PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 648

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07J 5/00	(2006.01)
C07J 1/00	(2006.01)
C07J 31/00	(2006.01)
A61P 25/00	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-757**
(22) Přihlášeno: **27.11.2017**
(40) Zveřejněno: **30.01.2019**
(Věstník č. 5/2019)
(47) Uděleno: **19.12.2018**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **30.01.2019**
(Věstník č. 5/2019)

(56) Relevantní dokumenty:
PARK-CHUNG M. et al.: „Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids“, Molecular Pharmacology, vol. 52, no. 6, 1997, str. 1113 - 1123, ISSN 0026-895X; JANG M.-K. et al.: „A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity“, Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., vol. 101, no. 21, 2004, str. 8198 - 8203, ISSN 0027-8424; KOSTAKIS E. et al.: „The neuroactive steroid Pregnenolone Sulfate stimulates trafficking of functionals N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface via a noncanonical, G protein, and Ca2+-dependent mechanism“, Molecular Pharmacology, vol. 84, no. 2, 2013, str. 261 - 274, ISSN 0026-895X; SLAVIKOVA B. et al.: „Neurosteroid-like inhibitors of N-methyl-D-aspartate receptor: substitoted 2-Sulfates and 2-Hemisuccinates of Perhydrophenanthrene“, Journal of Medicinal Chemistry, vol. 59, no. 10, 2016, str. 4724 - 4739, ISSN 0022-2623; ADLA S. K. et al.: „Physicichemical and biological properties of novel amide-based steroidal inhibitors of NMDA receptors“, Steroids, vol. 117, leden 2017, str. 52 - 61, ISSN 0039-128X.

(73) Majitel patentu:
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., Praha 6, CZ
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, CZ

(72) Původce:
RNDr. Eva Kudová, Ph.D., Praha 4, CZ
MUDr. Ladislav Vyklický, DrSc., Kamenice, CZ

(74) Zástupce:
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., RNDr. Ladislava Součková, Flemingovo náměstí 542/2, 160 00 Praha 6, Dejvice

(54) Název vynálezu:
Cílené ovlivnění důsledku mutace N-methyl-D-aspartátového receptoru

(57) Anotace:
Steroidní sloučeniny umožňující cílené ovlivnění důsledku mutace, která se nachází v membránové části podjednotky lidského N-methyl-D-aspartátového receptoru, mající na receptor potenciační účinek.

CZ 307648 B6

Cílené ovlivnění důsledku mutace N–methyl–D–aspartátového receptoru

Oblast techniky

Steroidní látky mohou potencovat odpovědi NMDA receptoru a kompenzovat tak defekt vyvolaný *de novo* mutacemi genů, kódujících jeho podjednotky. Takový defekt vede ke vzniku závažných většinou vývojově vázaných onemocnění, jakými jsou mentální retardace, neurovývojové poruchy v různých oblastech – řeči, motoriky, intelektu; porucha pozornosti s hyperaktivitou; epilepsie, poruchy autistického spektra (PAS) a schizofrenie.

Dosavadní stav techniky

Zvýšené použití sekvenování DNA nové generace u neurologických pacientů vedlo k doplnění znalostí o možných variantách podjednotek imitovaného N–methyl–D–aspartátového receptoru (NMDAR). Ty hrají důležitou roli v normálním vývoji mozku a jejich poškození vyvolává poruchy, jakými jsou epilepsie, poruchy řeči, motoriky, učení, poruchy autistického spektra (PAS), porucha pozornosti s hyperaktivitou (ADHD), vývojové poruchy a schizofrenie. Funkční výsledky naznačují, že mutace v této oblasti receptoru mají vážné důsledky pro funkci receptoru a neuronů, což může přispět k výskytu symptomů u pacientů i k poškození neuronů.

N–methyl–D–aspartátový receptor (NMDAR) je iontový kanál s heteromerickým ligandem propouštějící ionty Ca^{2+}, který je exprimován v neuronech a gliích. Prakticky všechny okruhy mozku a míchy užívají excitaci vyvolanou přechodnou aktivací NMDAR glutamátem, při níž vznikají NMDAR excitační postsynaptické proudy (EPSC), k regulaci fyziologických funkcí a navíc je tato složka zapojena do různých forem synaptické plasticity (Dingledine et al., 1999; Lynch, 2004; Traynelis et al., 2010; Huganir and Nicoll, 2013).

NMDAR se skládají ze dvou povinných (GluN1) a dvou variabilních podjednotek, které sestávají buď z GluN2 (A až D), nebo GluN3 (A, B) (Traynelis et al., 2010). Podjednotka GluN1 je exprimována v celém systému centrálním nervovém systému (CNS), zatímco čtyři podtypy podjednotek GluN2 (A až D) mají odlišné časové a prostorové expresní vzorce (Akazawa et al., 1994) (Monyer et al., 1994). Exprese GluN2B podjednotky (kódovaná genem GRIN2B) dominuje při rychlé kortikální synaptogenezi v pozdní embryogenezi a v raném postnatálním vývoji (Hall et al., 2007). Existuje řada důkazů, že podjednotka GluN2B hraje důležitou roli při vývoji mozku, tvorbě nervových obvodů, diferenciaci a synaptické plasticitě (Cohen and Greenberg, 2008).

Nedávný pokrok ve vysoce výkonném sekvenování DNA umožnil stanovení četnosti mutací genů kódujících NMDAR u postižených jedinců. Zatímco podjednotka GluN2B je kódována v psychiatrických a neurovývojových poruchách nejčastěji *de novo* mutovaným genem GRIN2B, *de novo* mutace genů GRIN1 a GRIN2A, kódujících GluN1 a GluN2A, jsou méně časté. Je zajímavé, že v případě GRIN2C, GRIN3A a GRIN3B byly popsány pouze vzácné zkrácené mutace, které se mohou vyskytovat jak u zdravých jedinců, tak u pacientů s poruchami vývoje nervové soustavy (Burnashev and Szepetowski, 2015; Hu et al., 2016).

Tabulka 1: Podjednotky NMDA receptoru a geny, které je kódují

Receptor	Podjednotka	Gen	Chromozom
NMDA	GluN1	GRIN1	9q34.3
	GluN2A	GRIN2A	16p13.2
	GluN2B	GRIN2B	12p12
	GluN2C	GRIN2C	17q24-q25
	GluN2D	GRIN2D	19q13.1qter
	GluN3A	GRIN3A	9q31.1
	GluN3B	GRIN3B	19p13.3

Varianty GRIN2B – *de novo* synonymních mutací, missense či nonsense mutací, mutací posunu čtecího rámce nebo místa sestřihu – byly identifikovány u jedinců s definovanými poruchami, jako je defekt intelektu (ID), opožděný vývoj (DD), porucha autistického spektra (ASD, česky PAS), epileptická encefalopatie (EE), schizofrenie (SCZ) a v menší míře porucha pozornosti s hyperaktivitou (ADHD), centrální porucha zraku (CVI) (Burnashev and Szepetowski, 2015; Hu et al., 2016).

