmi sestříhovým variantám, označovaným GluN1-1a, 2a, 3a, 4a a GluN1-1b, 2b, 3b, 4b (viz Obrázek 1.1). Vzhledem k tomu, že samotné GluN1 podjednotky nejsou schopny vytvořit funkční kanál, musí být dvě GluN1 podjednotky doplněny dvěma GluN2 podjednotkami. V méně častých případech mohou být v receptoru jedna, či obě GluN2 podjednotky nahrazeny GluN3 podjednotkou (Clements and Westbrook 1991; Vicini *et al.* 1998). GluN2 podjednotka je kódována čtyřmi různými geny označovanými GluN2A-D. Podjednotka GluN3 je kódována dvěma různými geny označovanými GluN3A a GluN3B. Alternativní sestříhové varianty byly popsány i v případě GluN2 a GluN3 podjednotek, ale ve výrazně menším rozsahu než je tomu u GluN1 podjednotky (Chandrasekar 2013). Velikost jednotlivých podjednotek se pohybuje v rozmezí od 867 aminokyselinových zbytků pro sestříhovou variantu GluN1-4a až po největší podjednotku GluN2B složenou z 1482 aminokyselinových zbytků.



**Obrázek 1.1:** (A) Schematické znázornění osmi sestříhových variant GluN1 podjednotky. Exon 5 (63 párů bazí (bp)), exon 21 (111 bp), exon 22 (356 pb) a exon 22' (66 pb). Celkový počet aminokyselinových zbytků je uveden po pravé straně příslušné sestříhové varianty. Transmembránové domény jsou znázorněny obdélníky v bílé barvě. (B) Fylogenetický strom GluN podjednotek. Upraveno dle (Chandrasekar 2013).

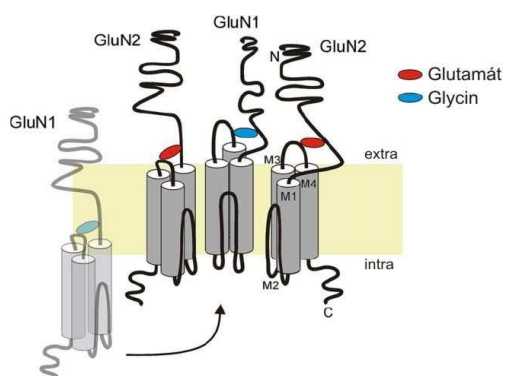
Původně se předpokládalo, že podjednotky jsou v rámci receptoru uspořádány v motivu 1-1-2-2 (tzn. GluN1-GluN1-GluN2-GluN2) (Schorge and Colquhoun 2003; Qiu *et al.* 2005), později však řada prací začala ukazovat na motiv střídajících se podjednotek 1-2-1-2 (Obrázek 1.2) (Sobolevsky *et al.* 2009; Rambhadran *et al.* 2010; Salussolia *et al.* 2011; Riou *et al.* 2012). Toto uspořádání bylo definitivně potvrzeno až analýzou krystalografické struktury receptoru (Karakas and Furukawa 2014; Lee *et al.* 2014) (Obrázek 1.3).

Receptory složené z různých kombinací sestříhových variant GluN1 podjednotek a z různých podtypů GluN2 nebo GluN3 podjednotek se liší svými funkčními i farmakologickými vlastnostmi. Tato funkční variabilita napříč různými podjednotkovými kombinacemi může být navíc rozšířena posttranslačními

modifikacemi receptoru, jako jsou fosforylace či glykosylace receptoru (Vicini *et al.* 1998; Traynelis *et al.* 2010).

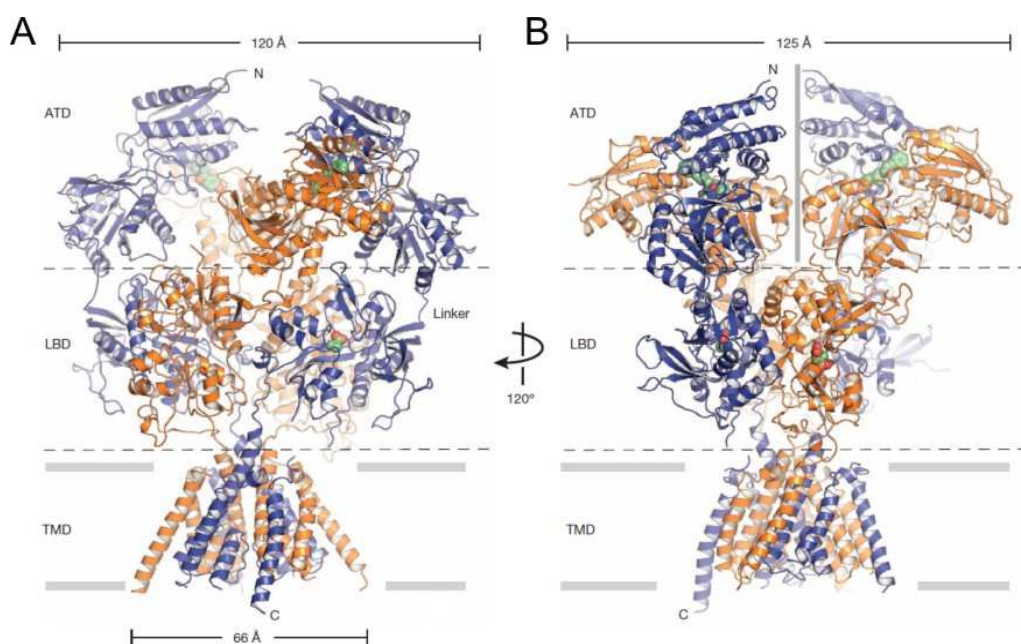
Podjednotkové složení NMDA receptorů se liší v rámci různých oblastí CNS, v rámci jednotlivých typů neuronových a gliových buněk, ale liší se i svojí lokalizací na povrchu samotných buněk. Bylo zjištěno, že v hipokampu dospělého potkana jsou GluN2B podjednotky přednostně umístěny extrasynapticky, zatímco GluN2A podjednotky jsou převážně přítomny v postsynaptických denzitách (Tovar and Westbrook 1999). Podjednotkové složení NMDA receptorů se mění i během vývoje. Například v novorozeném mozku potkana převažují GluN2B a GluN2D podjednotky, které jsou během vývoje nahrazeny GluN2A podjednotkou, a v některých oblastech mozku rovněž GluN2C podjednotkou (Cull-Candy *et al.* 2001; Paoletti 2011).

Jednotlivé podjednotky mezi sebou vykazují různý stupeň sekvenční homologie (Obrázek 1.1), ale z hlediska struktury mají jednotlivé podjednotky velmi konzervovanou strukturu skládající se ze 4 domén: extracelulárně umístěné amino-terminální domény (ATD), na ní navazující ligand vázající domény (LBD), transmembránové domény (TMD) a intracelulárně lokalizované C-terminální domény (CTD) (viz Obrázek 1.2 a Obrázek 1.3). TMD je tvořena celkem čtyřmi membránovými doménami. Domény M1, M3 a M4 jsou tvořeny transmembránovými  $\alpha$ -helixy. M2 doména v membráně tvoří intracelulárně orientovanou vratnou kličku, která je součástí vnitřní strany iontového póru a tvoří selektivní filtr. LBD se skládá ze segmentu S1, který extracelulárně navazuje na M1 doménu a segmentem S2, který je tvořen extracelulární kličkou spojující transmembránové domény M3 a M4. Společně pak S1 a S2 doména tvoří u GluN2 podjednotek vazebné místo pro glutamát nebo v případě GluN1 a GluN3 podjednotek vazebné místo pro glycin.



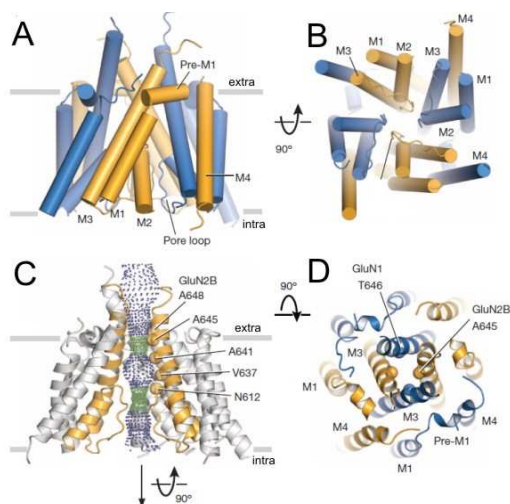
**Obrázek 1.2: Schematické znázornění uspořádání GluN1 a GluN2B podjednotek v rámci funkčního NMDA receptoru.**

Receptor je uspořádán v motivu střídajících se podjednotek 1-2-1-2. V ligand vázajících doménách příslušných podjednotek jsou zobrazeny agonisté glutamát (červeně) a glycin (modře). Dále je znázorněna i ATD (N), CTD proteinu (C) a transmembránová část proteinu skládající se ze čtyř domén (M1-M4). Převzato z (Vyklícky *et al.* 2014).



**Obrázek 1.3: Krystalografická struktura GluN1-GluN2B NMDA receptoru.**

(A) Boční pohled na strukturu NMDA receptoru. GluN1 podjednotka je zde znázorněna modře, GluN2B podjednotka oranžově. (B) Struktura NMDA receptoru pootočená o 120° okolo dvoučetné osy symetrie (znázorněna šedou vertikální úsečkou). V obrázku jsou znázorněny navázané molekuly alosterického inhibitoru Ro 25-6981 (v ATD) a parciálních agonistů 1-aminocyclopropan-1-karboxylové kyseliny a trans-1-aminocyclobutan-1,3-dikarboxylové kyseliny (v LBD). C-terminální doména receptoru v obrázku chybí. Převzato z (Lee *et al.* 2014).



**Obrázek 1.4: Krystalografická struktura transmembránové domény GluN1-GluN2B NMDA receptoru.**

(A) Boční pohled na uspořádání TMD. GluN1 podjednotka je zde znázorněna modře, GluN2B podjednotka oranžově. Šedé horizontální úsečky přibližně vymezují hranice cytoplazmatické membrány. (B) Pohled na TMD podél osy póru iontového kanálu z intracelulární strany membrány.

(C) Boční pohled na TMD s vyobrazeným prostorem přístupným molekulám vody. Zelené tečky znázorňují průměr póru 1.15-2.3 Å, fialové tečky pak průměr > 2.3 Å.

(D) Pohled na TMD podél osy póru iontového kanálu z extracelulární strany membrány. Převzato z (Lee *et al.* 2014).

Detailní krystalografická struktura transmembránové oblasti GluN1-GluN2B receptoru je ukázána na Obrázek 1.4. Na bočním pohledu TMD je patrný vestibul iontového kanálu přístupný molekulám vody (Obrázek 1.4. (C), fialové tečky). Jsou patrná i dvě zúžení tohoto vestibulu (zelené tečky). Oblast zúžení na intracelulární straně odpovídá selektivnímu filtru, který je tvořen vratnými membránovými kličkami M2. Druhé zúžení, které se nachází na samé hranici mezi extracelulárním prostorem a cytoplazmatickou membránou, je tvořeno křížením transmembránových domén M3, zřejmě vytváří fyzická vrátka NMDA receptoru (Lee *et al.* 2014). Nejužší místo těchto vrátek je tvořeno threoninem 645 na GluN1 podjednotce a alaninem 645 na GluN2B podjednotce. Tato residua jsou součástí vysoce konzervovaného SYTANLAAF motivu, který hraje klíčovou roli ve vrátkování glutamátových receptorů (Chang and Kuo 2008; Murthy *et al.* 2012).

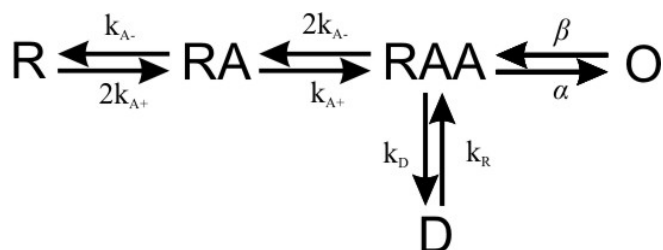
Přes významný pokrok v pochopení struktury NMDA receptorů, dosažený odhalením jeho krystalografické struktury, není dosud známa reálná struktura receptoru v jeho otevřeném stavu. Pro zvýšení stability receptorů při krystalizaci NMDA receptoru bylo nutné použití parciálních agonistů (1-aminocyclopropan-1-karboxylové kyseliny a trans-1-aminocyclobutan-1,3-dikarboxylovou kyseliny) a antagonistů Ro 25-6981 a MK-801. Výsledkem krystalografické struktury je tedy receptor ve stavu, který neodpovídá ani zavřenému ani otevřenému stavu (Murthy *et al.* 2012).

## 1.4 Kinetické schéma aktivace NMDA receptorů

NMDA receptory jsou ligandem řízené iontové kanály. Po vazbě agonistů glutamátu a glycinu, receptor prochází sérií konformačních změn ústících v otevření iontového kanálu. Pro popis makroskopických proudů vyvolaných aplikací glutamátu na NMDA receptory bylo navrženo pětistavové kinetické schéma (Obrázek 1.5) (Lester and Jahr 1992). Vzhledem k tomu, že agonisté glycinového vazebného místa se v CNS vyskytují v poměrně stabilních koncentracích, dostatečných pro aktivaci receptoru, předkládané schéma bere v úvahu pouze obsazení glutamátových vazebných míst.

Receptor se dle tohoto schématu může nacházet ve stavu bez (R), s jedním (RA) nebo se dvěma (RAA) navázanými molekulami agonisty v glutamátovém vazebném místě. Existují tři odlišné konformace (RAA, O a D), v nichž se receptor s

navázanými molekulami agonisty může nacházet. Ze stavu RAA, při kterém je iontový kanál zavřený, může receptor přejít do stavu otevřeného (O) nebo do stavu se zavřeným iontovým kanálem, z něhož se nemůže přímo otevřít tzv. desenzitizovaný stav (D). Rychlost přechodu mezi těmito stavy, a z nich vyplývající pravděpodobnosti obsazení jednotlivých stavů, jsou dány rychlostními konstantami  $k$  a koncentrací agonisty  $[A]$ .



**Obrázek 1.5: Kinetické schéma aktivace NMDA receptoru.**

Receptor se dle tohoto schématu může nacházet v následujících konformačních stavech: stav bez navázaného agonisty (R), s jedním (RA) nebo se dvěma (RAA) navázanými molekulami agonisty v glutamátovém vazebném místě, v desenzitizovaném (D) nebo otevřeném (O) stavu. Rychlost přechodu mezi jednotlivými konformačními stavy je dána rychlostními konstantami: asociační ( $k_{A+}$ ) a disociační ( $k_{A-}$ ) rychlostní konstanty pro vazbu agonisty, rychlostní konstanty desenzitizace ( $k_D$ ) a resenzitizace ( $k_R$ ), rychlostní konstanty otevírání ( $\alpha$ ) a zavírání ( $\beta$ ) NMDA receptoru (upraveno dle (Lester and Jahr 1992)).

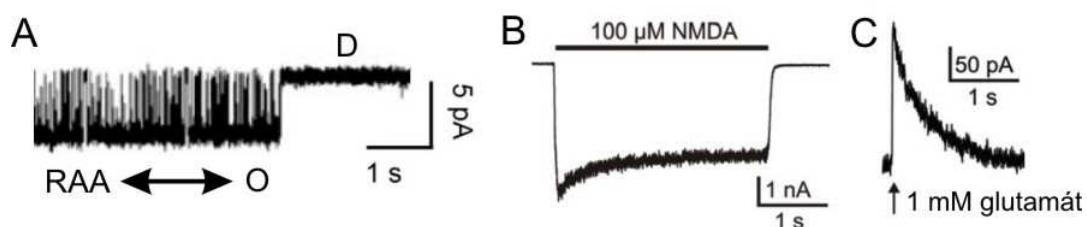
Vzhledem k poměrně rychlým časovým konstantám  $\alpha$  (časová konstanta otevírání) a  $\beta$  (časová konstanta zavírání), v porovnání s časovými konstantami vstupu a výstupu z desenzitizovaného stavu, dochází po navázání agonistů nejdříve k řadě následných přechodů mezi stavy (RAA) a (O) za vzniku tzv. salv otevření (Gibb and Colquhoun 1991). Z rychlostních konstant  $\alpha$  a  $\beta$  se určuje parametr pravděpodobnosti otevření kanálu ( $P_O$ ) dle vztahu  $P_O = \alpha / (\alpha + \beta)$  (Huettnner and Bean 1988).  $P_O$  udává rovnovážný poměr otevřených receptorů vůči receptorům ve stavu (RAA) v přítomnosti saturující koncentrace agonisty.  $P_O$  NMDA receptorů závisí na mnoha faktorech a je rovněž závislá na podjednotkovém složení. V případě GluN1/GluN2B se pohybuje okolo 10 % (Jahr 1992; Rosenmund *et al.* 1995). U GluN1/GluN2A je  $P_O$  výrazně vyšší, okolo 40 % (Chen *et al.* 1999), zatímco u GluN1/GluN2C a GluN1/GluN2D receptorů je velmi nízká, ~1-2 % (Dravid *et al.* 2008; Vance *et al.* 2013).

Výše zmíněné salvy otevření jsou ukončeny až odvázním agonisty nebo vstupem receptoru do desenzitizovaného stavu, který je nevodivý. Vzhledem k pomalé resenzitizační konstantě  $k_R$  se přechod do desenzitizovaného stavu



projevuje jako dlouhé nevodivé období mezi salvami přechodu (RAA-O) (viz Obrázek 1.6). Tento jev, který se makroskopicky projevuje jako časově závislé snížení odpovědi receptorů v průběhu aplikace agonisty, je charakteristické pro většinu chemicky aktivovaných iontových kanálů (Geoffroy *et al.* 1991).

Kromě výše popsaného průběhu desenzitizace byly u NMDA receptorů popsány další dva typy desenzitizace, tzv. glycin-závislá desenzitizace a  $\text{Ca}^{2+}$ -závislá inaktivace. Bylo ukázáno, že mezi vazebnými místy pro glutamát a glycin existuje negativní kooperativita (Mayer *et al.* 1989; Vyklicky *et al.* 1990a). To znamená, že vazbou glutamátu dochází ke snížení afinity pro glycin, jeho disociaci z glycinového vazebného místa a následnému poklesu odpovědi. Efekt se makroskopicky projevuje snížením odpovědi na aplikaci glutamátu při nesaturujících koncentracích glycinu. NMDA receptory navíc vykazují  $\text{Ca}^{2+}$ -závislou inaktivaci. Ta se projevuje postupným snížením amplitudy proudových odpovědí během aplikace glutamátu v přítomnosti fyziologické nebo zvýšené koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Inaktivace NMDA receptorů vzniká v důsledku zvýšené intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , která mimo jiné způsobuje depolymeraci cytoskeletárních aktinových vláken (Rosenmund and Westbrook 1993; Vyklicky 1993).



**Obrázek 1.6: Proudové záznamy GluN1/GluN2 receptorů.**

(A) Proudový záznam jednoho NMDA receptoru plně obsazeného agonisty. Na záznamu jsou nejprve patrné rychlé přechody (RAA-O) následované přechodem do desenzitizovaného stavu (D) (upraveno dle (Murthy *et al.* 2012)). (B) Tonic aktivace NMDA receptorů z celé buňky vyvolaná 100  $\mu\text{M}$  NMDA po dobu 3 s. Po rychlém nástupu proudové odpovědi je patrný nástup desenzitizace. Záznam končí deaktivací receptorů způsobenou odmytím agonisty. (C) Fazická aktivace NMDA receptorů (1 mM glutamátu po dobu  $\sim 1$  ms), ke které dochází při synaptickém přenosu. Rychlý nástup odpovědi je okamžitě následován pomalou dvou-exponenciální deaktivací kinetikou. Proudové odpovědi byly naměřeny z HEK293 buněk transfekovaných GluN1/GluN2B podjednotkami.

Během excitačního přenosu v CNS savců dochází k uvolnění glutamátu z presynaptického zakončení, což má za následek krátkodobé zvýšení koncentrace glutamátu v synaptické štěrbině na  $\sim 1$  mM po dobu  $\sim 1$  ms (Clements *et al.* 1992).



Tato přechodně zvýšená koncentrace glutamátu aktivuje ionotropní glutamátové receptory na postsynaptické membráně, které vyvolají excitační postsynaptický proud (EPSC) složený z rychlé AMPA/kainátové složky a pomalé NMDA složky. Deaktivační fáze AMPA a NMDA složek EPSC se vyznačují rozdílnou kinetikou a jejich mechanismy se liší. V případě AMPA receptorů je rychlý pokles amplitudy odpovědi (časová konstanta řádově v jednotkách milisekund) způsoben velmi vysokou rychlostní konstantou vstupu do desenzitizace. V případě NMDA receptorů je pomalá deaktivační kinetika dána hlavně pomalým odvázaním glutamátu, a navíc je z části prodlužována postupnou resenzitizací receptorů (receptor musí nejprve přejít z (D) do (RAA) a až poté může dojít k disociaci agonistů; Obrázek 1.5). Časová konstanta deaktivační fáze NMDA receptorů je závislá na typu GluN2 podjednotky a dosahuje desítek až stovek milisekund (Vicini *et al.* 1998).

Iontové kanály NMDA receptorů jsou propustné pro  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ . Jejich jednotková vodivost závisí na podjednotkovém složení a řadě dalších faktorů. Navíc i receptory daného podjednotkového složení vykazují více vodivostních podstavů. U NMDA receptorů byly pozorovány jednotkové vodivosti od 20 do 70 pS. Nejčtenější jednotková vodivost u rekombinantních GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů se pohybuje okolo 50 pS s méně častými vodivostními podstavami okolo 40 pS. V případě GluN1/GluN2C a GluN1/GluN2D receptorů se jednotková vodivost pohybuje okolo 30 pS s méně častými vodivostními podstavami okolo 20 pS (Stern *et al.* 1992; Abdrachmanova *et al.* 2000; Abdrachmanova *et al.* 2001; Green and Gibb 2001).

## 1.5 Farmakologie NMDA receptorů

Aktivita NMDA receptorů je modulována celou řadou endogenních i exogenních látek. Na základě mechanismu jejich působení je dělíme na agonisty a antagonisty. Antagonisté NMDA receptorů se rozdělují do tří základních skupin: kompetitivní antagonisté, blokátory otevřeného kanálu a nekompetitivní antagonisté.

Na rozdíl od ostatních glutamátových receptorů je pro aktivaci NMDA receptorů nezbytné současné obsazení glutamátových a glycinových vazebných míst. Fyziologickým agonistou glutamátového vazebného místa na GluN2 podjednotce je kromě L-glutamátu i L-aspartát (Patneau and Mayer 1990). Při experimentech na rekombinantních receptorech GluN1-1a/GluN2A-D bylo ukázáno, že hodnota  $EC_{50}$

pro glutamát je postupně: 1.7, 0.8, 0.7 a 0.4  $\mu\text{M}$  (Kutsuwada *et al.* 1992; Ishii *et al.* 1993). Fyziologickým agonistou glycinového vazebného místa na GluN1 podjednotce je kromě glycinu i D-serin (Clements and Westbrook 1991). Hodnoty  $EC_{50}$  pro glycin na rekombinantních receptorech GluN1-1a/GluN2A-D byly stanoveny na: 2.1, 0.3, 0.2 a 0.1  $\mu\text{M}$  (Kutsuwada *et al.* 1992; Ishii *et al.* 1993). V nedávné době bylo ukázáno, že synaptické receptory jsou za fyziologických podmínek v mozku aktivovány především D-serinem na rozdíl od extrasynaptických, které jsou aktivovány především glycinem (Papouin *et al.* 2012).

Vzhledem k tomu, že GluN3 podjednotka je glycin vázající, jsou receptory složené pouze z GluN1 a GluN3 podjednotek aktivovány pouze glycinem (Chatterton *et al.* 2002)). Kromě této unikátní vlastnosti se od klasických GluN1/GluN2 NMDA receptorů liší i nízkou propustností pro  $\text{Ca}^{2+}$  (Smothers and Woodward 2009).

