

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Šárka Danačíková

Strukturní determinanty regulace povrchového transportu NMDA receptorů v savčích buňkách

Structural determinants of regulation of surface delivery of NMDA receptors in mammalian cells

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Martin Horák, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Výsledky experimentů jsem konzultovala se svým vedoucím Mgr. Martinem Horákem, Ph.D.

V Praze, 24. 4. 2018

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Martinovi Horákovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a vstřícný přístup. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kristýně Skřenkové, Mgr. Kataríně Lichnerové za odborné konzultace v oblasti experimentálních metod a Mgr. Viktorovi Sinicovi za věcné připomínky při vypracování diplomové práce. Mé poděkování patří i všem kolegům na oddělení Buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. za vytváření podporujícího a příjemného prostředí. Tato diplomová práce byla podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GA UK) projektem č. 468217.

Abstrakt

N-methyl-*D*-aspartátové (NMDA) receptory jsou ligandem otevírané iontové kanály aktivované agonistou glutamátem a koagonistou glycinem. Mají klíčovou roli ve zprostředkování rychlého excitačního synaptického přenosu v centrální nervové soustavě savců. Pro vytvoření funkčního receptoru je nutná přítomnost dvou GluN1 podjednotek, které se společně s GluN2 nebo GluN3 podjednotkami skládají do formy heterotetramerů. Předchozí studie potvrdily důležitost M3 transmembránového helixu a extracelulárně lokalizovaných cysteinů v regulaci povrchové exprese funkčních NMDA receptorů. Cílem mé práce je objasnit vliv klinicky relevantních mutací lokalizovaných v M3 transmembránovém helixu a roli všech známých cysteinů tvořících disulfidické můstky na povrchový transport NMDA receptorů exprimovaných v heterologní buněčné linii opičích ledvinných fibroblastů (COS-7). Pomocí molekulárně-biologických, imunocytochemických a mikroskopických metod jsem zjistila, že klinicky relevantní mutace M641I a Y647S v GluN1 podjednotce a mutace konkrétních cysteinů tvořící disulfidické můstky v GluN1, GluN2A a GluN2B podjednotkách způsobily výrazné snížení počtu povrchově exprimovaných NMDA receptorů. Dále jsem zjistila, že vliv mutovaných GluN1 podjednotek na snížení povrchového transportu závisí na podjednotkovém složení receptorů. Výsledky experimentů přispívají k objasnění mechanismů regulace povrchové exprese NMDA receptorů, což je významné pro pochopení fyziologických a patofyziologických procesů v savčím mozku.

Klíčová slova: NMDA receptor, glutamátový receptor, povrchový transport, disulfidické můstky, transmembránová doména, neuropsychiatrické poruchy

Abstract

N-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptors are ligand-gated ion channels activated by agonist glutamate and co-agonist glycine. They play a key role in mediating the fast excitatory synaptic neurotransmission in the mammalian central nervous system. To create a functional heterotetrameric receptor, the presence of two GluN1 subunits combined with GluN2 or GluN3 subunits is necessary. Previous studies confirmed the importance of M3 transmembrane helix and extracellularly localized cysteines in regulation of surface expression of functional NMDA receptors. The aim of my thesis is to elucidate an influence of clinically relevant mutations in M3 transmembrane helix and the role of all known cysteines that form disulphide bonds on surface delivery of NMDA receptor expressed in heterologous monkey kidney fibroblasts cell culture (COS-7). Using molecular biology methods, immunocytochemistry and microscopy I found that the clinically relevant mutations M641I and Y647S in GluN1 subunit and also the mutations of particular cysteines forming disulphide bonds caused substantial decrease of surface expression of NMDA receptors. Furthermore, I discovered that the effect of mutated GluN1 subunits on decrease of surface expression depends on the subunit composition. The contribution of my results lies in elucidating the mechanisms of regulation of surface expression of NMDA receptors, which is important for understanding the physiological and pathophysiological processes in the mammalian brain.

Keywords: NMDA receptor, glutamate receptor, surface delivery, disulphide bonds, transmembrane domain, neuropsychiatric disorders

Obsah

1	Seznam zkratk.....	1
2	Úvod.....	3
3	Literární přehled.....	5
3.1	Struktura NMDA receptorů.....	5
3.1.1	Podjednotkové složení receptorů.....	5
3.1.2	Domény receptorů.....	6
3.1.2.1	Extracelulární amino-terminální doména.....	7
3.1.2.2	Extracelulární doména vázající ligand.....	7
3.1.2.3	Transmembránová doména.....	8
3.1.2.4	Intracelulární karboxy-terminální doména.....	9
3.2	Vývojová stádia jedince a distribuce podjednotek NMDA receptorů.....	10
3.3	Formování, maturace a transport NMDA receptorů z endoplasmatického retikula do membrán synapsí.....	11
3.3.1	Formování a zpracování NMDA receptorů v endoplasmatickém retikulu.....	11
3.3.2	Transport NMDA receptorů do Golgiho aparátu a membrán synapsí.....	13
3.4	Faktory regulující povrchový transport NMDA receptorů.....	15
3.4.1	Patogenní mutace a transport NMDA receptorů.....	15
3.4.2	Transmembránová doména a transport NMDA receptorů.....	17
3.4.3	Modifikace cysteinů a transport NMDA receptorů.....	18
4	Cíle diplomové práce.....	21
5	Materiál a metody.....	22
5.1	Chemikálie a roztoky.....	22
5.2	Příprava mutovaných podjednotek NMDA receptorů.....	23
5.3	Pasážování a transfekce COS-7 buněčné linie.....	25
5.4	Imunocytochemické značení povrchově exprimovaných NMDA receptorů.....	26
5.5	Fluorescenční mikroskopie.....	27
5.6	Obrazová a statistická analýza dat.....	27
6	Výsledky.....	28
6.1	Charakteristika povrchového transportu NMDA receptorů obsahujících klinicky relevantní mutace v GluN1-1a podjednotce.....	28
6.2	Charakteristika povrchového transportu NMDA receptorů obsahujících klinicky relevantní mutace v GluN1-4a podjednotce.....	31

6.3	Vliv známých cysteinů tvořících disulfidické můstky v GluN1-1a podjednotce na povrchový transport NMDA receptorů.....	34
6.4	Vliv známých cysteinů tvořících disulfidické můstky v GluN2A podjednotce na povrchový transport NMDA receptorů.....	37
6.5	Vliv známých cysteinů tvořících disulfidické můstky v GluN2B podjednotce na povrchový transport NMDA receptorů.....	39
7	Diskuze.....	41
7.1	Vliv M3 transmembránového helixu obsahující klinicky relevantní mutace v GluN1-1a a GluN1-4a podjednotkách na povrchový transport NMDA receptorů ..	41
7.2	Vliv známých cysteinů tvořících disulfidické můstky v GluN1-1a, GluN2A a GluN2B podjednotkách na povrchový transport NMDA receptorů	44
8	Závěr.....	48
9	Seznam použité literatury	49

1 Seznam zkratek

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
ATD	amino-terminální doména
BSA	hovězí sérový albumin
cDNA	cirkulární deoxyribonukleová kyselina
CNS	centrální nervová soustava
COS-7	opičí ledvinné fibroblasty
CTD	karboxy-terminální doména
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
ERAD	degradace proteinů asociovaná s endoplasmatickým retikulem
FTS	fetální telecí sérum
GA	Golgiho aparát
GFP	zelený fluorescenční protein
GluN	podjednotka NMDA glutamátových receptorů
HEK 293	lidské embryonální ledvinné buňky 293
iGluRs	ionotropní glutamátové receptory
KIF17	protein rodiny kinezinů 17
LB médium	lysogenní bujón
LBD	doména vázající ligand
MAGUK	rodina membránově asociovaných guanylát kináz

MEM	minimální esenciální médium Eagle
mLin-10	savčí varianta proteinu abnormálního buněčného původu 10
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -asparagová kyselina
PBS	fosfátový pufr s chloridem sodným
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDZ	z angl. postsynaptic density 95/disc large/zonula occludens-1
PSD	postsynapsická denzita
SAP102	protein asociovaný se synapsí 102
TMD	transmembránová doména
YFP	žlutý fluorescenční protein

2 Úvod

Ionotropní glutamátové receptory (iGluRs) tvoří membránové iontové kanály, které jsou aktivovány agonistou glutamátem. Zprostředkovávají rychlý excitační synaptický přenos v centrální nervové soustavě savců (CNS), (Traynelis, 2010). iGluRs se kromě neuronů, kde byla jejich funkce široce zkoumána, vyskytují i na dalších typech buněk a tkání. Jedná se například o centrální i periferní gliové buňky, cévní endotel, jaterní, ledvinnou či kostní tkáň (Hogan-Cann & Anderson, 2016).

Dle selektivních agonistů jsou iGluRs rozdělovány na čtyři subtypy: AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina), NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartát), kainátové (2-karboxy-3-karboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidin) a δ receptory (Niciu *et al.*, 2012). U δ receptorů nebylo dlouho známo, zda tvoří iontové kanály nebo receptory spřažené s G-proteiny. Při elektrofyziologickém měření po aplikaci běžných agonistů jako je AMPA, kainát či glutamát nebyly naměřeny žádné záznamy proudů. Další studie však potvrdily cerebelin-1, glycin, and *D*-serin jako endogenní agonisty GluD2 receptorů (Naur *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2010).

Ve své práci se zabývám pouze NMDA receptory, které jsou unikátní svou propustností nejen pro sodné či draselné, ale i pro vápenaté kationty. Právě díky propustnosti pro vápenaté kationty mají NMDA receptory důležitou roli při ontogenezi nervové soustavy, synaptické plasticitě, procesu učení, utváření paměťových stop a excitotoxicitě (Traynelis, 2010). Synaptická plasticita je proces zesilování nebo zeslabování konkrétní synapse v závislosti na aktivitě nervového přenosu (Migliore *et al.*, 2015). Excitotoxicita je na rozdíl od synaptické plasticity patologický proces. Při nadměrné aktivaci NMDA a AMPA receptorů agonistou glutamátem, dochází ke zvýšení vtoku vápenatých kationtů do neuronů, což vyvolá jejich nevratné poškození (Gupta *et al.*, 2013).

Pro správnou funkci nervového přenosu je nezbytná kontrola a regulace formování, maturace a transportu receptorů do synapsí a extrasynaptických oblastí. Jednou z nejlépe charakterizovaných drah, která monitoruje vznikající sekreční a membránové proteiny v endoplasmatickém retikulu (ER), je dráha označovaná jako degradace proteinů asociována s endoplasmatickým retikulem – dráha ERAD (Ruggiano *et al.*, 2014). Abnormální regulace transportu NMDA receptorů může být příčinou vzniku mnoha neuropsychiatrických onemocnění zahrnující vývojové poruchy, Alzheimerovu chorobu, Huntingtonovu chorobu, Parkinsonovu chorobu, schizofrenii či epilepsii (Bowie, 2008; Chen *et al.*, 2017).

V diplomové práci se věnuji dvěma faktorům, M3 transmembránovému helixu a známým cysteinům tvořícím disulfidické můstky v extracelulární části podjednotky, u kterých byla v přechozích studiích zjištěna spojitost s regulací povrchového transportu NMDA receptorů. Předpokládám, že práce přispěje k objasnění mechanismů regulace povrchové exprese NMDA receptorů, což vede k hlubšímu pochopení fyziologických i patologických dějů v CNS.

3 Literární přehled

3.1 Struktura NMDA receptorů

3.1.1 Podjednotkové složení receptorů

NMDA receptory jsou integrální membránové iontové kanály, které se skládají do formy heterotetramerů nejméně ze dvou typů podjednotek. Liší se tak od ostatních typů iGluRs, neboť ty mohou tvořit i funkční homotetramery. Byly identifikovány tři typy podjednotek NMDA receptorů: GluN1, GluN2 a GluN3 (Yamamoto *et al.*, 2015). GluN1 podjednotka je kódována pouze jedním genem, ale díky alternativnímu sestřihu tří exonů (5, 21, a 22) může tvořit až osm specifických isoform GluN1-1a/b – GluN1-4a/b (Hollmann *et al.*, 1993). Typ sestřihové isoformy GluN1 podjednotky ovlivňuje farmakologické vlastnosti (exon 5) i vazbu dalších intracelulárních proteinů (exon 21 a 22) na NMDA receptor (Traynelis *et al.*, 1995). GluN2 podjednotky jsou kódovány čtyřmi odlišnými geny GluN2A, GluN2B, GluN2C a GluN2D (Vance *et al.*, 2012). GluN3 podjednotky jsou kódovány dvěma geny GluN3A a GluN3B, které rovněž podléhají alternativnímu sestřihu (Sun *et al.*, 1998; Domingues *et al.*, 2011).

Funkční NMDA receptor se skládá ze dvou GluN1 podjednotek, které jsou kombinovány s dalším typem GluN2 či GluN3 podjednotky (Chazot & Stephenson, 1997). Dále bylo zjištěno, že většina nativních receptorů má pravděpodobně triheterotetramerní uspořádání, kdy jsou dvě GluN1 podjednotky kombinovány s dvěma odlišnými GluN2 podjednotkami. Triheterotetramerní GluN1/GluN2A/GluN2B receptory vykazovaly odlišné farmakologické vlastnosti v porovnání s GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptory. Byly pozorovány odlišnosti v deaktivaci receptoru po odváznání agonisty glutamátu, v modulaci zinečnatými kationty či podjednotkově selektivními agonisty, například ifenprodilem (Hansen *et al.*, 2014).

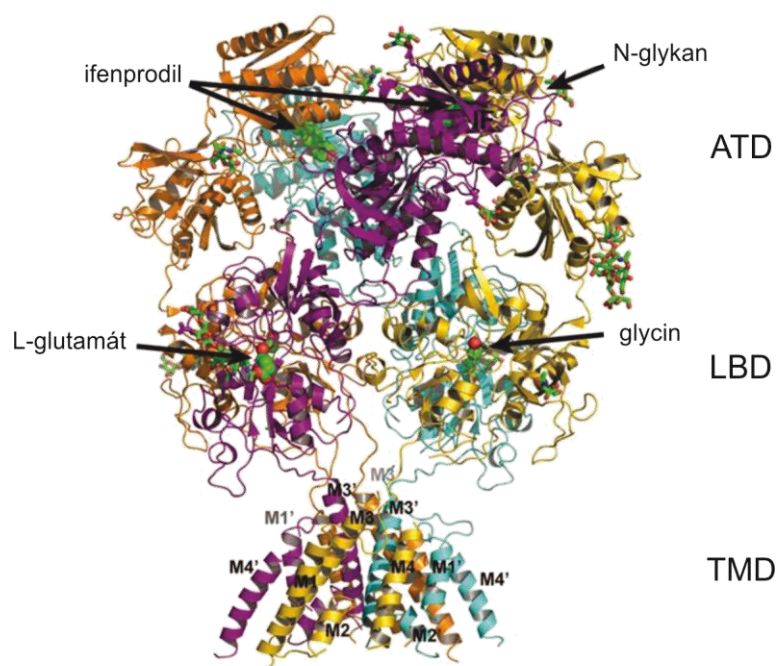
GluN1/GluN2 receptory jsou aktivovány současným navázáním agonisty glutamátu do vazebného místa na GluN2 podjednotce a koagonisty glycinu na GluN1 podjednotku (Johnson & Ascher, 1987). Aktivace GluN1/GluN3 receptorů vyžaduje pouze přítomnost glycinu, jelikož GluN3 podjednotka neobsahuje glutamátové, ale glycinové vazebné místo (Chatterton *et al.*, 2002). Při klidovém membránovém potenciálu je pór GluN1/GluN2 receptoru extracelulárně blokován kationtem hořčíku. Tato blokáda je závislá na depolarizaci postsynaptické membrány, při níž dojde k uvolnění kationtu z póru a aktivaci receptoru.