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je cílená kompenzace účinků mutací lidského N–methyl–D–aspartátového receptoru látkami steroidní povahy, využitelná pro léčení poruch, souvisejících s geneticky podmíněnými mutacemi podjednotek tohoto receptoru. Nebo přesněji kompenzování dysfunkce GluN2B podjednotek tohoto receptoru, zapříčiněné jejich kódováním mutovaným genem GRIN2B. Pro jednoduchost bude dále pro takové podjednotky používán termín mutované podjednotky. Takové mutace jsou příčinou vzniku závažných, většinou vývojově vázaných chorob, jakými jsou mentální retardace, neurovývojové poruchy v různých oblastech – řeči, motoriky, intelektu; porucha pozornosti s hyperaktivitou (ADHD); epilepsie, poruchy autistického spektra (PAS) a schizofrenie.

Nedávné výsledky bádání ukázaly, že mutace genů kódujících podjednotky NMDA receptoru (Tabulka 1) mohou vést k různým poruchám funkce receptoru. Nyní bylo prokázáno, že mutace, které byly popsány v membránové části GluN2B podjednotky a mající vážné funkční důsledky, lze překvapivě kompenzovat působením některých steroidních látek.

Předmětem předkládaného vynálezu je sloučenina zvolená ze skupiny, zahrnující 20–oxo–pregn–5–en–3β–yl sulfát, androst–5–en–3β–yl hemisukcinát, 20–oxo–5β–pregnan–3–yliden–4'–but–2–enovou kyselinu a 20–oxo–5β–pregnan–3β–yl butanovou kyselinu, pro použití při léčení poruchy intelektu, opožděného vývoje, epilepsie, epileptických spasmů, onemocnění autistického spektra jako důsledku geneticky podmíněné mutace nebo *de novo* mutace membránové části podjednotky GluN2B lidského N–methyl–D–aspartátového receptoru, zahrnující mutace P553L, V558I, W607C, N615I, V618G, S628F, E657G, G820E, G820A, M824R a L825V.

Významem předkládaného vynálezu je sloučenina zvolená ze skupiny, zahrnující 20–oxo–pregn–5–en–3β–yl sulfát, androst–5–en–3β–yl hemisukcinát, 20–oxo–5β–pregnan–3–yliden–4'–but–2–enovou kyselinu a 20–oxo–5β–pregnan–3β–yl butanovou kyselinu, pro použití při léčení poruchy intelektu, opožděného vývoje, epilepsie, epileptických spasmů a onemocnění autistického

spektra, vzniklých v důsledku mutace L825V podjednotky GluN2B lidského N–methyl–D–aspartátového receptoru, vykazující náhradu leucinu v poloze 825 aminokyselinového řetězce GluN2B podjednotky valinem.

Cílem předkládaného vynálezu bylo také objasnit důsledky mutací NMDA receptoru v místech, zjištěných u jedinců s diagnózou poruch vývoje nervové soustavy. Bylo prokázáno, že lidské NMDA receptory, tvořené hGluN1 a hGluN2B podjednotkami (hGluN1/hGluN2B), mají změněnou funkci v případě zavedení mutací do GluN2B podjednotky v oblasti transmebránové domény (TMD). Tyto mutace byly totožné s *de novo* mutacemi, které byly popsány u pacientů se závažnými duševním nebo neurologickým onemocněním, u nichž je velmi pravděpodobné, že mezi onemocněním a mutací je příčinný vztah. Seznam zkoumaných mutací je uveden v tabulce 2 včetně fenotypické charakterizace a lokalizace na chromozomu.

Tabulka 2. Vybrané *de novo* GRIN2B varianty a jejich fenotypické charakteristiky

GluN2B mut.	Genotyp	Fenotyp	Věk, kdy se projeví	Zdroj
P553L	c.1658C>T	ID, hypotonie	Časně postnatální	(de Ligt et al., 2012)
V558I	c.1672G>A	ID	-	(Hamdan et al., 2014) (Lelieveld et al., 2016)
W607C	c.1821G>T	ID, OV, dysmorfické rysy	-	(Yavarna et al., 2015)
N615I	c.1844A>T	WS, ID	7 týdnů	(Lemke et al., 2014)
V618G	c.1853T>G	ID, WS,	4 měsíce	(Lemke et al., 2014)
S628F	c.1883C>T	ID, OV	-	(Platzer et al., 2017)
E657G	c.1970A>G	ID, OV	-	(Platzer et al., 2017)
G820E	c.2459G>A	ID, microcefalie	Časně postnatální	(Hamdan et al., 2014)
G820A	c.2459G>C	ID, OV, DPP, EK, GVL, PAS	-	(Platzer et al., 2017)
M824R	c.2471T>G	ID, OV, mikrocefalie, klinický obraz Rettova syndromu, Epi activita na EEG	2 měsíce	(Zhu et al., 2015)
L825V	c.2473T>G	PAS	-	(Awadalla et al., 2010) (Swanger et al., 2016)

ID – defekt intelektu; OV – opožděný vývoj; WS – West syndrom; Epi – epilepsie a/nebo záchvaty, infantilní křeče; PAS – poruchy autistického spektra; DPP – Dyskinetická porucha pohybu; EK – epileptické křeče; GVL – generalizovaná ztráta objemu mozku

De novo mutace GRJN2B genu, který kóduje GluN2B podjednotku NMDA receptoru, jsou tedy spojeny s defektem intelektu (ID), opožděným vývojem, epilepsií, epileptickými spasmy a onemocněním autistického spektra (PAS). I přesto, že tato onemocnění jsou pravděpodobně kauzálně podmíněna mutací příslušného GRIN2B genu, informace o funkčních důsledcích pro NMDA receptor dosud nebyla známa.

Nyní jsme zjistili, že nejvýznamnější funkční změny u receptoru s mutací v GluN2B podjednotce se týkají pravděpodobnosti otevření (P_o) (tedy relativní schopnosti kanálů NMDA receptoru být v přítomnosti saturující koncentrace glutamátu v otevřeném stavu). Podle našich zjištění pravděpodobnost otevření u různých mutací v GluN2B podjednotce klesla nejméně desetkrát.