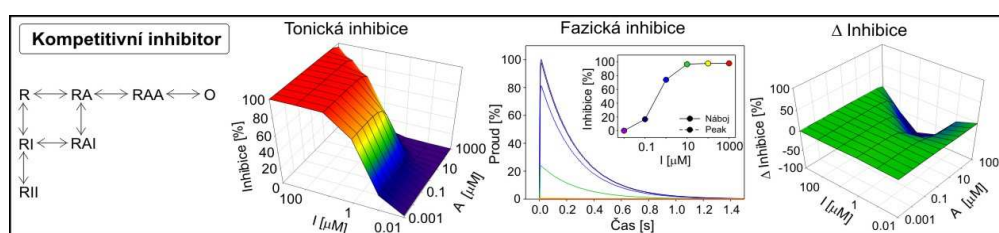
Vývoj nových látek s modulačním účinkem na NMDA receptory vede k hlubšímu porozumění funkcí tohoto receptoru, k detailnímu pochopení jeho fyziologické úlohy a v neposlední řadě jsou nově navržené látky potenciálním nástrojem k léčbě závažných neurologických a psychiatrických onemocnění. Největší překážkou v rozšíření nových léčiv založených na negativní modulaci NMDA receptorů do klinické praxe, jsou jejich závažné vedlejší účinky způsobené narušením normální funkce synaptických NMDA receptorů. Klíčem k překonání této překážky by mohl být rozdílný způsob aktivace NMDA receptorů během synaptického přenosu (fazická aktivace) za fyziologických podmínek a za patologických podmínek, kdy dochází k dlouhodobému zvýšení extracelulární koncentrace glutamátu (tonická aktivace). Tato patologická aktivace doprovází řadu akutních i chronických patologických stavů. Bylo by proto přínosné najít takového antagonistu, který by zabránil dlouhodobé aktivaci NMDA receptorů, ale současně by neovlivnil krátkodobou aktivaci provázející synaptický přenos.

### **1.5.1 Kompetitivní antagonisté**

Kompetitivní antagonisté NMDA receptoru se váží do glutamátového nebo glycinového vazebného místa, receptor neaktivují, ale naopak brání agonistům ve vazbě a aktivaci tohoto receptoru (kompetují o vazebné místo). Pro tento typ antagonismu je typické, že účinek kompetitivních antagonistů klesá s rostoucí koncentrací agonisty. Mezi typické kompetitivní antagonisty glutamátového

vazebného místa patří D-2-amino-5-fosfovalerová kyselina (D-APV) (Davies *et al.* 1982). V případě glycinového vazebného místa je jeho typickým selektivním kompetitivním antagonistou derivát kyseliny kynurenové: 5,7-dichlorokynurenová kyselina (KYNA) (Kemp *et al.* 1988; Leeson *et al.* 1991).

Simulace vlivu kompetitivního antagonisty glutamátového vazebného místa na rozdílně aktivované NMDA receptory ukázala, že v jeho přítomnosti budou fazicky aktivované receptory inhibovány více než tonicky aktivované receptory (viz Obrázek 1.7).



**Obrázek 1.7: Simulace míry inhibice vyvolané kompetitivním antagonistou glutamátového vazebného místa pro tonicky a fazicky aktivované NMDA receptory.**

Vlevo je kinetické schéma působení kompetitivního antagonisty  $I$  na NMDA receptor (desenzitizovaný stav zde není uvažován, viz Obrázek 1.5). Míra tonické inhibice je zde vynesena v závislosti na koncentraci glutamátu  $A$  působícího při tonické aktivaci a na koncentraci antagonisty  $I$ . Fazická inhibice je zde znázorněna jako časová závislost proudové odpovědi NMDA receptorů aktivovaných 1 mM glutamátu po dobu 5 ms v trvalé přítomnosti různé koncentrace inhibitoru  $I$  (inhibitor je i preaplikován). Vynesena je rovněž závislost míry inhibice fazicky aktivovaných receptorů na koncentraci antagonisty počítané jako inhibice amplitudy proudové odpovědi (Peak) i jako inhibice přeneseného náboje (Náboj) (zde se obě křivky překrývají).  $\Delta$  Inhibice = Tonická inhibice - Fazická inhibice: udává rozdíl v míře tonicky aktivovaných receptorů a receptorů aktivovaných fazicky. Míra inhibice fazicky aktivovaných receptorů je zde brána jako míra inhibice jejich amplitudy. (Pro detaily a rychlostní konstanty viz (Vyklicky *et al.* 2014)).

### 1.5.2 Blokátory otevřeného kanálu

Blokátory otevřeného kanálu se váží do póru iontového kanálu a brání tím vtoku iontů do buňky. Tyto blokátory jsou kladně nabitě látky jen o málo větší než je ústí selektivního filtru iontového kanálu (Woodhull 1973; Sobolevskii and Khodorov 2002). Chovají se jako akompetitivní (jinak též „use-dependentní“) antagonisté, a tudíž působí jen na receptory, které byly předem aktivovány agonisty (Rogawski 1993). Vzhledem k tomu, že jejich vazebné místo se nachází v póru iontového kanálu, působí na tyto látky při nenulovém membránovém potenciálu síla, která

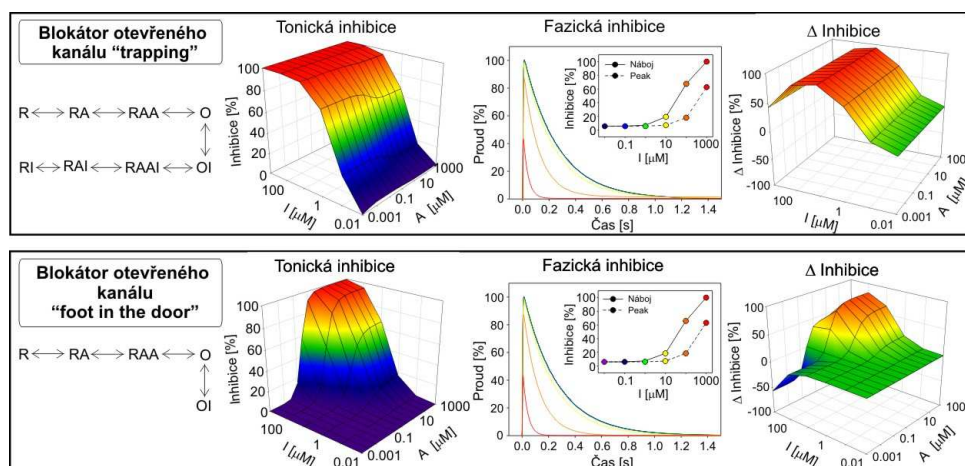
vzniká v důsledku transmembránového elektrického pole, a jejich vazba je tudíž napěťově závislá.

Nejdůležitějším endogenním blokátorem otevřeného kanálu NMDA receptorů jsou hořčnaté ionty ( $Mg^{2+}$ ). Za přirozených podmínek jsou NMDA receptory napěťově závislým způsobem blokovány fyziologickou koncentrací  $Mg^{2+}$  (~1 mM), přičemž po depolarizaci buňky je tento blok uvolněn (Evans *et al.* 1977; Nowak *et al.* 1984; Ascher and Nowak 1988). Z fyziologického hlediska hraje tato blokáda otevřeného kanálu zásadní roli. K uvolnění  $Mg^{2+}$  bloku může dojít např. až při depolarizaci postsynaptické buňky vyvolané aktivací dostatečného počtu AMPA/kainátových receptorů v krátkém časovém rozmezí. NMDA receptory tedy za fyziologických podmínek fungují jako koincidenční detektory a jsou nezbytnými prvky Hebbianovy teorie učení, kterou dnes vysvětlujeme mechanismus synaptické plasticity (Hebb 2002).

Kromě  $Mg^{2+}$  existuje celá řada uměle syntetizovaných látek schopných blokovat otevřený iontový kanál NMDA receptorů jako například fencyklidin, MK-801, ketamin nebo memantin (pro přehled viz (Traynelis *et al.* 2010)). Vzhledem k výrazným psychomimetickým účinkům většiny těchto látek je jejich farmakologické využití limitované. Kromě ketaminu, který se i přes jeho vedlejší účinky využívá jako anestetikum u zvířat a dětí, se dále využívá jen memantin, jehož podání nezpůsobuje závažnější vedlejší účinky a je schválen pro léčbu Alzheimerovy choroby (Lipton 1993).

Blokátory otevřeného kanálu můžeme rozdělit na blokátory typu „trapping“ a „foot in the door“. Blokátory typu „trapping“, jehož představitelem je např.  $Mg^{2+}$ , jsou rozměrově menší a váží se hluboko v póru iontového kanálu. Tyto blokátory mohou své vazebné místo okupovat i ve stavu zavřeného kanálu, a tudíž je pro jejich odváznání nutné, aby byl receptor plně aktivován agonisty (jejich odváznání je „use-dependentní“). Druhou skupinou blokátorů jsou blokátory „foot in the door“ typu, které se vyznačují většími rozměry než blokátory typu „trapping“. „Foot in the door“ blokátory se proto neváží tak hluboko do iontového kanálu a svoji vazbou fyzicky brání zavření iontového kanálu a následnému odváznání agonistů z jejich vazebných míst. Proto je jejich odváznání „use-independentní“ (jejich typickým představitelem je např. 9-aminoakridin). (Blanpied *et al.* 1997; Sobolevsky *et al.* 1999; Sobolevskii and Khodorov 2002)

Simulace chování obou typů blokátorů otevřeného kanálu na rozdílně aktivované NMDA receptory ukázala, že v jejich přítomnosti mohou být fazicky aktivované receptory inhibovány v menší míře než tonicky aktivované receptory (viz Obrázek 1.8).



**Obrázek 1.8: Simulace míry inhibice vyvolané blokátory otevřeného kanálu („trapping“ i „foot in the door“ typu) pro tonicky a fazicky aktivované NMDA receptory.**

Vlevo je vždy kinetické schéma působení daného typu blokátoru otevřeného kanálu  $I$  na NMDA receptor (desenzitizovaný stav zde není uvažován, viz Obrázek 1.5). Míra tonické inhibice je zde vynesena v závislosti na koncentraci glutamátu  $A$  působícího při tonické aktivaci a na koncentraci antagonisty  $I$ . Fazická inhibice je zde znázorněna jako časová závislost proudové odpovědi NMDA receptorů aktivovaných 1 mM glutamátu po dobu 5 ms v trvalé přítomnosti různé koncentrace inhibitoru  $I$  (inhibitor je i preaplikován). Vynesena je rovněž závislost míry inhibice fazicky aktivovaných receptorů na koncentraci blokátoru počítané jako inhibice amplitudy proudové odpovědi (Peak) i jako inhibice přeneseného náboje (Náboj).  $\Delta$  Inhibice = Tonická inhibice - Fazická inhibice: udává rozdíl v míře tonicky aktivovaných receptorů a receptorů aktivovaných fazicky. Míra inhibice fazicky aktivovaných receptorů je zde brána jako míra inhibice jejich amplitudy. (Pro detaily a rychlostní konstanty viz (Vyklícky *et al.* 2014)).

### 1.5.3 Allosterické modulátory

Nekompetitivní antagonisté jsou látky, které jsou schopné snižovat aktivitu NMDA receptorů, ale jejich vazebné místo není ve vazebném místě pro glutamát či glycin a ani v póru iontového kanálu.

### $Zn^{2+}$

Některé kationty jsou schopné inhibovat odpovědi NMDA receptorů napětově nezávislým způsobem, a tudíž jejich účinek není vyvolán blokadou

otevřeného kanálu. Mezi takové ionty patří např.  $Zn^{2+}$ . Ten je uvolňován během synaptického přenosu a může v synaptické stěrbině dosahovat koncentrací dostatečných pro modulování aktivity NMDA receptorů (Assaf and Chung 1984; Forsythe *et al.* 1988; Mayer and Vyklicky 1989). Analýzou záznamů aktivity jednotlivých NMDA receptorů bylo ukázáno, že  $Zn^{2+}$  snižuje frekvenci i průměrnou dobu otevření receptorů (Legendre and Westbrook 1990), přičemž receptory obsahující GluN2A podjednotku vykazují vůči  $Zn^{2+}$  zvýšenou citlivost (Paoletti *et al.* 1997). Ze studií vyplývá, že vazebné místo pro  $Zn^{2+}$  se nachází v ATD GluN2 podjednotek (Gielen *et al.* 2009).

### ***Protony***

Elektrofyzilogická měření prokázala, že aktivita NMDA receptorů je modulována koncentrací protonů v extracelulárním prostředí, přičemž tento efekt není dán protonací či deprotonací agonistů (Traynelis and Cull Candy 1990; Vyklicky *et al.* 1990b). Koncentrace protonů v extracelulárním prostoru CNS není konstantní. Zvýšená synaptická aktivita významně snižuje hodnoty pH v okolí synapsí (Kraig *et al.* 1983; Krishtal *et al.* 1987) a hyperventilace může tyto hodnoty naopak zvýšit (Balestrino and Somjen 1988). Bylo ukázáno, že  $IC_{50}$  pro protony je blízké fyziologickému pH, přičemž snížení hodnot pH má za následek snížení frekvence otevírání NMDA receptorů (Traynelis and Cull Candy 1991). Pomocí mutagenese NMDA receptorů byla v blízkosti vnějšího ústí póru v LBD identifikována rezidua zodpovědná za citlivost receptoru vůči protonům (Low *et al.* 2003).

### ***Polyaminy***

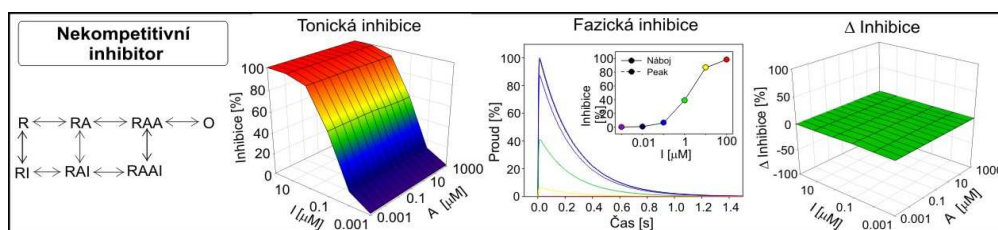
Polyaminy, jako spermin či spermidin, jsou alifatické aminy vyskytující se v CNS jako přirozené metabolity v poměrně vysokých koncentracích. Bylo zjištěno, že spermin moduluje odpovědi NMDA receptorů v závislosti na jejich podjednotkovém složení. Nízké koncentrace extracelulárně aplikovaného sperminu potencují odpovědi NMDA receptorů glycin-závislým a glycin nezávislým mechanismem (Williams 1994). Glycin závislá potenciace je důsledkem zvýšené afinity glycinu vůči GluN1/GluN2A-B receptorům. Glycin-nezávislou potenciaci můžeme pozorovat i při saturujících koncentracích glycinu, ale pouze v případě

GluN1/GluN2B receptorů (Ransom and Deschenes 1990; Durand *et al.* 1993). V případě vysokých koncentrací extracelulárního nebo intracelulárního sperminu můžeme pozorovat navíc i napětově závislou inhibici GluN1/GluN2A-B receptorů (Benveniste and Mayer 1993).

### ***Ifenprodil***

Přestože většina NMDA antagonistů vykazuje určitou míru podjednotkově selektivního působení, nebývá tato selektivita příliš výrazná a proto nelze tyto látky využít jako selektivní antagonisty schopné blokovat pouze daný podjednotkový typ receptoru. Prvním objeveným selektivním antagonistou receptorů obsahujících GluN2B podjednotku byl ifenprodil. Afinita ifenprodilu vůči GluN1/GluN2B receptorům je přibližně 400-krát vyšší ( $IC_{50} = 0.34 \mu\text{M}$ ) než vůči GluN1/GluN2A receptorům ( $IC_{50} = 146 \mu\text{M}$ ), přičemž GluN1/GluN2C-D receptory jsou k nízkým koncentracím ifenprodilu necitlivé (Williams 1993). Vazebné místo pro ifenprodil bylo identifikováno na ATD GluN2 podjednotky (Perin-Dureau *et al.* 2002).

Simulace působení nekompetitivního antagonisty, jehož zástupcem je ifenprodil, na tonicky a fazicky aktivované NMDA receptory ukázala, že v jeho přítomnosti budou fazicky aktivované receptory inhibovány ve stejné míře jako tonicky aktivované receptory (viz Obrázek 1.9)



**Obrázek 1.9: Simulace míry inhibice vyvolané nekompetitivním antagonistou pro tonicky a fazicky aktivované NMDA receptory.**

Vlevo je kinetické schéma působení nekompetitivního antagonisty  $I$  na NMDA receptor (desenzitizovaný stav zde není uvažován, viz Obrázek 1.5). Míra tonické inhibice je zde vynesena v závislosti na koncentraci glutamátu  $A$  působícího při tonické aktivaci a na koncentraci antagonisty  $I$ . Fazická inhibice je zde znázorněna jako časová závislost proudové odpovědi NMDA receptorů aktivovaných 1 mM glutamátu po dobu 5 ms v trvalé přítomnosti různé koncentrace inhibitoru  $I$  (inhibitor je i preaplikován). Vynesena je rovněž závislost míry inhibice fazicky aktivovaných receptorů na koncentraci antagonisty počítané jako inhibice amplitudy proudové odpovědi (Peak) i jako inhibice přeneseného náboje (Náboj).  $\Delta$  Inhibice = Tonická inhibice - Fazická inhibice: udává rozdíl v míře tonicky aktivovaných receptorů a receptorů aktivovaných fazicky. Míra inhibice fazicky aktivovaných receptorů je zde brána jako míra inhibice jejich amplitudy. (Pro detaily a rychlostní konstanty viz (Vyklicky *et al.* 2014)).

## 1.6 Neurosteroidy

### 1.6.1 Syntéza neurosteroidů

Neurosteroidy jsou  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$  deriváty syntetizované *de novo* v CNS z cholesterolu nebo z prekurzorů steroidních látek pocházejících z periferních zdrojů (Corpechot *et al.* 1981; Baulieu 1998). Prvním krokem syntézy neurosteroidů je konverze cholesterolu na pregnenolon. Cholesterol je nejprve transportován steroidogenním akutním regulačním proteinem do mitochondrií, kde cytochrom P450<sub>scc</sub> štěpí boční řetězec cholesterolu, čímž vzniká pregnenolon. Ten může být dále transportován do endoplazmatického retikula, kde P450 17 $\alpha$ -hydroxyláza katalyzuje jeho přeměnu na dehydroepiandrosteron. Hydroxysteroidové sulfotransferázy katalyzují vznik dvou forem neurosteroidů: pregnenolon sulfátu a dehydroepiandrosteron sulfátu. Z pregnenolonu mohou dále vznikat další neurosteroidní látky jako progesteron nebo pregnanolon sulfát (pro přehled viz (Kawato *et al.* 2003)).

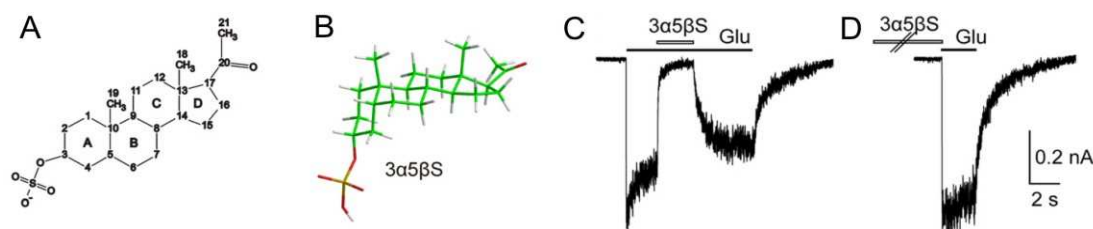
### 1.6.2 Efekt neurosteroidů v CNS

Neurosteroidy jsou neuroaktivní látky, které v CNS působí na celou řadu cílů. Mezi tyto cíle patří i řada ionotropních receptorů. Kromě glutamátových receptorů se jedná rovněž o GABA, nikotinové nebo glycinové receptory (Gee *et al.* 1988; Wu *et al.* 1990; Wu *et al.* 1991; Bullock *et al.* 1997). Výsledky elektrofyziologických studií ukazují, že v závislosti na struktuře steroidu mohou mít tyto látky na ionotropních receptorech negativní či pozitivní modulační účinek, který má důsledky pro regulaci řady fyziologických a patofyziologických procesů (Flood and Roberts 1988; Nasman *et al.* 1991; Grobin *et al.* 1992; Reddy 2010). Aktivita NMDA receptorů je významně ovlivněna dvěma sulfatovanými steroidy s podobnou strukturou, které se přirozeně vyskytují v savčím mozku (Corpechot *et al.* 1983). Pregnanolon sulfát (3 $\alpha$ 5 $\beta$ S; 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát) NMDA receptory inhibuje, zatímco pregnenolon sulfát (20-oxo-5- $\beta$ -pregnen-3- $\alpha$ -yl sulfát) odpovědi potencuje (Park-Chung *et al.* 1994; Park-Chung *et al.* 1999; Horak *et al.* 2004; Petrovic *et al.* 2005).

Místo kde 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S na NMDA receptorech působí je odlišné od vazebného místa pro agonisty glycin a glutamát (Park-Chung *et al.* 1997). Kinetická analýza ukazuje, že efekt 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S je závislý na předchozí aktivaci receptoru glutamátem a je

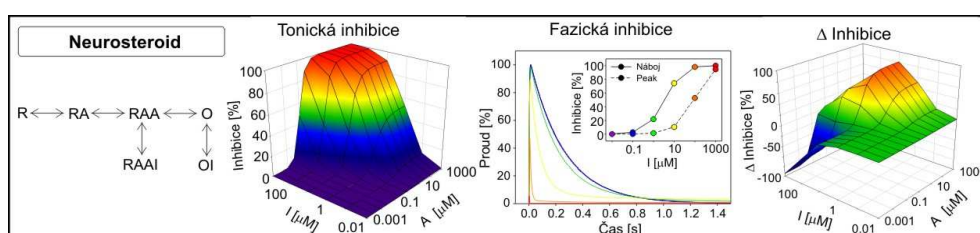


tedy „use-dependentní“ (Obrázek 1.10). Vzhledem k tomu, že tato inhibice je napěťově nezávislá, nejedná se o klasický blokátor otevřeného kanálu. Ostatně tomuto způsobu blokady nenasvědčuje ani trvalý záporný náboj této molekuly nesený sulfátovou skupinou na uhlíku číslo tři (C3).



**Obrázek 1.10: Struktura a modulační účinek pregnanolon sulfátu (3α5βS).** (A) Strukturní vzorec 3α5βS. (B) Prostorová struktura 3α5βS. (C) Inhibiční účinek 300 μM 3α5βS na rekombinantních GluN1-1a/GluN2B receptorech aktivovaných 1 mM glutamátem. (D) Preaplikace 300 μM 3α5βS před samotnou aplikací 1 mM glutamátu nemá na průběh nástupu glutamátové odpovědi žádný vliv. To ukazuje, že pro vazbu 3α5βS je nezbytná předchozí aktivace receptoru a jeho účinek je tedy „use-dependentní“.

Simulace chování neurosteroidu, s využitím kinetického schématu jeho působení na rozdílně aktivované NMDA receptory, publikovaném v (Petrovic *et al.* 2005) na rozdílně aktivované NMDA receptory ukázala, že v jejich přítomnosti budou fazicky aktivované receptory inhibovány v menší míře než tonicky aktivované receptory (viz Obrázek 1.11)



**Obrázek 1.11: Simulace míry inhibice vyvolané neurosteroidy pro tonicky a fazicky aktivované NMDA receptory.**

Vlevo je kinetické schéma působení neurosteroidu  $I$  na NMDA receptor (desenzitizovaný stav zde není uvažován, viz Obrázek 1.5). Míra tonické inhibice je zde vynesena v závislosti na koncentraci glutamátu  $A$  působícího při tonické aktivaci a na koncentraci antagonisty  $I$ . Fazická inhibice je zde znázorněna jako časová závislost proudové odpovědi NMDA receptorů aktivovaných 1 mM glutamátu po dobu 5 ms v trvalé přítomnosti různé koncentrace inhibitoru  $I$  (inhibitor je i preaplikován). Vynesena je rovněž závislost míry inhibice fazicky aktivovaných receptorů na koncentraci antagonisty počítané jako inhibice amplitudy proudové odpovědi (Peak) i jako inhibice přeneseného náboje (Náboj).  $\Delta$  Inhibice = Tonická inhibice - Fazická inhibice: udává rozdíl v míře tonicky aktivovaných receptorů a receptorů aktivovaných fazicky. Míra inhibice fazicky aktivovaných receptorů je zde brána jako míra inhibice jejich amplitudy. (Pro detaily a rychlostní konstanty viz (Vyklícky *et al.* 2014)).

