VÝZKUMNÝ ZÁMĚR 1 - SYNTÉZA LÁTEK OVLIVŇUJÍCÍCH GLUTAMÁTERGNÍ NEUROTRANSMISI

Výzkumný cíl 3 : Neuroaktivní steroidy jako třída CNS farmak

Aktivita 1: Neurosteroidy s alosterickým efektem na NMDA receptorech

Cílem této aktivity je syntéza nových steroidních sloučenin s pozitivním alosterickým účinkem na receptorech NMDA.

Specifické kroky:

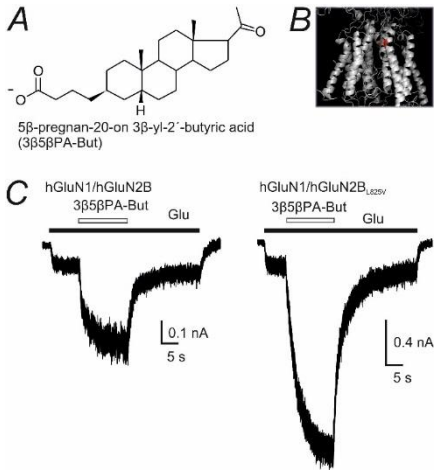
1) Syntéza a testování strukturálních analogů přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu pregnenolon sulfátu s očekávaným pozitivním allosterickým účinkem na NMDA receptorech. Hlavní zájem se soustředí na strukturní požadavky vedoucí k zvýšení biologické aktivity, např. substituenty hemiesterů v postavení C-3 a postavení dvojné vazby v kruhu A nebo B. Včetně syntézy a testování analogů se zvýšenou stabilitou v plazmě a aktivních metabolitů. Takto připravené látky s negativním či kombinovaným účinkem na NMDA receptorech budou dále studovány se zájmem o zjištění jejich biologických a farmakologických vlastností v biologických systémech.
2) Detailní analýza interakce steroidů s NMDA receptorem. V tomto kroku bude využita technika patch-clamp ke studiu účinků nově syntetizovaných steroidů, se záměrem posoudit jejich schopnost zvýšit reakce na NMDAR agonisty receptorů WT hGluN1/hGluN2B.
3) Biofyzikální analýza mutovaných hGluN1/hGluN2 receptorů. Ty budou vybrány na základě mutací nalezených sekvencováním genů u psychiatrických a neurologických pacientů (ty jsou publikovány ve vybraných časopisech, specifických databázích (PubMed https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) a/nebo poskytnuty specializovanými odděleními klinické genetiky (jako je Oddělení dětské neurologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, s nimiž jsme již navázali spolupráci). Pro generování těchto mutací budou použity metody molekulární biologie a analýza patch-clamp mutovaných receptorů odhalí, která funkce NNMDAR je poškozena (afinita ke glutamátu, glycinu, Mg^{2+}, Ca^{2+}-propustnost, pravděpodobnost otevření, přesouvání receptorů, tzv. „trafficking“).
4) Analýza interakce steroidů s mutovaným NMDA receptorem. Zde posoudíme relativní schopnost (potenci) steroidu potencovat mutované receptory. V tomto bodě bude provedena strukturální analýza steroidů na mutovaných receptorech, jako východisko racionálního postupu při vývoji nových farmaceutických sloučenin pro personalizovanou medicínu.
5) Na základě výše popsaných výsledků objednáme GMO myši, které nesou specifickou mutaci. Tato myš bude následně fenotypicky a farmakologicky testována.

Již dříve jsme ukázali, že pregnenolon sulfát (PE-S), přirozeně se vyskytující steroid, posiluje reakce zprostředkované receptory NMDA (Horak et al., 2004) (Horak et al., 2006) (Petrovic et al., 2009). Na základě matematické analýzy a kinetického modelování jsme dospěli k závěru, že afinita receptorů NMDA k PE-S závisí na aktivaci receptorů, přičemž u neaktivovaných receptorů je vysoká, ale u aktivovaných receptorů nízká, a dále, že působení PES je závislé na složení podjednotky receptoru (Horak et al., 2006).