Zde testované steroidní sloučeniny pak prokázaly schopnost kompenzovat defekt vyvolaný takovou mutací lidských GluN2B podjednotek, která snižovala pravděpodobnost otevření kanálu receptoru. Analýza ukázala, že receptory obsahující GluN2B s mutací L825V (tj. GluN2B(L825V)) jsou výrazně více potencovány testovanými steroidy, než byly potencovány nemutované receptory (Obr. 3 A, tabulka 6), přičemž nárůst činil až více než 1600 %! Naproti tomu receptory obsahující mutace hGluN2B(V558I), hGluN2B(W607C), hGluN2B(V618G) a hGluN2B(G820A) byly potencovány podobně jako nemutované receptory (viz obr. 3C a tabulka 6).

Schopnost steroidních sloučenin kompenzovat defekt související s mutací GluN2B podjednotky, kterou vykazují osoby s duševním nebo neurologickým onemocněním, byl testován také *in vivo* na myších, které vykazují změnu sociálního chování. Po aplikaci steroidu byly pozorovány mírné změny v chování zvířat směrem ke zvýšené socializaci.

Zmíněné výsledky však představují biologicky extrémní stav, v němž by byly *de novo* mutací poškozeny obě alely, což je v praxi velmi nepravděpodobné. Lze tedy předpokládat, že u lidí v případě mutace jednoho genu na jedné alele a v přítomnosti zdravého genu na druhé alele povede k vytvoření receptoru podle mendelovských pravidel genetiky. Výpočty ukazují, že v případě, že by byl mutovaný receptor dominantní, by byla k plné kompenzaci potřebná potenciace odpovědi receptoru o 67 %. V případě recesivní varianty mutovaného receptoru by k úplně kompenzaci bylo třeba pouze mírné, asi 20 procentní potenciace odpovědi. Účinek testovaných steroidu tyto požadavky mnohonásobně překračuje.

Během vývoje neurony exprimují různé podjednotky a jejich kombinace. V případě kortexu jsou to nejprve převážně GluN2B podjednotky a v malé míře podjednotky GluN2A, přičemž v průběhu vývoje se jejich poměr vyrovná, aby v dospělosti převládl receptor s GluN2A podjednotkami. Lze proto očekávat, že k úspěšné kompenzaci defektu postačí ještě nižší míra potenciace receptoru.

Objasnění výkresů

Obrázek **1**

Lokalizace zkoumaných mutací v podjednotce hGluN2B. A: NMDA receptor a jeho podjednotkové složení. Proteinová sekvence pre–M1, M1, M2, M3, a M4 oblastí podjednotek NMDA receptorů. Membránové oblasti jsou označeny horizontální čarou. B: Stuhové zobrazení modelu GluN1/GluN2B receptoru (Karakas and Furukawa, 2014) (Lee et al., 2014) Vybrané aminokyseliny, které byly změněny u lidských pacientů, jsou zdůrazněny. ABD = agonisty vážící doména, TMD = transmembránová doména. C: M1, M3, a M4 = transmembránové helixy a M2 = klička vytvářející iontový kanál.

Obrázek 2

Mutace TMD podjednotky hGluN2B ovlivňují povrchovou expresi NMDA receptoru. Kvantitativní kolorimetrické stanovení bylo užito k určení relativní povrchové/celkové exprese NMDA receptoru hYFP–GluN1. COS–7 buňky byly transfekovány buď pouze hYFP–GluN1 podjednotkou, nebo hYFP–GluN1 a WT (hGluN2B)/genem kódujícím mutovanou hGluN2B podjednotku. Data ukazují průměr ± SEM; *P < 0,05 je relativní povrchová exprese hYFP–GluN1/hGluN2B (WT nebo imitovaných), statist. vyhodnocení: jednosměrná ANOVA (vícečetná srovnání *versus* WT (Dunnova metoda).

Obrázek 3

Mutace hGluN1/hGluN2B(L825V) je zvýšeně citlivá k modulačnímu vlivu steroidu, zde jsou znázorněny typické odpovědi WT a hGluN2B/hGluN2B(L825V) receptorů na aplikaci steroidu. PE–S (100 μmol.1^{-1}) (A) a AE–hSuc (30 μmol.l^{-1}) (B) potencovaly odpovědi hGluN2B/hGluN2B (WT) receptoru, vyvolané rychlou aplikací 1 μmol.l^{-1} glutamátu a snímané v přítomnosti 30 μmol.l^{-1} glycinu (potenciace o 110 % u PE–S a 612 % u AE–hSuc). Oba steroidy potencovaly odpovědi hGluN2B/hGluN2B(L825V) receptoru přibližně třikrát více než u WT receptoru. C: Graf relativní potenciace vyvolané PE–S (100 μmol.l^{-1}) vůči potenciaci vyvolané AE–hSuc (30 μmol.l^{-1}) u WT a mutovaných receptoru. Data byla proložena lineární regresí (korelační koeficient r = 0,928; P = 0,0764). D, E: Koncentrační závislost vlivu PES a AE–hSuc na odpovědi vyvolané u WT a hGluN2B/hGluN2B(L825V) receptoru rychlou aplikací 1 μmol.l^{-1} glutamátu. Na mutovaných receptorech oba steroidy působily s větší účinností. F, G: Odpovědi WT a hGluN2B/hGluN2B(L825V) receptoru, vyvolané krátkou aplikací (5 ms) 1 mmol.l^{-1} glutamátu (kontrola) a glutamátu v přítomnosti PE–S (100 μmol.l^{-1}) nebo AE–hSuc (30 μmol.l^{-1}). Vertikální čára v levé horní části označuje amplitudu odezvy WT ve stejném měřítku amplitudy, jakou byla zaznamenána v mutantních receptorech.

Příklady uskutečnění vynálezu

Seznam použitých zkratek

NMDA: N–methyl–D–aspartátový receptor GluN1: podjednotka NMDA receptoru
GluN2A: podjednotka NMDA receptoru
hGluN2B: lidská podjednotka NMDA receptoru
GluN2B: podjednotka NMDA receptoru
YFP–hGluN1: lidská podjednotka NMDA receptoru označená žlutým fluorescenčním proteinem
GRIN2B: gen kódující GluN2B podjednotku
GluN2B(L825V): mutovaná podjednotka GluN2B – leucin (L) v pozici 825 byl nahrazen valinem (V)
preM1, M2, M3, M4: transmembránové helixy NMDA receptoru
PE–S: 20–oxopregn–5–en–3β–yl sulfát
AE–hSuc: androst–5–en–3β–yl hemisukcinát
PA–but: 20–oxo–5β–pregnan–3–yliden–4'–but–2–enová kyselina
BAPTA: (l,2–bis(*o*–aminofenoxy)ethane–*N*,*N*,*N'*,*N'*–tetraoctová kyselina
HEPES: kyselina 4–(2–hydroxyethyl)–1–piperazinethansulfonová
EDTA: kyselina ethylendiamintetraoctová
ANOVA: statistický test
DNA: deoxyribonukleová kyselina
Opti–MEM: kultivační médium
ABD: agonistu vážící doména
TMD: transmembránová doména
WT: wild type receptor (nemutovaný)
ADHD: porucha pozornosti s hyperaktivitou
PAS: poruchy autistického spektra
NMDA EPSC: komponenta excitačního postsynaptického proudu vyvolaná aktivací NMDA receptoru.