### **1.6.3 Vazebné místo inhibičních neurosteroidů na NMDA receptoru**

Předchozí farmakologické studie poskytují silnou podporu pro existenci specifického vazebného místa pro inhibiční neurosteroidy na NMDA receptoru, avšak přesná identifikace tohoto místa se zatím nepodařila. (Park-Chung *et al.* 1997; Abdrachmanova *et al.* 2001; Petrovic *et al.* 2005).

V elektrofyziologických experimentech, kde byl  $3\alpha5\beta S$  aplikován buď intracelulárně nebo extracelulárně (vzhledem ke svému trvalému náboji  $3\alpha5\beta S$  neprochází skrze cytoplazmatickou membránu buněk), bylo zjištěno, že  $3\alpha5\beta S$  působí výhradně z extracelulární strany cytoplazmatické membrány, tudíž se vazebné místo může nacházet v transmembránové oblasti receptoru po úroveň vnějšího listu cytoplazmatické membrány, v LBD nebo v ATD. Inhibiční působení  $3\alpha5\beta S$  vykazuje mírnou selektivitu vůči různým GluN2 podjednotkám (hodnoty  $IC_{50}$  pro GluN2C/D (26  $\mu M$  a 30  $\mu M$ ) jsou přibližně dvakrát nižší než pro GluN2A/B podjednotky (50  $\mu M$  a 45  $\mu M$ ) (Petrovic *et al.* 2005)).

K vysvětlení efektů  $3\alpha5\beta S$  na sumární proudy z celé buňky i na jednotlivé kanály, byly navrženy dvě odlišná kinetická schémata působení  $3\alpha5\beta S$  na NMDA receptor. První publikovaný model předpokládal vazbu  $3\alpha5\beta S$  do stavů (RAA) a (O) (viz Obrázek 1.11), které následně převedl do inkativovaného stavu (Petrovic *et al.* 2005). Pozdější model navrhoval, že  $3\alpha5\beta S$  by mohl působit jako alosterický modulátor, jehož vazbou se zvyšuje rychlostní konstanta přechodu do desenzitizovaného stavu, čímž se snižuje počet receptorů ve vodivém stavu (Kussius *et al.* 2009). I když se obě schémata nevyklučují, bude potřeba dalších pokusů k jejich upřesnění.

### **1.6.4 Inhibiční neurosteroidy v behaviorálních pokusech**

Na základě inhibičního působení  $3\alpha5\beta S$  na NMDA receptorech byl vyvinut jeho syntetický analog pregnanolon-glutamát, který je na rozdíl od  $3\alpha5\beta S$  schopný přecházet přes hematoencefalickou bariéru. Na zvířecích modelech byl prokázán jeho neuroprotektivní účinek při ischemii a hipokampálních NMDA lezích (Rambousek *et al.* 2011; Kleteckova *et al.* 2014), i ve zvířecích modelech schizofrenie a deprese (Vales *et al.* 2012; Holubova *et al.* 2014). Na rozdíl od většiny ostatních NMDA antagonistů navíc jeho podání nezpůsobovalo nežádoucí psychomimetické účinky. Tyto výsledky ukazují na potenciálně slibné terapeutické

využití neurosteroidních analogů při léčbě širokého rozsahu patofyziologických stavů, u kterých se vyskytuje nadměrná aktivace NMDA receptorů.

## 2 CÍLE STUDIE

### 2.1 Vztah mezi strukturou $3\alpha5\beta\text{S}$ derivátů a jejich schopností modulovat NMDA receptory

#### Hypotéza:

Díky sulfátové skupině na uhlíku C3 steroidního jádra má přirozeně se vyskytující neurosteroid  $3\alpha5\beta\text{S}$  trvalý záporný náboj (viz Obrázek 1.10). Acetylová skupina na uhlíku číslo 17 (C17), je vedle sulfátové skupiny na C3, další významnou strukturální determinantou  $3\alpha5\beta\text{S}$ . Rozhodli jsme se testovat hypotézu, že záměna náboje na molekule  $3\alpha5\beta\text{S}$  ve smyslu velikosti, polarity nebo jeho vzdálenosti od uhlíku C3 nebo záměna acetylové skupiny na C17, může ovlivňovat schopnost těchto derivátů modulovat funkci NMDA receptorů.

#### Cíl:

Pomocí techniky terčíkového zámku na rekombinantních NMDA receptorech experimentálně určit hodnoty  $IC_{50}$  pro deriváty  $3\alpha5\beta\text{S}$ , lišící se chemickými skupinami vázanými na C3, které ponese rozdíl počet kladných a záporných nábojů v různých vzdálenostech od C3, a dále pro deriváty, které se liší funkčními skupinami vázanými na C17. Na základě získaných dat následně definovat klíčové strukturální determinanty ovlivňující schopnost těchto látek modulovat NMDA receptory.

### 2.2 Úloha interakce neuroaktivních steroidů s cytoplazmatickou membránou buněk při modulaci NMDA receptorů

#### Hypotéza:

V případě endogenních steroidních látek s přímým modulačním účinkem na GABA receptory bylo ukázáno, že je pro jejich působení nezbytné, aby se akumulovaly v cytoplazmatické membráně buněk (Akk *et al.* 2005). Na základě těchto skutečností lze usuzovat i na možný význam této interakce pro působení  $3\alpha5\beta\text{S}$  a jeho derivátů na NMDA receptory.

**Cíl:**

Pomocí elektrofyziologických technik ukázat, zda se interakce  $3\alpha5\beta\text{S}$  a jeho derivátů s cytoplazmatickou membránou buněk uplatňuje při jejich inhibičním působení na NMDA receptory.

### **2.3 Molekulární mechanismus působení neurosteroidů na NMDA receptory**

**Hypotéza:**

Některé výsledky naznačují, že vazebné místo pro  $3\alpha5\beta\text{S}$  na NMDA receptoru je přístupné pouze z extracelulární strany cytoplazmatické membrány (Park-Chung *et al.* 1997). Vzhledem k tomu, že  $3\alpha5\beta\text{S}$  neprochází přes cytoplazmatickou membránu a naše předchozí výsledky ukázaly na významnou roli cytoplazmatické membrány pro inhibiční působení  $3\alpha5\beta\text{S}$ , rozhodli jsme se testovat hypotézu, že vazebné místo pro  $3\alpha5\beta\text{S}$  na NMDA receptoru se nachází ve vnějším listu cytoplazmatické membrány nebo v blízkosti vnějšího povrchu cytoplazmatické membrány.

**Cíl:**

Pomocí elektrofyziologických experimentů na různých podtypech glutamátových receptorů a jejich mutovaných variantách lokalizovat vazebné místo  $3\alpha5\beta\text{S}$  na NMDA receptoru. Po vytipování možného vazebného místa vytvořit pomocí molekulárního modelování zatím neexistující model NMDA receptoru v otevřeném stavu, což je konformace receptoru schopná vázat  $3\alpha5\beta\text{S}$ . Na závěr pomocí dokovacích experimentů potvrdit výsledky předchozích experimentů.

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1. Chemikálie a roztoky

K přípravě všech roztoků byla použita deionizovaná voda přečištěná přístrojem Simplicity 185 (Millipore, Billerica, USA). Veškeré použité steroidní látky byly syntetizovány na oddělení Neuroprotektiv Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i. (Praha, Česká republika) a jejich čistota byla kontrolována pomocí nukleární magnetické rezonance, tenkovrstevné chromatografie a elementární analýzy. Pokud není uvedeno jinak, ostatní chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

#### **PBS**

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH upraveno pomocí NaOH na 7.3

#### **Versenův roztok**

0.2% trypsin a 0.02% ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EDTA) v PBS; pH = 7.3

#### **Transfekční médium**

Kultivačního médium Opti-MEM (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) navíc obsahovalo: 1% fetální bovinní sérum (PAN Biotech, Aidenbach, Německo), 1 mM D,L-2-amino-5-fosfovalerová kyselina, 3 mM kynurenová kyselina, 4.2  $\mu\text{M}$  ketamin a 20 mM  $\text{MgCl}_2$ .

#### **LB médium**

1% pepton (Serva, Heidelberg, Německo), 0.5% kvasničný extrakt (Serva) a 1% NaCl; rozpuštěno ve vodě a sterilizováno (20 min, 121 °C).

#### **Agarové plotny**

Ve vodě bylo rozpuštěno 40 g/l Nutrient agar N°2 (Biolife, Miláno, Itálie) a sterilizováno (15 min, 121 °C). Agar byl ochlazen na 50 °C a těsně před rozlitím do Petriho misek bylo pro selekci transformovaných bakterií přidáno antibiotikum.

### **Intracelulární roztok (ICS)**

Intracelulární roztok pro elektrofyziologická snímání NMDA receptorů obsahoval: 120 mM Cs-glukonát, 15 mM CsCl, 10 mM 1,2-bis(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (BAPTA), 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP (Mg<sup>2+</sup> sůl). pH bylo upraveno pomocí CsOH na hodnotu 7.2 a výsledná osmolarita roztoku byla 290 mOsm/l.

### **Extracelulární promývací roztok**

Extracelulární promývací roztok používaný pro perfuzi buněk mezi elektrofyziologickými snímáními a pro fluorescenční experimenty: 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glukóza, 10 mM HEPES; pH bylo upraveno na 7.3 pomocí NaOH a výsledná osmolarita byla 320 mOsm/l.

### **Extracelulární aplikační roztok (ECS)**

Extracelulární aplikační roztok používaný pro elektrofyziologická snímání NMDA receptorů obsahoval: 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM glukóza, 10 mM HEPES, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA; pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7.3 a výsledná osmolarita byla 320 mOsm/l.

### **ICS GluR0**

Intracelulární roztok pro elektrofyziologická snímání GluR0 receptoru obsahoval: 120 mM K-glukonát, 15 mM KCl, 10 mM BAPTA, 10 mM HEPES, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP (Mg<sup>2+</sup> sůl); pH bylo upraveno pomocí KOH na hodnotu 7.2 a výsledná osmolarita roztoku byla 290 mOsm/l.

### **ECS GluR0**

Extracelulární aplikační roztok používaný pro elektrofyziologická snímání GluR0 receptoru obsahoval: 162.5 mM KCl, 10 mM glukóza, 10 mM HEPES, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA; pH bylo upraveno pomocí KOH na hodnotu 7.3 a výsledná osmolarita byla 320 mOsm/l.

### **Redukovaný extracelulární aplikační roztok**

Redukovaný extracelulární aplikační roztok byl připraven 50 % zředěním ECS vodou, přičemž osmolarita byla upravena pomocí sacharózy na hodnotu původního ECS; pH=7.3.

Roztoky pro elektrofyziologická snímání byly přefiltrovány přes filtr o velikosti pórů 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Billerica, USA) a skladovány po alikvotech při -20 °C. Extracelulární roztoky byly v den měření ohřáté ve vodní lázni na 50°C, byly přidány agonisté NMDA receptorů glycin a glutamát (pokud není uvedeno jinak, standardně byla použita koncentrace 10  $\mu\text{M}$  glycinu a 1 mM glutamátu) a dále přidány steroidní látky z čerstvě namíchaných 20 mM zásobních roztoků v dimethylsulfoxidu (DMSO). Stejně množství DMSO, které bylo v roztocích obsahujících steroid, bylo přidáno i do všech ostatních aplikačních roztoků. Pro dokonalé rozpuštění steroidních látek bylo v některých případech nutné zásobní roztoky krátce sonikovat při 50 °C (Sonorex Digitec DT 100/H, Badelin electronic, Berlín, Německo).

### **3.1 cDNA klony**

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

GluN1 $\Delta\text{N}$  bez 354 aminokyselin v ATD (od 32 do 386)

GluN1-4a(F484A) (GenBank accession no. NP\_001257539) v pcDNA3

GluN2B (GenBank accession no. M91562) v RK7

GluN2B $\Delta\text{N}$  bez 354 aminokyselin v ATD (od 32 do 386)

GluN3A (GenBank accession no. Q9R1M7) v iGFP-N3

GluR0 (GenBank accession no. PCC 6803) v IRES-EGFP-pRK5

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

### **3.2 Tkáňové kultury a transfekce**

Jako expresní systém pro rekombinantní receptory bylo použito lidských embryonálních ledvinových buněk HEK293T (Human Embryonic Kidney cells; ATCC, USA). Buňky byly kultivovány v médiu Opti-MEM obohaceném o 5 % fetálního telecího séra (PAN Biotech, Aidenbach, Německo) v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Pro účely transfekce byly buňky nasazovány na kultivační destičky s 24 jamkami (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) (0.5 ml na jamičku) pokrytými kolagenem (SERVA, Heidelberg, Německo), tak aby v den transfekce dosahovaly 80-90 % konfluence.

Transfekce probíhala pomocí činidla MATra-A Reagent a silného neodymového magnetu (IBA GmbH, Göttingen, Německo) následujícím postupem:



do 50  $\mu$ l kultivačního média Opti-MEM bylo přidáno 0.9  $\mu$ l činidla MATra a celkově 0.9  $\mu$ g cDNA (po 0.3  $\mu$ g cDNA od každé jednotlivé NMDA podjednotky a navíc stejné množství cDNA kódující eGFP – k identifikaci úspěšně transfekovaných buněk). Tato směs byla ponechána 20 min při pokojové teplotě a následně přidána k buňkám v jamičce. Kultivační destička byla následně umístěna na 15 min na magnet v inkubátoru. Po transfekci byly buňky opláchnuty PBS a bylo k nim přidáno 200  $\mu$ l Versenova roztoku. Po uvolnění byly buňky nasazeny na plastové kultivační misky o průměru 35 mm, které měly na svém dně připravena krycí sklíčka o průměru 24 mm pokrytá kolagenem a poly-L-lysinem pro lepší adsorpci buněk. Jako médium bylo použito transfekčního média. Buňky byly použity k experimentům 24-48 hodin po transfekci.

### **Cílená mutageneze**

Záměny aminokyselin divokých typů podjednotek NMDA receptorů byly připraveny pomocí navržených mutačních primerů syntetizovaných na zakázku (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a PCR reakce v Thermo-cycleru (Eppendorf, Hamburg, Německo). Kromě primerů a DNA templátu byly všechny potřebné chemikálie součástí použitého kitu: QuikChange II XL Site-Directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Po ukončení PCR reakce byla templátová DNA naštěpena enzymem DpnI. Dle protokolu výše uvedeného kitu byly ultrakompetentní bakterie XL10-Gold transformovány 2  $\mu$ l PCR produktu metodou teplotního šoku (42 s při 45 °C). Buněčná suspenze byla nanášena na agarové Petriho misky obohacené ampicilinem (2  $\mu$ g/ml) nebo kanamycinem (50  $\mu$ g/ml) a ponechána přes noc v inkubátoru (37 °C). Narostlé kolonie byly zaočkovány do LB média s příslušným antibiotikem a za stálého třepání (200 rpm) při 37 °C byly kultivovány 16-20 hodin. Takto připravené bakteriální kultury byly připraveny pro izolaci plazmidové DNA. K izolaci byl použit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germantown, USA). DNA byla z kolonky eluována sterilní deionizovanou vodou ohřátou na 70 °C. Koncentrace získané DNA byla změřena na přístroji Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) a přítomnost mutace byla potvrzena sekvenací (Macrogen, Seoul, Jižní Korea).

### 3.3 Metoda terčíkového zámku („Patch clamp“)

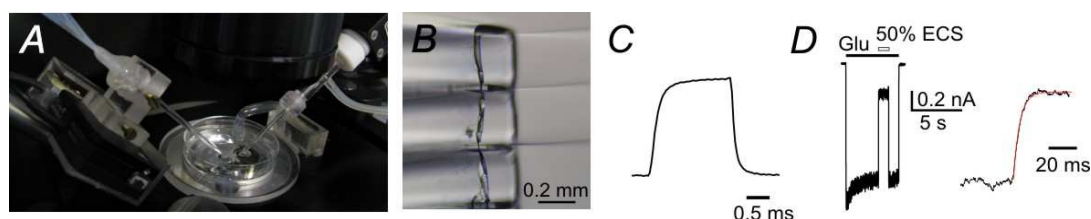
Pro měření proudových odpovědí vyvolaných aktivací NMDA receptorů exprimovaných v cytoplazmatické membráně HEK293T buněk, byla využita technika terčíkového zámku („patch clamp“) v konfiguraci snímání z celé buňky („whole cell“) (Hamill *et al.* 1981). Snímání probíhalo pomocí zesilovače Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) v režimu napětového zámku, kdy je membránový potenciál zpětnovazebně udržován na konstantní úrovni. Z analogového signálu byly pomocí osmipólového Besselova filtru odfiltrovány frekvence vyšší než 2 kHz a tento signál byl dále pomocí A/D převodníku Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) digitalizovány vzorkovací frekvencí 10 kHz a uschovány na pevném disku počítače za využití programu pClamp 10.2 od téže firmy. Pro snímání byly použity skleněné pipety o vnějším průměru 1.5 mm a vnitřním průměru 0.86 mm vytažené z borosilikátových kapilár (BioMedical Instruments, Zöllnitz, Německo) pomocí horizontálního tahače P-1000 (Sutter Instrument, Novato, USA). Po naplnění pipet ICS se jejich odpor pohyboval v rozmezí 3-5 M $\Omega$ . Přesné umístění snímací pipety vůči membráně buňky bylo zajištěno mikromanipulátorem MP-225 (Sutter Instrument, Novato, USA). Referenční elektroda a elektroda zajišťující elektrický kontakt mezi intracelulárním roztokem a zesilovačem tvořila Ag/AgCl elektroda. Mistička se snímanými buňkami byla elektricky propojena s mističkou naplněnou ECS a obsahující referenční elektrodu pomocí solného agarového můstku. Veškeré experimenty probíhaly při pokojové teplotě (23-25 °C) a membránový potenciál buněk, pokud není uvedeno jinak, byl udržován na -60 mV. Sériový odpor (< 10 M $\Omega$ ) byl u všech buněk kompenzován z 80-90 %. Z důvodu odstínění elektromagnetického rušení a vibrací byla aparatura obsahující invertovaný mikroskop Olympus CKX41 (Tokyo, Japonsko) umístěna na antivibrační stůl TMC (Technical Manufacturing Co., Peabody, USA), který byl uzavřen do Faradayovy klece.

Naměřená data byla analyzována pomocí programu Clampfit 10.2, který je součástí pClamp 10.2 a statisticky zpracována pomocí programů Sigma Plot 10 a Sigma Stat 3.5 (Systat Software Inc, San Jose, USA).

Pro aplikaci kontrolních a pokusných roztoků byl použit rychlý aplikační systém vyvinutý v naší laboratoři, který umožňuje aplikaci až deseti různých roztoků s časovou konstantou koncentračních změn aplikovaných látek v okolí snímané

buňky < 5 ms. Pomocí mikroprocesorové řídicí jednotky lze tímto systémem přesně řídit sekvenci a délku aplikace jednotlivých roztoků v okolí snímaných buněk. Původní systém (Vyklícky et al., 1990b, Dittert et al., 2006) byl dále vylepšen využitím super-rychlého piezo posuvu a borosilikátových trubiček s čtvercovým profilem, které zajišťují úzké a přesně definované rozhraní mezi roztoky.

Rychlost výměny roztoku byla určena pomocí změny difúzního potenciálu a pomocí výměny ECS za redukovaný ECS, který má za následek pokles proudu protékajícího NMDA kanály exprimovanými na membráně buněk (viz Obrázek 3.1).



**Obrázek 3.1: Aplikace roztoků.**

(A) Uspořádání elektrofyziologického experimentu. Piezo posuv s aplikačními trubičkami (vlevo) a měřící elektroda (vpravo) jsou umístěny naproti sobě a svírají s rovinou mikroskopického stolku úhel 45°. (B) Detail aplikačních trubiček vyrobených z borosilikátového skla. (C) Rychlost výměny roztoků měřená jako změna difúzního potenciálu mezi otevřenou měřící elektrodou naplněnou ICS a roztoky ECS s různou iontovou silou. Doba trvání aplikačního pulzu byla 2 ms, dobu nástupu 380  $\mu$ s a dobu poklesu 220  $\mu$ s (měřeno jako 10-90 %). (D) Rychlost aplikace měřená na HEK293T buňce transfekované GluN1-1a/GluN2B podjednotkami. Buňka byla při experimentu oddělena od podložky, aby bylo dosaženo maximální rychlosti výměny roztoku v okolí celé buňky. Aplikace ECS obsahujícího 1 mM glutamátu a 10  $\mu$ M glycinu byla přerušena aplikací ECS zředěného na 50 %. Časová konstanta nástupu redukovaného ECS (viz metody) byla  $\tau = 4.5$  ms (výřez). (Více též viz „Vyklícky V. et al., Analysis of whole-cell NMDA receptor responses. Modern iGluR technologies, Springer 2015“)

### Kapacitní měření

Pro určení rychlostních konstant vazby a odvazování steroidních látek do a z cytoplazmatické membrány buněk bylo využito rovněž metody terčíkového zámku v konfiguraci napětového zámku, ale s tím rozdílem že membránový potenciál netransfekovaných HEK293T buněk nebyl udržován na konstantní úrovni, ale docházelo v pravidelných intervalech k jeho opakovanému skokovému zvýšení a následnému návratu k původní hodnotě. Jednalo se o skoky z -60 mV na +30 mV a zpět na -60 mV na dobu 3 ms každých 5 ms. Vlivem vazby steroidních látek do cytoplazmatické membrány dochází ke změně její kapacity, což následně vede ke změnám v nabíjecích a vybíjecích proudech vznikajících v důsledku skokové změny membránového potenciálu. Vynesením integrálu těchto kapacitních proudů v čase

Ize určit časové konstanty interakce hydrofobních látek s membránou buněk (Mennerick *et al.* 2008).

### Simulace a statistické zpracování dat

Molekulární modelování bylo prováděno v programu Hyperchem 8 (Hypercube, Gainesville, FL, USA) s využitím silového pole MM+ ve vakuu.

Nelineární regrese byla prováděna v programu Clampfit 10.2 nebo Gnuplot 4.0 využitím Levenberg-Marquardtova algoritmu.

Míra desenzitizace  $D$  v procentech byla určena jako:

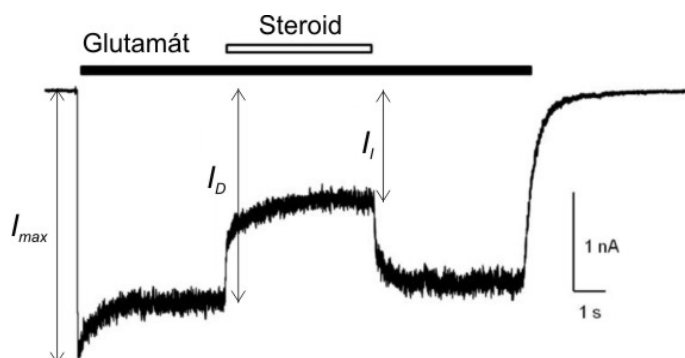
$$D = \left( 1 - \left( \frac{I_D}{I_{max}} \right) \right) \times 100, \quad (1)$$

kde  $I_{max}$  vyjadřuje maximální proudovou odpověď po začátku aplikace saturující koncentrace agonisty a  $I_D$  ustálený stav proudové odpovědi po nástupu desenzitizace.