Díky své napěťově závislé blokádě kationty hořčičku a nutnosti současného navázání agonisty glutamátu a koagonisty glycinu bývá NMDA receptor nazýván detektorem koincidence (Zhu *et al.*, 2016).

Některé studie prokazují, že funkční NMDA receptor je složen do formy heterotetrameru ze dvou heterodimerů. V případě GluN1/GluN2 receptoru by se jednalo o 1-2-1-2 uspořádání podjednotek (Karakas & Furukawa, 2014). Jiná studie zase ukázala, že NMDA receptor má 1-1-2-2 uspořádání podjednotek (Schorge & Colquhoun, 2003).

3.1.2 Domény receptorů

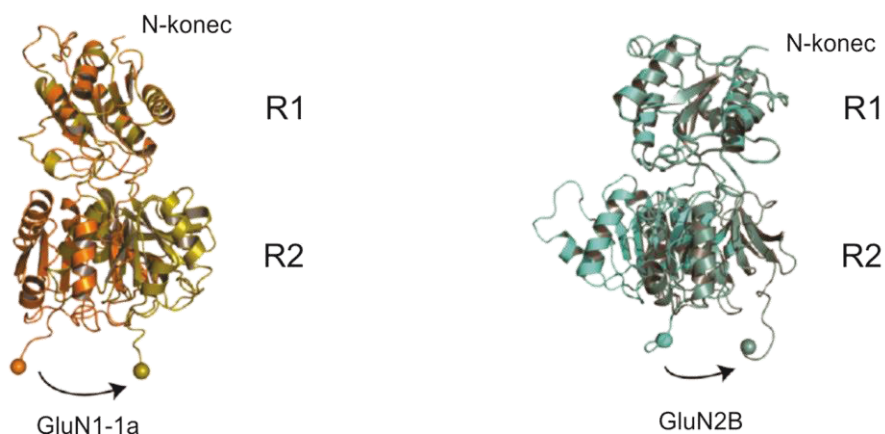
Všechny podjednotky NMDA receptorů zaujímají stejnou membránovou topologii. Extracelulární část receptoru tvoří amino-terminální doména (ATD) a doména vázající ligand (LBD). Dále následuje transmembránová doména (TMD) a intracelulární karboxy-terminální doména (CTD), (Obr. č. 1). Pro udržení stability heterotetramerního NMDA receptoru jsou nejdůležitější interakce mezi všemi čtyřmi TMD a také interakce mezi dimery ATD a LBD (Sobolevsky, 2015).



Obr. č. 1: Struktura heterotetramerního GluN1-1a/GluN2B NMDA receptoru. GluN1-1a podjednotky jsou zobrazeny oranžovou a žlutou barvou a GluN2B podjednotky modrou a fialovou barvou. Amino-terminální doména (ATD) a doména vázající ligand (LBD) tvoří extracelulární část receptoru. Dále následuje transmembránová doména (TMD) a intracelulární část receptoru tvoří karboxy-terminální doména (CTD), která zde není zobrazena. Šípkami jsou označeny vazebná místa pro antagonistu ifenprodil na rozhraní GluN1-1a a GluN2B podjednotek, agonistu *L*-glutamát a koagonistu glycin. *N*-glykany jsou zobrazeny zelenou barvou (převzato a upraveno dle Karakas & Furukawa, 2014).

3.1.2.1 Extracelulární amino-terminální doména

ATD má strukturu podobnou tvaru mušle složenou z R1 a R2 subdomén, které jsou navzájem spojeny třemi smyčkami. Vrchol R1 laloku tvoří amino-terminální část receptoru a na spodní část R2 laloku dále navazuje LBD (Karakas *et al.*, 2009), (Obr. č. 2). Role ATD je známá pouze v případě NMDA receptorů. U dalších subtypů iGluRs nebyly dosud zjištěny žádné ionty či molekuly, které by se na ATD vázaly (Kumar *et al.*, 2009). ATD NMDA receptorů přispívá k regulaci pravděpodobnosti otevření a deaktivaci iontového kanálu. Dále obsahuje vazebná místa pro alosterické modulátory, které jsou specifické pro různé podjednotky. Bylo identifikováno vazebné místo pro zinečnaté kationty ve štěrbině GluN2A i GluN2B receptorů, kde po navázání iontu dochází ke stabilizaci uzavřené konformace domény a tím k inhibici aktivity receptoru (Karakas *et al.*, 2009). Dalším antagonistou je ifenprodil, který se váže na rozhraní GluN1 a GluN2B podjednotek (Karakas *et al.*, 2011). V ATD se rovněž nachází cysteiny, u kterých byla potvrzena tvorba disulfidických můstků, a asparaginy modifikovatelné *N*-glykosylací (Hollmann *et al.*, 1994; Lipton *et al.*, 2002; Karakas *et al.*, 2009).

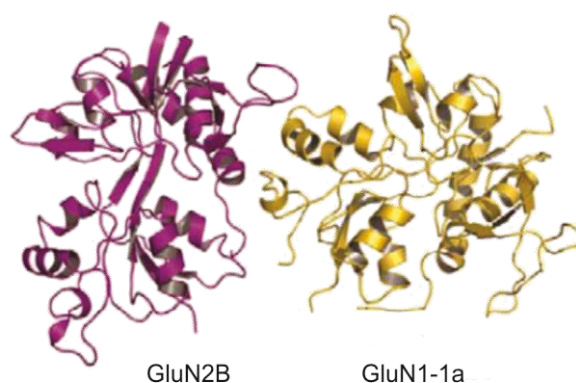


Obr. č. 2: Struktura dvou konformací amino-terminální domény GluN1-1a a GluN2B podjednotek NMDA receptoru. Šipkou je označena změna konformace R1 a R2 laloků, která následně ovlivňuje konformaci domény vázající ligand (převzato a upraveno dle Karakas & Furukawa, 2014).

3.1.2.2 Extracelulární doména vázající ligand

LBD zaujímá podobně jako ATD strukturu podobnou tvaru mušle, která je tvořena S1 a S2 polypeptidovými segmenty. S1 segment se nachází mezi ATD a M1 transmembránovým helixem a tvoří velkou část D1 laloku. S2 segment je lokalizován mezi M3 a M4 transmembránovými helixy a tvoří D2 lalok (Traynelis, 2010), (Obr. č. 3). Ve štěrbině mezi D1 a D2 laloky se nachází vazebné místo pro agonisty a antagonisty NMDA receptorů.

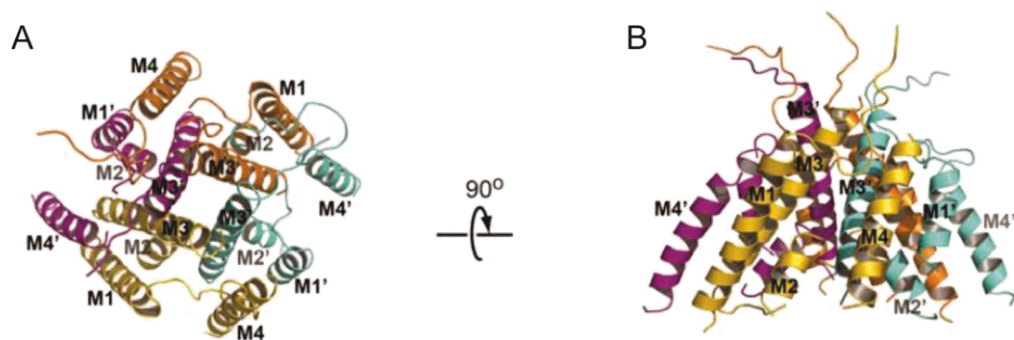
Vazba ligandu způsobí konformační změnu, která se projeví přiblížením D1 a D2 laloků. Signál je dále transdukován směrem k TMD, dochází k otevření iontového kanálu a vtoku sodných a vápenatých kationtů do buňky (Swanger *et al.*, 2016). Studie prokázala, že izolované LBD GluN1 a GluN2 podjednotek tvoří heterodimery pouze při současném navázání agonisty glutamátu a koagonisty glycinu do příslušných vazebných míst. Za nepřítomnosti agonistů tvoří domény homomerní interakce, které jsou však narušeny při opětovné aplikaci agonistů (Cheriyani *et al.*, 2015). Jednou z posttranslačních modifikací LBD je tvorba disulfidických můstků mezi S1 a S2 segmenty (Takahashi *et al.*, 2007).



Obr. č. 3: Struktura domény vázající ligand GluN1-1a a GluN2B podjednotek NMDA receptoru (převzato a upraveno dle Karakas & Furukawa, 2014).

3.1.2.3 Transmembránová doména

TMD utváří samotný heterotetramerní iontový kanál, který má čtyřčetnou rotační symetrii. Je složena z M1, M3 a M4 transmembránových helixů a M2 smyčky, která intracelulárně asociuje s membránou (Obr. č. 4). Mezi S1 segmentem a M1 helixem se extracelulárně nachází Pre-M1 helix v paralelním postavení vůči membráně, který reguluje vrátkování kanálu. M1 a M4 helixy tvoří vnější část iontového póru. Uvnitř kanálu se nachází překřížené M3 helixy a intracelulární M2 smyčky zabraňující průniku iontů při klidovém stavu receptoru (Sobolevsky *et al.*, 2009; Karakas & Furukawa, 2014). M3 helixy také přispívají k regulaci funkčních vlastností a povrchové exprese NMDA receptorů (Kaniakova *et al.*, 2012a).



Obr. č. 4: Struktura transmembránové domény heterotetramerního GluN1-1a/GluN2B NMDA receptoru. Uspořádání M1, M3 a M4 helixů a M2 smyčky tvořící iontový kanál (A - pohled shora, B - boční pohled), (převzato a upraveno dle Karakas & Furukawa, 2014).

3.1.2.4 Intracelulární karboxy-terminální doména

Na základě sekvenční homologie je CTD nejvíce variabilní částí NMDA receptorů. Obsahuje krátké sekvenční motivy, kterými interaguje s mnoha intracelulárními proteiny. Jedná se například o adaptorové, kotevní, strukturní, cytoskeletální či signální proteiny (Ehlers *et al.*, 1998). CTD také ovlivňuje funkční vlastnosti receptorů. U GluN1 podjednotky se podílí na změně vodivosti a rychlosti desensitizace receptorů. V případě GluN2A nebo GluN2B podjednotky se CTD podílí na prodloužení doby otevření kanálu (Maki *et al.*, 2012). GluN2A podjednotky bez CTD exprimované v myších (*Mus musculus*) potvrdily důležitost těchto domén pro synaptickou plasticitu, funkci hipokampu a koordinaci pohybu (Sprenkel *et al.*, 1998).

3.2 Vývojová stádia jedince a distribuce podjednotek NMDA receptorů

Podjednotkové složení NMDA receptorů je odlišně regulováno během ontogenetického vývoje jedince a zároveň se exprese jednotlivých podjednotek liší v rámci různých oblastí mozku. Jelikož je složení NMDA receptorů podmíněno přítomností GluN1 podjednotky (Chazot & Stephenson, 1997), je široce rozšířena v mnoha oblastech CNS. Každý typ GluN2 podjednotky má svou unikátní lokalizaci v rámci mozku a období vývoje, ve kterém dochází k nárůstu či poklesu jeho exprese. Nejvýznamnější odlišnost v expresi GluN2 podjednotek lze pozorovat během vývoje jedince, kdy na synapsích dochází ke snížení četnosti GluN1/GluN2B receptorů a naopak ke zvýšení počtu GluN1/GluN2A receptorů (Flint *et al.*, 1997). Tato změna v četnosti podjednotek způsobí změnu farmakologických vlastností NMDA receptorů a je regulována zkušeností jedince a změnami synaptické aktivity (Bellone & Nicoll, 2007). GluN2A a GluN2B podjednotky jsou dominantně exprimovány v kortexu a hipokampu. GluN2C podjednotka byla identifikována v granulárních buňkách mozečku a čichovém laloku (Chen *et al.*, 2006).

Za fyziologických podmínek je exprese GluN3A podjednotky omezena na dobu raného postnatálního vývoje. Největší vzrůst je zaznamenán během prvních dvou týdnů po narození. K expresi GluN3A podjednotky dochází v oblastech neokortexu, subikula, čichového laloku, hipokampu, thalamu, mozečku a prodloužené míchy. Mezi typy neuronů exprimující GluN3A podjednotky patří interneurony, pyramidové neurony hipokampu či Purkyňovy buňky mozečku. Receptory obsahující GluN3A podjednotky jsou kromě extrasynaptické, perisynaptické a postsynaptické oblasti lokalizovány i na presynaptickém zakončení neuronu, kde pravděpodobně modulují výlev glutamátu (Pachernegg *et al.*, 2012; Pérez-Otaño *et al.*, 2016). V porovnání s GluN3A podjednotkou je exprese GluN3B podjednotky udržována nejen v časných stádiích vývoje, ale i v období dospělosti. Exprese GluN3B podjednotky byla zjištěna v oblastech mozečku, hipokampu, striata, středního mozku a míchy (Wong *et al.*, 2002).