Transfekce a udržování buněk

Lidské geny kódující podjednotky NMDA receptoru hGluN1 (GenBank, přírůstkové č. NP_015566) a hGluN2B (GenBank, přírůstkové č. NP_000825) byly transfekovány do lidských embryonálních ledvinných buněk (HEK293T). Stejná množství (0,25 mg) DNA kódující GluN1 a GluN2B byly smíchány s 0,9 μl Matra–A Reagent (IBA, Göttingen, Germany) a přidány

ke konfluentním HEK293T buňkám. Po následné trypsinizaci byly buňky resuspendovány v Opti–MEM I (ThermoFisher Scientific, Paisley, UK; katal. 31985062) obsahující 1 % fetálního telecího séra, do kterého bylo přidáno 15 mmol.l^{-1} $MgCl_2$; , 1 mmol.$^{-1}$ D,L–2–amino–5–phosphonovalerové kyseliny and 1 μmol.l^{-1} ketaminu. Mutageneze byla provedena QuikChange Site–Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) podle instrukce výrobce. Po následné PCR reakci byly pozitivní klony přeneseny do XL10–Gold *E.coli* buněk. Byly vybrány pozitivní klony a izolována plazmidová DNA, která byla následně sekvenována. Všechny mutace byly verifikovány DNA sekvenováním. Aminokyseliny jsou číslovány v celém proteinu včetně signálního peptidu.

Elektrofyziologická snímání

Experimenty byly provedeny 12 až 36 hodin po transfekci HEK buněk. Technika terčíkového zámku (patch clamp technique) byla užita pro snímání proudů vyvolaných aktivací NMDA receptoru. Snímání byla provedena při teplotě 21 až 25 stupňů na membránovém potenciálu –60 mV za pomoci zesilovače AXOPATCH 200 A po kompenzaci kapacity a serviho odporu. Pipety byly naplněny následujícím roztokem: (v mmol.l^{-1}): 120 kyselina glukonová, 15 CsCl, 10 BAPTA, 10 HEPES, 3 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 2 ATP–Mg sůl (pH upraveno na 7,2 za pomoci CsOH); extracelulární roztok obsahoval: (v mmol.l^{-1}): 160 NaCl, 2,5 KCl, 10 HEPES, 10 glukóza, 0,2 EDTA, a 0,7 $CaCl_2$ (pH upraveno na 7,3 za pomoci NaOH). Extracelulární roztok obsahoval: glycin (koagonista NMDA receptoru), který byl přítomen ve všech kontrolních a testovacích roztocích. Testované roztoky se steroidy byly připraveny z 20 mmol.l^{-1} zásobního roztoku 20–oxopregn–5en–3β–yl sulfátu, PE–S), 5 mmol.l^{-1} androst–5–en–3β–yl hemisukcinátu (AND–hSuc), případně 10 mmol.l^{-1} 20–oxo–5β–pregnan–3–yliden–4'–but–2–enové kyseliny v DMSO. Výsledné naředění extracelulárního roztoku bylo provedeno při 50 °C po následné 1 minutové sonikaci. Stejná koncentrace DMSO byla přítomna ve všech extracelulárních roztocích. Kontrolní a testované roztoky byly aplikovány pomocí multibarelového aplikačního systému kontrolovaného mikroprocesorovým systémem. Výměna roztoku proběhla během přibližně 15 ms. Byly testovány následující mutace lidské GRIN2B: P553L; V558I; W607C; N615I; V618G; S628F; E657G; G820E; G820A; M824R; L825V. Jedná se o mutace, které se nacházejí v preM1, M2, M3, M4 transmembránových oblastech (Obr. 1).

Bylo zjištěno, že proudové odpovědi vyvolané saturující koncentrací glutamátu vyvolaly u lidského nemutovaného WT (wild type) hGluN1/hGluN2B receptoru odpovědi v hodnotě 66 pA/pF (což je normalizovaná odpověď na velikost buňky). V případě mutovaných receptoru (hGluN2B(V558I) a hGluN2B(L825V) byly odpovědi buď stejně velké jako u WT, nebo byly významně sníženy, popřípadě HEK293 buňky nesoucí mutované geny neodpovídaly na aplikaci glutamátu žádným proudem (tabulka 3).

Tabulka 3. Relativní odpovědi buněk HEK293, exprimujících nemutované WT hGluN1 a WT či mutované hGluN2B receptory

Receptory (hGluN1/)	**Relativní max. proudová odpověď** (pA/pF)
hGluN2B	66 ± 15 (23)
hGluN2B(P553L)	NR (5)
hGluN2B(V558I)	30 ± 11 (12)[†]; P = 0,068[‡]
hGluN2B(W607C)	6,1 ± 1,6 (11)[†]; P = <0,001[‡]
hGluN2B(N615I)	17 ± 5 (9)[†]; P = 0,021[‡]
hGluN2B(V618G)	2,7 ± 1,0 (11)[†]; P = <0,001[‡]
hGluN2B(S628F)	NR (8)
hGluN2B(E657G)	0,7 ± 0,2 (11)[†]; P = <0,001[‡]
hGluN2B(G820E)	NR (5)
hGluN2B(G820A)	1,8 ± 0,6 (7)[†]; P = 0,002[‡]
hGluN2B(M824R)	NR (6)
hGluN2B(L825V)	67 ± 8 (17)[†]; P = 0,198[‡]

Shrnutí současných amplitud vyvolaných 1 mmol.l^{-1} glutamátem, normalizováno s ohledem na kapacitu buněk HEK293.