Relativní účinná inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  je definována jako

$$IC_{50} = [steroid] \times_h \sqrt{\frac{1 - \left( \frac{I_I}{I_D} \right)}{\frac{I_I}{I_D}}}, \quad (2)$$

kde  $[steroid]$  značí použitou koncentraci steroidu,  $I_I$  vyjadřuje ustálený stav proudové odpovědi po nástupu inhibice vyvolané koaplikací agonisty a inhibičního neurosteroidu a  $h$  Hillův koeficient (viz Obrázek 3.2). Ten byl při určování hodnoty  $IC_{50}$  z jedné koncentrace fixován na 1.2 (Petrovic *et al.* 2005).



### Obrázek 3.2: Analýza inhibičního působení neurosteroidů na NMDA receptorech.

$I_{max}$  vyjadřuje maximální proudovou odpověď po začátku aplikace saturující koncentrace agonisty,  $I_D$  ustálený stav proudové odpovědi po nástupu desenzitizace, a  $I_I$  vyjadřuje ustálený stav proudové odpovědi po nástupu inhibice vyvolané koaplikací agonisty a inhibičního neurosteroidu.

Proudově-napěťová závislost odpovědí na aplikaci agonisty v přítomnosti neurosteroidů byla proložena Boltzmannovou funkcí ve tvaru:

$$I = \frac{a \times g_0 (V - V_{rev})}{a + e^{-bV} [\text{steroid}]}, \quad (3)$$

kde  $a$  a  $b$  jsou parametry s následující interpretací:

$$a = K_d \times e^{bV} \quad (4)$$

$$b = \frac{2\delta F}{RT} \quad (5)$$

Význam ostatních parametrů v rovnicích (3) až (5) je následující:  $I$  označuje proud,  $V$  membránový potenciál,  $V_{rev}$  reverzní potenciál,  $K_d$  rovnovážnou disociační konstantu,  $\delta$  vyjadřuje sílu pole působícího na napěťově závislý blokátor (může nabývat hodnot 0 až 1) a odpovídá relativní hloubce vazebného místa blokátoru v iontovém kanále,  $g_0$  vodivost,  $R$  univerzální plynovou konstantu,  $F$  Faradayovu konstantu a  $T$  termodynamickou teplotu.

Pro jednodušší porovnání časových konstant u průběhů popisovaných dvouexponenciální funkcí, bylo použito vážené časové konstanty  $\tau_w$  definované jako:

$$\tau_w = \tau_1 \frac{A_1}{A_1 + A_2} + \tau_2 \frac{A_2}{A_1 + A_2}, \quad (6)$$

kde  $\tau_1$  a  $\tau_2$  jsou časové konstanty jednotlivých exponenciál a  $A_1$ ,  $A_2$  jsou jejich amplitudy.

Prezentované výsledky jsou vyjádřené jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD) z počtu  $n$  buněk. K porovnání jednotlivých skupin dat byl použit Studentův t-test s hladinou významnosti  $p < 0.05$ .

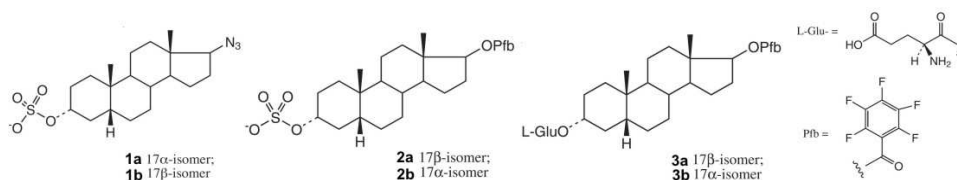
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Vztah mezi strukturou 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S derivátů a jejich schopností modulovat NMDA receptor

Každá biologicky aktivní látka vykazuje specifické strukturní determinanty, které jsou zásadní pro její farmakologický efekt na daném typu receptoru. Odhalení těchto determinant je nezbytné pro pochopení mechanismu účinku těchto látek a pro návrh nových analogů s příznivějšími farmakologickými účinky. Pro odhalení takových determinant, které jsou klíčové pro inhibiční účinek 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S na NMDA podtypu glutamátových receptorů, byla navržena řada 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S derivátů, které se liší od 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S substituenty na uhlících C3 a C17.

Výsledky uvedené v této kapitole, které se týkají C17 derivátů, jsou součástí dvou článků publikovaných v časopise *Steroids* (Vidrna *et al.* 2011; Cerny *et al.* 2012) a článku „New Class of Potent Inhibitors of NMDA Receptor: Sulfated Neurosteroids with Nonpolar Substituent on the D-ring“, který je v recenzním řízení. Výsledky týkající se C3 derivátů, jsou součástí publikace uveřejněné v časopise *British Journal of Pharmacology* (Borovska *et al.* 2012) a článku „Preferential inhibition of tonically over phasically activated NMDA receptors by pregnane derivatives“, který je v recenzním řízení. Publikované články jsou součástí příloh.

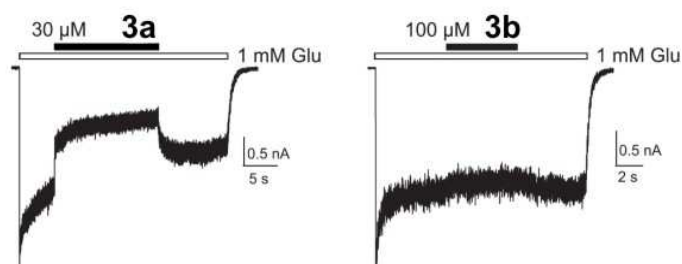
. První skupinu testovaných látek tvořily deriváty 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S substituované na C17 azidem a perfluorobenzoátem. Perfluorované benzoáty byly navíc připraveny ve variantě, kde na C3 byl sulfát nahrazen kyselinou glutamovou. Každý ze tří derivátů byl připraven v obou čistých izomerních formách substituentů na C17 ( $\alpha$  a  $\beta$ ). Struktury těchto látek jsou uvedené na Obrázek 4.1



**Obrázek 4.1: Struktura 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S derivátů substituovaných na C17 azidovou nebo perfluorobenzoátovou funkční skupinou a na C3 kyselinou glutamovou.**

Analýzou inhibičního působení C17 derivátů na rekombinantních GluN1-1a/GluN2B receptorech aktivovaných 10  $\mu\text{M}$  glycinem a 1 mM glutamátem byly určeny jejich hodnoty  $IC_{50}$  a porovnány s hodnotou  $IC_{50}$  pro 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S ( $31.1 \pm 5.9$   $\mu\text{M}$ ).

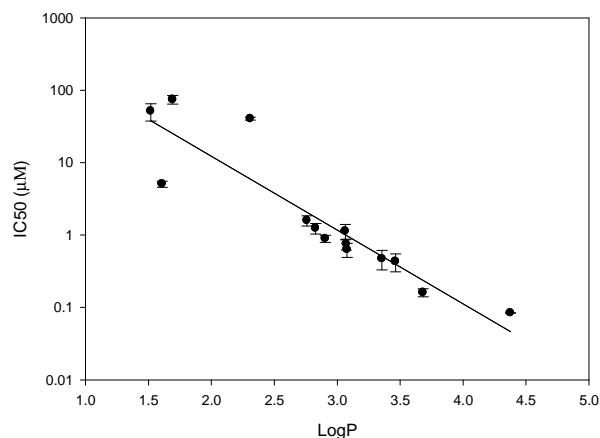
Substituce různých funkčních skupin na C17 zvyšovala i snižovala hodnoty  $IC_{50}$ . Zatímco v případě C17 azido derivátů (**1a** a **1b** viz Obrázek 4.1) se hodnoty  $IC_{50}$  pro oba izomery v rámci chyby nelišily: ( $2.4 \pm 0.5$ )  $\mu\text{M}$  pro  $\alpha$  izomer a ( $2.7 \pm 1.0$ )  $\mu\text{M}$  pro  $\beta$  izomer, tak v případě C17 perfluorbenzoátů se ukázalo, že stereospecificita NMDA receptorů je vůči těmto látkám velmi vysoká. Pro perfluorbenzoáty se sulfátovou skupinou na C3 (**2a** a **2b** viz Obrázek 4.1) byly naměřeny hodnoty  $IC_{50}$ : ( $3.7 \pm 0.8$ )  $\mu\text{M}$  pro  $\alpha$  izomer a ( $37.3 \pm 3.5$ )  $\mu\text{M}$  pro  $\beta$  izomer. Pro perfluorbenzoáty s kyselinou glutamovou na C3 (**3a** a **3b** viz Obrázek 4.1) byl rozdíl v hodnotách  $IC_{50}$  mezi oběma izomery nejvýraznější: ( $44 \pm 12$ )  $\mu\text{M}$  pro  $\alpha$  izomer a ( $1580 \pm 1105$ )  $\mu\text{M}$  pro  $\beta$  izomer (viz Obrázek 4.2).



**Obrázek 4.2: Inhibice proudových odpovědí rekombinantních GluN1-1a/GluN2B receptorů deriváty 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S substituovanými na C17 perfluorbenzoátem a kyselinou glutamovou na C3.**

Během aktivace NMDA receptorů 10  $\mu\text{M}$  glycinem a 1 mM glutamátem (znázorněno bílou čarou nad záznamy), byl v případě prvního záznamu aplikován 30  $\mu\text{M}$   $\alpha$  izomer a u druhého záznamu 100  $\mu\text{M}$   $\beta$  izomer (struktura obou izomerů **3a** a **3b** je uvedena na Obrázek 4.1).  $\alpha$  izomer na rozdíl od  $\beta$  izomeru vyvolal inhibici proudových odpovědí NMDA receptorů. Délka aplikace obou derivátů je znázorněna černou čarou.

Abychom ukázali, zda na snížení hodnoty  $IC_{50}$  může mít vliv zvýšení hydrofobicity těchto derivátů, naměřili jsme hodnoty  $IC_{50}$  pro řadu C17 derivátů lišících se hydrofobicitou v širokém rozsahu hodnot ( $\log P = 1.5$  až  $4.5$ ).  $\log P$  udává poměr mezi koncentrací látky rozpuštěné v oktanolu a ve vodě po ustanovení rovnováhy této nemísitelné směsi. Závislost  $IC_{50}$  na  $\log P$  je znázorněna na Obrázek 4.3. Proložení této závislosti lineární funkcí vyšla hodnota korelačního koeficientu  $R^2 = 0.8$ . Nejvíce hydrofobní derivát substituovaný na C17 2-butylem byl rovněž i nejvíce potentním derivátem s  $IC_{50} = (84 \pm 1)$  nM.



**Obrázek 4.3: Závislost  $IC_{50}$  na logP C17 derivátů.** Závislost je proložena lineární funkcí ( $R^2 = 0.8$ ).

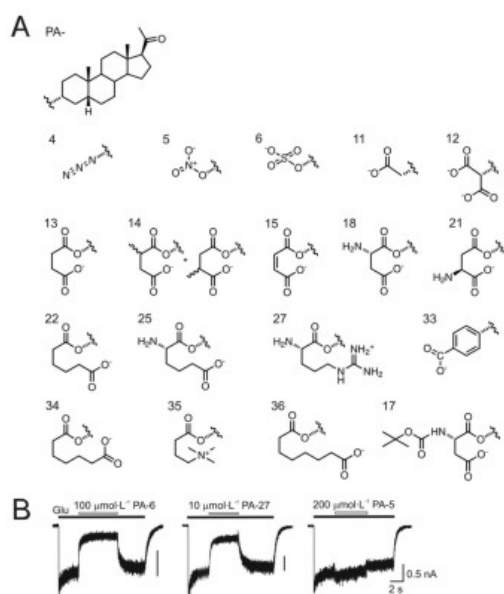
Další skupinu testovaných látek tvořily deriváty  $3\alpha5\beta S$  substituované na C3. Struktura a označení těchto derivátů je znázorněna na Obrázek 4.4. Výsledné hodnoty  $IC_{50}$  jejich inhibičního účinku na proudové odpovědi rekombinantních GluN1-1a/GluN2B receptorů aktivovaných 10  $\mu M$  glycinem a 100  $\mu M$  glutamátem jsou uvedeny v Tabulka 1.

Z uvedených výsledků je patrné, že pro inhibiční působení  $3\alpha5\beta S$  na NMDA receptorech je náboj na C3 klíčový. U dvou různých testovaných látek s celkově nulovým nábojem na C3 (PA-4 a PA-5, viz Obrázek 4.4), byla zásadním způsobem narušena schopnost inhibovat NMDA receptory (viz Tabulka 1).

Pokud byl ovšem záporný náboj nesený sulfátovou skupinou u  $3\alpha5\beta S$  nahrazen kladným nábojem (deriváty PA-27 a PA-35), potence těchto látek inhibovat NMDA receptory výrazně stoupla. Zatímco  $IC_{50}$  pro  $3\alpha5\beta S$  je  $(31.1 \pm 5.9) \mu M$ , pro kladně nabitě deriváty byla výrazně nižší:  $(6.8 \pm 1.3) \mu M$  (pro PA-27) a  $(5.9 \pm 0.7) \mu M$  (pro PA-35).

Analýzou energeticky minimalizovaných trojrozměrných struktur  $3\alpha5\beta S$  derivátů, bylo zjištěno, že vzdálenost jejich náboje od C3 uhlíku nekoreluje s naměřenými hodnotami jejich  $IC_{50}$  ( $R = 0.6$ ) a není tedy zřejmě zásadní pro vazbu na NMDA receptor.





**Obrázek 4.4: Struktura C3 syntetických  $3\alpha5\beta\text{S}$  derivátů a jejich inhibiční účinek na NMDA receptory.**

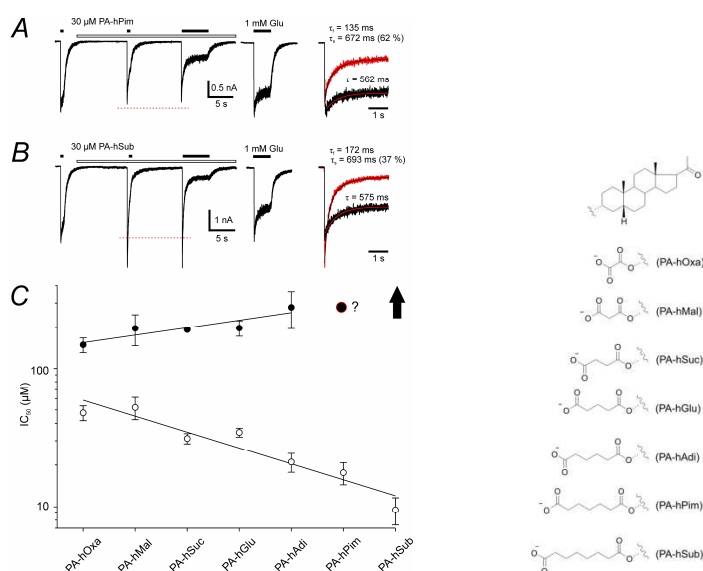
(A) Struktury modifikací na C3 uhlíku  $3\alpha5\beta\text{S}$ . (B) Ukázka inhibičního působení přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu  $3\alpha5\beta\text{S}$  (PA-6), který má záporný náboj na C3, kladně nabitého derivátu PA-27 a derivátu PA-5, jehož celkový náboj na C3 je nulový a inhibiční efekt chybí. Receptory byly aktivovány 10  $\mu\text{M}$  glycinem a 100  $\mu\text{M}$  glutamátem.

**Tabulka 1: Výsledné hodnoty inhibičního působení  $3\alpha5\beta\text{S}$  a jeho syntetických derivátů, jejichž struktury jsou uvedeny na Obrázek 4.4.**

Hodnoty jsou uvedeny jako průměrná změna resp. hodnota  $IC_{50} \pm$  směrodatná odchylka (SD). V případě, že látka neinhibovala, je její výsledná hodnota  $IC_{50}$  označena jako ND. DR v tabulce označuje, že hodnota  $IC_{50}$  byla určena ze závislosti inhibičního účinku na dávce (3-300  $\mu\text{M}$  nebo 0.3-30  $\mu\text{M}$ ). *n* vyjadřuje počet naměřených buněk.

NS	Koncentrace [ $\mu\text{M}$ ]	Průměrná změna $\pm$ SD (n)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
PA-4	200	+1.9 $\pm$ 6.2 (4)	ND
PA-5	200	+14.1 $\pm$ 7.5 (5)	ND
PA-6	100	-84.4 $\pm$ 3.4 (5)	24.6 $\pm$ 5.3
	3-300	(5)	31.1 $\pm$ 5.9 (DR)
PA-11	200	-71.5 $\pm$ 13.3 (4)	97.3 $\pm$ 48.3
PA-12	200	-84.7 $\pm$ 0.6 (4)	48.1 $\pm$ 1.8
PA-13	100	-69.2 $\pm$ 7.0 (6)	51.9 $\pm$ 14.2
PA-14	100	-80.9 $\pm$ 3.6 (4)	30.1 $\pm$ 5.9
PA-15	50	-81.6 $\pm$ 6.1 (6)	14.4 $\pm$ 4.9
PA-18	200	-83.6 $\pm$ 2.7 (5)	51.7 $\pm$ 8.6
PA-21	50	-63.7 $\pm$ 2.9 (5)	31.4 $\pm$ 3.3
PA-22	200	-87.3 $\pm$ 8.9 (4)	40.8 $\pm$ 27.8
PA-25	200	-77.1 $\pm$ 5.2 (5)	73.4 $\pm$ 18.0
PA-27	10	-69.2 $\pm$ 9.6 (7)	5.3 $\pm$ 2.1
	0.3-30	(7)	6.8 $\pm$ 1.3 (DR)
PA-33	50	-31.5 $\pm$ 2.5 (4)	95.9 $\pm$ 8.8
PA-34	200	-61.5 $\pm$ 10.6 (5)	141.1 $\pm$ 54.3
PA-35	10	-65.4 $\pm$ 3.4 (5)	5.9 $\pm$ 0.7
PA-36	200	-54.0 $\pm$ 10.8 (5)	184.0 $\pm$ 70.2 <sup>(5)</sup>
PA-17	100	-54.1 $\pm$ 8.4 (5)	89.7 $\pm$ 23.8

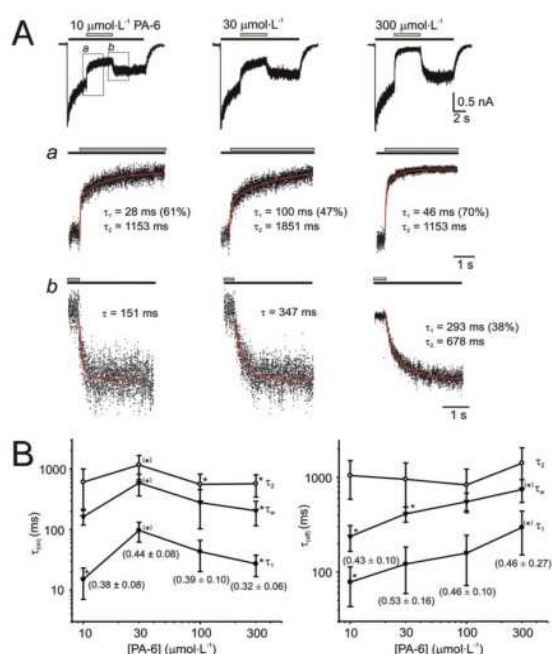
Podrobnější analýza vybraných C3 derivátů ukázala, že míra inhibice pro tonicky aktivované receptory je vyšší než pro receptory aktivované fazicky. V případě 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S byla hodnota  $IC_{50}$  pro fazicky aktivované receptory ( $1.8 \pm 0.1$ ) násobně vyšší než pro tonicky aktivované receptory. Pro 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S deriváty lišící se vzdáleností karboxylové kyseliny od C3, která zde nahrazuje záporný náboj sulfátové skupiny, byl prokázán vliv této vzdálenosti na míru inhibice pro tonicky versus fazicky aktivované receptory. Pro derivát 5 $\beta$ -pregnan-20-on 3 $\alpha$ -yl-hemipimelát (PA-hPim) byla hodnota  $IC_{50}$  pro fazicky aktivované receptory přibližně stokrát vyšší než pro tonicky aktivované receptory. Nejdelší z těchto derivátů PA-hSub vykazoval kombinovaný účinek, kdy za jeho přítomnosti byly fazicky aktivované receptory potenceovány, zatímco tonicky aktivované receptory byly inhibovány.



**Obrázek 4.5:** (A) Vliv 30  $\mu$ M PA-hPim (struktura viz vpravo) na fazicky a tonicky aktivované GluN1/GluN2B receptory. Inset ukazuje překryv odpovědi na glutamát v přítomnosti steroidu (červeně) a bez něj (černě). (B) Vliv 30  $\mu$ M PA-hSub (struktura viz vpravo) na fazicky a tonicky aktivované GluN1/GluN2B receptory. Inset ukazuje překryv odpovědi na glutamát v přítomnosti steroidu (červeně) a bez něj (černě). (C) Závislost hodnot  $IC_{50}$  neurosteroidních derivátů pro tonicky (prázdná kolečka) a fazicky (plná kolečka) aktivované receptory v závislosti na vzdálenosti karboxylové kyseliny od C3. Hodnota  $IC_{50}$  PA-hPim pro fazicky aktivované receptory je uvedena s otázníkem, jelikož při míře inhibice v řádu jednotek procent dosahují hodnoty  $IC_{50}$  vysokých čísel s velkým rozptylem. Hodnota  $IC_{50}$  PA-hSub pro fazicky aktivované receptory je uvedena jako šipka, jelikož jeho účinek na fazicky aktivované receptory není inhibiční ale potencečnický.

## 4.2 Úloha interakce neuroaktivních steroidů s cytoplazmatickou membránou buněk při modulaci NMDA receptorů

Pregnanolon sulfát i jeho neuroaktivní deriváty jsou látky které mají amfipatický charakter. Důsledkem této povahy je jejich přirozená tendence interagovat s buněčnými membránami (Schreier *et al.* 2000). Cílem následujících pokusů bylo ukázat, zda se tato interakce uplatňuje při modulačním efektu  $3\alpha5\beta S$  na NMDA receptory. Výsledky uvedené v této kapitole jsou součástí publikací Borovska *et al.* 2012 a Vyklicky *et al.* 2015.



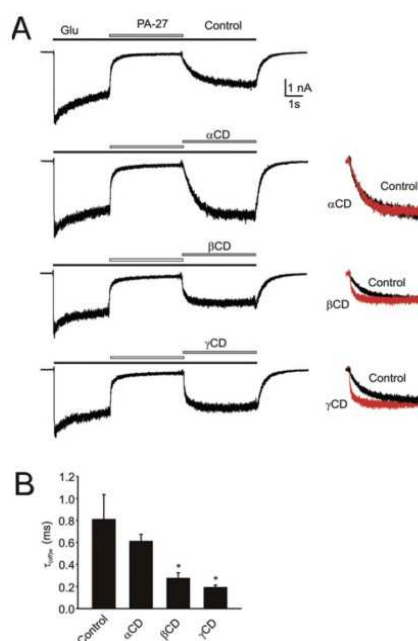
**Obrázek 4.6: Analýza časových konstant nástupu a odmývání inhibičního účinku  $3\alpha5\beta S$  na rekombinantních GluN1-1a/GluN2B NMDA receptorech.**

(A) Příklady proudových záznamů inhibovaných různými koncentracemi  $3\alpha5\beta S$  a ukázka jejich analýzy (a, b). (B) Koncentrační závislosti časových konstant nástupu  $\tau_{off}$  a odmývání  $\tau_{on}$ . V grafu jsou vyneseny průměry jednotlivých časových konstant dvouexponenciálních funkcí ( $\tau_1$  a  $\tau_2$ ), tak i jejich vážené průměry  $\tau_w$ .

Z výsledků analýzy časových konstant nástupu a odmývání inhibičního účinku  $3\alpha5\beta S$  na rekombinantních GluN1-1a/GluN2B NMDA receptorech vyplývá, že koncentrační závislosti těchto časových konstant neodpovídají průběhům typickým pro interakci látek s receptorem ve vodném prostředí. Pro interakci látek s receptorem ve vodném prostředí platí, že se zvyšující se koncentrací látky se musí zvyšovat i její rychlost vazby na receptor. Naopak pro časovou konstantu odmývání platí, že je na koncentraci nezávislá. Nástup a odmývání  $3\alpha5\beta S$  z NMDA receptorů

aktivovaných 10  $\mu\text{M}$  glycinem a 100  $\mu\text{M}$  glutamátem bylo pomalé a vykazovalo dvouexponenciální průběh. Vynesení těchto konstant (jednotlivě nebo ve formě váženého průměru) ukázalo, že rychlost nástupu nejenže nevykazuje lineární průběh, ale navíc není tento průběh ani monotónní (viz Obrázek 4.6). A naopak, koncentrační závislost časové konstanty odmyváání není koncentračně nezávislá, ale monotónně roste.