3.3 Formování, maturace a transport NMDA receptorů z endoplasmatického retikula do membrán synapsí

3.3.1 Formování a zpracování NMDA receptorů v endoplasmatickém retikulu

Podjednotky NMDA receptorů jsou syntetizovány v ER, kde následně dochází k jejich složení do formy heterotetramerů (Traynelis, 2010). Působením mechanismů kontroly kvality proteinů jsou z ER uvolněny pouze správně zformované a funkční receptory, které jsou transportovány do Golgiho aparátu (GA) a následně do membrán synapsí či extrasynaptických oblastí. Všechny typy GluN1-1, GluN2 a GluN3 podjednotek jsou zadržovány v ER a k jejich uvolnění dochází až po vytvoření funkčních heterotetramerů, na rozdíl od samostatně exprimovaných GluN1-2, GluN1-3 a GluN1-4 podjednotek, které byly detekovány na povrchu buňky (Okabe *et al.*, 1999; Standley *et al.*, 2000). V podjednotkách NMDA receptorů byly nalezeny oblasti, které se podílí na formování či retenci nezralých receptorů v ER a také na transportu receptorů na buněčný povrch, avšak přesný mechanismus těchto regulací není dosud zcela objasněn.

V extracelulární části receptoru se mezi tyto regulační oblasti řadí A2 segment ATD GluN2A a GluN2C podjednotek obsahující retenční signál, který způsobí zadržení nezralého receptoru v ER. Interakce s ATD GluN1 podjednotky způsobí negování retenčního signálu v GluN2A podjednotce a dojde k uvolnění receptoru z ER. U GluN2B podjednotky nebyl prokázán retenční signál v A2 segmentu, i přes jeho vysokou sekvenční homologii s A2 segmentem GluN2A podjednotky (Qiu *et al.*, 2009; Lichnerova *et al.*, 2014).

Další oblasti klíčové pro uvolnění receptoru z ER jsou vazebná místa pro agonistu glutamát a koagonistu glycin v LBD. Mutace na pozici D732A v glycinovém místě GluN1 podjednotky, která snížila afinitu vazebného místa pro glycin, zároveň způsobila snížení povrchové exprese GluN1/GluN2A receptoru téměř o 90 % (Kenny *et al.*, 2009). Povrchový transport GluN1/GluN2 receptorů je podmíněn vazbou agonisty glutamátu na obě vazebná místa GluN2 podjednotky. I když koncentrace glutamátu v ER obvykle nelimituje povrchový transport, je tento kontrolní mechanismus důležitý pro zajištění exprese funkčních NMDA receptorů (She *et al.*, 2012).

Mezi posttranslační modifikace, které se podílí na regulaci skládání a povrchové exprese NMDA receptorů patří disulfidické můstky tvořené kovalentní vazbou mezi cysteiny (Kap. č. 3.4.3), (Papadakis *et al.*, 2004; Oka & Bulleid, 2013; Swanger *et al.*, 2016).

Podjednotky NMDA receptorů také obsahují mnoho *N*-glykosylačních míst, na které se v ER váží glykany dále modifikované v GA. Glykanové struktury vázící se na asparaginy na pozicích N203 a N368 v GluN1 podjednotce NMDA receptorů jsou kritické pro jejich povrchovou expresi. GluN2A a GluN2B podjednotky jsou také modifikovány *N*-glykosylací, avšak absence těchto glykanových struktur neovlivní povrchovou expresi NMDA receptorů (Chazot *et al.*, 1995; Lichnerova *et al.*, 2015).

TMD je jedna z klíčových oblastí regulující povrchový transport NMDA receptorů, která obsahuje specifické retenční signály (Horak *et al.*, 2008b; Kaniakova *et al.*, 2012a). Význam TMD v regulaci povrchové exprese bude podobněji popsán níže (Kap. č. 3.4.2).

V CTD GluN1 podjednotky se nacházejí C kazety, které obsahují retenční motivy způsobující zadržení receptoru v ER anebo naopak exportní signály zajišťují jeho uvolnění směrem ke GA. V C1 kazetě GluN1-1 podjednotky byly nalezeny dva specifické ER retenční motivy (RRR a KKK), které působí její zadržení v ER. GluN1-3 podjednotka, která také obsahuje C1 kazetu, je však díky přítomnosti jiné, C2'kazety, exportována na povrch buňky. Součástí této C2'kazety je PDZ-vazebná doména STVV anebo doména pro vazbu koatomerního proteinového komplexu II, která inhibuje retenční motivy C1 kazety. GluN1-2 a GluN1-4 podjednotky C1 kazetu neobsahují a tudíž jsou exportovány na buněčný povrch (Standley *et al.*, 2000; Horak *et al.*, 2008b; Horak & Wenthold, 2009).

GluN2A a GluN2B podjednotky obsahují exportní signál, HLFY motiv, který se nachází v blízkosti M4 transmembránového helixu. Absence tohoto signálu způsobí zadržení funkčního receptoru v ER (Hawkins *et al.*, 2004; Horak *et al.*, 2008a). Fosforylace CTD také ovlivňuje povrchový transport NMDA receptorů. Fosforylace serinů na pozicích S896 a S897 v blízkosti retenčního motivu RRR C1 kazety GluN1 podjednotky pomocí protein kinázy C vede k uvolnění podjednotek z ER (Scott *et al.*, 2003). Procesy retence a uvolnění NMDA receptorů z ER jsou přísně kontrolovány pomocí celé řady exportních či retenčních motivů, neboť se jedná o jeden z prvních důležitých kroků pro následné správné fungování synapsí.

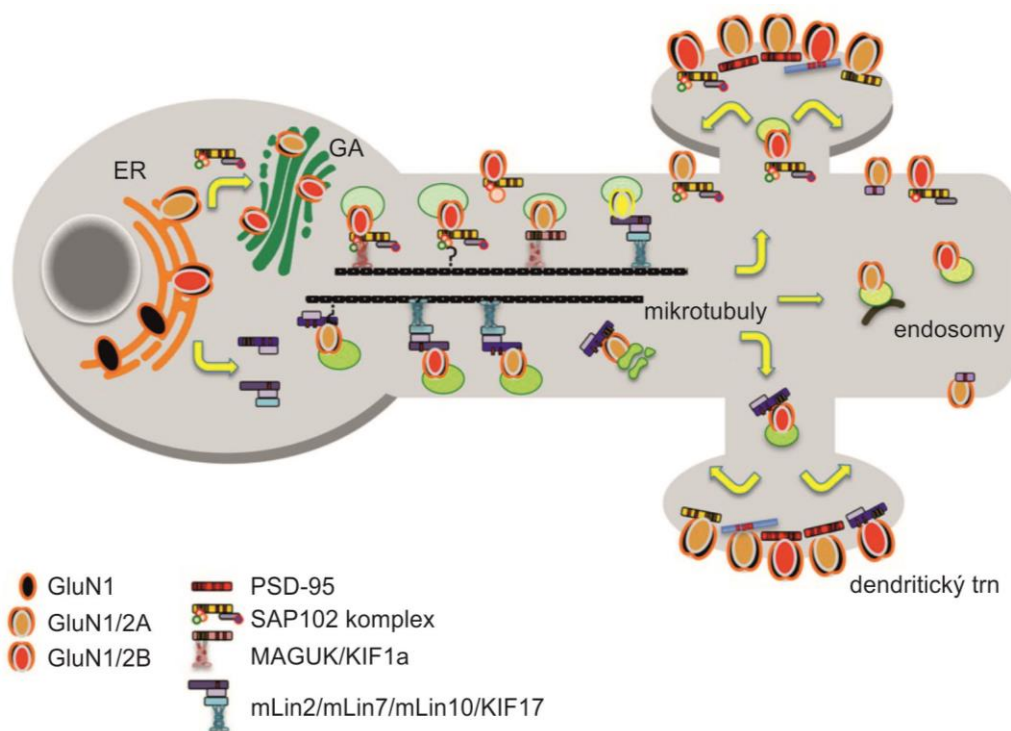
3.3.2 Transport NMDA receptorů do Golgiho aparátu a membrán synapsí

Po opuštění ER jsou NMDA receptory zpracovávány v GA, dále transportovány do trans-Golgiho sítě, endosomů a následně inkorporovány do membrány synapsí či extrasynaptických oblastí. Funkční komplexy ER a GA se kromě buněčného těla nacházejí i v oblastech některých dendritů anebo dendritických trnů, kde mohou zprostředkovávat rychlou odpověď v reakci na lokální změnu podmínek (Horak *et al.*, 2014), (Obr. č. 5).

Vezikulární transport NMDA receptorů směrem k synaptické membráně je zprostředkován cytoplasmatickými molekulárními motory kineziny, které se pohybují podél cytoskeletálních mikrotubulů. Protein rodiny kinezinů 17 (KIF17) specifický pro dopravu váčků obsahující NMDA receptory v dendritech neuronů je asociován s PDZ doménou savčí varianty proteinu abnormálního buněčného původu 10 (mLin-10), který je součástí proteinového komplexu vážící podjednotku GluN2B heterotetramerního NMDA receptoru (Setou *et al.*, 2000). K uvolnění transportovaného váčku v dendritických trnech dochází prostřednictvím fosforylace proteinu KIF17 na pozici S1029 enzymem kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkinázou II (Guillaud *et al.*, 2008). NMDA receptory jsou následně pomocí molekulárních motorů myosinů a cytoskeletálního proteinu aktinu dopraveny v rámci dendritického trnu do oblasti postsynaptické denzity (PSD), (Kapitein & Hoogenraad, 2011).

Proteiny s PDZ doménou patřící do rodiny membránově asociovaných guanylát kináz (MAGUK) mají klíčovou roli v transportu NMDA receptorů do membrán synapsí a rovněž slouží při jejich ukotvení k cytoskeletu v PSD. Protein asociovaný se synapsí 102 (SAP102) je jedním ze strukturních proteinů hojně exprimovaných během raného postnatálního vývoje jedince, který se podílí na transportu NMDA receptorů během synaptogeneze. SAP102 obsahuje několik vazebných domén, kterými jsou zprostředkovány interakce mezi proteiny. Zatímco PDZ doména váže NMDA receptor, SH3 či guanylát kinázová doména interaguje se signálními a cytoskeletálními proteiny (Wei *et al.*, 2015). PSD-95 patří mezi hlavní regulační proteiny synaptického zrání a podílí se na transportu a stabilizaci NMDA receptorů v PSD. Exprese proteinu PSD-95 vzrůstá během života jedince, na rozdíl od proteinu SAP102, u kterého naopak s věkem klesá. Tento rozdíl mezi regulačními proteiny souvisí se změnou zastoupení GluN2B a GluN2A podjednotek během vývoje, jelikož SAP102 tvořící komplex s GluN2B podjednotkou je postupně nahrazován PSD-95/GluN2A komplexem (Lin *et al.*, 2006; Coley & Gao, 2018). Po transportu NMDA receptorů do membrán synapsí

či extrasynaptických oblastí je jejich množství a lokalizace dynamicky regulována různými dalšími mechanismy (Horak *et al.*, 2014).



Obr. č. 5: Formování, maturace a transport NMDA receptorů z endoplasmatického retikula (ER) do membrán synapsí. NMDA receptory jsou syntetizovány a skládány v ER a dále zpracovávány v Golgiho aparátu (GA). Transport NMDA receptoru směrem k membráně je zprostředkováván mnoha proteiny, mezi které se řadí molekulární motory kineziny (KIF17) interagující s PDZ doménou proteinu abnormálního buněčného původu (mLin10). Proteiny membránově asociovaných guanylát kináz (MAGUK) mají důležitou roli jak v transportu, tak v kotvení NMDA receptorů v synapsích. Jedná se například o PSD-95 či protein asociovaný se synapsí 102 (SAP102), (převzato a upraveno dle Horak *et al.*, 2014).

3.4 Faktory regulující povrchový transport NMDA receptorů

3.4.1 Patogenní mutace a transport NMDA receptorů

Technologický pokrok a rozvoj metod sekvenování nové generace umožňuje efektivní a přesnou analýzu individuálních lidských genomů. V nedávné době byly v rámci klinických studií zjištěny *de novo* mutace a vzácně se vyskytující varianty GluN1, GluN2A a GluN2B podjednotek NMDA receptorů u pacientů s neuropsychiatrickými symptomy (například poruchy intelektu, opožděný vývoj nebo epilepsie). Dosud však není známo, zdali a jakým způsobem se tyto mutace NMDA receptorů podílejí na narušení správné funkce glutamatergní transmise a v důsledku také na rozvoji neuropsychiatrických onemocnění. Existuje několik studií, které se kromě charakteristiky funkčních vlastností mutovaných NMDA receptorů zaměřily také na sledování změn jejich povrchové exprese s využitím různých expresních systémů (Swanger *et al.*, 2016; Addis *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Vyklicky *et al.*, 2018).

V klinických studiích byla v M2 transmembránovém helixu GluN1 podjednotky nalezena *de novo* mutace G620R, která mění povrchový transport NMDA receptorů. Pacienti s touto mutací vykazovali poruchy intelektu, motoriky, avšak netrpěli záchvaty. Při expresi mutantní GluN1-G620R podjednotky s GluN2B podjednotkou byla zaznamenána snížená povrchová exprese receptorů o 60 % oproti přirozeným GluN1/GluN2B receptorům s využitím expresního systému lidských embryonálních ledvinných buněk 293 (HEK 293). Povrchová exprese mutovaného GluN1-G620R/GluN2A receptoru byla snížena pouze mírně oproti přirozenému GluN1/GluN2A receptoru. Jelikož je GluN2B dominantní podjednotkou v mozku během fetálního a postnatálního vývoje, může mít snížený transport receptorů výrazný dopad při vývoji nervové soustavy (Chen *et al.*, 2017).

V další studii byla sledována povrchová exprese NMDA receptorů s GluN2A podjednotkou, která obsahovala mutace spojené s epilepsií a kognitivními poruchami. Pomocí expresního systému HEK 293 buněk a konfokální mikroskopie bylo zjištěno, že NMDA receptory s mutacemi P79R, C231Y, C436R, G483R a D731N v GluN2A podjednotce koexprimované s GluN1 podjednotkou vykazovaly sníženou povrchovou expresi a v některých případech také docházelo k narušení funkčních vlastností iontového kanálu. Předpokládá se, že mutace P79R, C231Y, D731N nacházející se v ATD mohou ovlivnit strukturu receptoru. Mutace v C436R a G483R jsou lokalizovány v LBD, přičemž důvodem snížené povrchové exprese receptorů může být rozrušení disulfidického můstku v případě

záměny cysteinu a ovlivnění vazebného místa pro glutamát v případě mutovaného glycinu. Dále byly testovány mutace M705V, E714K, I814T, D933N a N976S GluN2A podjednotky, u kterých nebyla pozorována žádná nebo pouze mírná změna povrchové exprese receptoru (Addis *et al.*, 2017).