Údaje jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM (stř. odchylka průměru)
(n) je počet měřených buněk, NR = neodpovídající
[†]Kruskal–Wallisova jednosměrná analýza odchylek na úrovni P = 0,001
[‡]Mann–Whitney Rank Sum Test, P označuje úroveň významnosti ve srovnání s WT

Detailní vyšetření těch receptoru, které měly na glutamát nízkou citlivost, bylo zaměřeno na čtyři možné problémy, které se mohou vzájemně kombinovat, a to je: snížená povrchová exprese receptoru, změna jeho desenzitizace, snížená pravděpodobnost jeho otevření a rovněž změněná citlivost na glutamát nebo glycin – viz tabulka 4. Nejvýznamnější změny byly nalezeny v pravděpodobnosti otevření (P_o) (tedy v relativní schopnosti kanálů NMDA receptoru být v přítomnosti saturující koncentrace glutamátu v otevřeném stavu). Pravděpodobnost otevření nemutovaných hGluN1/hGluN2B receptoru je přibližně 10 %. V případě různě mutovaných receptoru pravděpodobnost otevření klesla přibližně desetkrát (viz tabulka 5).

Tabulka 4. Shrnutí účinnosti glutamátu a glycinu pro mutace v TMD

Receptor hGluN1/	**Glutamát EC_{50} µmol.l^{-1} (*n*) *h***	**Glycin EC_{50} µmol.l^{-1} (*n*) *h***
hGluN2B	1,6 ± 0,1 (25)#	0,23 ± 0,02 (19)#
hGluN2B(V558I)	1,6 ± 0,3 (6)§	0,22 ± 0,05 (5)‡
hGluN2B(W607C)	5,1 ± 0,4 (5)# **	0,43 ± 0,05 (12)# **
hGluN2B(N615I)	2,7 ± 0,2 (5)# **	0,31 ± 0,02 (5)‡
hGluN2B(V618G)	1,8 ± 0,2 (8)§	0,27 ± 0,02 (7)‡
hGluN2B(E657G)	0,5 ± 0,1 (5)# **	0,39 ± 0,08 (5)‡
hGluN2B(G820A)	1,5 ± 0,3 (4)§	0,20 ± 0,09 (3)‡
hGluN2B(L825V)	1,6 ± 0,2 (12)§	0,16 ± 0,01 (5)‡

§Poměr reakcí na 1 mmol.l^{-1} a 3 µmol.l^{-1} glutamátu byl použit k výpočtu EC_{50} (viz rovnice 1, h byl stanoven na 1,4).
‡Pro výpočet EC_{50} byl použit poměr reakcí na 30 µmol.l^{-1} a 0,3 µmol.l^{-1} glycin (viz rovnice 1, h byl stanoven na 1,4).
#Hodnota EC_{50} byla stanovena z logické rovnice (viz rovnice 1) proudů indukovaných 0,3 nebo 1 až 1000 µmol.l^{-1} glutamátu v kontinuální přítomnosti 30 µmol.l^{-1} glycinu nebo 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 µmol.l^{-1} glycinu společně s 1 mmol.l^{-1} glutamátu.
Statistické testy účinnosti byly provedeny na log EC_{50}. ** p <0,001 ve srovnání s kontrolním WT (nepárový t–test).

Tabulka 5. Souhrn desensitizace a pravděpodobnosti otevření kanálu pro mutace v TMD

Receptor (hGluN1/)	**Desensitization** (%), n	**P_o** (%), n
hGluN2B	16,1 ± 2,2 (10)	10,48 ±1,30 (10)
hGluN2B(V558I)	72,9 ± 3,4 (5); P = <0,001	0,66 ± 0,11 (5); P = 0,003
hGluN2B(W607C)	23,5 ± 003 (4); P = 0,088	0,89 ± 0,25 (4); P = 0,006
hGluN2B(V618G)	4,1 ± 2,2 (4); P = 0,008	0,49 ± 0,16 (4); P = 0,006
hGluN2B(L825V)	19,8 ± 3,8 (6); P = 0,357	1,47 ± 1,8 (10); P = 0,001

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM, (n) je počet měřených buněk.

Statistické vyhodnocení: Kruskal–Wallisova jednosměrná analýza odchylek na úrovni P = <0,001; následující Mann–Whitney Rank Sum Test nebo nepárový t–test, P signalizuje význam ve srovnání s WT.

K ovlivnění testovaných receptoru jsme použili tři vybrané steroidy 20–oxopregn–5–en–3β–yl sulfát (PES), androst–5–en–3β–yl hemisukcinát (AE) 20–oxo–5β–pregnan–3–yliden–4'–but–2–enovou kyselinu, o nichž je známo, že potencují odpovědi, vyvolané aktivací potkaních NMDA receptorů. Cílem bylo zjistit, zda a v jaké míře budou schopny kompenzovat defekt vyvolaný mutací lidských GluN2B. Analýza ukázala, že receptory obsahující GluN2B s mutací L825V (tj. GluN2B(L825V)) jsou výrazně více potencovány PE–S (100 μmol.1^{-1}), než byly potencovány nemutované receptory (Obr. 3 A, tabulka 6). Podobný, ještě výraznější účinek na mutované receptory měl i AE–hSuc (30 μmol.l^{-1}). GluN2B(L825V) byly potencovány AE–hSuc o 1647 %. Receptory obsahující hGluN2B(V558I), hGluN2B(W607C), hGluN2B(V618G) a hGluN2B(G820A) byly potencovány podobně jako nemutované receptory (viz Obr. 3C a tabulka 6). Analýza závislosti dávky steroidu na míře potenciace ukázala, že příčinou většího potenciačního účinku steroidu na receptorech, tvořených GluN1/GluN2B(L825V), je jejich zvětšená účinnost, nikoliv změna afinity s jakou na receptoru působí (viz obr. 3D)

Tabulka 6. Souhrn potenciačních účinků steroidu na mutované receptory, tonicky aktivované nízkou koncentrací glutamátu.

Receptor (hGluN1/)	**PE-S** (100 μmol.l^{-1}) (%)	**AE-hSuc** (30 μmol.l^{-1}) (%)	**PA-But** (15 μmol.l^{-1}) (%)
hGluN2B	85 ± 4 (31)	628 ± 71 (19)	212 ± 19 (22)
hGluN2B(V558I)	59 ± 8 (5)†; P = 0,117‡	685 ± 67 (6)††; P = 0,448‡	-9 ± 5 (4)††; P = <0,001‡
hGluN2B(W607C)	73 ± 16 (8)†; P = 0,412‡	406 ± 49 (8)††; P = 0,489‡	160 ± 24 (3)††; P = 0,885‡
hGluN2B(V618G)	96 ± 10 (8)†; P = 0,542‡	509 ± 61 (5)††; P = 0,966‡	67 ± 12 (3)††; P = 0,002‡
hGluN2B(G820A)	74 ± 21 (5)†; P = 0,271‡	411 ± 138 (3)††; P = 0,498‡	7 ± 3 (5)††; P = <0,001‡
hGluN2B(L825V)	197 ± 36 (9)†; P = <0,001‡	1647 ± 425 (7)††; P = <0,001‡	577 ± 78 (10)††; P = <0,001‡

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM, (n) je počet měřených buněk.
†/†† Kruskal–Wallisova jednosměrná analýza odchylek na úrovni P = <0,001; Mann–Whitney
‡ Rank Sum Test nebo nepárový t–test, P signalizuje význam ve srovnání s WT

Zkoumání vlivu steroidu na krátkodobou, přibližně 5ms aplikací 1 mmol.l^{-1} glutamátu (tento způsob aplikace napodobuje aktivaci NMDA receptoru během excitačního synaptického přenosu) ukázalo, že amplituda těchto odpovědí je zvýšená (viz Obr. 3F, G a tabulky 7 a 8) a dále, že dochází ke zpomalení deaktivace (Obr. 3 F, G a tabulky 7 a 8).