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy vzniklé spojením šesti ( $\alpha$  CD), sedmi ( $\beta$  CD) nebo až osmi glukózových zbytků ( $\gamma$  CD) do prstence. Tato struktura je vzhledem ke své polaritě vysoce rozpustná ve vodě, ale zároveň vytváří uvnitř prstence hydrofobní kavitu, do které se mohou vázat hydrofobní látky, jakými jsou např. neurosteroidy, a zrychlovat jejich odstavování z cytoplazmatické membrány buněk (Akk *et al.* 2005). Obrázek 4.7 ilustruje vliv 10 mM  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  CD na rychlost ukončení inhibičního účinku 10  $\mu\text{M}$  PA-27 na rekombinantních GluN1-1a/GluN2B NMDA receptorech. Z výsledků vyplývá, že  $\beta$  a  $\gamma$  CD signifikantně zrychlují časovou konstantu odmyváání účinku PA-27 z receptoru. Účinek  $\alpha$  CD oproti kontrole nevykazoval signifikantní rozdíl.



**Obrázek 4.7: Vliv cyklodextrinů na rychlost odmyváání inhibičního působení neurosteroidního analogu PA-27 z GluN1-1a/GluN2B NMDA receptorů aktivovaných 10  $\mu\text{M}$  glycinem a 100  $\mu\text{M}$  glutamátem.**

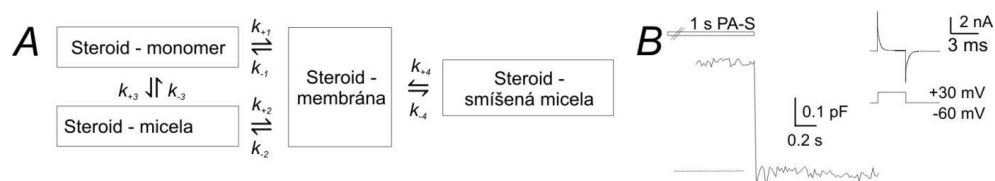
(A) Kontrolní záznam inhibičního působení 10  $\mu\text{M}$  PA-27 a vliv 10 mM  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  cyklodextrinů (CD) na ukončení jeho působení na NMDA receptorech. Insety ukazují překryv odmyváání steroidu čistým glutamátem (černě) a glutamátem s CD (červeně). (B) Shrnující graf vlivu různých typů cyklodextrinů na váženou časovou konstantu odmyváání  $\tau_{(off)_w}$ . Hvězdička označuje signifikantní rozdíl vůči kontrole.

Analýzou světelného rozptylu roztoků  $3\alpha5\beta\text{S}$  bylo zjištěno, že  $3\alpha5\beta\text{S}$  se ve vodných roztocích nachází převážně ve formě agregátů nebo ve formě micel (dále jen micel), přičemž jeho kritická micelární koncentrace byla stanovena na  $0.4\ \mu\text{M}$  (tzn. že koncentrace monomerní formy  $3\alpha5\beta\text{S}$  zůstává nad touto koncentrací konstantní a navyšuje se pouze jeho podíl v micelární formě). Vzhledem k tomu, že v elektrofyziologických experimentech vidíme nárůst inhibičního účinku s koncentrací až do koncentrace  $300\ \mu\text{M}$ , je zřejmé, že se na inhibičním působení  $3\alpha5\beta\text{S}$  musí nějakým způsobem podílet i  $3\alpha5\beta\text{S}$  v micelární formě. Velikost detekovaných micel ( $\sim 300\ \text{nm}$ ) nenasvědčuje tomu, že by byla možná přímá interakce mezi micelou a NMDA receptorem, jelikož extracelulární část samotného NMDA receptoru je o několik řádů menší než velikost micel.

Na Obrázek 4.8 je schéma možných interakcí  $3\alpha5\beta\text{S}$  s buněčnou membránou (Schreier *et al.* 2000). Z měření partičního koeficientu  $\log P$  bylo experimentálně zjištěno, že hodnota  $\log P$  (zde měřen jako poměr koncentrace steroidu v cytoplazmatických membránách buněk a ve vodném supernatantu) je pro  $3\alpha5\beta\text{S}$   $\sim 1.6$ , dochází tedy k akumulaci  $3\alpha5\beta\text{S}$  v membránách buněk. Vzhledem k tomu, že  $3\alpha5\beta\text{S}$  v rozsahu námi používaných koncentrací nenarušuje cytoplazmatickou membránu buněk, k jeho výskytu ve formě smíšených micel nedochází (snímání metodou terčíkového zámku není přítomností steroidu narušeno, tudíž steroid nenarušuje integritu membrány).

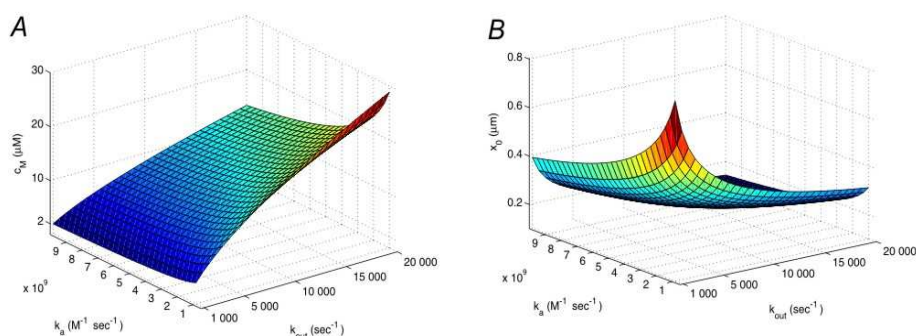
Pokud tedy budeme předpokládat, že steroid v micelární formě nemůže přímo interagovat s receptorem, potom s receptorem může interagovat buď steroid rozpuštěný v membráně (jeho koncentrace v membráně roste se zvyšující se koncentrací  $3\alpha5\beta\text{S}$  v micelární formě, což vyplývá z naměřených závislostí inhibice NMDA odpovědí  $3\alpha5\beta\text{S}$  na koncentraci) nebo jeho monomerní forma v roztoku. Jak již ale bylo řečeno, tak koncentrace monomerní formy steroidu je za normálních okolností rovna kritické micelární koncentraci a nelze tak vysvětlit zvyšující se inhibiční účinek  $3\alpha5\beta\text{S}$  při koncentracích výrazně vyšších než je kritická micelární koncentrace. Nicméně toto platí pouze ve vodném prostředí bez přítomnosti membrány. Pokud budeme dále uvažovat schéma na Obrázek 4.8, kde budeme předpokládat, že rychlostní konstanta výstupu steroidu z membrány přímo ve formě micel je velmi nízká, pak musí steroid membránu opouštět prakticky jen v monomerní formě. Pomocí kapacitních měření jsme určili, že časová konstanta odmyváání  $3\alpha5\beta\text{S}$  z membrány HEK293T buněk je rychlejší, než maximální rychlost

výměny roztoků v okolí studované buňky ( $< 5$  ms). Pomocí matematického modelu, do kterého byly dosazeny výše uvedené parametry získané experimentálně, se nám podařilo určit, že v blízkém okolí cytoplazmatické membrány buněk se může  $3\alpha5\beta S$  vyskytovat ve formě monomeru a to v koncentracích výrazně převyšujících kritickou micelární koncentraci (viz Obrázek 4.9). Z těchto výsledků vyplývá, že vazebné místo neurosteroidů se pravděpodobně nachází v transmembránové oblasti receptoru na úrovni vnějšího listu cytoplazmatické membrány, anebo v její těsné blízkosti.



**Obrázek 4.8: Model interakce  $3\alpha5\beta S$  s buněčnými membránami.**

(A) Schéma možných interakcí steroidu s buněčnými membránami (upraveno dle (Schreier *et al.* 2000)). (B) Časová konstanta výstupu  $3\alpha5\beta S$  z membrány (měřené změnou kapacity buňky vlivem navázaného  $3\alpha5\beta S$  v membráně) je kratší než rychlost výměny roztoku v okolí buňky odtržené od podložky ( $< 5$  ms).



**Obrázek 4.9: Koncentrace monomerní formy steroidu v blízkosti membrány v závislosti na rychlostních konstantách výstupu monomerní formy z membrány  $k_{out}$  (v Obrázek 4.8 označena jako  $k_{-1}$ ) a rychlostní konstanty agregace monomerní formy do formy micel  $k_a$  (v Obrázek 4.8 označena jako  $k_{+3}$ ).**

(A) Závislost koncentrace monomerní formy na samé hranici membrány a vodného prostředí  $c_M$  na rychlostních konstantách  $k_{out}$  a  $k_a$ . (B) Závislost vzdálenosti od membrány, kde koncentrace  $c_M$  klesne na  $1/4$  své původní hodnoty  $x_0$  na rychlostních konstantách  $k_{out}$  a  $k_a$ .

### 4.3 Molekulární mechanismus působení neurosteroidů na NMDA receptorech

Pro pochopení mechanismu inhibičního působení neurosteroidů na NMDA receptorech je zásadní identifikovat jejich vazebné místo. Identifikace vazebného místa společně s jeho strukturou přináší výjimečnou možnost navrhovat nové látky, které se do tohoto místa váží a mohou vykazovat příznivější farmakologické účinky. Výsledky uvedené v této kapitole jsou součástí publikací Kaniakova *et al.* 2012 a Vyklicky *et al.* 2015.

Z dřívějších publikací je známo, že vazebné místo  $3\alpha5\beta S$  se pravděpodobně nachází ve vnějším listu cytoplazmatické membrány nebo na extracelulární části receptoru, přičemž se neshoduje s vazebnými místy pro glutamát ani glycin (Park-Chung *et al.* 1997) a je přístupné až po plné aktivaci receptoru glutamátem a glycinem zároveň (Petrovic *et al.* 2005).

Abychom vyloučili možnost, že se  $3\alpha5\beta S$  váže na NMDA receptor v ATD, rozhodli jsme se otestovat inhibiční účinek  $3\alpha5\beta S$  na rekombinantních receptorech, kterým chybí na obou podjednotkách ATD (GluN1 $\Delta$ N/GluN2B $\Delta$ N). Výsledek těchto experimentů ukázal, že míra inhibice při koaplikaci 50  $\mu$ M  $3\alpha5\beta S$  s 10  $\mu$ M glycinem a 1 mM glutamátem se mezi divokým typem GluN1/GluN2B a zkrácenou variantou GluN1 $\Delta$ N/GluN2B $\Delta$ N signifikantně neliší.

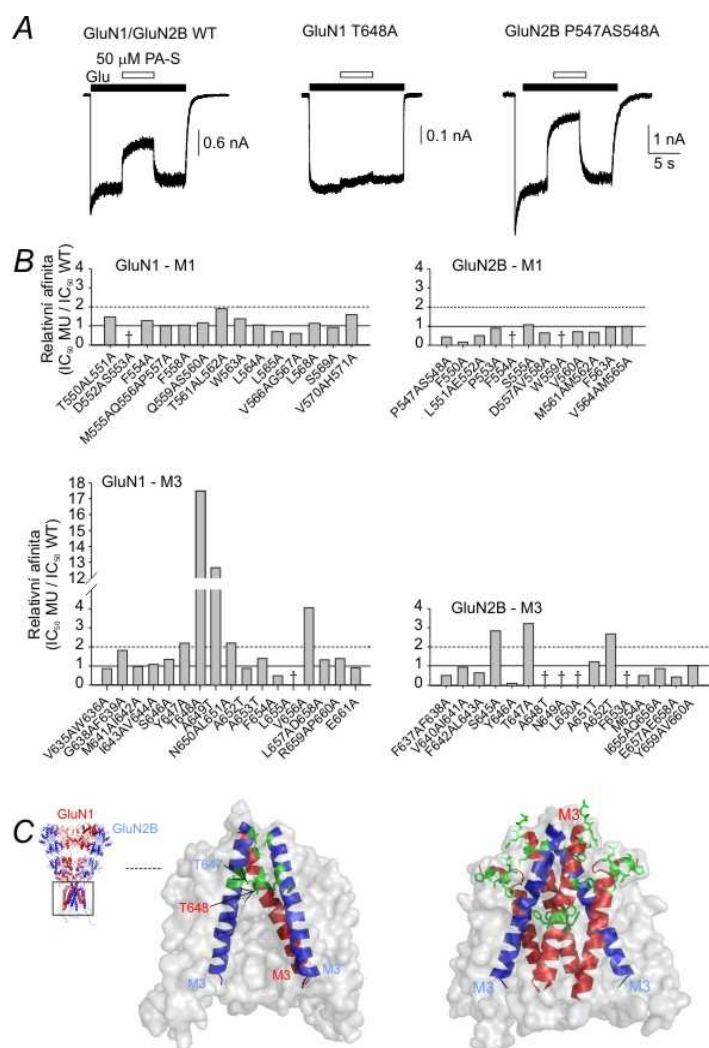
Abychom dále omezili počet aminokyselinových zbytků na NMDA receptoru, které se mohou účastnit vazby  $3\alpha5\beta S$ , rozhodli jsme se otestovat inhibiční účinek  $3\alpha5\beta S$  na glutamátovém receptoru GluR0. Glutamátem aktivovaný receptor tvořený pouze podjednotkami GluR0 má velmi nízkou sekvenční homologii s podjednotkami NMDA receptorů, ale i přesto je terciální strukturou a mechanismem vrátkování NMDA receptorům podobný (Arinaminpathy *et al.* 2003). Elektrofyzilogická měření ukázala, že 300  $\mu$ M  $3\alpha5\beta S$  je schopný glutamátový receptor GluR0 zcela inhibovat.

Vzhledem k našim předchozím odhadům, že se  $3\alpha5\beta S$  může účastnit vazby pouze v membránové části receptoru nebo v těsné blízkosti membrány, rozhodli jsme se připravit mutantní formy GluN1-1a a GluN2B podjednotek, u kterých byly postupně zaměněny všechny aminokyselinové zbytky v extracelulárně směřované oblasti první a třetí (M1 a M3) membránové domény. Vzhledem k tomu, že GluR0



postrádá čtvrtou transmembránovou doménu M4, a přesto je inhibován 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S, nebyla tato doména do mutační analýzy zahrnuta.

Z výsledků získaných z 59 mutantních forem (alaninové záměny) obou podjednotek vyplývá, že většina mutací v transmembránové části receptoru nemá na inhibici 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S výrazný vliv nebo ji naopak zvyšuje. Výjimku tvořily mutace v oblasti křížení M3 helixů, nacházející se v rámci SYTANLAAF motivu, jenž je mezi glutamátovými receptory vysoce konzervovaný. Tyto mutace vykazovaly signifikantně zvýšené hodnoty  $IC_{50}$  pro 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S. Jednalo se zejména o: Y647A, T648A, A649T, V656A na GluN1 podjednotce a S645A, T647A, A652T na GluN2B podjednotce, které oproti divokému typu GluN1-1a/GluN2B vykazovaly alespoň dvojnásobnou hodnotu  $IC_{50}$  (> 84  $\mu$ M; viz Obrázek 4.10).



**Obrázek 4.10: Vliv mutací v M1 a M3 doménách GluN1-1a a GluN2B podjednotek na inhibiční působení 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S.**

(A) Ukázky proudových odpovědí divokého typu a mutantních forem podjednotek NMDA receptorů. NMDA receptory byly aktivovány 1 mM glutamátu a 10  $\mu$ M glycinu.



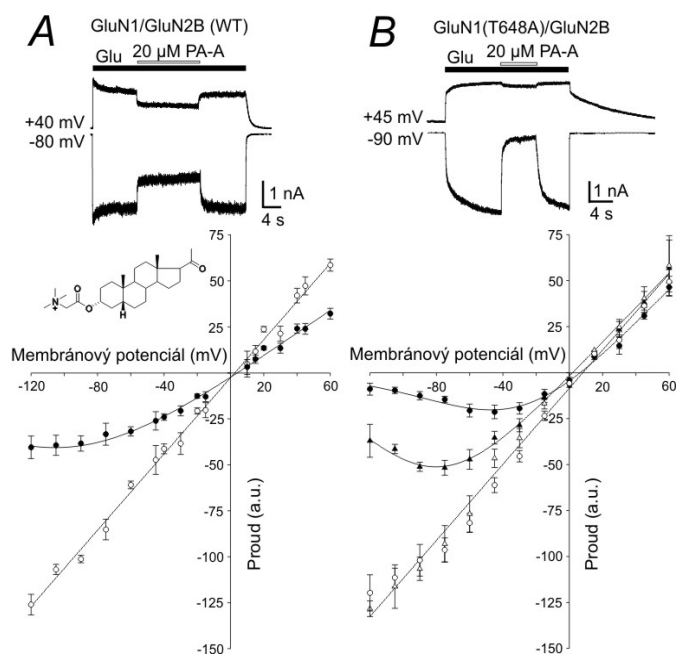
Inhibiční účinek 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S byl studován při koncentraci 50  $\mu$ M. Kontrolní roztok (roztok bez glutamátu) obsahoval v případě měření na receptoru obsahujícího mutovanou GluN1(T648A) podjednotku 1 mM Mg<sup>2+</sup> a 30  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> pro potlačení spontánních proudů. (B) Sloupcové grafy shrnující hodnoty  $IC_{50}$  pro mutované formy podjednotek NMDA receptorů. Vertikální osa vyjadřuje násobky  $IC_{50}$  divokého typu receptoru GluN1-1a/GluN2B. Křížky označují mutace, které nevyvolávaly proudové odpovědi. (C) Znázornění aminokyselinových zbytků (zeleně) mající signifikantní vliv na míru inhibice 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S. Ve struktuře transmembránové části receptoru vlevo jsou znázorněny aminokyselinové zbytky, jejichž záměna vyvolala snížení míry inhibice 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S. Ve struktuře transmembránové části receptoru vpravo jsou znázorněny aminokyselinové zbytky, jejichž záměna vyvolala zvýšení míry inhibice 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S.

Tyto výsledky podporují hypotézu, že vazebné místo pro 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S by se mohlo nacházet právě v oblasti konzervovaného SYTANLAAF motivu. Pokud by tomu tak opravdu bylo, mělo by platit, že 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S kompetuje s blokátory otevřeného kanálu o vazebné místo (v tomto případě o přístup k vazebnému místu). V takovém případě by měla být míra inhibice NMDA receptorů 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S ovlivněna přítomností blokátorů otevřeného kanálu. Výsledky našich experimentů ukazují, že míra inhibice 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S za přítomnosti 30  $\mu$ M 9-aminoakridinu, který je blokátorem otevřeného kanálu NMDA receptorů, dochází při membránovém potenciálu -60 mV k signifikantnímu nárůstu hodnoty  $IC_{50}$  pro 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S na hodnotu (95  $\pm$  17)  $\mu$ M (n = 5) oproti (52  $\pm$  3)  $\mu$ M (n = 6) při membránovém potenciálu +40 mV, při kterém se inhibiční vliv 9-aminoakridinu neuplatňuje.

Vzhledem k tomu, že mutace které vykazovaly nejnižší míru inhibice (GluN1(T648A) a GluN1(A649T)) byly spontánně aktivní (k jejich aktivaci není potřeba agonistů), mohlo zavedením mutací dojít k narušení stability konformace zavřeného stavu tvořeného M3 helixy. Pokud by ovšem tento stav byl identický s otevřeným stavem divokého typu, nemělo by to mít vliv na inhibici 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S. Rozhodli jsme se proto testovat hypotézu, že zavedením mutací dojde ke ztrátě stability M3 helixů, které se od sebe oddálí více, než je tomu u divokého typu receptoru, což má za následek vytvoření tak velkého vstupního otvoru, že velikost 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S nestačí k jeho blokádě. Abychom mohli tuto hypotézu potvrdit či vyvrátit, použili jsme 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S a kladně nabitý steroid PA-A (5 $\beta$ -pregnan-20-on 3 $\alpha$ -yl-[(2-trimethylammonio)-ethanoát] chlorid) a proměřili jejich proudově napěťovou závislost na divokém typu a mutantních formách GluN1(T648A), GluN1(A649T), GluN1(V656A) a GluN2(T647A) receptorů. Výsledky experimentů ukázaly, že inhibice 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S na divokém typu i mutantních formách receptoru je napěťově nezávislá, což je v souladu s předpokladem, že záporně nabitá látka (jako 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S)

nemohou fungovat jako blokátory otevřeného kanálu NMDA receptorů. V případě PA-A se však ukázalo, že inhibice divokého typu receptoru má svoji napětově nezávislou složku a velmi slabou napětově závislou složku, která se projevuje až při velmi záporných hodnotách membránového potenciálu (viz Obrázek 4.11). Na druhé straně inhibice mutantních forem receptoru vykazuje pouze napětově závislou složku.

Proložení získaných závislostí Boltzmanovou rovnicí jsme dostali hodnoty parametrů (viz rovnice 3, 4 a 5):  $\delta = 0.15$ ,  $K_d = 335 \mu\text{M}$ ,  $g_0 = 0.62$ , ( $n = 11$ ) pro divoký typ receptoru.  $\delta = 0.29$ ,  $K_d = 340 \mu\text{M}$ ,  $g_0 = 0.83$ ; ( $n = 7$ ) pro GluN1(T648A)/GluN2B.  $\delta = 0.23$ ,  $K_d = 745 \mu\text{M}$  a  $g_0 = 0.93$  ( $n = 8$ ) pro GluN1(A649T)/GluN2B a  $\delta = 0.19$ ,  $K_d = 193 \mu\text{M}$ ,  $g_0 = 1.0$ , ( $n = 8$ ) pro GluN1(V656A)/GluN2B.

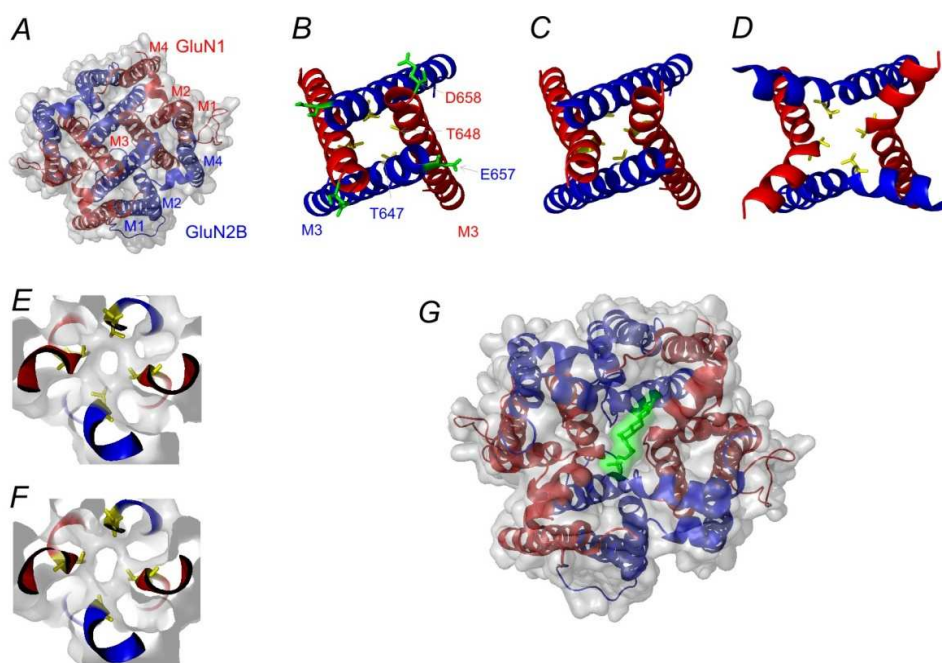


**Obrázek 4.11: Napětová závislost inhibičního působení 20  $\mu\text{M}$  PA-A (5 $\beta$ -pregnan-20-on 3 $\alpha$ -yl-[(2-trimethylammonio)-ethanoát] chlorid) na GluN1-1a/GluN2B NMDA receptorech.**

(A) Napětově proudová závislost v přítomnosti 20  $\mu\text{M}$  PA-A (plná kolečka) a bez něj (prázdná kolečka) na divokém typu receptoru. Struktura PA-A. (B) Napětově proudová závislost v přítomnosti 20  $\mu\text{M}$  PA-A (plné symboly) a bez něj (prázdné symboly) na mutovaných receptorech GluN1(T648A) (kolečka) a GluN1(A649T) (trojúhelníčky). Horní záznamy představují charakteristické proudové odpovědi s inhibičním efektem PA-A steroidu na divoký (A) a mutantní typ receptoru (B) na kladných a záporných potenciálech. Kontrolní roztok (roztok bez glutamátu) obsahoval kromě 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$  i 30  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  pro potlačení spontánních proudů.