Při testování klinicky relevantních mutací v LBD GluN2A a GluN2B podjednotky bylo zjištěno, že přítomnost některých aminokyselin v této doméně je kritická pro správnou funkci a transport receptorů. GluN2A a GluN2B podjednotky byly extracelulárně značeny reportérovým genem β -laktamázou a jako expresní systém sloužily HEK 293 buňky. Snížená povrchová exprese byla pozorována v případě mutací G483R, R518H, T531M, V685G, I694T, M705V, A716T, A727T, D731N a K772E v GluN2A podjednotce a mutací E413G a C461F GluN2B podjednotky koexprimované s GluN1 podjednotkou. Výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi (Addis *et al.*, 2017), kdy mutace G483R, M705V a D731N GluN2A podjednotky snížily povrchový transport receptorů, avšak v případě mutace M705V pouze mírně. Bylo zjištěno, že většina vzácně se vyskytujících variant v GluN2A podjednotce je asociována s epilepsií a v případě GluN2B podjednotky s poruchou intelektu s přítomností nebo bez přítomnosti záchvatů. U mutací C436R, R504W GluN2A a C436R, C456Y, R540H, R696H GluN2B podjednotky vyskytujících se na rozhraní podjednotek bylo také potvrzeno snížení povrchového transportu NMDA receptorů (Swanger *et al.*, 2016).

V naší laboratoři jsme zkoumali vliv *de novo* mutací TMD GluN2B podjednotky na povrchovou expresi NMDA receptorů. Analyzovali jsme 11 klinicky relevantních mutací P553L, V558I, W607C, N615I, V618G, S628F, E657G, G820A, G820E, M824R a L825V GluN2B podjednotky koexprimované s GluN1 podjednotkou. Tyto mutace byly identifikovány u pacientů s poruchou intelektu, opožděným vývojem, záchvaty a s poruchami autistického spektra. K transfekci jsme využili heterologní buněčnou linii opičích ledvinných fibroblastů (COS-7) a HEK 293 buňky a imunocytochemicky značili povrchově exprimované NMDA receptory. Největší pokles povrchové exprese jsme zaznamenali u mutovaných GluN1/GluN2B-S682F receptorů a dále také mírné snížení u GluN1/GluN2B-W607C receptorů. Dále jsme zjistili, že mutace G820E naopak zvýšila počet povrchově exprimovaných NMDA receptorů (Vyklícky *et al.*, 2018).

Mutace S1415L v CTD GluN2B podjednotky nalezená v klinických studiích u pacientů s autismem způsobila snížení povrchové exprese GluN1/GluN2B-S1415L receptorů s využitím expresního systému savčích hipokampálních neuronů. Tento mutovaný

receptor také méně interagoval se strukturním a regulačním proteinem PSD-95 (Liu *et al.*, 2017).

3.4.2 Transmembránová doména a transport NMDA receptorů

TMD je jedním z klíčových faktorů podílejících se na regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch (Cao *et al.*, 2011). Mezi významné oblasti TMD, které mají vliv na zadržení či uvolnění receptorů z ER, patří M3 a M4 transmembránové helixy (Horak *et al.*, 2008b).

V M3 helixu GluN1, GluN2B a GluN2C podjednotek se nachází ER retenční signály, které musí být maskovány pro uvolnění receptoru z ER. S využitím expresního systému COS-7 a HEK 293 buněk, byly objeveny konkrétní aminokyseliny v M3 helixu GluN1-1a, GluN2B a GluN2C podjednotek, zodpovědné za regulaci povrchového transportu NMDA receptorů. Konkrétně se jedná o aminokyseliny W636, Y647, T648 GluN1-1a podjednotky, W635, S645, Y646, T647 GluN2B podjednotky a W645, Y656 a T657 v GluN2C podjednotce. Jednotlivé klíčové aminokyseliny byly nahrazeny alaninem, přičemž GluN1-1a podjednotka byla koexprimována s GluN2A, GluN2B i GluN2C podjednotkami a GluN2B či GluN2C podjednotky koexprimovány s GluN1 podjednotkou. Díky elektrofyziologickému měření bylo zjištěno, že nahrazení klíčových aminokyselin v GluN1-1a a GluN2B podjednotkách nezabránilo vytvoření funkčního receptoru, byla však ovlivněna rychlost desensitizace iontového kanálu. U mutovaných GluN1/GluN2C receptorů byly oproti ostatním variantám naměřeny velmi malé proudové odpovědi. Důvodem může být celkově snížená exprese GluN1/GluN2C receptorů v porovnání s GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptory. Z výsledků experimentů také vyplývá, že retenční signál M3 helixu je nadřazen retenčním motivům v CTD (Kaniakova *et al.*, 2012a; Lichnerova *et al.*, 2014).

Dále byla studována role M4 transmembránového helixu v regulaci transportu NMDA receptorů. Bylo zjištěno, že k zamaskování M3 helixu GluN2B podjednotky dochází prostřednictvím interakce s M3 a M4 helixy GluN1 podjednotky (Horak *et al.*, 2008a). V M4 helixu GluN1 podjednotky byla identifikována i konkrétní aminokyselina L830, která se podílí na maskování helixů v TMD a uvolnění receptoru z ER. Mutovaná GluN1 podjednotka byla koexprimována s GluN2A i GluN2B podjednotkami v COS-7 buněčné linii, přičemž povrchová exprese obou GluN1-L830/GluN2A i GluN1-L830/GluN2B receptorů byla regulována podobným způsobem. Z výsledků také vyplynulo, že aminokyselina L830 není klíčová pro interakci GluN1 a GluN2 podjednotek, pro složení

funkčního receptoru, ani pro transport samostatně exprimovaných GluN1 podjednotek na buněčný povrch (Kaniakova *et al.*, 2012b).

Ve svých experimentech jsem vycházela z klinické studie, která identifikovala *de novo* mutace (M641I, A645S, Y647S, N650K) v genu kódující M3 transmembránový helix GluN1 podjednotky u pacientů s poruchami intelektu, hybnosti nebo s projevy záchvatů. V tomto případě nebyl dosud studován vliv lidských mutací na transport NMDA receptorů (Lemke *et al.*, 2016). Některé další studie již přímo sledovaly vliv klinicky relevantních mutací v TMD na povrchový transport receptorů. Jednalo se o mutaci G620R v M2 transmembránovém helixu, která snížila počet povrchově exprimovaných GluN1-G620R/GluN2B receptorů, zatímco množství GluN1-G620R/GluN2A receptorů v membráně buňky bylo sníženo pouze mírně (Chen *et al.*, 2017). V naší laboratoři jsme zkoumali lidské mutace v TMD GluN2B podjednotky a zjistili jsme, že tři mutace S682F, W607C, G820E ovlivnily transport receptorů na povrch buňky. Mutovaný serin (S682F), který výrazně snížil povrchovou expresi GluN1/GluN2B-S682F receptorů je součástí M3 helixu klíčového pro regulaci povrchového transportu. Důvodem snížení může být narušení kvartérní struktury proteinu. U mutovaného GluN1/GluN2B-W607C receptoru jsme zjistili pouze mírné snížení povrchové exprese. Aminokyselina W607, která se nachází v M2 helixu, přispívá k jeho správnému uspořádání. U mutace G820E nacházející se v M4 helixu jsme pozorovali zvýšenou povrchovou expresi, přičemž tento glycin podléhá strukturálním změnám při reorientaci LBD po navázání ligandu (Vyklícky *et al.*, 2018). Z klinických studií a experimentů vyplývá, že TMD je důležitým faktorem pro regulaci povrchového transportu NMDA receptorů. Což dokazují i záměny jednotlivých aminokyselin, které poškozením správné regulace receptorů mohou vést ke vzniku nebo rozvoji neuropsychiatrických onemocnění.

3.4.3 Modifikace cysteinů a transport NMDA receptorů

Cystein je polární aminokyselina obsahující reaktivní thiolovou skupinu, která se nachází v redukované či oxidované formě v závislosti na redoxním potenciálu prostředí. Thiolové skupiny cysteinů lokalizovaných v oxidativním prostředí na extracelulární části NMDA receptorů mohou vzájemně tvořit disulfidické můstky, podílet se na koordinaci zinečnatých kationtů nebo jsou *S*-nitrosylovány (Choi *et al.*, 2000, 2001; Karakas & Furukawa, 2014). Cysteiny NMDA receptorů vyskytující se v redukujícím prostředí cytosolu vytváří disulfidické můstky velmi ojediněle a jsou například modifikovány palmitoylací (Hayashi *et al.*, 2010; Mattison *et al.*, 2012). Různé typy modifikací thiolových skupin cysteinů mají vliv

na skládání, stabilitu, signalizaci, modulování aktivity, zprostředkování interakce s agonistou i na povrchovou expresi NMDA receptorů (Laube *et al.*, 1993; Lipton *et al.*, 1998, 2002; Papadakis *et al.*, 2004; Huggins & Grant, 2005).

Palmitoylace je jednou z reverzibilních posttranslačních modifikací proteinů, u které byl zjištěn vliv na regulaci povrchové exprese NMDA receptorů. Modifikace spočívá ve vazbě kyseliny palmitové na thiolovou skupinu cysteinů lokalizovaných intracelulárně. Součástí CTD GluN2A a GluN2B podjednotek NMDA receptorů jsou dva odlišné cysteinové klastry, které jsou modifikovány palmitoylací. Modifikace prvního cysteinového klastru, který se nachází v blízkosti TMD, zajišťuje stabilní expresi a konstitutivní internalizaci receptorů. Palmitoylace druhého klastru lokalizovaného v prostřední části CTD pomocí odlišných palmitoyl transferáz vede ke zvýšené akumulaci NMDA receptorů v GA a k následnému snížení jejich povrchové exprese (Hayashi *et al.*, 2010; Mattison *et al.*, 2012).

Ve své práci se zabývám cysteiny tvořící disulfidické můstky, které jsou dalším faktorem regulujícím povrchový transport NMDA receptorů. Jedná se o kovalentní vazbu mezi thiolovými skupinami aminokyselin cysteinů ATD a LBD, která je tvořena v oxidativním prostředí ER za účasti mnoha enzymů například protein disulfid izomerázy. Mají klíčovou roli jak při formování receptoru a stabilizaci terciální či kvartérní struktury proteinu, tak při regulaci jeho funkčních vlastností a povrchové exprese. Přítomnost disulfidických můstků byla studována v GluN1, GluN2A a GluN2B podjednotkách NMDA receptorů pomocí krystalografických studií či biochemických experimentů. V případě samostatné GluN1 podjednotky byly disulfidické můstky potvrzeny nebo predikovány mezi páry cysteinů na pozicích C79-C308, C420-C454, C436-C455, C744-C798 (Lipton *et al.*, 2002; Furukawa & Gouaux, 2003; Kaye *et al.*, 2007; Karakas & Furukawa, 2014). U GluN2A podjednotky se jedná o pozice C87-C320, C429-C455, C436-C456 a C745-C800 (Zhang *et al.*, 2013; Swanger *et al.*, 2016; Volgraf *et al.*, 2016). A v případě GluN2B podjednotky byly krystalografickými studiemi potvrzeny disulfidické můstky mezi páry cysteinů na pozicích C86-C321, C429-C456, C436-C457 a C746-C801 (Karakas *et al.*, 2009; Karakas & Furukawa, 2014).

V GluN1-2a podjednotce byl studován vliv cysteinů na povrchovou expresi NMDA receptorů pomocí expresního systému HEK 293 buněk a biochemických metod. Cysteiny na pozicích C22, C79, C308 byly jednotlivě nahrazeny aminokyselinou alaninem

a koexprimovány s GluN2B podjednotkou, přičemž cysteiny C79 a C308 tvoří disulfidický můstek. Z výsledků vyplývá, že mutace C22A téměř neovlivnila povrchovou expresi GluN1-2a-C22A/GluN2B receptorů (88 %), zatímco množství GluN1-2a-C79A/GluN2B a GluN1-2a-C308A/GluN2B receptorů bylo sníženo na 45 % v porovnání s povrchovou expresí přirozeného GluN1-2a/GluN2B receptoru (Papadakis *et al.*, 2004).

Dále byla studována role cysteinů na pozicích C87 a C320 ATD GluN2A podjednotky NMDA receptorů při dimerizaci ATD GluN2A podjednotek. Cysteiny GluN2A podjednotky byly nahrazeny alaninem a koexprimovány s GluN1 podjednotkou v COS-7 buněčné linii. Pomocí metod biochemie, imunocytochemie a Försterova rezonančního přenosu energie bylo zjištěno, že cysteiny C87 a C320 v ATD GluN2A podjednotky jsou potřebné pro formování disulfidického můstku a pro tvorbu GluN2A ATD homodimerů. Pokud se však mutací cysteinů (C87, C320) zabránilo homodimerizaci GluN2A podjednotek, nebylo ovlivněno formování receptoru, ani jeho povrchová exprese (Zhang *et al.*, 2013). V GluN2A podjednotce byly také zjištěny klinicky relevantní mutace cysteinů C231Y a C436R, které při koexpresi s GluN1 podjednotkou snižovaly množství povrchově exprimovaných receptorů v HEK 293 buňkách. Mutace C231Y se nachází v ATD a může ovlivnit strukturu receptoru. Mutace C436R naruší tvorbu disulfidického můstku, což může být důvodem změny povrchového transportu (Swanger *et al.*, 2016; Addis *et al.*, 2017).

U pacientů s poruchou intelektu byly v klinických studiích nalezeny mutované cysteiny v GluN2B podjednotce (C436R, C456Y, C461F), které snižovaly povrchovou expresi NMDA receptorů. Mutovaná GluN2B podjednotka byla koexprimována s GluN1 podjednotkou v HEK 293 buňkách (Swanger *et al.*, 2016). Mutace cysteinů C436R, C456Y pravděpodobně narušily disulfidické můstky (C436-C457, C429-C456) a mutace C461F mohla narušit strukturu proteinu (Karakas & Furukawa, 2014). Z výsledků různých experimentů, kde byly bodovou mutagenézí cysteinů narušeny disulfidické vazby, vyplývá, že kovalentní spojení dvou cysteinů je velmi důležité pro proces formování, maturace a pro povrchovou expresi NMDA receptorů.

4 Cíle diplomové práce

1. Zjistit, které klinicky známé lidské mutace v M3 transmembránovém helixu GluN1 podjednotky mění povrchovou expresi NMDA receptorů v COS-7 buněčné linii. Dále identifikovat odlišnosti exprese těchto mutovaných NMDA receptorů v závislosti na jejich podjednotkovém složení, pomocí molekulárně-biologických, imunocytochemických a mikroskopických metod.
2. Objasnit vliv všech známých cysteinů tvořících disulfidické můstky v GluN1-1a, GluN2A a GluN2B podjednotkách na povrchovou expresi NMDA receptorů v COS-7 buněčné linii, s využitím molekulárně-biologických, imunocytochemických a mikroskopických metod.