Tabulka 7. Souhrn farmakologických vlastností "synaptic–like" odpovědí nemutovaného hGluNl/hGluN2B receptoru

	Kontrola	PE-S (100 μmol.l^{-1})	Kontrola	AE-hSuc (30 μmol.l^{-1})
Potentiace (%)	-	98,7 ± 11,5 (5)	-	924,5 ± 172,7 (5)
τ (ms)	307± 14 (5)†	499 ± 20 (5)‡ *P = <0,001	370 ± 35 (5)†	5961 ± 542 (5)†† *P = <0,001
Zpomalení kinetiky deaktivace	-	1,63 ± 0,06 (5)	-	16,36 ± 1,44 (5)††
Relat. přenesený náboj	-	3,26 ± 0,30 (5)	-	161,36 ± 20,28 (5)

Tabulka 8. Souhrn farmakologických vlastností "synaptic–like" odpovědí imitovaného hGluNlhGluN2B(L825V) receptoru

	Kontrola	PE-S (100 μmol.l^{-1})	Kontrola	AE-hSuc (30 μmol.l^{-1})
Potentiace (%)	-	140,8 ± 10,8 (*5*)	-	2323,1 ± 120,7 (*5*)
τ (ms)	323± 9 (5)†	507 ± 28 (*5*)‡ *P = <0,001	335± 29 (5)†	2467 ± 168 (*5*)†† *P = <0,001
Zpomalení kinetiky deaktivace	-	1,57 ± 0,05 (*5*)	-	7,19 ± 0,59 (*5*)††
Relat. přenesený náboj	-	3,79 ± 0,25 (*5*)	-	179,65 ± 9,11 (*5*)

V obou tabulkách 7 a 8 jsou data vyjádřena jako průměr ± SEM; (n) je počet měřených buněk
* Párovaný t–test, P signalizuje význam ve srovnání s kontrolou
† τ určeno z jediného exponenciálního stanovení
‡ τw určeno z dvojitého exponenciálního stanovení
Zpomalení je definováno jako τ steroid/$\tau_{kontrola}$
přenos náboje je definován jako τ x (*potenciace* / 100 + 1)

In vivo stanovení

V pokusech in vivo byl srovnám účinek steroidu, kterým byla 20–oxo–5β–pregnan–3–yliden–4'–but–2–enová kyselina, na myši C57BL/6 (kontrola) a na myši BALB/c. Myši kmene BALB/c vykazují vyšší míru úzkostného chování a nižší socializaci, což je považováno za určitou obdobu autistických projevů u lidí.

Po intraperitoneální aplikaci dávek 1 a 10 mg/kg výše uvedeného steroidu, rozpuštěného v cyklodextrinu, zvířata vykazovala v tříkomorovém testu sociálního chování větší zájem o druhou

myš v kleci než o prázdnou klec, což je možné považovat za známku snížení defektu sociálního chování.

Průmyslová využitelnost

Ovlivnění mutace na podjednotce N–methyl–D–aspartátového receptoru by mohlo poskytnout účinnou léčbu vývojově vázaných onemocnění, jakými jsou mentální retardace, neurovývojové poruchy v různých oblastech – řeči, motoriky, intelektu; porucha pozornosti s hyperaktivitou; epilepsie, poruchy autistického spektra (PAS) a schizofrenie.

Seznam použité literatury

Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of five N–methyl–D–aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. J Comp Neurol 347:150–160.

Awadalla P et al. (2010) Direct measure of the de novo mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. American journal of human genetics 87:316–324.

Burnashev N, Szepetowski P (2015) NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. Curr Opin Pharmacol 20:73–82.

Cohen S, Greenberg ME (2008) Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 24:183–209.

de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto–van Silfhout AT, Koolen DA, de Vries P, Gilissen C, del Rosario M, Hoischen A, Scheffer H, de Vries BB, Brunner HG, Veltman JA, Vissers LE (2012) Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. N Engl J Med 367:1921–1929.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. Pharmacological reviews 51:7–61.

Hall BJ, Ripley B, Ghosh A (2007) NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27:13446–13456.

Hamdan FF, Srour M, Capo–Chichi JM, Daoud H, Nassif C, Patry L, Massicotte C, Ambalavanan A, Spiegelman D, Diallo O, Henrion E, Dionne–Laporte A, Fougerat A, Pshezhetsky AV, Venkateswaran S, Rouleau GA, Michaud JL (2014) De novo mutations in moderate or severe intellectual disability. PLoS genetics 10:e1004772.

Hu C, Chen W, Myers SJ, Yuan H, Traynelis SF (2016) Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. Journal of pharmacological sciences 132:115–121.

Huganir RL, Nicoll RA (2013) AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. Neuron 80:704–717.

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

Lee CH, Lu W, Michel JC, Goehring A, Du J, Song X, Gouaux E (2014) NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. Nature 511:191–197.

Lelieveld SH et al. (2016) Meta–analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. Nat Neurosci 19:1194–1196.

Lemke JR, Hendrickx R, Geider K, Laube B, Schwake M, Harvey RJ, James VM, Pepler A, Steiner I, Hortnagel K, Neidhardt J, Ruf S, Wolff M, Bartholdi D, Caraballo R, Platzer K, Suls A, De Jonghe P, Biskup S, Weckhuysen S (2014) GRIN2B mutations in West syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. Annals of neurology 75:147–154.

Lynch MA (2004) Long–term potentiation and memory. Physiol Rev 84:87–136.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron 12:529–540.

Platzer K et al. (2017) GRIN2B encephalopathy: novel findings on phenotype, variant clustering, functional consequences and treatment aspects. J Med Genet 54:460–470.