Poslední í genetické studie u člocěka dokazují existenci vícečetných alterací v genech podjednotek NMDAr u několika významných onemocnění mozku, jako jsou poruchy autistického spektra (ASD) nebo epilepsie (Burnashev and Szepetowski, 2015) (Hu et al., 2016). Již publikované údaje spolu s našimi předběžnými nálezy napovídají, že jednobodové mutace de novo v GluN1, GluN2A a GluN2B mohou vést k receptorové hypofunkci, která pravděpodobně přispívá k pozorovaným klinickým symptomům. To jasně ukazuje potřebu látek, které by dokázaly kompenzovat ztrátu funkce NMDAr. Mezi těmito látkami se neurosteroidy s pozitivním alosterickým účinkem mohou ukázat jako zvláště užitečné.

Naše předběžné údaje vykazují výrazné rozdíly mezi humánními GluN1/GluN2B receptory „divokého typu“ (hGluN1/hGluN2B) na jedné straně, a receptory s mutací missense nalezenou u autismu hGluN2B(L825V) (Tarabeux et al., 2011). Biofyzikální analýza naznačuje menší proudy indukované glutamátem v HEK293 buňkách, které vyjadřují hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory, než ve WT. Důvodem k tomu je nižší pravděpodobnost otevření (Po) v mutovaných receptorech (~1%) v porovnání s receptory WT hGluN1/hGluN2B (8%).

Nebyla zjištěna žádná změna afinity ke glutamátu/glycinu nebo povrchové expresi WT oproti mutovaným receptorům. K testování potenciálu steroidů v léčbě NMDAr kanálopatií jsme použili 5β-pregnan-20-on 3β-yl-2´-kyselina máselnou (3β5βPA-But) (nově syntetizovaný steroid, který má pozitivní alosterický efekt na nativní a rekombinantní receptory potkanů; nezveřejněné údaje) a analyzovali její účinek na hGluN1/hGluN2B a hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory. Obrázek 1 znázorňuje, že 3β5βPA-But v koncentraci 100 µM potencovala hGluN1/hGluN2B receptory 5 krát, zatímco hGluN1/hGluN2B(L825V) receptory byly potencované 10 krát. To svědčí pro terapeutický potenciál steroidů s pozitivním alosterickým účinkem na NMDA receptory v léčbě kanálopatií, které souvisejí s hypofunkcí NMDAR.



Působení 3β5βPABut na mutovaný humánní NMDA receptor související s autismem. ***A.*** Chemická struktura 5β-pregnan-20-on 3β-yl-2´-kyseliny máselné. ***B***. Homologický model membránových domén humánních GluN1/GluN2B receptorů (hGluN1/hGluN2B). Postavení alterace v hGluN2B(L825V) je označeno fialovým písmenem ***C.*** Reakce di-heteromerických humánních GluN1/GluN2B receptorů (hGluN1/hGluN2B) a receptorů s mutací zjištěnou u autismu (hGluN1/hGluN2B(L825V)). Mutované receptory byly potencované kyselinou 3β5βPABut (100 µM) dvakrát více než WT.

Zapojené instituce:

1) Fyziologický ústav AV ČR: Prof. Ladislav Vyklický, MD, PhD, DSc,
2) Ústav organické chemie a biochemie : RNDr. Eva Kudová, PhD.
3) (Již více než 16 let probíhá plodná spolupráce mezi ústavy IPHYS a IOCB v oblasti výzkumu steroidy vyvolané modulace aktivity NMDAR - v prestižních mezinárodních časopisech byly publikovány četné články a bylo přijato pět patentů. Dále jsme nedávno navázali spolupráci s MUDr. Milošem Petrovičem, PhD. z University of Central Lanceshire.

Literatura:

1) Burnashev N, Szepetowski P (2015) NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. Curr Opin Pharmacol 20:73-82.
2) Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2006) Subtype-dependence of N-methyl-d-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. Neuroscience 137:93-102.
3) Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2004) Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24:10318-10325.
4) Hu C, Chen W, Myers SJ, Yuan H, Traynelis SF (2016) Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. Journal of pharmacological sciences 132:115-121.
5) Petrovic M, Sedlacek M, Cais O, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2009) Pregnenolone sulfate modulation of N-methyl-D-aspartate receptors is phosphorylation dependent. Neuroscience 160:616-628.
6) Tarabeux J et al. (2011) Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. Translational psychiatry 1:e55.