5 Materiál a metody

Hlavním záměrem prováděných experimentů bylo zjistit vliv konkrétních bodových mutací ve dvou různých oblastech GluN podjednotek na povrchovou expresi NMDA receptorů. Nejdříve byly cílenou DNA mutagenézí vytvořeny mutované cirkulární DNA (cDNA) konstrukty kódující rekombinantní i přirozené podjednotky NMDA receptorů. Následně byly tyto mutované cDNA konstrukty v kombinaci s přirozenými transfekovány do COS-7 buněčné linie. Receptory exprimované na povrchu buněk byly imunocytochemicky značeny specifickými protilátkami. Pro detekci intenzity fluorescenčního signálu byl užíván systém Cell[^]R, zahrnující invertovaný fluorescenční mikroskop. Na závěr byla provedena obrazová a statistická analýza dat programy ImageJ, SigmaPlot a SigmaStat.

5.1 Chemikálie a roztoky

LB médium

Ve 300 ml destilované a deionizované vody jsem rozpustila 3 g peptonu z kaseinu (Serva, Německo), 1,5 g kvasničného extraktu (Serva, Německo) a 3 g NaCl (Sigma-Aldrich, USA). Sterilizace lysogenního bujónu (LB média) v autoklávu probíhala 20 minut při 121 °C.

Agarové plotny

Ve 300 ml destilované a deionizované vody jsem rozpustila 12 g Nutrient agaru N°2 (Biolife, Itálie) a autoklávovala 20 minut při 121 °C. Po vychladnutí agaru na 50 °C jsem přidala antibiotikum ampicilin v koncentraci 2 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) a rozlila do 15 – 17 připravených plastových Petriho misek.

PBS

Do objemu 800 ml destilované a deionizované vody jsem přidala 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ a 0,24 g KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, USA). Hodnotu pH jsem upravila na 7,4 a doplnila roztok do objemu 1 litru. Roztok fosfátového pufru s chloridem sodným (PBS) jsem sterilizovala v autoklávu 20 min při 121°C.

Trypsin

Připravila jsem si 0,05% roztok trypsinu (Invitrogen, USA) v PBS a upravila pH na hodnotu 7,3.

Kultivační médium s inhibitory NMDA receptorů

K 1 ml minimálního esenciálního média Eagle (MEM; Sigma-Aldrich, USA) obohaceném o 10 % fetálního telecího séra (FTS; Invitrogen, USA) jsem přidala 1 µg ketaminu, 197 µg 2-amino-5-fosfonopentanové kyseliny, 20 µl 1M MgCl₂ (Sigma-Aldrich, USA) a 10 µl 100x koncentrovaného antibiotika Penicilin-Streptomycin (Invitrogen, USA).

BSA roztok

V 10 ml PBS jsem rozpustila 0,02 g hovězího sérového albuminu (BSA; MP Biomedicals, USA). Roztok jsem připravila vždy čerstvý těsně před jeho použitím v imunocytochemii.

5.2 Příprava mutovaných podjednotek NMDA receptorů

Pro účely experimentů jsem používala cDNA konstrukty kódující potkaní i lidské varianty přirozených a rekombinantních podjednotek NMDA receptorů: GluN1-1a podjednotku značenou žlutým fluorescenčním proteinem na extracelulární části receptoru (YFP-GluN1-1a), GluN2A, GluN2B a GluN3A podjednotky značené zeleným fluorescenčním proteinem na extracelulární části receptoru (GFP-GluN2A, GFP-GluN2B, GFP-GluN3A). Dále jsem ve svých experimentech užívala neznačené GluN1-4a, GluN2A, GluN2B a GluN3A podjednotky NMDA receptorů (Luo *et al.*, 2002; Horak *et al.*, 2008b; Kaniakova *et al.*, 2012a).

Pro realizaci prvního stanoveného cíle jsem vyrobila dvě sestřihové varianty lidských GluN1 podjednotek obsahující jednotlivé klinicky relevantní lidské mutace v M3 transmembránovém helixu (Lemke *et al.*, 2016), (Tab. č. 1).

Templátová cDNA	YFP-GluN1-1a	GluN1-4a
Vyrobené mutace	M641I	M641I
	A645S	A645S
	Y647S	Y647S
	N650K	N650K

Tab. č. 1: Vyrobené sestřihové varianty lidských GluN1 podjednotek obsahující jednotlivé klinicky relevantní lidské mutace v M3 transmembránovém helixu (Lemke *et al.*, 2016).

Mutované YFP-GluN1-1a i GluN1-4a podjednotky jsem následně exprimovala v kombinaci s přirozenými a rekombinantními GluN2A, GluN2B a GluN3A podjednotkami.

V rámci druhého stanoveného cíle jsem jednotlivé známé cysteiny v GluN1-1a, GluN2A a GluN2B podjednotkách tvořící disulfidické můstky nahradila aminokyselinou serinem. Serin je polární aminokyselina chemicky podobná cysteinu, avšak s neschopností tvořit disulfidické můstky (Ronzoni *et al.*, 2016). V případě YFP-GluN1-1a (Choi *et al.*, 2001; Papadakis *et al.*, 2004; Kaye *et al.*, 2007), GFP-GluN2A (Choi *et al.*, 2001; Furukawa *et al.*, 2005; Huggins & Grant, 2005; Salussolia *et al.*, 2013; Schauder *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Swanger *et al.*, 2016) a GFP-GluN2B (Karakas *et al.*, 2009; Karakas & Furukawa, 2014; Swanger *et al.*, 2016) podjednotek jsem nahradila cysteiny na následujících pozicích (Tab. č. 2).

Templátová cDNA	YFP-GluN1-1a	GFP-GluN2A	GFP-GluN2B
Vyrobené mutace	C79S	C87S	C86S
		C320S	C321S
	C308S	C429S	C429S
		C436S	C436S
	C744S	C455S	C456S
		C456S	C457S
	C798S	C745S	C746S
		C800S	C801S

Tab. č. 2: Fluorescenčně značené GluN1-1a, GluN2A a GluN2B podjednotky obsahující jednotlivé mutace známých cysteinů tvořících disulfidické můstky nahrazených aminokyselinou serinem (Choi *et al.*, 2001; Papadakis *et al.*, 2004; Furukawa *et al.*, 2005; Kaye *et al.*, 2007; Karakas *et al.*, 2009; Salussolia *et al.*, 2013; Schauder *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Karakas & Furukawa, 2014; Swanger *et al.*, 2016).

Uvedené mutované YFP-GluN1-1a podjednotky jsem kombinovala s přirozenými GluN2A, GluN2B a GluN3A podjednotkami. Další mutované GFP-GluN2A a GFP-GluN2B podjednotky jsem exprimovala v kombinaci s přirozenou GluN1-4a podjednotkou.

Podjednotky NMDA receptorů obsahující bodovou mutaci v definované oblasti jsem připravila polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) pomocí přístroje PCR termocyklieru (Eppendorf, Německo) a syntetizovaných oligonukleotidových primerů (Eurofins Genomics, Německo). Komplementární primery o přibližné délce 30 nukleotidů obsahovaly změněný

kodón v prostřední části sekvence. Konce primerů tvořily nukleotidy cytosin a guanin pro stabilnější interakci s templátovou DNA v průběhu amplifikace. Při provádění PCR reakce jsem postupovala dle návodu výrobce (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, USA). Výslednou reakční směs jsem po proběhlé amplifikaci inkubovala 1 hodinu s enzymem DpnI (New England Biolabs, USA) pro rozštěpení nemutované templátové DNA.

Pro navýšení počtu mutovaných cDNA konstruktů jsem transformovala XL10-Gold ultrakompetentní bakterie kmene *Escherichia coli* metodou teplotního šoku. Do objemu 100 µl suspenze bakteriálních buněk jsem přidala 5 µl PCR reakční směsi a inkubovala 1 hodinu na ledu. Poté jsem provedla teplotní šok po dobu 45 s při 42 °C a mikrozkuhavku přenesla na 2 minuty zpět na led. Ke směsi jsem přidala 500 µl předeřátého LB média (37 °C) a vložila na 1 hodinu do rotačního inkubátoru (37 °C, 200 rpm). Bakteriální směs jsem nanášela na agar v Petriho miskách obsahující selekční antibiotikum ampicilin (2 µg/ml), (Sigma-Aldrich, USA). Petriho misky s agarem jsem vložila do inkubátoru (37 °C) na 16 hodin. Vybrané bakteriální kolonie jsem sterilní špičkou naočkovala do 5 ml LB média obsahující antibiotikum ampicilin a nechala třepat přibližně 16 hodin (37 °C, 200 rpm). Bakteriální kulturu jsem centrifugovala (Centrifuga Rotanta 460R, 6000 x g), odstranila supernatant a z bakteriální pelety podle návodu z High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) izolovala mutovaný cDNA konstrukt. Pro zjištění koncentrace izolované cDNA jsem použila spektrofotometr NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, USA). Správnost mutagenese jsem ověřila sekvenací vzorku (GATC Biotech, Německo).

5.3 Pasážování a transfekce COS-7 buněčné linie

Pro pozorování vlivu různých faktorů na změnu povrchové exprese NMDA receptorů jsem použila heterologní buněčnou COS-7 linii, která přirozeně neexprimuje podjednotky NMDA receptorů. Buněčnou linii jsem kultivovala v roztoku 10% FTS v MEM v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ a téměř 100% vlhkosti a pravidelně ji pasážovala. Při pasáži jsem nejprve nechala ve vodní lázni vytemperovat roztoky PBS, MEM a trypsinu na teplotu 37 °C. Poté jsem z kultivační lahve s buňkami o vysoké konfluenci (70 – 80 %) odstranila médium a opláchla je 1 ml PBS. Pomocí 0,5 ml trypsinu jsem uvolnila adheované buňky do roztoku a přidáním 1 ml 10% FTS v MEM působení trypsinu opět inaktivovala. Vzniklou suspenzi jsem rozdělila do nových kultivačních lahví a doplnila čerstvým médiem.

Prostřednictvím transfekčního činidla Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies, USA) jsem vkládala cDNA konstrukty podjednotek NMDA receptorů do buněk COS-7 linie.

Den před transfekcí jsem nasadila buňky do 12-jamkových kultivačních destiček s vloženými skličky o rozměrech 15 mm pokrytých poly-L-lysinem (Sigma-Aldrich, USA) pro lepší adheenci buněk k podkladu. V den transfekce jsem zkontrolovala konfluenci (80 – 90 %) a stav buněk pod invertovaným mikroskopem CKX41 (Olympus, Japonsko). Z každé jamky v kultivační destičce jsem odebrala kultivační médium a nahradila 1,5 ml média Opti-MEM (Invitrogen, USA) předem vytemperovaným na teplotu 37 °C. Do jedné mikrozkušavky jsem přidala 50 µl Opti-MEM a celkem 450 nebo 900 ng cDNA pro expresi jednoho nebo dvou typů GluN podjednotek. Do další mikrozkušavky jsem smíchala 50 µl Opti-MEM s 2 µl Lipofectamine™ 2000, promíchala a inkubovala 5 minut při pokojové teplotě. Obsahy obou mikrozkušavek jsem spojila dohromady, promíchala pipetou, nechala inkubovat 20 minut při pokojové teplotě, roztok pak přidala k buňkám a 12-jamkovou kultivační destičku jsem vložila zpět do inkubátoru. Po 5 hodinách inkubace jsem Opti-MEM s transfekční směsí v jamkách nahradila 2 ml kultivačního média s inhibitory NMDA receptorů obsahující 2 µg ketaminu, 394 µg 2-amino-5-fosfonopentanové kyseliny, 40 µl 1M MgCl₂ a také 20 µl 100x koncentrovaného antibiotika Penicilin-Streptomycin. Kultivační destičku jsem poté vložila do inkubátoru na dobu 22 – 24 hodin (37 °C, 5% CO₂ a téměř 100% vlhkost).

5.4 Imunocytochemické značení povrchově exprimovaných NMDA receptorů

Pro zjištění celkové exprese NMDA receptorů v buňkách COS-7 linie byla vždy jedna z koexprimovaných GluN podjednotek značena YFP nebo GFP na extracelulární ATD. NMDA receptory exprimované na povrchu buněk jsem značila pomocí primární a sekundární protilátky.

Po 22 – 24 hodinách od ukončení transfekce jsem sklíčka s transfekovanými buňkami COS-7 linie přemístila na podložku s parafilmem umístěnou na ledu a každé sklíčko pokryla kapkou vychlazeného PBS o teplotě 0 °C. Po odsátí PBS jsem na 10 minut přidala čerstvě připravený 0,2% roztok BSA v PBS (0 °C) pro zablokování nespecifických vazebných míst protilátek. Dále jsem na každé sklíčko přidala 100 µl primární králičí protilátky Anti-Green Fluorescent Protein (Merck Millipore, USA), naředěné 0,2% roztokem BSA v poměru 1:1000 a nechala inkubovat 30 minut. Sklíčka s buňkami jsem dvakrát po dobu 2 minut omyla pomocí 0,2% roztoku BSA v PBS (0°C) a na 30 minut přidala 100 µl sekundární kozi protilátky Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA), naředěné 0,2% roztokem BSA v poměru 1:1000. Poté jsem buňky třikrát po dobu 2 minut omyla PBS vychlazeným na teplotu 0 °C a 20 minut fixovala 4% roztokem paraformaldehydu v PBS (Sigma-Aldrich,

USA). Nakonec jsem sklíčka s buňkami třikrát omyla PBS o pokojové teplotě, odsála přebytečnou kapalinu a umístila do kapky montovacího média ProLong™ Gold Antifade (Life Technologies, USA) na podložní sklíčko a uložila do lednice.

5.5 Fluorescenční mikroskopie

Pro detekci intenzity celkové a povrchové exprese fluorescenčně značených podjednotek NMDA receptorů v COS-7 buněčné linii jsem použila systém Cell[^]R (Olympus, Japonsko), který zahrnuje fluorescenční invertovaný mikroskop IX81 (Olympus, Japonsko), monochromátor Polychrome V (Till Photonics, Germany), adaptér DualView (Optical Insights, USA) a rovněž digitální kameru (Hamamatsu Orca ER, Japonsko). Pozorovala jsem celkovou expresi NMDA receptorů, přičemž jsem excitovala GFP nebo YFP značené podjednotky světlem o vlnové délce 480 nm a následně byl emitován signál o vlnové délce vyšší než 510 nm. Při sledování povrchové exprese receptorů jsem excitovala světlem o vlnové délce 555 nm a následně jsem pozorovala emitovaný signál o vlnové délce vyšší než 570 nm. V rámci jednoho nezávislého experimentu jsem u každého vzorku fotila snímky minimálně 15 buněk z optických rovin s rozestupy 0,3 μ m. Snímky z jednotlivých optických rovin (Z-stacků) s projekcí maximálních intenzit signálu jsem postupně složila dohromady a výsledný snímek dále analyzovala.