Swanger SA, Chen W, Wells G, Burger PB, Tankovic A, Bhattacharya S, Strong KL, Hu C, Kusumoto H, Zhang J, Adams DR, Millichap JJ, Petrovski S, Traynelis SF, Yuan H (2016) Mechanistic Insight into NMDA Receptor Dysregulation by Rare Variants in the GluN2A and GluN2B Agonist Binding Domains. American journal of human genetics 99:1261–1280.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R, Sibley D (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacological reviews 62:405–496.

Yavarna T, Al–Dewik N, Al–Mureikhi M, Ali R, Al–Mesaifri F, Mahmoud L, Shahbeck N, Lakhani S, AlMulla M, Nawaz Z, Vitazka P, Alkuraya FS, Ben–Omran T (2015) High diagnostic yield of clinical exome sequencing in Middle Eastern patients with Mendelian disorders. Hum Genet 134:967–980.

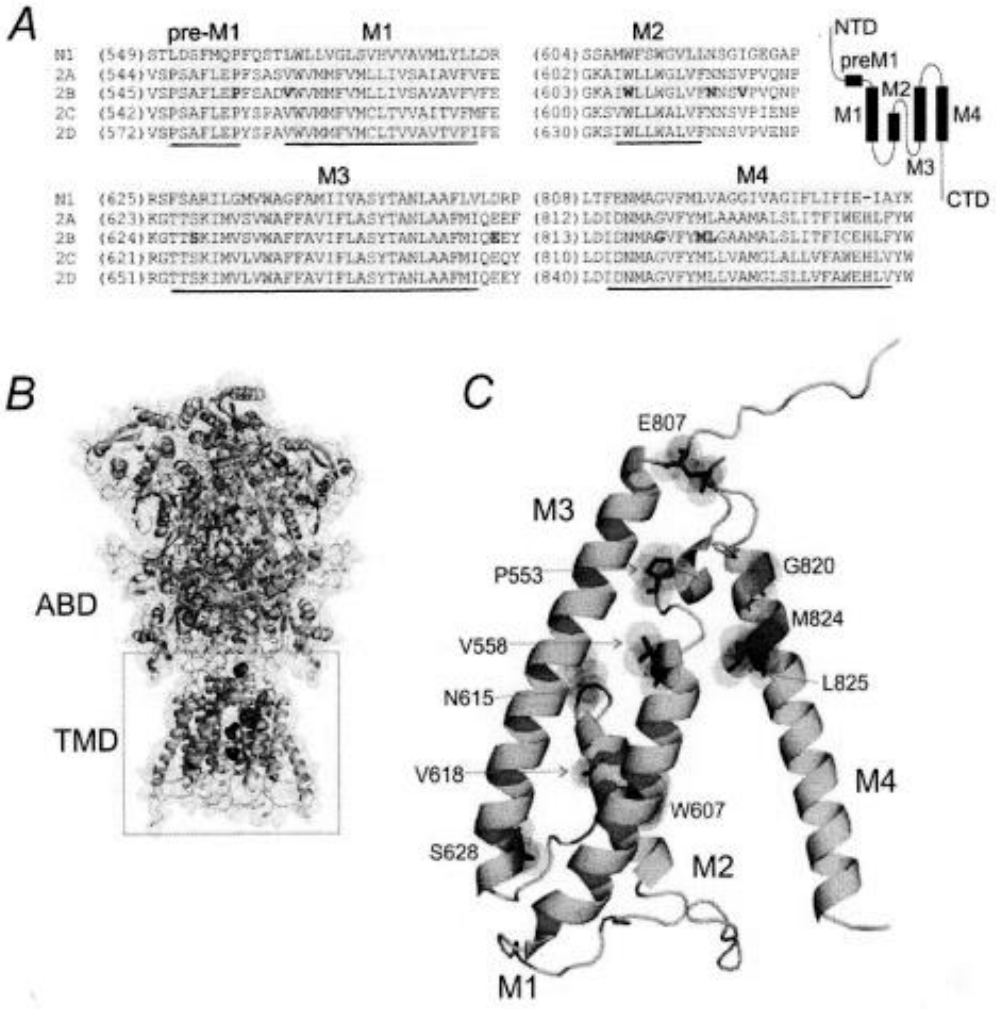
Zhu X et al. (2015) Whole–exome sequencing in undiagnosed genetic diseases: interpreting 119 trios. Genet Med 17:774–781.

PATENTOVÉ NÁROKY

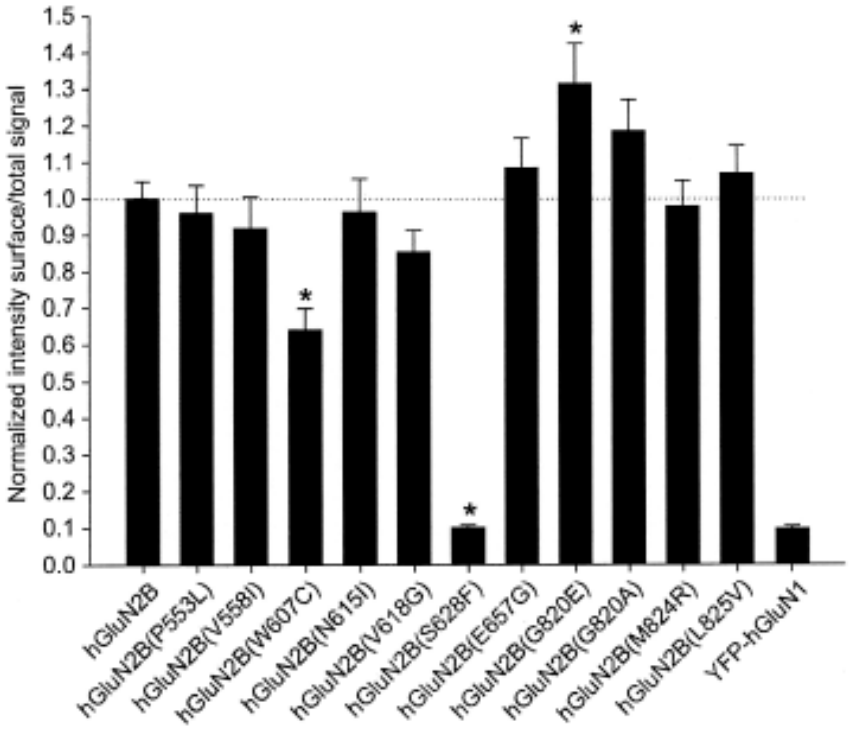
1. Sloučenina zvolená ze skupiny, zahrnující 20–oxo–pregn–5–en–3β–yl sulfát, androst–5–en–3β–yl hemisukcinát, 20–oxo–5β–pregnan–3–yliden–4'–but–2–enovou kyselinu a 20–oxo–5β–pregnan–3β–yl butanovou kyselinu, pro použití při léčení poruchy intelektu, opožděného vývoje, epilepsie, epileptických spasmů a onemocnění autistického spektra jako důsledku geneticky podmíněné mutace nebo *de novo* mutace membránové části podjednotky GluN2B lidského N–methyl–D–aspartátového receptoru, zahrnující mutace P553L, V558I, W607C, N615I, V618G, S628F, E657G, G820E, G820A, M824R a L825V.