Abychom mohli potvrdit existenci vazebného místa a přímo odhalit jeho strukturu v otevřené konformaci receptorů, vytvořili jsme pomocí metody

molekulárního modelování model NMDA receptoru v otevřeném stavu. V návaznosti na to se nám podařilo pomocí dokování  $3\alpha5\beta S$  do struktury otevřeného receptoru určit místo a nejpravděpodobnější orientaci  $3\alpha5\beta S$ , v které se váže na NMDA receptor (viz Obrázek 4.12). Pro odhalení struktury otevřeného stavu receptoru bylo využito experimentálních dat, z kterých víme, že mutovaný receptor musí mít v křížení M3 helixů průměr odpovídající minimálně velikosti PA-A. Dále musí platit, že struktura takto otevřeného receptoru po záměně mutovaných reziduí zpět odpovídající divokému typu receptoru, musí mít již dostatečně malý průměr pro jeho průchod. Otvírání receptoru probíhalo postupným oddalováním extracelulárních konců M3 helixů, čímž se napodoboval přirozený stav, kdy se tyto domény od sebe oddalují vlivem tahu linkerů spojujících konce M3 helixů a LBD po navázání agonistů. Toto postupné krokové oddalování v transverzálním směru bylo provedeno v rozsahu 1.0 až 17.2 Å, čímž bylo dosaženo otevření kanálu v nejužším místě křížení M3 helixů v úrovni GluN1(T648) a GluN2(T647) na rozměr 11.5 x 10.2 Å (měřeno jako vzdálenost mezi  $C_{\alpha}$ ).



**Obrázek 4.12: Vazba neurosteroidu  $3\alpha5\beta S$  do otevřeného stavu NMDA receptoru.**

(A) Transmembránová oblast zavřeného NMDA receptoru při pohledu z extracelulární strany. (B) M3 domény receptoru v zavřené konformaci. (C) M3 domény receptoru v iniciální fázi otvírání. (D) M3 domény receptoru v otevřené konformaci. (E) Povrchová reprezentace divokého typu otevřeného receptoru GluN1/GluN2B v nejužším místě křížení M3 helixů. (F) Povrchová reprezentace mutované formy otevřeného receptoru GluN1(T648A)/GluN2B v nejužším místě křížení M3 helixů. (G) Nejstabilnější orientace  $3\alpha5\beta S$  (vyznačen zeleně) dokovaného do otevřeného stavu GluN1/GluN2B receptoru.

## 5 DISKUZE

### 5.1 Vztah mezi strukturou 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S derivátů a jejich schopností modulovat NMDA receptor

Přestože mechanismu inhibičního působení sulfatovaných neurosteroidních látek na NMDA receptor byla již v minulosti věnována pozornost (Park-Chung *et al.* 1994; Yaghoubi *et al.* 1998; Kussius *et al.* 2009; Petrovic *et al.* 2009), tak vliv struktury těchto látek na jejich působení na NMDA receptory nebyl doposud podroben systematickému zkoumání. Naše výsledky ukazují, že modifikací steroidního jádra na uhlíku C17 lze významně zvýšit potenci těchto látek jakožto NMDA antagonistů oproti přirozeně se vyskytujícímu 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S  $IC_{50} = (31.1 \pm 5.9) \mu\text{M}$ . Nejvýrazněji se snížila hodnota  $IC_{50}$  u C17 2-butyl derivátu na hodnotu  $(84 \pm 1) \text{ nM}$ . V případě perfluorobenzoátového derivátu v  $\alpha$  pozici klesla oproti 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S hodnota  $IC_{50}$  na  $(3.7 \pm 0.8) \mu\text{M}$  (viz Obrázek 4.1). Překvapivě se hodnota  $IC_{50}$  pro perfluorobenzoátový izomer v  $\beta$  pozici  $(37.3 \pm 3.5) \mu\text{M}$  oproti hodnotě  $IC_{50}$  pro 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S v rámci chyby nezměnila. Z těchto výsledků vyplývají dva důležité závěry. Zaprvé, že s velkou pravděpodobností je interakce mezi neuroaktivními steroidy a NMDA receptorem přímá (ve smyslu vazby receptor-ligand) a nejedná se tudíž o nepřímou interakci zprostředkovanou např. změnou fyzikálních vlastností cytoplazmatické membrány vlivem vazby steroidu do membrány ( $\alpha$  a  $\beta$  izomery mají téměř shodný vliv na fyzikální vlastnosti membrány; Casado and Ascher 1998). Za druhé, výsledky ukazují na přímou interakci C17 substituentů těchto neuroaktivních derivátů s NMDA receptorem. Přičemž v případě malých substituentů, typu azidu, není NMDA receptor vůči této vazbě prakticky stereospecifický, avšak u prostorově výraznějších substituentů typu perfluorobenzoátu, se již tato stereospecificita významně uplatňuje. Ze závislosti  $IC_{50}$  na logP pro C17 deriváty (viz Obrázek 4.3) vyplývá výrazná korelace ( $R^2 = 0.8$ ) mezi  $IC_{50}$  a logP. To vedle specifické interakce C17 substituentů s NMDA receptorem ukazuje i na nesespecifický vliv akumulace steroidu v membráně buněk na potenci těchto látek inhibovat NMDA receptor (Tarcsey *et al.* 2012).

Další experimenty byly zaměřeny na odhalení úlohy záporně nabitě sulfátové skupiny na uhlíku C3 steroidního jádra při působení na NMDA receptoru. Výsledky ukázaly, že nahrazení sulfátu skupinou s celkovým nulovým nábojem vede k

úplné eliminaci inhibičního působení těchto derivátů na NMDA receptory. K podobnému závěru dospěl (Weaver *et al.* 2000), který testoval vliv nenabitě molekuly pregnanolonu na NMDA receptor nepřímo pomocí fluorescenční techniky měření intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ .

Záměna negativního náboje za pozitivní naopak snižuje hodnotu  $IC_{50}$  těchto derivátů ( $(6.8 \pm 1.3) \mu\text{M}$  pro PA-27 a  $(5.9 \pm 0.7) \mu\text{M}$  pro PA-35 oproti  $(31.1 \pm 5.9) \mu\text{M}$  pro  $3\alpha5\beta\text{S}$ ). Kromě velikosti náboje byla dalším sledovaným parametrem vzdálenost tohoto náboje od uhlíku C3. Porovnáním hodnot  $IC_{50}$  se vzdáleností náboje od C3 u těchto derivátů jsme neprokázali mezi danými parametry žádnou závislost či korelaci, což je v souladu s již dříve publikovanými výsledky vlivu vzdálenosti nabitě skupiny na C3 na hodnoty  $IC_{50}$  (Weaver *et al.* 2000). Nicméně naše výsledky byly provedeny na pětinašobně vyšším počtu C3 derivátů a navíc pomocí techniky terčíkového zámku, která umožňuje na rozdíl od fluorescenční techniky sledování intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  vysoce přesné kvantitativní vyhodnocení naměřených dat.

Výsledky strukturálně funkční analýzy působení C3 derivátů potvrdily naši hypotézu, že sulfátová skupina na C3 je důležitá pro působení  $3\alpha5\beta\text{S}$  na NMDA receptoru, nicméně možnost záměny tohoto záporného náboje za kladný i možnost jeho oddálení od uhlíku C3 naznačuje, že se náboj přímo neúčastní vazby na receptor, ale spíše ukazuje na důležitost tohoto náboje pro přístup neurosteroidu k vazebnému místu na NMDA receptoru. Například v případě, že by se steroid dostával k vazebnému místu přes cytoplazmatickou membránu buněk, jako to bylo ukázáno u GABA receptorů (Akk *et al.* 2005; Akk *et al.* 2007; Hosie *et al.* 2007), může tento náboj hrát důležitou roli v interakci neurosteroidů s membránou. Což je v souladu s pozorováním, že kladně nabitě deriváty vykazují výrazně nižší hodnoty  $IC_{50}$  než je tomu u záporně nabitých analogů. Bylo totiž ukázáno, že kladně nabitě látky se akumulují v cytoplazmatické membráně buněk ve výrazně vyšších koncentracích než stejně hydrofobní látky nesoucí negativní náboj. Tento jev je připisován tomu, že na akumulaci látek v membráně má vliv nejen jejich hydrofobicita, ale i elektrostatické interakce s nabitými hlavičkami fosfolipidů, v tomto případě zejména s jejich záporně nabitou fosfátovou skupinou (Austin *et al.* 1995; Austin *et al.* 2005).

Předcházející pokusy ukázaly, jaký vliv má struktura steroidu na hodnotu  $IC_{50}$  u tonicky aktivovaných NMDA receptorů. Pro případné farmakologické využití

těchto látek je podstatné, aby vykazovaly výrazný rozdíl v hodnotách  $IC_{50}$  pro tonicky a fazicky aktivované receptory. Rozhodli jsme se studovat sérii sedmi steroidních látek s karboxy skupinou na C3 vázanou pomocí esterové vazby (viz Obrázek 4.5). Výsledky našich elektrofyziologických pokusů v souladu s výsledky získanými kinetickým modelováním (Vyklícky *et al.* 2014) ukázaly, že neurosteroidy inhibují fazicky aktivované receptory méně než tonicky aktivované receptory. Relativní rozdíl této inhibice je závislý na struktuře nabitého rezidua na C3. S prodlužující se vzdáleností mezi C3 a karboxylovou skupinou vzrostl rozdíl  $IC_{50}$  mezi fazicky a tonicky aktivovanými receptory až na stonásobek. Přestože některé z testovaných derivátů byly již dříve studovány z hlediska tonického působení na NMDA receptory, jejich vliv na fazicky aktivované receptory nebyl dosud publikován (Park-Chung *et al.* 1994; Yaghoubi *et al.* 1998) (pro přehled (Korinek *et al.* 2011)). Jedním z důvodů může být, že tyto studie byly prováděny převážně na NMDA receptorech exprimovaných v oocytech drápatek. Elektrofyziologické techniky při využití oocytů neumožňují studium působení steroidů na fazicky aktivované receptory (oocyty jsou příliš velké pro rychlou aplikaci roztoků v jejich okolí). Ze stejného důvodu rovněž nemohl být odhalen ani potenciační vliv na fazicky aktivované receptory, který jsme odhalili v případě nejdelšího z testovaných derivátů (PA-hSub). Naše výsledky byly měřeny na přechodně transfekovaných HEK293T buňkách, které vzhledem ke svým malým rozměrům umožňují měření vlivu steroidů na fazicky aktivované receptory. Tyto výsledky jsme navíc posléze potvrdili i na synapticky aktivovaných NMDA receptorech v kulturách autaptických hipokampálních neuronů. Důvodem zvýšení poměru fazicky vůči tonicky aktivovaným receptorům, v porovnání s  $3\alpha 5\beta S$ , se zdá být pozměněná kinetika vazby na receptor. Jelikož hodnota  $IC_{50}$  pro tonicky aktivované receptory se nezměnila nebo se mírně snížila, je pravděpodobné, že došlo ke snížení rychlostní konstanty vazby na receptor za současného zpomalení rychlostní konstanty odvazování z receptoru. Nicméně pro detailní rozkrytí skutečného mechanismu by bylo potřeba dalších experimentů.

Přestože rozdíl  $IC_{50}$  mezi tonicky a fazicky aktivovanými receptory se do určité míry předpokládá pro všechny „use-dependentní“ inhibitory NMDA receptorů (Vyklícky *et al.* 2014), zatím byl publikován nejvýše dvojnásobek  $IC_{50}$  mezi fazicky versus tonicky aktivovanými receptory v případě memantinu (Xia *et al.* 2010). Nicméně následná studie ukázala, že tato hodnota s rostoucím počtem fazických

aktivací klesá v přítomnosti memantinu téměř k jedné (Emnett *et al.* 2013). K tomuto saturačnímu efektu v případě neurosteroidů nedochází, protože na rozdíl od memantinu, neurosteroidy vykazují „use-independentní“ odstavování (Petrovic *et al.* 2005).

## 5.2 Úloha interakce neuroaktivních steroidů s cytoplazmatickou membránou buněk při modulaci NMDA receptorů

Amfipatické látky, mezi které patří neuroaktivní steroidy, mají přirozenou tendenci interagovat s buněčnými membránami (Schreier *et al.* 2000). Vazba do membrán jim umožňuje přímo interagovat s transmembránovými oblastmi iontových kanálů. Vzhledem k tomu, že tyto látky mají často značně hydrofobní charakter, akumulují se zde ve vysokých koncentracích, které i o několik řádů přesahují jejich koncentrace ve vodném prostředí a tudíž jejich případná vazebná místa v transmembránových oblastech iontových kanálů mohou být relativně nízkoafinitní (Chisari *et al.* 2009; Chisari *et al.* 2010). Právě takové působení neuroaktivních steroidů bylo prokázáno v případě GABA receptorů (Akk *et al.* 2005).

Naše výsledky ukázaly, že kinetika nástupu a odmyvání inhibičního působení  $3\alpha5\beta S$  na NMDA receptoru je pomalá a netypická pro interakci ligandu s receptorem ve vodném prostředí. Pro takové působení musí platit, že rychlost nástupu inhibice roste lineárně se zvyšující se koncentrací antagonisty a časová konstanta odmyvání je na koncentraci nezávislá. Zároveň musí platit, že  $k_{on}[\text{antagonisty}] > k_{off}$ . Naše výsledky však u  $3\alpha5\beta S$  takové chování inhibiční kinetiky neprokázaly (viz Obrázek 4.6). Tato nesrovnalost mezi teorií a skutečným chováním, zjištěným z experimentů může být způsobena několika faktory (Popescu 2005). Například tím, že kinetika inhibice není přímo dána rychlostními konstantami  $k_{on}$  a  $k_{off}$ , nebo tím, že reálná koncentrace látky ve formě schopné interagovat s receptorem není v místě jejího působení stejná jako ta, aplikovaná z vodného prostředí. Naše výsledky s použitím cyklodextrinů, které ukázaly zrychlení odmyvání účinku neurosteroidů v přítomnosti cyklodextrinu (tak jako v případě GABA receptorů (Akk *et al.* 2005)), silně naznačují, že alespoň rychlost návratu z inhibice není striktně dána pouze rychlostní konstantou  $k_{off}$  (viz Obrázek 4.7)

Naše další experimenty zaměřené na interakci  $3\alpha5\beta S$  s buněčnými membránami ukázaly, že tato interakce může být velmi komplexní a nedá se popsat

čistě jako distribuce monomerní látky mezi vodným prostředím a buněčnou membránou v poměru daném její hydrofobicitou, resp. logP. Pomocí reakčně-difuzního modelování, doplněného o experimentálně zjištěné parametry (s využitím elektrofyziologických metod, metod hmotnostní spektrometrie a světelného rozptylu), popisující chování  $3\alpha5\beta S$  ve vodném prostředí a membráně buněk jsme ukázali, že při koncentraci  $50 \mu M$   $3\alpha5\beta S$ , přibližně odpovídající hodnotě  $IC_{50}$  na NMDA receptorech, se 99.5 % molekul vyskytuje ve formě micel či v jiných formách agregátů a jen zbývajících 0.5 % se vyskytuje v monomerní formě. To ovšem platí pouze v čistě vodných prostředích. V případě, že je ve vodném prostředí navíc přítomna buněčná membrána, koncentrace této monomerní formy směrem k membráně roste a v její těsné blízkosti může za těchto okolností dosahovat v rovnováze jednotek až desítek  $\mu M$ .

Naše výsledky tedy podporují hypotézu, že při působení neuroaktivních steroidů na NMDA receptory hraje membrána zásadní roli, nikoli však nutně jen ve smyslu přímého působení steroidu na receptor z transmembránové oblasti, ale potencionálně i ve smyslu přeměny agregovaného steroidu v monomerní formu v její těsné blízkosti (viz Obrázek 4.9). Možnost vlivu interakce cytoplazmatické membrány buněk s farmaky z hlediska jejich kinetiky působení na iontových kanálech byla diskutována již před dvaceti lety v souvislosti s blokátorem otevřeného kanálu NMDA receptorů MK-801 (Huettner and Bean 1988; Moring *et al.* 1994). Tyto výsledky tudíž mohou otevírat nový pohled na analýzu a interpretaci výsledků pro hydrofobní modulátory iontových kanálů obecně.

### **5.3 Molekulární mechanismus působení neurosteroidů na NMDA receptorech**

Jak již bylo blíže popsáno v úvodu této práce, funkce NMDA receptorů je poměrně široce farmakologicky ovlivnitelná (Traynelis *et al.* 2010; Monaghan *et al.* 2012). Přestože doposud byla popsána celá řada látek působících jako antagonisté NMDA receptorů a stále jsou nalézány nové (Costa *et al.* 2010; Ogden and Traynelis 2011; Costa *et al.* 2012; Monaghan *et al.* 2012), tak zatím se v klinické praxi žádná z těchto látek jakožto neuroprotektivum nevyužívá. Jedinou výjimku tvoří memantin, který je schválený pro léčbu Alzheimerovy choroby. Ve vědeckých kruzích však



panují jisté pochybnosti o jeho výhradním účinku přes NMDA receptory (Aracava *et al.* 2005; Johnson and Kotermanski 2006; Kotermanski and Johnson 2009).

Vzhledem k tomu, že v od klinicky použitelných neuroprotektivních NMDA antagonistů požadujeme, aby vykazovaly zdánlivě neslučitelné účinky: blokovaly dlouhodobě nadměrně aktivované NMDA receptory (terapeutický účinek), ale zároveň neovlivňovaly normální synaptický přenos (zamezení vedlejších účinků) zprostředkovaný shodnými NMDA receptory, není tento úkol jednoduchý. Nicméně jak jsme ukázali výše, neurosteroidy mají mechanismus účinku, který tyto požadavky umožňuje splnit. Dané účinky jsou podloženy jak kinetickým modelováním (Vyklícky *et al.* 2014), tak výsledky získanými na zvířecích modelech deprese, mrtvice a NMDA léze (Weaver *et al.* 1997; Vales *et al.* 2012; Holubova *et al.* 2014; Kleteckova *et al.* 2014). Mezi klíčové vlastnosti inhibičních neurosteroidů patří „use-dependentní“ účinek, tudíž nemůže tedy dojít k zablokování receptoru ještě před jeho aktivací (Petrovic *et al.* 2005). Na druhou stranu je jejich odstavování z receptoru na aktivaci nezávislé, tudíž v případě zablokování receptoru může dojít k jeho odblokování bez nutnosti aktivace agonistou a to i v přetrvávající přítomnosti neurosteroidu (Petrovic *et al.* 2005). Tyto dvě zásadní vlastnosti tudíž umožňují, aby v přítomnosti neurosteroidů nebyl synaptický přenos vůbec ovlivněn, nebo v případě jeho ovlivnění (např. v důsledku zvýšené synaptické aktivity při epileptickém záchvatu, či v jiných případech extracelulárně zvýšené koncentrace glutamátu) aby se receptor po odeznění nadměrné aktivace samovolně dostal do svého normálního (nezablokovaného) klidového stavu, a byl tedy opět připraven plnit svoji synaptickou úlohu. Další vlastností, která navíc podporuje neuroprotektivní účinek neurosteroidů, je nezávislost jejich inhibičního působení na membránovém potenciálu. Tato vlastnost pomáhá v neuroprotekcii i již depolarizovaných neuronů, kdy klasické napěťově závislé blokátory otevřeného kanálu ztrácejí svoji účinnost (Sobolevsky *et al.* 1998; Sobolevskii and Khodorov 2002; Johnson and Kotermanski 2006; Xia *et al.* 2010).

Dosavadní slabou stránkou neurosteroidů je jejich poměrně nízká účinnost ( $IC_{50}$  v řádu desítek  $\mu M$ ) a z ní vyplývající nutnost podávat je ve vysokých dávkách. Přestože synapticky aktivované AMPA receptory jsou i při vysokých dávkách k působení neurosteroidů necitlivé (Sedlacek *et al.* 2008), s jejich nižší účinností úzce souvisí i fakt, že při podávání vysokých dávek se zvyšuje pravděpodobnost vedlejších účinků zprostředkovaných jinými typy receptorů (Gee *et al.* 1988; Wu *et*

*al.* 1990; Wu *et al.* 1991; Bullock *et al.* 1997; Park-Chung *et al.* 1999; Korinek *et al.* 2011). Důležitým krokem při vývoji nových neurosteroidních látek je tedy najít jejich deriváty, které budou vykazovat vyšší selektivitu (a to potenciálně i v rámci různých podtypů NMDA receptorů) a účinnost. K nalezení takové látky by významně přispěla lokalizace vazebného místa pro neurosteroidy na NMDA receptoru a znalost jeho detailní struktury ve stavu, do kterého se neurosteroidy váží.

Předcházející výsledky ukázaly, že vazebné místo pro  $3\alpha5\beta S$  na NMDA receptoru se neshoduje s vazebnými místy pro glutamát ani pro glycin (Park-Chung *et al.* 1999). Vzhledem k tomu, že  $3\alpha5\beta S$  je trvale nabitý, přeskok z jednoho listu cytoplazmatické membrány do druhého by vyžadoval překonání energetické bariéry, která je tepelným pohybem jen obtížně překonatelná. Lze tedy předpokládat, že vazebné místo se nenachází ani ve vnitřním listu cytoplazmatické membrány ani intracelulárně. Naše výsledky tato zjištění potvrzují a dále ukazují na význam cytoplazmatické membrány pro přístup  $3\alpha5\beta S$  k jeho vazebnému místu na NMDA receptoru (Borovska *et al.* 2012). Teoretické výpočty chování  $3\alpha5\beta S$  ve vodném prostředí dále naznačují, že by se vazebné místo mohlo nacházet ve vnějším listu cytoplazmatické membrány nebo v její těsné blízkosti.

Abychom s jistotou vyloučili možnost, že se vazebné místo pro neurosteroidy nachází v oblasti ATD, na kterou ukazovaly vazebné studie na izolovaných ATD jako na možné místo jejich působení (Cameron *et al.* 2012), využili jsme podjednotky GluN1 a GluN2B bez ATD (GluN1 $\Delta$ N/GluN2B $\Delta$ N). Vzhledem k tomu, že míra inhibice  $3\alpha5\beta S$  na divokém typu receptoru a receptoru složeném z podjednotek, kterým chyběly ATD, se signifikantně nelišila, sice možnost vazby do oblasti ATD přímo nevylučuje, ale vyvrací, že tato vazba zprostředkovává jeho inhibiční působení na NMDA receptory.

Dále jsme se zaměřili na již dříve vytipovanou transmembránovou oblast. Vzhledem k tomu, že i pouhá polovina transmembránové domény na obou podjednotkách znamená velké množství potenciálně důležitých aminokyselin, rozhodli jsme se jejich počet snížit testováním glutamátového receptoru GluR0, kterému chybí M4 transmembránová doména (Arinaminpathy *et al.* 2003). Vzhledem k tomu, že i tento receptor je citlivý k inhibičnímu působení  $3\alpha5\beta S$ , není zřejmě M4 pro vazbu  $3\alpha5\beta S$  nezbytná, a proto jsme M4 oblasti na obou podjednotkách vyloučili z mutační analýzy.