5.6 Obrazová a statistická analýza dat

Pro obrazové zpracování nafocených snímků jsem užívala program ImageJ (National Institutes of Health, USA). Na snímcích jsem ručně označovala oblasti jednotlivých buněk COS-7 linie, měřila intenzitu fluorescenčního signálu celkové (GFP a YFP) a povrchové (Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG) exprese receptorů, přičemž jsem od naměřených hodnot vždy odečetla intenzitu signálu pozadí. Rozdíly v povrchové expresi mezi jednotlivými vzorky jsem určovala z podílu hodnot intenzit povrchové k celkové expresi NMDA receptorů. Analyzovala jsem vždy minimálně 15 buněk v 1 – 2 nezávislých experimentech. Pro tvorbu grafů jsem využívala program SigmaPlot a pro statistickou analýzu dat metodou ANOVA, program SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA).

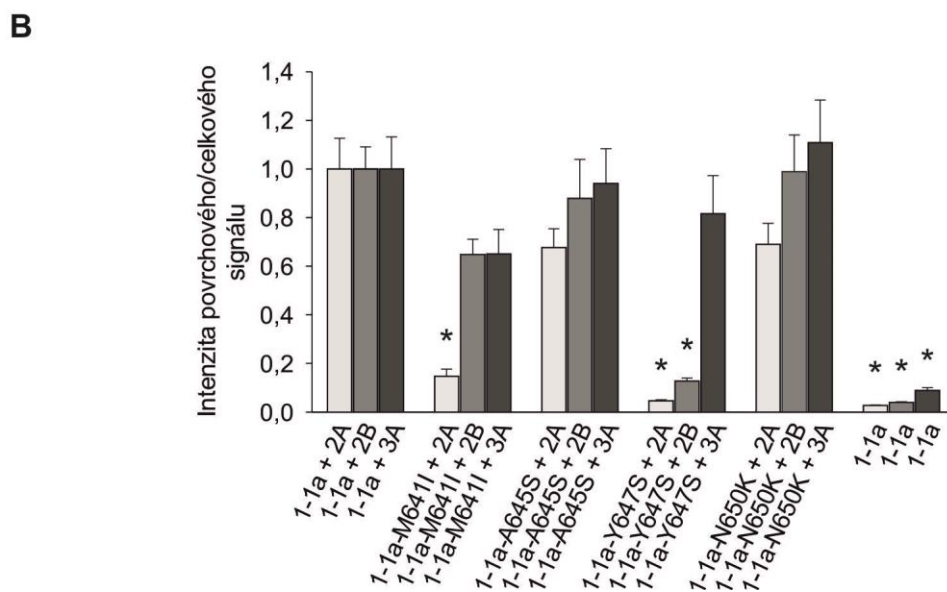
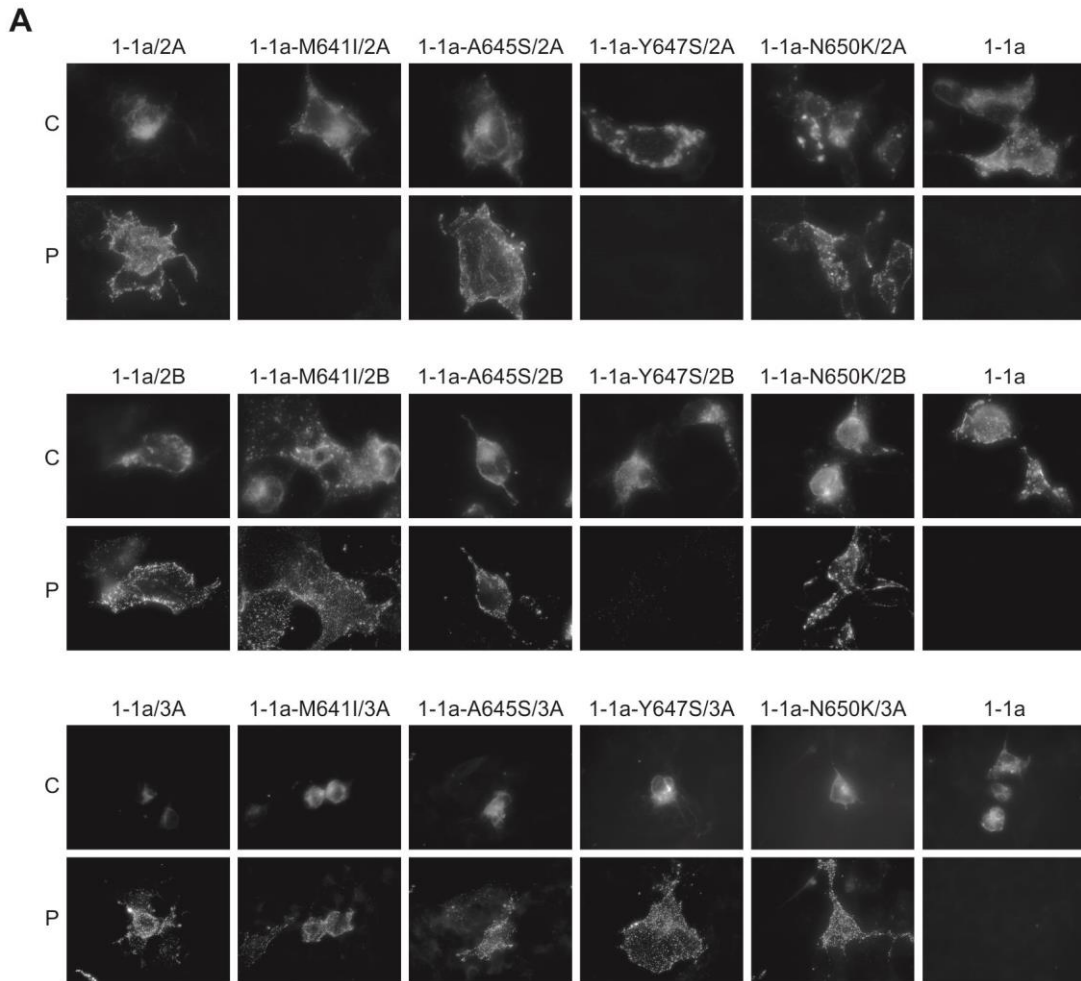
6 Výsledky

6.1 Charakteristika povrchového transportu NMDA receptorů obsahujících klinicky relevantní mutace v GluN1-1a podjednotce

Předchozí studie prokázaly důležitost role M3 helixu TMD v regulaci povrchového transportu funkčních NMDA receptorů. Bylo zjištěno, že M3 helix reguluje funkční vlastnosti a podílí se na zadržení nezralých nebo nesprávně složených NMDA receptorů v ER, ale konkrétní mechanismus regulace není dosud znám (Kaniakova *et al.*, 2012a). Zároveň byly v klinických studiích u pacientů s neuropsychiatrickými symptomy nalezeny nově vzniklé mutace v M3 transmembránovém helixu GluN1 podjednotky NMDA receptorů, které se projevovaly například záchvaty, poruchami intelektu či hybnosti (Lemke *et al.*, 2016).

V provedeném experimentu jsem zjišťovala změny povrchové exprese NMDA receptorů obsahujících *de novo* klinicky relevantní mutace (M641I, A645S, Y647S, N650K) v M3 helixu fluorescenčně značené GluN1-1a podjednotky. Mutovanou YFP-GluN1-1a podjednotku jsem koexprimovala s GluN2A, GluN2B nebo GluN3A podjednotkou v COS-7 buněčné linii a pomocí fluorescenční mikroskopie studovala celkovou a povrchovou expresi NMDA receptorů. Provedením dvou nezávislých experimentů jsem zjistila, že mutace M641I a Y647S v YFP-GluN1-1a podjednotce vykazovaly statisticky významně sníženou povrchovou expresi, přičemž toto snížení bylo ovlivněno podjednotkovým složením NMDA receptorů (ANOVA, metoda Dunn's, $p < 0,05$, $n > 30$), (Obr. č. 6). V případě koexprese mutovaných podjednotek YFP-GluN1-1a-M641I a YFP-GluN1-1a-Y647S s GluN2A podjednotkou jsem pozorovala signifikantně sníženou povrchovou expresi obou mutovaných NMDA receptorů. Dále jsem zjistila signifikantně sníženou povrchovou expresi v případě YFP-GluN1-1a-Y647S/GluN2B receptorů, na rozdíl od YFP-GluN1-1a-M641I/GluN2B receptorů. Statisticky významně snížená povrchová exprese NMDA receptorů obsahujících mutované YFP-GluN1-1a podjednotky (M641I, Y647S) koexprimované s GluN3A podjednotkou zaznamenána nebyla. Jako negativní kontrola sloužila exprese samostatné YFP-GluN1-1a podjednotky, která je zadržena v ER, dokud nevytvoří společně s GluN2 či GluN3 podjednotkou funkční NMDA receptor (Fukaya *et al.*, 2003), (Kap. č. 7). Celková exprese značených YFP-GluN1-1a podjednotek se mezi jednotlivými vzorky v rámci experimentů statisticky významně nelišila (ANOVA, $p > 0,05$). Z uvedených výsledků vyplývá, že regulace povrchové exprese NMDA receptorů je závislá, jak na přítomnosti

mutovaných GluN1-1a podjednotek, tak na použití konkrétního typu druhé koexprimované podjednotky, ze které je NMDA receptor složen.

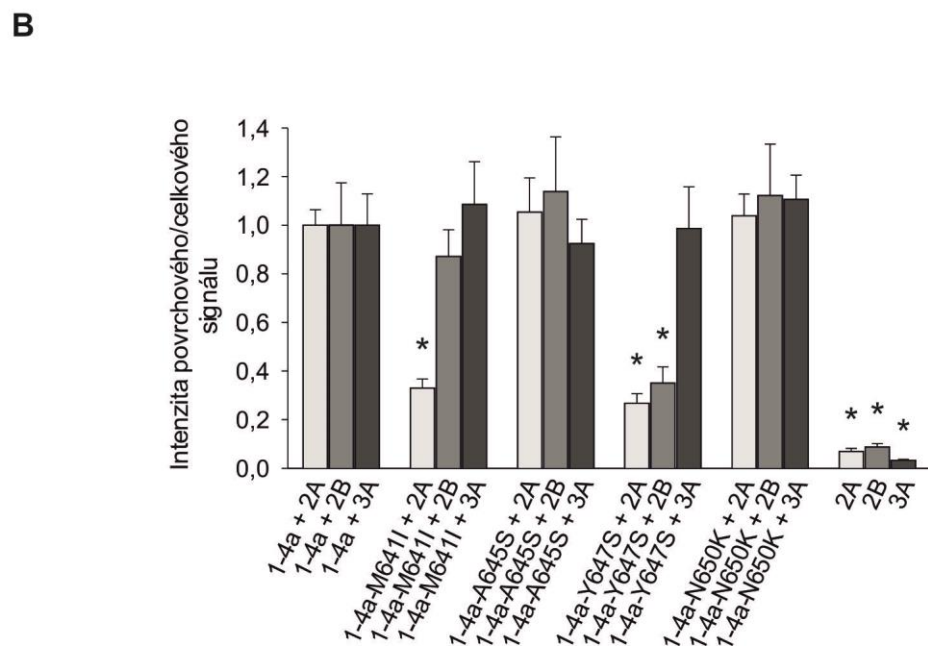
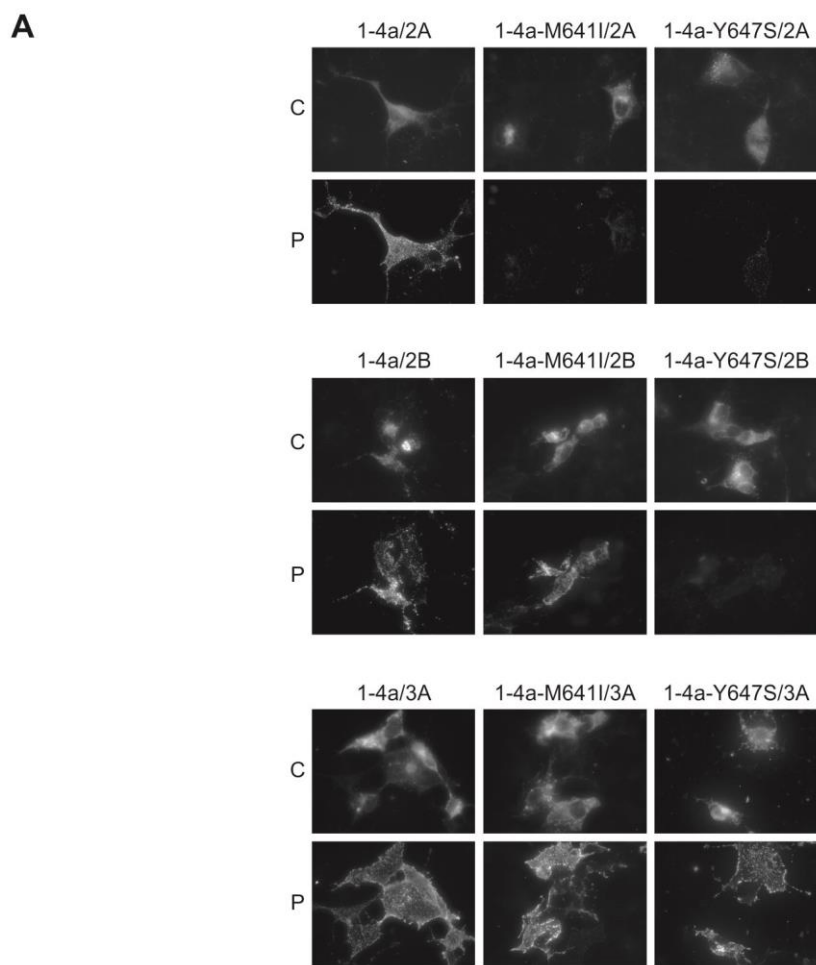


Obr. č. 6: Změny povrchového transportu lidských NMDA receptorů obsahujících klinicky relevantní mutace v GluN1-1a podjednotce A) Fotografie z fluorescenční mikroskopie celkové (C) a povrchové (P) exprese NMDA receptorů složených z YFP-GluN1-1a podjednotky (1-1a) obsahující jednotlivé bodové mutace (M641I, A645S, Y647S, N650K) koexprimované s GluN2A (2A), GluN2B (2B) a GluN3A (3A) podjednotkami v COS-7 buněčné linii. Změny exprese byly detekovány na základě rekombinantní fluorescenčně značené YFP GluN1-1a podjednotky, povrchového značení protilátkami a fluorescenční mikroskopie. B) Kvantifikace podílu intenzit povrchového a celkového fluorescenčního signálu mutovaných receptorů v porovnání s kontrolními nemutovanými YFP-GluN1-1a/GluN2A (1-1a/2A), YFP-GluN1-1a/GluN2B (1-1a/2B), YFP-GluN1-1a/GluN3A (1-1a/3A) NMDA receptory. V případě YFP-GluN1-1a-M641I/GluN2A, YFP-GluN1-1a-Y647S/GluN2A a YFP-GluN1-1a-Y647S/GluN2B receptorů jsem zjistila statisticky signifikantní snížení povrchové exprese (*, ANOVA, metoda Dunn's, $p < 0,05$).