2. Sloučenina podle nároku 1, pro použití při léčení poruchy intelektu, opožděného vývoje, epilepsie, epileptických spasmů a onemocnění autistického spektra, vzniklých v důsledku mutace L825V podjednotky GluN2B lidského N–methyl–D–aspartátového receptoru, vykazující náhradu leucinu v poloze 825 aminokyselinového řetězce GluN2B podjednotky valinem.

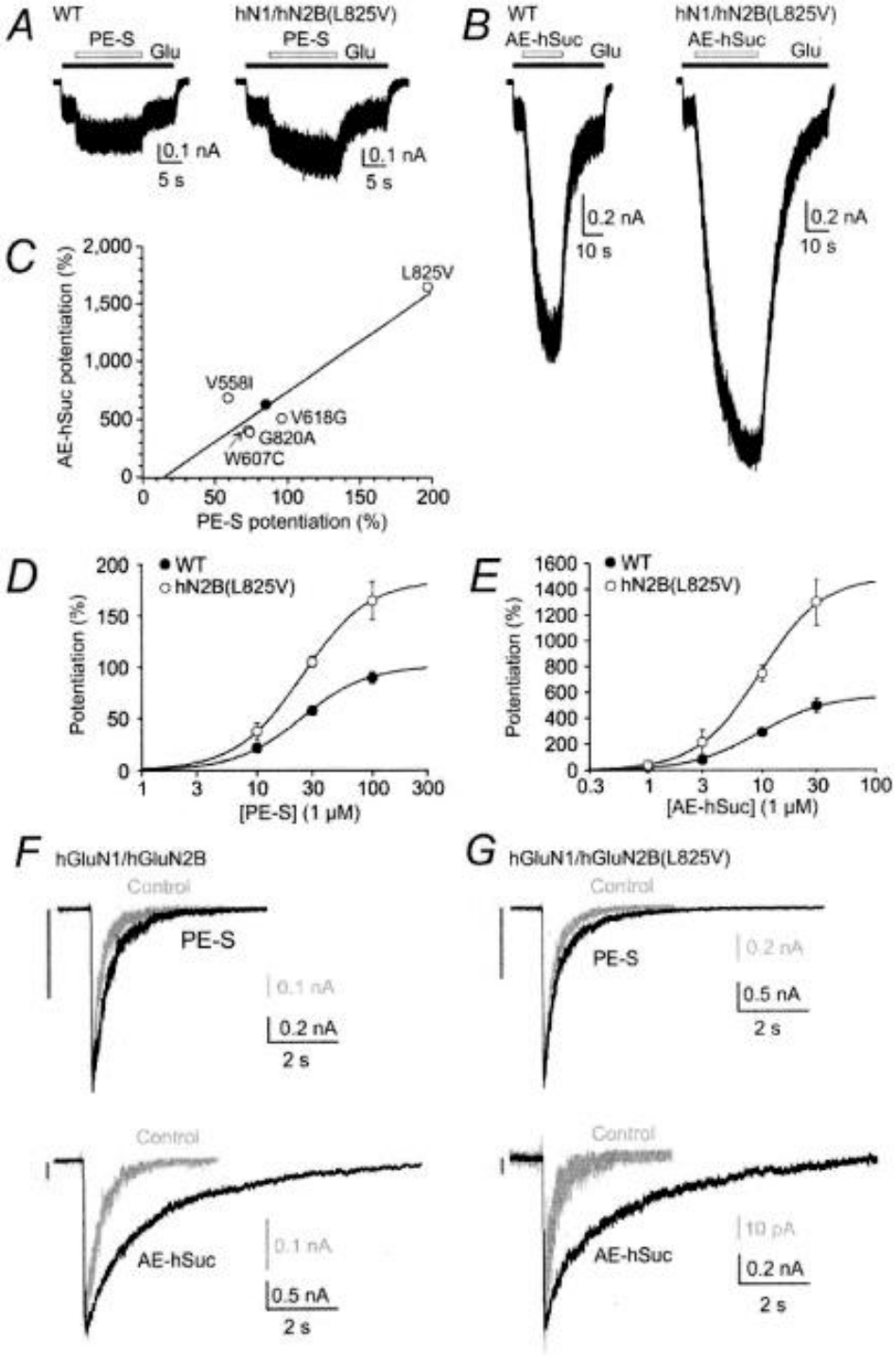
3 výkresy


A
pre-M1
M1
M2
NTD
preM1
M1
M2
M3
M4
CTD
M3
M4
B
ABD
TMD
C
E807
M3
P553
G820
M824
V558
L825
N615
V618
M4
W607
S628
M2
M1

Obr. 1


Normalized intensity surface/total signal
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
*
hGluN2B
hGluN2B(P553L)
hGluN2B(V558I)
hGluN2B(W607C)
hGluN2B(N615I)
hGluN2B(V618G)
hGluN2B(S628F)
hGluN2B(E657G)
hGluN2B(G820E)
hGluN2B(G820A)
hGluN2B(M824R)
hGluN2B(L825V)
YFP-hGluN1

Obr. 2


A
WT
PE-S
Glu
0.1 nA
5 s
hN1/hN2B(L825V)
PE-S
Glu
0.1 nA
5 s
B
WT
AE-hSuc
Glu
0.2 nA
10 s
hN1/hN2B(L825V)
AE-hSuc
Glu
0.2 nA
10 s
C
AE-hSuc potentiation (%)
PE-S potentiation (%)
L825V
V558I
V618G
G820A
W607C
D
WT
hN2B(L825V)
Potentiation (%)
[PE-S] (1 μM)
E
WT
hN2B(L825V)
Potentiation (%)
[AE-hSuc] (1 μM)
F
hGluN1/hGluN2B
Control
PE-S
0.1 nA
0.2 nA
2 s
Control
AE-hSuc
0.1 nA
0.5 nA
2 s
G
hGluN1/hGluN2B(L825V)
Control
PE-S
0.2 nA
0.5 nA
2 s
Control
AE-hSuc
10 pA
0.2 nA
2 s

Obr. 3