Po záměně všech aminokyselinových zbytků ve vytipované oblasti a určení  $IC_{50}$  jednotlivých mutantů se ukázalo, že ze všech testovaných mutací mají výrazně sníženou citlivost pouze mutace v konzervovaném SYTANLAAF motivu a ostatní mutace buď nemají na  $IC_{50}$  signifikantní vliv nebo  $IC_{50}$  naopak snižují. Mutace, které snižovaly  $IC_{50}$ , nebyly lokalizovány do žádné konkrétní oblasti, ale naopak byly rozptýleny v rámci celé studované TMD (viz Obrázek 4.10). Navíc u těchto mutací byla prokázána pozitivní korelace mezi mírou desenzitizace a časovou konstantou odmývání  $3\alpha5\beta S$  z mutovaných receptorů ( $R^2 = 0.79$ ). Snížené hodnoty  $IC_{50}$  výše zmíněných mutací tedy spíše než se změnou vazebného místa pro  $3\alpha5\beta S$  souvisí s pozměněnou kinetikou receptoru.

Mutace se sníženou citlivostí k  $3\alpha5\beta S$  vykazovaly různý stupeň spontánní aktivity, což poukazovalo na narušení spřažení konformačních změn ve LBD a M3 helixech (Chang and Kuo 2008). U těchto již dříve popsanych tzv. Lurcher mutací bylo ukázáno, že jejich aktivační kinetika je výrazně posunuta směrem k otevřenému stavu (Murthy *et al.* 2012). Takové chování ukazuje na možnost, že vlivem mutace se od sebe M3 domény více oddalují, a umožňují tak průchod větších molekul skrz vnější vrátka receptoru, než je tomu u divokého typu receptoru. V této pozici pak zůstávají, nehledě na obsazenost vazebných míst v LBD.

Naše předpoklady se potvrdily naměřením napěťových závislostí blokady kladně nabitým PA-A na divokém typu receptoru a na jeho mutantních formách GluN1(T648A), GluN1(A649T), GluN1(V656A) a GluN2(T647A), které vykazovaly sníženou citlivost k  $3\alpha5\beta S$ . Všechny tyto mutantní formy receptoru vykazovaly napěťově závislou blokádu PA-A, ale nevykazovaly již napěťově nezávislou inhibici na kladných potenciálech typickou pro divoký typ receptoru (viz Obrázek 4.11). Což ukazuje na to, že tyto mutace nezpůsobily jen nový typ napěťově závislé blokady (ke stávající napěťově nezávislé), ale také, že došlo ke změně formy inhibice z napěťově nezávislé na napěťově závislou. To je v souladu s představou, že právě v místě křížení M3 helixů se nachází vazebné místo pro  $3\alpha5\beta S$ , které se tímto zásahem rozšířilo natolik, že  $3\alpha5\beta S$  již nemůže vstup do póru iontového kanálu blokovat.

Naše laboratoř již dříve ukázala, že  $3\alpha5\beta S$  navázaný ve svém vazebném místě uzamyká agonisty NMDA receptoru, glycin a glutamát, v jejich vazebných místech na LBD, a zabraňuje tak jejich disociaci z receptoru (Petrovic *et al.* 2005). Toto chování je typické pro tzv. „foot in the door“ blokátory otevřeného kanálu, které

svoji vazbou v iontovém kanále brání zavření kanálu, což je doprovázeno následnou disociací agonistů. Typickým představitelem takových látek je 9-aminoakridin. Abychom dále experimentálně podpořili náš předpoklad o vazebném místě, naměřili jsme pro  $3\alpha 5\beta S$  závislosti účinku na dávce v přítomnosti 9-aminoakridinu při membránových potenciálech  $-60$  mV a  $+40$  mV. Křivka měřená při  $-60$  mV, tedy při napětí, kdy je 9-aminoakridin schopen se vázat do póru iontového kanálu, došlo k významnému posunu křivky k vyšším koncentracím oproti křivce naměřené při  $+40$  mV, kdy 9-aminoakridin nemá schopnost ovlivňovat funkci NMDA receptorů. To vypovídá o kompetici mezi vazebným místem pro 9-aminoakridin a  $3\alpha 5\beta S$ , nebo o shodném přístupu k němu.

Vzhledem k tomu, že křížení M3 helixů představuje vnější vrátka glutamátových receptorů, jedná se o strukturu, která při aktivaci těchto receptorů prochází výraznými konformačními změnami, navíc se nachází téměř na samém okraji cytoplazmatické membrány, a tedy i transmembránového pole. Přestože sekvenční homologie mezi receptory GluN1/GluN2B a GluR0 je velmi nízká, SYTANLAAF motiv je i v rámci těchto receptorů vysoce konzervovaný. To vše je v souladu s námi navrhovaným vazebným místem pro  $3\alpha 5\beta S$ .

V nedávné době byly publikovány krystalografické studie, které poprvé ukazují strukturu NMDA receptoru včetně transmembránových oblastí (Karakas and Furukawa 2014; Lee *et al.* 2014). Další studie pak pomocí kryo-elektronové mikroskopie ukazuje na výrazné konformační změny v ligand-vázající a aminoterminální doméně po aktivaci a desenzitizaci AMPA receptorů (Meyerson *et al.* 2014). Obě tyto práce přinesly velký pokrok v poznání struktury a dynamiky glutamátových receptorů. Nicméně neodpověděly na otázku, jak vypadá struktura NMDA receptoru v otevřeném stavu. V případě krystalografických studií se jedná o struktury v nepřírozeném stavu, kdy je NMDA receptor vlivem celé řady NMDA parciálních agonistů a antagonistů zafixován ve stavu, který neodpovídá žádnému přirozeně se vyskytujícímu stavu. Na druhé straně kryo-elektronová mikroskopie sice poměrně přesně zachycuje jednotlivé stavy AMPA receptoru, ale její rozlišení neumožňuje bližší analýzu konformačních změn v transmembránové oblasti. Přičemž naše práce ukazuje, že právě v této oblasti se nejspíše nachází vazebné místo pro neurosteroidy.

Předchozí pokusy zabývající se nalezením struktury otevřeného stavu NMDA receptoru s využitím molekulární dynamiky (na základě homologního modelu

vycházejícího ze struktury AMPA receptoru (Sobolevsky *et al.* 2009)) narážely na problém nedostatečného otevření póru iontového kanálu. Výsledné struktury totiž nevykazovaly dostatečné rozevření M3 helixů pro průchod látek, u kterých bylo experimentálně prokázáno, že otevřeným receptorem procházejí (Vyklícky *et al.* 1988; Zarei and Dani 1995; Kazi *et al.* 2014). Námi navrhovaná struktura otevřeného kanálu NMDA receptoru je naproti tomu v souladu s experimentálními výsledky, které udávají limity pro rozevření M3 helixů u aktivovaného receptoru. Dokovací pokusy odhalily konkrétní vazebné místo a nejpravděpodobnější orientaci  $3\alpha5\beta S$ , čímž potvrdily naše závěry založené na experimentálních datech (viz Obrázek 4.12).

## 6 SOUHRN

### 6.1 Vztah mezi strukturou 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S derivátů a jejich schopností modulovat NMDA receptor

- A** Postraní řetězec na C17 zásadně ovlivňuje hodnotu  $IC_{50}$  derivátů 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S na NMDA receptorech. Záměnou tohoto řetězce z acetylu na 2-butyl bylo dosaženo snížení hodnoty  $IC_{50}$  z 31.1  $\mu$ M pro 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S na 84 nM pro 5 $\beta$ -androstan-17 $\beta$ -(2'-butyl) 3 $\alpha$ -yl-sulfát.
- B** Analogy 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S se stereospecifickými modifikacemi na C17 mají různé hodnoty  $IC_{50}$  pro inhibici NMDA receptorů. Při záměně postranního řetězce na C17 z acetylu na perfluorobenzoát došlo v případě  $\alpha$  izomeru ke snížení hodnoty  $IC_{50}$  z 31.1  $\mu$ M pro 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S na 3.7  $\mu$ M. V případě  $\beta$  izomeru se hodnota  $IC_{50}$  = 37.3  $\mu$ M v rámci chyby nezměnila. Pro perfluorobenzoátové deriváty s kyselinou glutamovou na C3, byla stereospecificita ještě výraznější:  $IC_{50}$  = 44  $\mu$ M pro  $\alpha$  izomer a  $IC_{50}$  = 1580  $\mu$ M pro  $\beta$  izomer.
- C** Záporně nabitá sulfátová skupina na C3 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S má klíčovou roli pro jeho inhibiční působení na NMDA receptorech. Nahrazení sulfátu, skupinou s celkovým nulovým nábojem vede k úplné eliminaci inhibičního působení takových derivátů na NMDA receptory. Záměna negativního náboje za pozitivní naopak snižuje hodnotu  $IC_{50}$  těchto derivátů (6.8  $\mu$ M pro PA-27 a 5.9  $\mu$ M pro PA-35, oproti 31.1  $\mu$ M pro 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S). Vzdálenost náboje od C3 nekoreluje s hodnotami  $IC_{50}$  těchto derivátů.
- D** 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S inhibuje tonicky aktivované receptory ~2-násobně více než fazicky aktivované receptory NMDA receptory. Byl prokázán vliv vzdálenosti nabitě skupiny na C3 na míru inhibice pro tonicky versus fazicky aktivované receptory a tedy i vliv C3 substituentu na vazebnou kinetiku steroidu na NMDA receptor. Pro derivát 5 $\beta$ -pregnan-20-on 3 $\alpha$ -yl-hemipimelát byla hodnota  $IC_{50}$  pro fazicky aktivované receptory asi stonásobně vyšší než pro tonicky aktivované receptory.

## 6.2 Úloha interakce neuroaktivních steroidů s cytoplazmatickou membránou buněk při modulaci NMDA receptorů

- A** Kinetika nástupu a odmývání inhibičního působení  $3\alpha5\beta\text{S}$  na NMDA receptoru je pomalá a netypická pro interakci ligandu s receptorem ve vodném prostředí. Navíc rychlost odmývání inhibičního působení neurosteroidů je urychlována  $\beta$  a  $\gamma$  cyklodextriny.
- B**  $3\alpha5\beta\text{S}$  se ve vodném prostředí vyskytuje převážně ve formě micel s kritickou micelární koncentrací  $\sim 0.4 \mu\text{M}$ . Pomocí matematického modelu doplněného o experimentálně zjištěné parametry bylo ukázáno, že  $3\alpha5\beta\text{S}$  v monomerní formě se v blízkosti membrány může vyskytovat v koncentracích výrazně převyšujících kritickou micelární koncentraci.

### 6.3 Molekulární mechanismus působení neurosteroidů na NMDA receptorech

- A** Na základě analýzy inhibičního působení  $3\alpha5\beta\text{S}$  na prokaryotickém glutamátovém receptoru GluR0 a na zkrácené variantě NMDA receptoru bez ATD domény (GluN1 $\Delta\text{N}$ /GluN2B $\Delta\text{N}$ ) byly vytipovány oblasti na M1 a M3 helixech, které by se mohly podílet na inhibičním působení  $3\alpha5\beta\text{S}$ . Mutační analýza M1 a M3 oblastí na GluN1 a GluN2B podjednotkách ukázala, že většina aminokyselinových záměn nemá na inhibiční působení  $3\alpha5\beta\text{S}$  signifikantní vliv nebo jeho inhibiční působení zvyšuje. Výjimku tvořily mutace v konzervovaném SYTANLAAF motivu, nacházející se na obou podjednotkách na úrovni vnějšího ústí receptorového póru.
- B** Výsledky mutační analýzy, které naznačují že  $3\alpha5\beta\text{S}$  působí jako blokátor otevřeného kanálu v ústí receptorového póru, byly dále podpořeny kompeticí mezi  $3\alpha5\beta\text{S}$  a blokátorem otevřeného kanálu 9-aminoakridinem o vazebné místo nebo přístup k němu. Výsledky ukazující napět'ovou závislostí inhibice NMDA receptorů za přítomnosti  $3\alpha5\beta\text{S}$  nebo kladně nabitého steroidu PA-A, měřených na divokém typu a mutovaných formách receptoru se sníženou citlivostí k  $3\alpha5\beta\text{S}$  rovněž podpořily tuto hypotézu.
- C** S využitím výsledků proudově napět'ových závislostí byl pomocí molekulárního modelování vytvořen model NMDA receptoru v konformaci odpovídající otevřenému stavu. Pomocí dokování byla následně nalezena nejpravděpodobnější orientace  $3\alpha5\beta\text{S}$  ve vazebném místě.



## 7 ZÁVĚR

Správná funkce NMDA podtypu glutamátových receptorů je klíčová pro normální funkci CNS, zvláště důležitá je pak pro učení a paměť. Na druhou stranu jejich nadměrná aktivace v řadě patofyziologických stavů vede k excitotoxicitě a následné smrti nervových buněk. Přes veškeré úsilí mnoha vědeckých laboratoří a farmaceutických firem, které v posledních 25 letech vynaložili miliardy dolarů na vývoj antagonistů NMDA receptorů (Monaghan *et al.* 2012), se doposud nepodařilo vyvinout takový lék, u kterého by se v klinických studiích prokázal léčebný efekt a přitom nebyl později vyřazen pro své nežádoucí vedlejší účinky.

Deriváty neurosteroidů jsou vzhledem k jejich příznivým vlastnostem nadějnou skupinou NMDA antagonistů. Nicméně k nalezení konečné struktury případného léčiva vede ještě dlouhá cesta. Zde předkládaná práce odhaluje zatím neznámé strukturní determinanty přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu  $3\alpha,5\beta S$ , které jsou důležité pro jeho inhibiční účinek a to včetně mechanismu tohoto účinku i s konkrétní strukturou vazebného místa. Doufejme, že tyto nově nabitě poznatky v budoucnu přispějí k nalezení nových účinných látek využitelných v klinické praxi pro léčbu chorob spojených s poruchami funkce NMDA receptorů.

## **7.1 Vztah mezi strukturou 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S derivátů a jejich schopností modulovat NMDA receptor**

Testováním celé řady nově syntetizovaných C3 a C17 derivátů 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S na GluN1/GluN2B receptorech jsme ukázali, že sulfátová skupina na C3 a acetylová skupina na C17 na molekule 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S hrají významnou roli při jeho inhibičním působení na NMDA receptorech. Vhodnou substitucí těchto funkčních skupin lze významně zvýšit účinnost těchto nových látek, a zároveň ovlivnit poměr mezi  $IC_{50}$  pro jejich účinek na fazicky versus tonicky aktivované receptory.

## **7.2 Úloha interakce neuroaktivních steroidů s cytoplazmatickou membránou buněk při modulaci NMDA receptorů**

Potvrdili jsme hypotézu, že cytoplazmatická membrána buněk hraje důležitou roli pro působení 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S na NMDA receptorech. Byl navržen nový mechanismus, díky kterému může vlivem cytoplazmatické membrány docházet v její blízkosti k lokálnímu zvýšení koncentrace monomerní formy amfipatických látek nad kritickou micelární koncentrací. Tyto poznatky mohou přispět k vysvětlení interakce lipofilních látek i s jinými typy receptorů.

## **7.3 Molekulární mechanismus působení neurosteroidů na NMDA receptorech**

Podářilo se nám identifikovat vazebné místo pro 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S na NMDA receptoru nacházející se ve vysoce konzervovaném SYTANLAAF motivu ve vnějším ústí póru NMDA receptoru. Navíc jsme ukázali (dosud nepublikovanou) strukturu TMD NMDA receptoru v otevřeném stavu, včetně navázané molekuly 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S v její pravděpodobné orientaci. Struktura otevřeného stavu přináší další střípek do mozaiky pro pochopení konformačních změn, ke kterým dochází během vrátkování NMDA receptorů.

## 8 SEZNAM PUBLIKACÍ

**Tato práce je založená na výsledcích uveřejněných v následujících impaktovaných publikacích:**

VIDRNA L, CERNY I, POUZAR V, BOROVSKA J, **VYKLICKY V**, VYKLICKY L, JR., CHODOUNSKA H: Azido analogs of neuroactive steroids. *Steroids* **76**: 1043-1050, 2011.

[**VV** - provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza]

(IF = 2.829, rok 2011)

CERNY I, BUDESINSKY M, POUZAR V, **VYKLICKY V**, KRAUSOVA B, VYKLICKY L, JR.: Neuroactive steroids with perfluorobenzoyl group. *Steroids* **77**: 1233-1241, 2012.

[**VV** - provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza]

(IF = 2.803, rok 2012)

KANIAKOVA M, KRAUSOVA B, **VYKLICKY V**, KORINEK M, LICHNEROVA K, VYKLICKY L, HORAK M: Key amino acid residues within the third membrane domains of NR1 and NR2 subunits contribute to the regulation of the surface delivery of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **287**: 26423-26434, 2012.

[**VV** - provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza]

(IF = 4.651, rok 2012)

BOROVSKA J, **VYKLICKY V**, STASTNA E, KAPRAS V, SLAVIKOVA B, HORAK M, CHODOUNSKA H, VYKLICKY L, JR.: Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *British Journal of Pharmacology* **166**: 1069-1083, 2012.

[**VV** - návrh experimentů, provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza, provádění fluorescenčních experimentů a jejich analýza]

(IF = 4.409, rok 2012)

**VYKLIČKY V**, KRAUSOVA B, CERNY J, BALIK A, ZAPOTOCKY M, LICHNEROVA K, SMEJKALOVA T, KANIAKOVA M, KORINEK M, PETROVIC M, KACER P, HORAK M, CHODOUNSKA H, VYKLIČKY L: Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the agonist-induced conformational states of the channel vestibule. *Scientific Reports*, 2015. (doi: 10.1038/srep10935)

[VV - návrh experimentů, provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza, příprava bodových mutací]

(IF = 5.078, 2013)

KUDOVA E, CHODOUNSKA H, SLAVIKOVA B, BUDESINSKY M, NEKARDOVA M, **VYKLIČKY V**, KRAUSOVA B, SVEHLA P, VYKLIČKY L: New Class of Potent Inhibitors of NMDA Receptor: Sulfated Neurosteroids with Nonpolar Substituent on the D-ring. *Journal of Medicinal Chemistry*.

(v revizi)

[VV - návrh experimentů, provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza]

**VYKLIČKY V\***, SMEJKALOVA T\*, BALIK A, KRAUSOVA B, KORINEK M, HORAK M, CERNY J, NEKARDOVA M, CHODOUNSKA H, STASTNA E, VYKLIČKY L: Preferential inhibition of tonically over phasically activated NMDA receptors by pregnane derivatives.

(manuskript)

[VV - návrh experimentů, provádění elektrofyziologických experimentů a jejich analýza]

Publikované články jsou součástí příloh.

## Ostatní autorovy impaktované publikace:

DEDIC R, VYKLICKY V, SVOBODA A, HALA J: Phosphorescence of Singlet Oxygen and 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphine: Time and Spectral-resolved Study. *Journal of Molecular Structure* **924-926**: 153-156, 2009.

(IF=1.551, rok 2009)

DEDIC R, VYKLICKY V, SVOBODA A, HALA J: Singlet Oxygen Lifetime Dependence on Photosensitizer Concentration in Lipid Films. *Journal of Luminescence* **131(3)**: 442-444, 2011.

(IF=2.102, rok 2011)

KORINEK M, KAPRAS V, VYKLICKY V, ADAMUSOVA E, BOROVSKA J, VALES K, STUCHLIK A, HORAK M, CHODOUNSKA H, VYKLICKY L, JR.: Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids* **76**: 1409-1418, 2011.

(IF = 2.829, rok 2011)

VYKLICKY V, DEDIC R, CURKANIUK N, HALA J: Spectral- and time-resolved phosphorescence of photosensitizers and singlet oxygen: From *in vitro* towards *in vivo*. *Journal of Luminescence* **143**: 729-733, 2013.

(IF=2.367, rok 2013)

ADAMUSOVÁ E, CAIS O, VYKLICKÝ V, KUDOVÁ E, CHODOUNSKÁ H, HORÁK M, VYKLICKÝ JR L: Pregnenolone sulfate activates NMDA receptor channels. *Physiological Research* **62(6)**:731-6, 2013.

(IF = 1.487, rok 2013)

VYKLICKY V, KORINEK M, SMEJKALOVA T, BALIK A, KRAUSOVA B, KANIAKOVA M, LICHNEROVA K, CERNY J, KRUSEK J, DITTERT I: Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research* **63**: S191-S203, 2014.

(IF = 1.487, rok 2013)

DEDIC R, STIBAL A, **VYKLICKY V**, FRANEK M, SVOBODA A, HALA J: Parallel fluorescence and phosphorescence monitoring of singlet oxygen photosensitization in rats. *Journal of Innovative Optical Health Sciences* **8(6)**: 1550037/1-14, 2015.  
(IF=0.93, rok 2014)

KORINEK M, **VYKLICKY V**, BOROVSKA J, LICHNEROVA K, KANIAKOVA M, KRAUSOVA B, KRUSEK J, BALIK A, SMEJKALOVA T, HORAK M, VYKLICKY L: Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. *The Journal of Physiology* **593(10)**: 2279-2293, 2015.  
(IF=4.544, rok 2013)

### **Kapitoly v monografiích:**

**VYKLICKY V**, KORINEK M, BALIK A, SMEJKALOVA T, KRAUSOVA B, VYKLICKY L: Analysis of whole-cell NMDA receptor responses. Gabriela K. Popescu (ed.), *Iontropic Glutamate Receptor Technologies, Neuromethods*, vol. 106, © Springer Science+Business Media New York 2015.

### **Patenty:**

CHODOUNSKA H, KAPRAS V, STASTNA E, BOROVSKA J, **VYKLICKY V**, VYKLICKY L, VALES K, STUHLIK A, RAMBOUSEK L: Steroid cationic compounds, way of their production, their applications and pharmaceutical substances containing them, (2011). (PCT 15.02.2011 CZ PV 2011-81)

## 9 LITERATURA

- ABDRACHMANOVA G, CHODOUNSKA H, VYKLIČKY L, JR.: Effects of steroids on NMDA receptors and excitatory synaptic transmission in neonatal motoneurons in rat spinal cord slices. *Eur J Neurosci* **14**: 495-502., 2001.
- ABDRACHMANOVA G, TEISINGER J, VLACHOVA V, VYKLIČKY L: Molecular and functional properties of synaptically activated NMDA receptors in neonatal motoneurons in rat spinal cord slices. *Eur J Neurosci* **12**: 955-963, 2000.
- AKK G, COVEY DF, EVERS AS, STEINBACH JH, ZORUMSKI CF, MENNERICK S: Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* **116**: 35-57, 2007.
- AKK G, SHU HJ, WANG C, STEINBACH JH, ZORUMSKI CF, COVEY DF, MENNERICK S: Neurosteroid access to the GABAA receptor. *J Neurosci* **25**: 11605-11613, 2005.
- ARACA VA Y, PEREIRA EF, MAELICKE A, ALBUQUERQUE EX: Memantine blocks alpha7\* nicotinic acetylcholine receptors more potently than n-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **312**: 1195-1205, 2005.
- ARINAMINPATHY Y, BIGGIN PC, SHRIVASTAVA IH, SANSOM MS: A prokaryotic glutamate receptor: homology modelling and molecular dynamics simulations of GluR0. *FEBS Lett* **553**: 321-327, 2003.
- ASCHER P, NOWAK L: The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol Lond* **399**: 247-266, 1988.
- ASSAF SY, CHUNG SH: Release of endogenous Zn<sup>2+</sup> from brain tissue during activity. *Nature* **308**: 734-736, 1984.
- AUSTIN RP, BARTON P, DAVIS AM, FESSEY RE, WENLOCK MC: The thermodynamics of the partitioning of ionizing molecules between aqueous buffers and phospholipid membranes. *Pharm Res* **22**: 1649-1657, 2005.
- AUSTIN RP, DAVIS AM, MANNERS CN: Partitioning of ionizing molecules between aqueous buffers and phospholipid vesicles. *J Pharm Sci* **84**: 1180-1183, 1995.
- BALESTRINO M, SOMJEN GG: Concentration of carbon dioxide, interstitial pH and synaptic transmission in hippocampal formation of the rat. *J Physiol* **396**: 247-266, 1988.
- BAULIEU EE: Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* **23**: 963-987, 1998.
- BENVENISTE M, MAYER ML: Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol Lond* **464**: 131-163, 1993.
- BLANPIED TA, BOECKMAN FA, AIZENMAN E, JOHNSON JW: Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *J Neurophysiol* **77**: 309-323, 1997.
- BOROVSKA J, VYKLIČKY V, STASTNA E, KAPRAS V, SLAVIKOVA B, HORAK M, CHODOUNSKA H, VYKLIČKY L, JR.: Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *Br J Pharmacol* **166**: 1069-1083, 2012.
- BULLOCK AE, CLARK AL, GRADY SR, ROBINSON SF, SLOBE BS, MARKS MJ, COLLINS AC: Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes. *J Neurochem* **68**: 2412-2423, 1997.
- CAMERON K, BARTLE E, ROARK R, FANELLI D, PHAM M, POLLARD B, BORKOWSKI B, RHOADS S, KIM J, ROCHA M, KAHLSON M, KANGALA M, GENTILE L: Neurosteroid binding to the amino terminal and glutamate binding domains of ionotropic glutamate receptors. *Steroids* **77**: 774-779, 2012.
- CASADO M, ASCHER P: Opposite modulation of NMDA receptors by lysophospholipids and arachidonic acid: common features with mechanosensitivity. *J Physiol (Lond)* **513**: 317-330, 1998.
- CERNY I, BUDESINSKY M, POUZAR V, VYKLIČKY V, KRAUSOVA B, VYKLIČKY L, JR.: Neuroactive steroids with perfluorobenzoyl group. *Steroids* **77**: 1233-1241, 2012.
- CLEMENTS JD, LESTER RA, TONG G, JAHR CE, WESTBROOK GL: The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* **258**: 1498-1501, 1992.
- CLEMENTS JD, WESTBROOK GL: Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* **7**: 605-613, 1991.