6.2 Charakteristika povrchového transportu NMDA receptorů obsahujících klinicky relevantní mutace v GluN1-4a podjednotce

Existuje osm typů sestřihových variant GluN1 podjednotky NMDA receptorů GluN1-1a/b – GluN1-4a/b, které se liší v regulaci jejich transportu na buněčný povrch. Samostatná GluN1-1a podjednotka, která je nejčastější isoformou, obsahuje C1 kazetu s retenčními motivy, díky kterým je zadržena v ER. Zatímco GluN1-4a podjednotka, která místo C1 kazety obsahuje C2' kazetu, vykazuje vysokou povrchovou expresi i bez kombinace s dalším typem GluN2 či GluN3A podjednotek (Okabe *et al.*, 1999).

Na základě poznatků o odlišnosti retence GluN1-1a a GluN1-4a podjednotek v ER jsem se v dalším experimentu zaměřila na sledování změn povrchové exprese NMDA receptorů obsahujících klinicky relevantní mutace (M641I, A645S, Y647S, N650K) v M3 helixu GluN1-4a podjednotky. Mutovanou GluN1-4a podjednotku jsem koexprimovala s fluorescenčně značenými GFP-GluN2A, GFP-GluN2B a GFP-GluN3A podjednotkami v COS-7 buněčné linii. Metodou fluorescenční mikroskopie jsem sledovala celkovou expresi podjednotek značených GFP a změny v povrchové expresi NMDA receptorů. Po provedení experimentu jsem pozorovala, obdobně jako u předchozího pokusu (Kap. č. 6.1), signifikantní vliv mutací (M641I, Y647S) na snížení povrchové exprese GluN1-4a-M641I/GFP-GluN2A, GluN1-4a-Y647S/GFP-GluN2A a GluN1-4a-Y647S/GFP-GluN2B receptorů (ANOVA, metoda Dunn's, $p < 0,05$, $n > 16$), (Obr. č. 7). Jako negativní kontroly jsem exprimovala samostatné GFP-GluN2A, GFP-GluN2B a GFP-GluN3A podjednotky, které bez přítomnosti GluN1-4a podjednotky nevytvořily funkční receptor, který by byl exprimován na buněčném povrchu. Celková exprese značených GFP-GluN2A, GFP-GluN2B a GFP-GluN3A podjednotek se mezi jednotlivými vzorky v experimentu statisticky významně nelišila (ANOVA, $p > 0,05$). Z uvedených výsledků vyplývá, že změny povrchové exprese NMDA receptorů souvisí jak s přítomností mutovaných GluN1-4a podjednotek, tak s přítomností konkrétního typu druhé koexprimované podjednotky. Na základě srovnání výsledků obou provedených experimentů s GluN1-1a a GluN1-4a podjednotkami obsahující lidské mutace (Kap. č. 6.1) jsem vyvodila, že role M3 transmembránového helixu je zásadní pro povrchovou expresi YFP-GluN1-1a i GluN1-4a podjednotky, i přes rozdílnou regulaci jejich transportu.



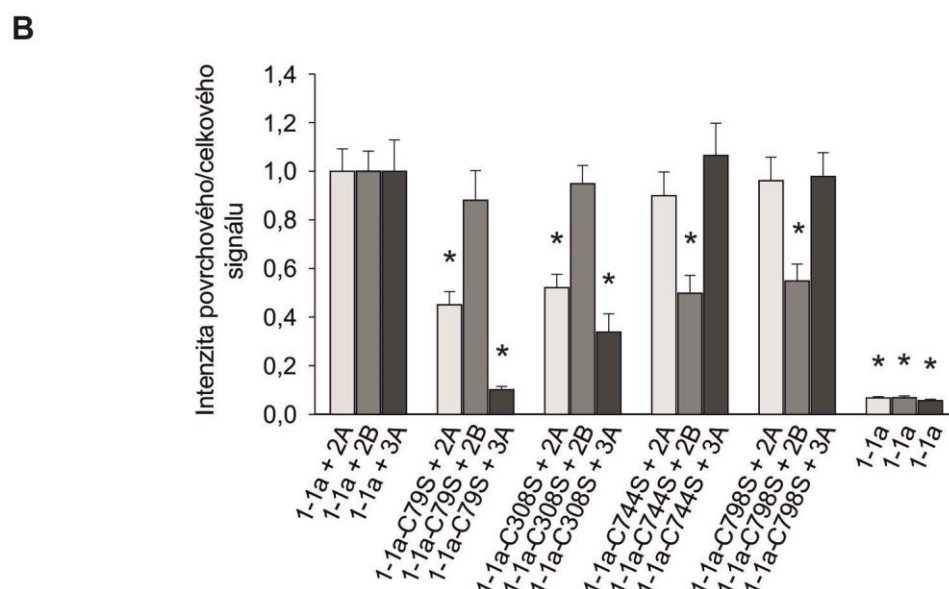
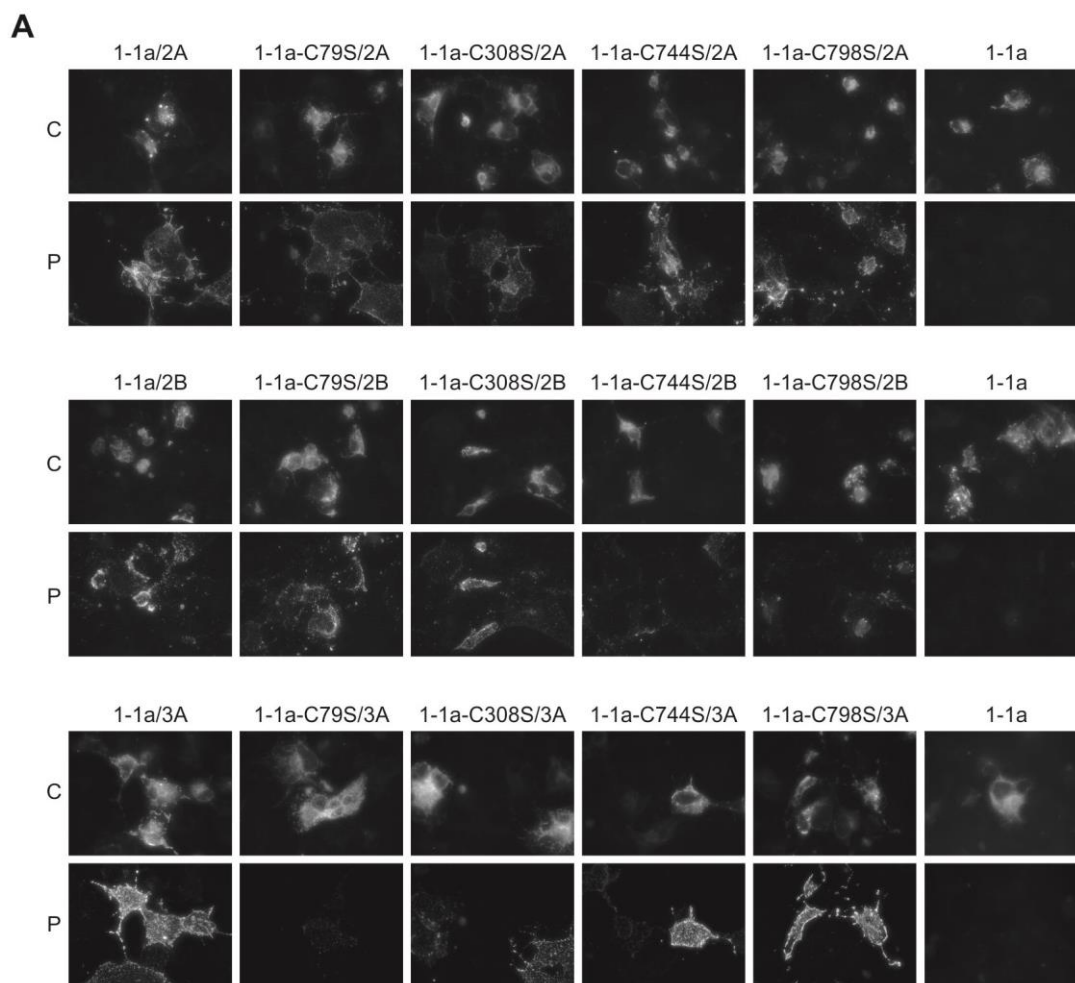
Obr. č. 7: Změny povrchového transportu lidských NMDA receptorů obsahujících klinicky relevantní mutace v GluN1-4a podjednotce A) Fotografie z fluorescenční mikroskopie znázorňují celkovou (C) a povrchovou (P) expresi kontrolních GluN1-4a/ GFP-GluN2A

(1-4a/2A), GluN1-4a/ GFP-GluN2B (1-4a/2B), GluN1-4a/ GFP-GluN3A (1-4a/3A) receptorů a vybraných mutací (M641I, Y647S) GluN1-4a podjednotky, které alespoň v jednom z případů signifikantně snížily povrchovou expresi receptorů. Změny exprese receptorů v COS-7 buněčné linii byly detekovány na základě fluorescenčně značených GFP-GluN2A, GFP-GluN2B a GFP-GluN3A podjednotek, povrchového značení protilátkami a fluorescenční mikroskopie. B) Kvantifikace podílu intenzit povrchového a celkového fluorescenčního signálu mutovaných receptorů v porovnání s kontrolními nemutovanými GluN1-4a/GFP-GluN2A (1-4a/2A), GluN1-4a/GFP-GluN2B (1-4a/2B), GluN1-4a/GFP-GluN3A (1-4a/3A) NMDA receptory. Signifikantní snížení povrchové exprese jsem pozorovala v případech GluN1-4a-M641I/GFP-GluN2A, GluN1-4a-Y647S/GFP-GluN2A a GluN1-1a-Y647S/GFP-GluN2B receptorů (*, ANOVA, metoda Dunn's, $p < 0,05$).

6.3 Vliv známých cysteinů tvořících disulfidické můstky v GluN1-1a podjednotce na povrchový transport NMDA receptorů

Další faktor, který se podílí na regulaci NMDA receptorů, představují disulfidické můstky. Je známo, že kovalentní vazba mezi thiolovými skupinami aminokyselin cysteinů ovlivňuje formování, stabilitu, funkční vlastnosti i povrchovou expresi receptorů (Papadakis *et al.*, 2004). Zároveň byly v rámci klinických studií u pacientů se symptomy epilepsie a poruchou intelektu zjištěny mutace cysteinů v extracelulární části GluN podjednotek, které snižovaly povrchovou expresi receptorů (Swanger *et al.*, 2016; Addis *et al.*, 2017).

Pro rozšíření poznatků o roli cysteinů v povrchovém transportu NMDA receptorů jsem ve fluorescenčně značené YFP-GluN1-1a podjednotce jednotlivě nahradila cysteiny za serin (C79S, C308S, C744S, C798S) a tyto mutované podjednotky koexprimovala s GluN2A, GluN2B a GluN3A podjednotkami v COS-7 buněčné linii. Ve dvou nezávislých experimentech jsem pomocí fluorescenční mikroskopie pozorovala celkovou a povrchovou expresi NMDA receptorů. Zjistila jsem, že všechny čtyři mutace cysteinů v YFP-GluN1-1a podjednotce vykazovaly signifikantně sníženou povrchovou expresi v závislosti na podjednotkovém složení receptorů (ANOVA, metoda Dunn's, $p < 0,05$, $n > 30$), (Obr. č. 8). V případě mutovaných cysteinů (C79S, C308S) tvořících jeden disulfidický můstek (Choi *et al.*, 2001; Papadakis *et al.*, 2004) v YFP-GluN1-1a podjednotce jsem pozorovala signifikantní snížení povrchové exprese receptorů v kombinaci s GluN2A a GluN3A podjednotkami. Mutace dalšího disulfidického můstku (C744S, C798S), (Choi *et al.*, 2001) vykazovaly statisticky významné snížení povrchové exprese u YFP-GluN1-1a-C744S/GluN2B a YFP-GluN1-1a-C798S/GluN2B receptorů. Jako negativní kontrola sloužila exprese samostatné YFP-GluN1-1a podjednotky. Celková exprese značených YFP-GluN1-1a podjednotek se mezi jednotlivými vzorky v rámci experimentů statisticky významně nelišila (ANOVA, $p > 0,05$). Z výsledků vyplývá, že cysteiny na pozicích C79, C308, C744 a C798, které vzájemně tvoří disulfidické můstky (C79-C308 a C744-C798), (Furukawa & Gouaux, 2003; Karakas & Furukawa, 2014) v YFP-GluN1-1a podjednotce, mají vliv na povrchový transport NMDA receptorů, přičemž tento vliv závisí na typu druhé koexprimované podjednotky.