- CORPECHOT C, ROBEL P, AXELSON M, SJOVALL J, BAULIEU EE: Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 4704-4707, 1981.
- CORPECHOT C, SYNGUELAKIS M, TALHA S, AXELSON M, SJOVALL J, VIHKO R, BAULIEU EE, ROBEL P: Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res* **270**: 119-125, 1983.
- COSTA BM, IRVINE MW, FANG G, EAVES RJ, MAYO-MARTIN MB, LAUBE B, JANE DE, MONAGHAN DT: Structure-activity relationships for allosteric NMDA receptor inhibitors based on 2-naphthoic acid. *Neuropharmacology* **62**: 1730-1736, 2012.
- COSTA BM, IRVINE MW, FANG G, EAVES RJ, MAYO-MARTIN MB, SKIFTER DA, JANE DE, MONAGHAN DT: A novel family of negative and positive allosteric modulators of NMDA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **335**: 614-621, 2010.
- CULL-CANDY S, BRICKLEY S, FARRANT M: NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 327-335., 2001.
- DAVIES J, EVANS RH, JONES AW, SMITH DA, WATKINS JC: Differential activation and blockade of excitatory amino acid receptors in the mammalian and amphibian central nervous systems. *Comp Biochem Physiol C* **72**: 211-224, 1982.
- DINGLELINE R, BORGES K, BOWIE D, TRAYNELIS SF: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**: 7-61, 1999.
- DRAVID SM, PRAKASH A, TRAYNELIS SF: Activation of recombinant NR1/NR2C NMDA receptors. *J Physiol* **586**: 4425-4439, 2008.
- DURAND GM, BENNETT MV, ZUKIN RS: Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Oct 15;90(20):9739]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6731-6735, 1993.
- EMNETT CM, EISENMAN LN, TAYLOR AM, IZUMI Y, ZORUMSKI CF, MENNERICK S: Indistinguishable synaptic pharmacodynamics of the N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers memantine and ketamine. *Mol Pharmacol* **84**: 935-947, 2013.
- EVANS RH, FRANCIS AA, WATKINS JC: Selective antagonism by Mg<sup>2+</sup> of amino acid-induced depolarization of spinal neurones. *Experientia* **33**: 489-491, 1977.
- FLOOD JF, ROBERTS E: Dehydroepiandrosterone sulfate improves memory in aging mice. *Brain Res* **448**: 178-181, 1988.
- FORSYTHE ID, WESTBROOK GL, MAYER ML: Modulation of excitatory synaptic transmission by glycine and zinc in cultures of mouse hippocampal neurons. *J Neurosci* **8**: 3733-3741, 1988.
- GEE KW, BOLGER MB, BRINTON RE, COIRINI H, MCEWEN BS: Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure- activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* **246**: 803-812, 1988.
- GEOFFROY M, LAMBOLEZ B, AUDINAT E, HAMON B, CREPEL F, ROSSIER J, KADO RT: Reduction of desensitization of a glutamate ionotropic receptor by antagonists. *Mol Pharmacol* **39**: 587-591, 1991.
- GIBB AJ, COLQUHOUN D: Glutamate activation of a single NMDA receptor-channel produces a cluster of channel openings. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **243**: 39-45, 1991.
- GIELEN M, SIEGLER RETCHLESS B, MONY L, JOHNSON JW, PAOLETTI P: Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* **459**: 703-707, 2009.
- GREEN GM, GIBB AJ: Characterization of the single-channel properties of NMDA receptors in laminae I and II of the dorsal horn of neonatal rat spinal cord. *Eur J Neurosci* **14**: 1590-1602, 2001.
- GROBIN AC, ROTH RH, DEUTCH AY: 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, 1992.
- HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**: 85-100, 1981.
- HAYASHI T: Effects of sodium glutamate on the nervous system. *The Keio Journal of Medicine* **3**: 183-192, 1954.
- HEBB D: The organization of behavior. 1949. *New York Wiley*: 2002.
- HOLLMANN M, HEINEMANN S: Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* **17**: 31-108, 1994.



- HOLUBOVA K, NEKOVAROVA T, PISTOVCAKOVA J, SULCOVA A, STUCHLIK A, VALES K: Pregnanolone Glutamate, a Novel Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor, Exerts Antidepressant-Like Properties in Animal Models. *Front Behav Neurosci* **8**: 130, 2014.
- HORAK M, VLCEK K, PETROVIC M, CHODOUNSKA H, VYKLIČKY L, JR.: Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *J Neurosci* **24**: 10318-10325, 2004.
- HOSIE AM, WILKINS ME, SMART TG: Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* **116**: 7-19, 2007.
- HUETTNER JE, BEAN BP: Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 1307-1311, 1988.
- CHANDRASEKAR R: Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction. *Frontiers in molecular neuroscience* **6**: 2013.
- CHANG HR, KUO CC: The activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. *J Neurosci* **28**: 1546-1556, 2008.
- CHATTERTON JE, AWOBULUYI M, PREMKUMAR LS, TAKAHASHI H, TALANTOVA M, SHIN Y, CUI J, TU S, SEVARINO KA, NAKANISHI N, TONG G, LIPTON SA, ZHANG D: Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**: 793-798, 2002.
- CHEN N, LUO T, RAYMOND LA: Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J Neurosci* **19**: 6844-6854., 1999.
- CHISARI M, EISENMAN LN, COVEY DF, MENNERICK S, ZORUMSKI CF: The sticky issue of neurosteroids and GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* **33**: 299-306, 2010.
- CHISARI M, EISENMAN LN, KRISHNAN K, BANDYOPADHYAYA AK, WANG C, TAYLOR A, BENZ A, COVEY DF, ZORUMSKI CF, MENNERICK S: The influence of neuroactive steroid lipophilicity on GABAA receptor modulation: evidence for a low-affinity interaction. *J Neurophysiol* **102**: 1254-1264, 2009.
- CHOI DW: Excitotoxic cell death. *Journal of neurobiology* **23**: 1261-1276, 1992.
- ISHII T, MORIYOSHI K, SUGIHARA H, SAKURADA K, KADOTANI H, YOKOI M, AKAZAWA C, SHIGEMOTO R, MIZUNO N, MASU M, NAKANISHI S: Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* **268**: 2836-2843., 1993.
- JAHR CE: High probability opening of NMDA receptor channels by L-glutamate. *Science* **255**: 470-472, 1992.
- JOHNSON JW, KOTERMANSKI SE: Mechanism of action of memantine. *Curr Opin Pharmacol* **6**: 61-67, 2006.
- KANIAKOVA M, KRAUSOVA B, VYKLIČKY V, KORINEK M, LICHNEROVA K, VYKLIČKY L, HORAK M: Key amino acid residues within the third membrane domains of NR1 and NR2 subunits contribute to the regulation of the surface delivery of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **287**: 26423-26434, 2012.
- KARAKAS E, FURUKAWA H: Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* **344**: 992-997, 2014.
- KAUER JA, MALENKA RC, NICOLL RA: NMDA application potentiates synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* **334**: 250-252, 1988.
- KAWATO S, YAMADA M, KIMOTO T: Brain neurosteroids are 4th generation neuromessengers in the brain: cell biophysical analysis of steroid signal transduction. *Adv Biophys* **37**: 1-48, 2003.
- KAZI R, DAI J, SWEENEY C, ZHOU HX, WOLLMUTH LP: Mechanical coupling maintains the fidelity of NMDA receptor-mediated currents. *Nat Neurosci* **17**: 914-922, 2014.
- KEMP JA, FOSTER AC, LEESON PD, PRIESTLEY T, TRIDGETT R, IVERSEN LL, WOODRUFF GN: 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, 1988.
- KLETECKOVA L, TSENOV G, KUBOVA H, STUCHLIK A, VALES K: Neuroprotective effect of the 3alpha5beta-pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats. *Neurosci Lett* **564**: 11-15, 2014.
- KORINEK M, KAPRAS V, VYKLIČKY V, ADAMUSOVA E, BOROVSKA J, VALES K, STUCHLIK A, HORAK M, CHODOUNSKA H, VYKLIČKY L, JR.: Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids* **76**: 1409-1418, 2011.

- KOTERMANSKI SE, JOHNSON JW: Mg<sup>2+</sup> imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. *J Neurosci* **29**: 2774-2779, 2009.
- KRAIG RP, FERREIRA-FILHO CR, NICHOLSON C: Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment. *J Neurophysiol* **49**: 831-850, 1983.
- KRISHTAL OA, OSIPCHUK YV, SHELEST TN, SMIRNOFF SV: Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res* **436**: 352-356, 1987.
- KUSSIUS CL, KAUR N, POPESCU GK: Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors. *J Neurosci* **29**: 6819-6827, 2009.
- KUTSUWADA T, KASHIWABUCHI N, MORI H, SAKIMURA K, KUSHIYA E, ARAKI K, MEGURO H, MASAKI H, KUMANISHI T, ARAKAWA M, ET AL.: Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* **358**: 36-41, 1992.
- LEE C-H, LÜ W, MICHEL JC, GOEHRING A, DU J, SONG X, GOUAUX E: NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature*: 2014.
- LEESON PD, BAKER R, CARLING RW, CURTIS NR, MOORE KW, WILLIAMS BJ, FOSTER AC, DONALD AE, KEMP JA, MARSHALL GR: Kynurenic acid derivatives. Structure-activity relationships for excitatory amino acid antagonism and identification of potent and selective antagonists at the glycine site on the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Med Chem* **34**: 1243-1252, 1991.
- LEGENDRE P, WESTBROOK GL: The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. *J Physiol Lond* **429**: 429-449, 1990.
- LESTER RA, JAHR CE: NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *J Neurosci* **12**: 635-643, 1992.
- LIPTON SA: Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci* **16**: 527-532, 1993.
- LOW CM, LYUBOSLAVSKY P, FRENCH A, LE P, WYATTE K, THIEL WH, MARCHAN EM, IGARASHI K, KASHIWAGI K, GERNERT K, WILLIAMS K, TRAYNELIS SF, ZHENG F: Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. *Mol Pharmacol* **63**: 1212-1222, 2003.
- LYNCH MA: Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* **84**: 87-136, 2004.
- MAYER ML, VYKLIČKY L, JR.: The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. *J Physiol Lond* **415**: 351-365, 1989.
- MAYER ML, VYKLIČKY L, JR., CLEMENTS J: Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* **338**: 425-427, 1989.
- MENNERICK S, LAMBERTA M, SHU HJ, HOGINS J, WANG C, COVEY DF, EISENMAN LN, ZORUMSKI CF: Effects on membrane capacitance of steroids with antagonist properties at GABAA receptors. *Biophys J* **95**: 176-185, 2008.
- MEYERSON JR, KUMAR J, CHITTORI S, RAO P, PIERSON J, BARTESAGHI A, MAYER ML, SUBRAMANIAM S: Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization. *Nature*: 2014.
- MONAGHAN DT, IRVINE MW, COSTA BM, FANG G, JANE DE: Pharmacological modulation of NMDA receptor activity and the advent of negative and positive allosteric modulators. *Neurochem Int* **61**: 581-592, 2012.
- MONYER H, SPRENGEL R, SCHOEPFER R, HERB A, HIGUCHI M, LOMELI H, BURNASHEV N, SAKMANN B, SEEBURG PH: Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **256**: 1217-1221, 1992.
- MORING J, NIEGO LA, GANLEY LM, TRUMBORE MW, HERBETTE LG: Interaction of the NMDA receptor noncompetitive antagonist MK-801 with model and native membranes. *Biophys J* **67**: 2376-2386, 1994.
- MORIYOSHI K, MASU M, ISHII T, SHIGEMOTO R, MIZUNO N, NAKANISHI S: Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**: 31-37., 1991.
- MURTHY SE, SHOGAN T, PAGE JC, KASPEREK EM, POPESCU GK: Probing the activation sequence of NMDA receptors with lurcher mutations. *J Gen Physiol* **140**: 267-277, 2012.
- NASMAN B, OLSSON T, BACKSTROM T, ERIKSSON S, GRANKVIST K, VIITANEN M, BUCHT G: Serum dehydroepiandrosterone sulfate in Alzheimer's disease and in multi-infarct dementia. *Biol Psychiatry* **30**: 684-690, 1991.
- NOWAK L, BREGESTOVSKI P, ASCHER P, HERBET A, PROCHIANTZ A: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**: 462-465, 1984.
- OGDEN KK, TRAYNELIS SF: New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **32**: 726-733, 2011.

- PAOLETTI P: Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* **33**: 1351-1365, 2011.
- PAOLETTI P, ASCHER P, NEYTON J: High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* **17**: 5711-5725, 1997.
- PAPOUIN T, LADÉPÊCHE L, RUEL J, SACCHI S, LABASQUE M, HANINI M, GROG L, POLLEGIONI L, MOTHET J-P, OLIET SH: Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* **150**: 633-646, 2012.
- PARK-CHUNG M, MALAYEV A, PURDY RH, GIBBS TT, FARB DH: Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res* **830**: 72-87., 1999.
- PARK-CHUNG M, WU FS, FARB DH: 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, 1994.
- PARK-CHUNG M, WU FS, PURDY RH, MALAYEV AA, GIBBS TT, FARB DH: Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol* **52**: 1113-1123, 1997.
- PATNEAU DK, MAYER ML: Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci* **10**: 2385-2399, 1990.
- PELLEGRINI-GIAMPIETRO DE, BENNETT MV, ZUKIN RS: Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an in situ hybridization study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 4157-4161, 1991.
- PERIN-DUREAU F, RACHLINE J, NEYTON J, PAOLETTI P: Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* **22**: 5955-5965, 2002.
- PETRALIA RS, SANS N, WANG Y-X, WENTHOLD RJ: Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience* **29**: 436-452, 2005.
- PETROVIC M, SEDLACEK M, CAIS O, HORAK M, CHODOUNSKA H, VYKLIČKY L, JR.: Pregnenolone sulfate modulation of N-methyl-D-aspartate receptors is phosphorylation dependent. *Neuroscience* **160**: 616-628, 2009.
- PETROVIC M, SEDLACEK M, HORAK M, CHODOUNSKA H, VYKLIČKY L, JR.: 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *J Neurosci* **25**: 8439-8450, 2005.
- PIN J-P, ACHER F: The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders* **1**: 297-317, 2002.
- POPESCU G: Mechanism-based targeting of NMDA receptor functions. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2100-2111, 2005.
- QIU S, HUA Y-L, YANG F, CHEN Y-Z, LUO J-H: Subunit assembly of N-methyl-d-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 24923-24930, 2005.
- RAMBHADRAN A, GONZALEZ J, JAYARAMAN V: Subunit arrangement in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *J Biol Chem* **285**: 15296-15301, 2010.
- RAMBOUSEK L, BUBENIKOVA-VALESOVA V, KACER P, SYSLOVA K, KENNEY J, HOLUBOVA K, NAJMANOVA V, ZACH P, SVOBODA J, STUHLIK A, CHODOUNSKA H, KAPRAS V, ADAMUSOVA E, BOROVSKA J, VYKLIČKY L, VALES K: Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-d-aspartate receptor 3alpha5beta-pregnanolone glutamate. *Neuropharmacology* **61**: 61-68, 2011.
- RANSOM RW, DESCHENES NL: Polyamines regulate glycine interaction with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Synapse* **5**: 294-298, 1990.
- REDDY DS: Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res* **186**: 113-137, 2010.
- RIOU M, STROEBEL D, EDWARDSON JM, PAOLETTI P: An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors. *PloS one* **7**: e35134, 2012.
- ROGAWSKI MA: Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci* **14**: 325-331, 1993.
- ROSENMUND C, FELTZ A, WESTBROOK GL: Synaptic NMDA receptor channels have a low open probability. *J Neurosci* **15**: 2788-2795, 1995.
- ROSENMUND C, WESTBROOK GL: Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. *Neuron* **10**: 805-814, 1993.
- SALUSSOLIA CL, PRODRMOU ML, BORKER P, WOLLMUTH LP: Arrangement of subunits in functional NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience* **31**: 11295-11304, 2011.

- SEDLACEK M, KORINEK M, PETROVIC M, CAIS O, ADAMUSOVA E, CHODOUNSKA H, VYKLIČKY L, JR.: Neurosteroid modulation of ionotropic glutamate receptors and excitatory synaptic transmission. *Physiol Res* **57 Suppl 3**: S49-57, 2008.
- SCHORGE S, COLQUHOUN D: Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *The Journal of neuroscience* **23**: 1151-1158, 2003.
- SCHREIER S, MALHEIROS SV, DE PAULA E: Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim Biophys Acta* **1508**: 210-234, 2000.
- SMOTHERS CT, WOODWARD JJ: Expression of glycine-activated diheteromeric NR1/NR3 receptors in human embryonic kidney 293 cells Is NR1 splice variant-dependent. *J Pharmacol Exp Ther* **331**: 975-984, 2009.
- SOBOLEVSKII AI, KHODOROV BI: Blocker studies of the functional architecture of the NMDA receptor channel. *Neurosci Behav Physiol* **32**: 157-171, 2002.
- SOBOLEVSKY AI, KOSHELEV SG, KHODOROV BI: Interaction of memantine and amantadine with agonist-unbound NMDA-receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurons. *J Physiol* **512 ( Pt 1)**: 47-60, 1998.
- SOBOLEVSKY AI, KOSHELEV SG, KHODOROV BI: Probing of NMDA channels with fast blockers. *J Neurosci* **19**: 10611-10626, 1999.
- SOBOLEVSKY AI, ROSCONI MP, GOUAUX E: X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **462**: 745-756, 2009.
- STERN P, BEHE P, SCHOEPPFER R, COLQUHOUN D: Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **250**: 271-277, 1992.
- SUCHER NJ, AWOBULUYI M, CHOI Y-B, LIPTON SA: NMDA receptors: from genes to channels. *Trends in pharmacological sciences* **17**: 348-355, 1996.
- TARCSAY A, NYIRI K, KESERU GM: Impact of lipophilic efficiency on compound quality. *J Med Chem* **55**: 1252-1260, 2012.
- TOLLE TR, BERTHELE A, ZIEGLGANSBERGER W, SEEBURG PH, WISDEN W: The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci* **13**: 5009-5028, 1993.
- TOVAR KR, WESTBROOK GL: The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* **19**: 4180-4188, 1999.
- TRAYNELIS SF, CULL CANDY SG: Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* **345**: 347-350, 1990.
- TRAYNELIS SF, CULL CANDY SG: Pharmacological properties and H<sup>+</sup> sensitivity of excitatory amino acid receptor channels in rat cerebellar granule neurones. *J Physiol Lond* **433**: 727-763, 1991.
- TRAYNELIS SF, WOLLMUTH LP, MCBAIN CJ, MENNITI FS, VANCE KM, OGDEN KK, HANSEN KB, YUAN H, MYERS SJ, DINGLEDINE R, SIBLEY D: Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* **62**: 405-496, 2010.
- ULBRICH MH, ISACOFF EY: Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 14163-14168, 2008.
- VALES K, RAMBOUSEK L, HOLUBOVA K, SVOBODA J, BUBENIKOVA-VALESOVA V, CHODOUNSKA H, VYKLIČKY L, STUČHLIK A: 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -Pregnanolone glutamate, a use-dependent NMDA antagonist, reversed spatial learning deficit in an animal model of schizophrenia. *Behav Brain Res* **235**: 82-88, 2012.
- VANCE KM, HANSEN KB, TRAYNELIS SF: Modal gating of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *Neuropharmacology* **71**: 184-190, 2013.
- VANDONGEN AM (2008) *Biology of the NMDA receptor*: CRC Press.
- VICINI S, WANG JF, LI JH, ZHU WJ, WANG YH, LUO JH, WOLFE BB, GRAYSON DR: Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* **79**: 555-566, 1998.
- VIDRNA L, CERNY I, POUZAR V, BOROVSKA J, VYKLIČKY V, VYKLIČKY L, JR., CHODOUNSKA H: Azido analogs of neuroactive steroids. *Steroids* **76**: 1043-1050, 2011.
- VOLIANSKIS A, BANNISTER N, COLLETT VJ, IRVINE MW, MONAGHAN DT, FITZJOHN SM, JENSEN MS, JANE DE, COLLINGRIDGE GL: Different NMDA receptor subtypes mediate induction of long-term potentiation and two forms of short-term potentiation at CA1 synapses in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* **591**: 955-972, 2013.
- VYKLIČKY L, JR.: Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol Lond* **470**: 575-600, 1993.

- VYKLIČKY L, JR., BENVENISTE M, MAYER ML: Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *J Physiol Lond* **428**: 313-331, 1990a.
- VYKLIČKY L, JR., KRUSEK J, EDWARDS C: Differences in the pore sizes of the N-methyl-D-aspartate and kainate cation channels. *Neurosci Lett* **89**: 313-318, 1988.
- VYKLIČKY L, JR., VLACHOVA V, KRUSEK J: The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *J Physiol Lond* **430**: 497-517, 1990b.
- VYKLIČKY V, KORINEK M, SMEJKALOVA T, BALIK A, KRAUSOVA B, KANIAKOVA M, LICHEROVA K, CERNY J, KRUSEK J, DITTERT I: Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research* **63**: 2014.
- WATKINS JC, EVANS RH: Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **21**: 165-204, 1981.
- WEAVER CE, JR., MAREK P, PARK-CHUNG M, TAM SW, FARB DH: 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, 1997.
- WEAVER CE, LAND MB, PURDY RH, RICHARDS KG, GIBBS TT, FARB DH: 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., 2000.
- WILLIAMS K: Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* **44**: 851-859, 1993.
- WILLIAMS K: Modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor by polyamines: molecular pharmacology and mechanisms of action. *Biochem Soc Trans* **22**: 884-887, 1994.
- WOODHULL AM: Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J Gen Physiol* **61**: 687-708, 1973.
- WU FS, GIBBS TT, FARB DH: Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol Pharmacol* **37**: 597-602, 1990.
- WU FS, GIBBS TT, FARB DH: Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* **40**: 333-336, 1991.
- XIA P, CHEN HS, ZHANG D, LIPTON SA: Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *J Neurosci* **30**: 11246-11250, 2010.
- YAGHOUBI N, MALAYEV A, RUSSEK SJ, GIBBS TT, FARB DH: Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. *Brain Res* **803**: 153-160, 1998.
- ZAREI MM, DANI JA: Structural basis for explaining open-channel blockade of the NMDA receptor. *J Neurosci* **15**: 1446-1454, 1995.
- ZUKIN RS, BENNETT MV: Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* **18**: 306-313, 1995.

## **10 PŘÍLOHY**