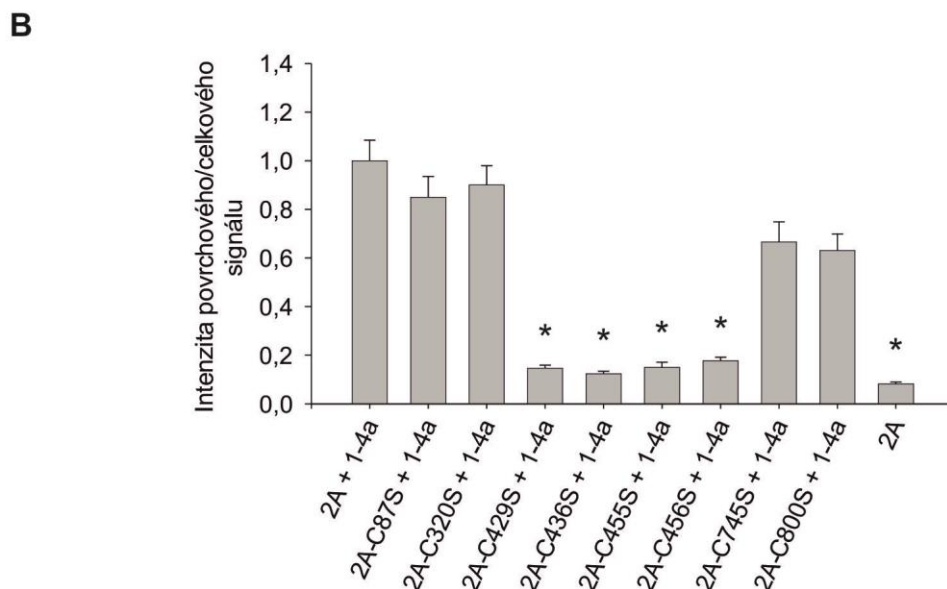
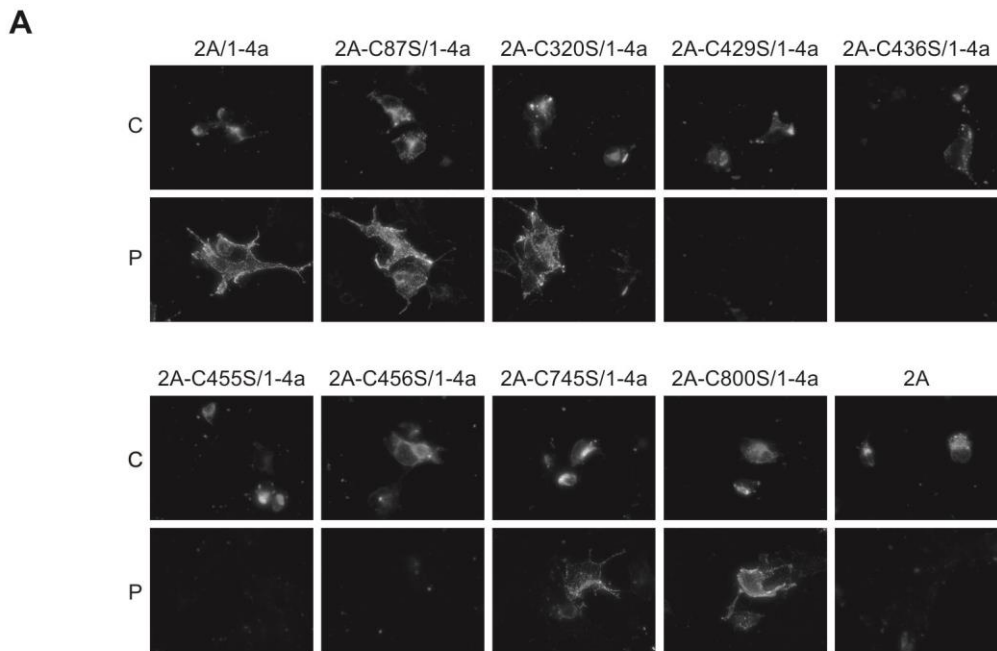


Obr. č. 8: Vliv mutací cysteinů v YFP-GluN1-1a podjednotce na povrchový transport NMDA receptorů. A) Fotografie z fluorescenční mikroskopie znázorňují celkovou (C) a povrchovou (P) expresi NMDA receptorů složených z YFP-GluN1-1a (1-1a) podjednotky obsahující jednotlivé mutace cysteinů za serin (C79S, C308S, C744S, C798S), koexprimované s GluN2A (2A), GluN2B (2B) a GluN3A (3A) podjednotkami v COS-7 buněčné linii.

Celková exprese podjednotek byla zjištěna na základě rekombinantní fluorescenčně značené YFP GluN1-1a podjednotky. Povrchová exprese receptorů byla detekována povrchovým značením primární a sekundární protilátkou. B) Kvantifikace podílu intenzit povrchového a celkového fluorescenčního signálu mutovaných receptorů v porovnání s kontrolními nemutovanými YFP-GluN1-1a/GluN2A (1-1a/2A), YFP-GluN1-1a/GluN2B (1-1a/2B), YFP-GluN1-1a/GluN3A (1-1a/3A) NMDA receptory. Pozorovala jsem signifikantní snížení povrchové exprese receptorů v případech mutací (C79S a C308S) YFP-GluN1-1a podjednotky koexprimované s GluN2A i GluN3A podjednotkami. Povrchová exprese byla snížena také v případě YFP-GluN1-1a-C744S/GluN2B a YFP-GluN1-1a-C798S/GluN2B receptorů (*, ANOVA, metoda Dunn's, $p < 0,05$).

6.4 Vliv známých cysteinů tvořících disulfidické můstky v GluN2A podjednotce na povrchový transport NMDA receptorů

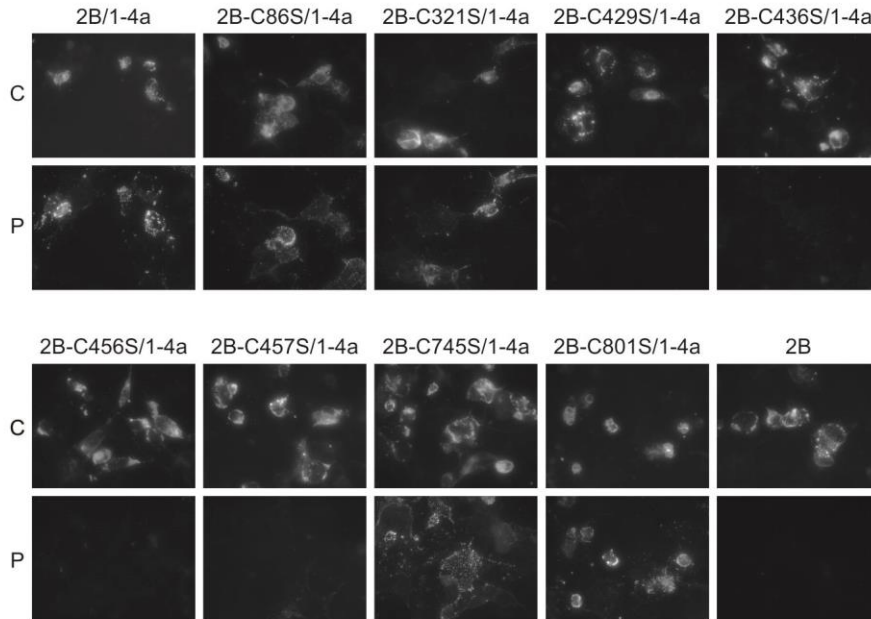
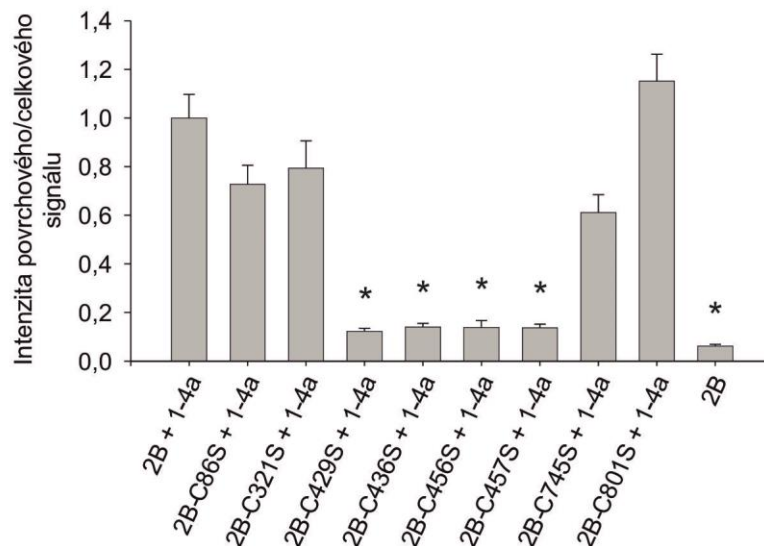
Sledovala jsem roli vybraných cysteinů GFP-GluN2A podjednotky v povrchovém transportu NMDA receptorů. Cysteiny v GFP-GluN2A podjednotce jsem nahradila za aminokyselinu serin (C87S, C320S, C429S, C436S, C455S, C456S, C745S, C800S) a koexprimovala s GluN1-4a podjednotkou v COS-7 buněčné linii. Provedla jsem dva nezávislé experimenty a sledovala celkovou a povrchovou expresi NMDA receptorů. Výsledky ukázaly, že čtyři mutace cysteinů (C429S, C436S, C455S, C456S), které mezi sebou navzájem tvoří disulfidické můstky (C429S-C455S, C436S-C456S), (Swanger *et al.*, 2016; Volgraf *et al.*, 2016) vykazovaly statisticky významné snížení povrchové exprese receptorů (ANOVA, metoda Dunn's, $p < 0,05$, $n > 35$), (Obr. č. 9). Jako negativní kontrola sloužila exprese samostatné GFP-GluN2A podjednotky. Celková exprese značených GFP-GluN2A podjednotek se mezi jednotlivými vzorky v rámci experimentů statisticky významně nelišila (ANOVA, $p > 0,05$).



Obr. č. 9: Vliv mutací cysteinů v GFP-GluN2A podjednotce na povrchový transport NMDA receptorů. A) Fotografie z fluorescenční mikroskopie znázorňují celkovou (C) a povrchovou (P) expresi NMDA receptorů složených z GFP-GluN2A (2A) podjednotky obsahující jednotlivé mutace cysteinů za serin (C87S, C320S, C429S, C436S, C455S, C456S, C745S, C800S) koexprimované s GluN1-4a (1-4a) podjednotkou v COS-7 buněčné linii. Změny povrchové exprese receptorů byly detekovány na základě rekombinantní fluorescenčně značené GFP GluN2A podjednotky, povrchového značení protilátkami a fluorescenční mikroskopie. B) Kvantifikace podílu intenzit povrchového a celkového fluorescenčního signálu mutovaných receptorů v porovnání s kontrolním nemutovaným GFP-GluN2A/GluN1-4a (2A/1-4a) receptorem. U čtyř mutovaných cysteinů (C429S, C436S, C455S, C456S) v GFP-GluN2A (2A) podjednotce jsem zaznamenala statisticky významný rozdíl v povrchové expresi receptorů (*, ANOVA, metoda Dunn's, $p < 0,05$).

6.5 Vliv známých cysteinů tvořících disulfidické můstky v GluN2B podjednotce na povrchový transport NMDA receptorů

Podobně jako v předchozím experimentu (Kap. č. 6.4) jsem určovala vliv aminokyselin cysteinů GFP-GluN2B podjednotky na povrchovou expresi NMDA receptorů. Cysteiny, u kterých byla studována tvorba disulfidických můstků, jsem nahradila aminokyselinou serinem na pozicích C86S, C321S, C429S, C436S, C456S, C457S, C745S, C801S GFP-GluN2B podjednotky (Karakas *et al.*, 2009; Karakas & Furukawa, 2014). Mutovanou GFP-GluN2B podjednotku jsem ve dvou nezávislých experimentech exprimovala s GluN1-4a podjednotkou v COS-7 buněčné linii. S využitím fluorescenční mikroskopie jsem zaznamenávala celkovou a povrchovou expresi NMDA receptorů. Ve čtyřech případech mutací cysteinů (C429S, C436S, C456S, C457S), které mezi sebou tvoří disulfidické můstky (C429S-C456S, C436S-C457S) jsem zaznamenala statisticky významné snížení povrchové exprese receptorů (ANOVA, metoda Dunn's, $p < 0,05$, $n > 32$), (Obr. č. 10). Jako negativní kontrolu jsem exprimovala samostatnou GFP-GluN2B podjednotku. Celková exprese GFP-GluN2B podjednotek nebyla mezi jednotlivými vzorky statisticky odlišná (ANOVA, $p > 0,05$).

A**B**

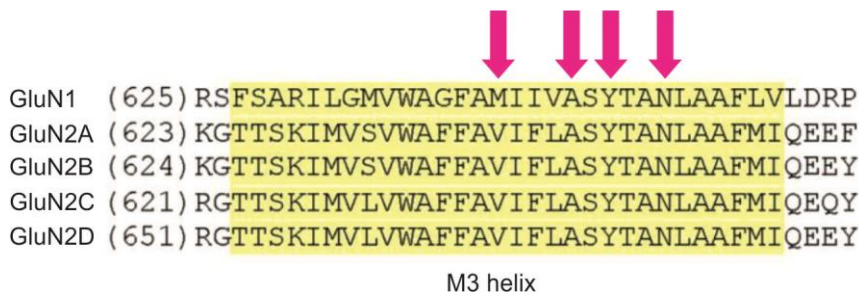
Obr. č. 10: Vliv mutací cysteinů v GFP-GluN2B podjednotce na povrchový transport NMDA receptorů. A) Ukázky fotografií z fluorescenčního mikroskopu, které znázorňují celkovou (C) a povrchovou (P) expresi NMDA receptorů složených z GFP-GluN2B (2B) podjednotky obsahující jednotlivé mutace cysteinů za serin (C86S, C321S, C429S, C436S, C456S, C457S, C745S, C801S) koexprimované s GluN1-4a (1-4a) podjednotkou v COS-7 buněčné linii. Pro detekci změn povrchové exprese jsem použila rekombinantní fluorescenčně značenou GFP-GluN2B podjednotku, povrchové značení receptorů protilátkami a fluorescenční mikroskopii. B) Kvantifikace podílu intenzit povrchového a celkového fluorescenčního signálu mutovaných receptorů v porovnání s kontrolními nemutovaným GFP-GluN2B/GluN1-4a (2B/1-4a) receptorem. Signifikantně sníženou povrchovou expresi receptorů jsem pozorovala v případě čtyř mutovaných cysteinů (C429S, C436S, C456S, C457S) GFP-GluN2B podjednotky (*, ANOVA, metoda Dunn's, $p < 0,05$).

7 Diskuze

NMDA receptory mají důležitou roli ve zprostředkování rychlého excitačního nervového přenosu v CNS savců. Abnormální regulace glutamatergní transmise může přispívat k rozvoji neurologických a psychiatrických onemocnění. Množství, lokalizace NMDA receptorů na synapsích a rovněž jejich podjednotkové složení je regulováno různými mechanismy, které dynamicky reagují na změnu okolních podmínek. Tyto mechanismy způsobí zadržení nesprávně složených či poškozených receptorů uvnitř buňky a naopak zajišťují expresi funkčních a správně složených receptorů na buněčný povrch. Ve své práci jsem studovala vliv dvou faktorů ovlivňující povrchovou expresi NMDA receptorů. Prvním faktorem je M3 helix, který je součástí TMD a druhým cysteiny, které tvoří disulfidické můstky na extracelulární části NMDA receptoru.

7.1 Vliv M3 transmembránového helixu obsahující klinicky relevantní mutace v GluN1-1a a GluN1-4a podjednotkách na povrchový transport NMDA receptorů

Ve své práci jsem studovala změny povrchové exprese NMDA receptorů obsahující *de novo* mutace M641I, A645S, Y647S, N650K v GluN1 podjednotce nalezené v klinických studiích u pacientů vykazujících symptomy neuropsychiatrických poruch (Obr. č. 11), (Lemke *et al.*, 2016). Využila jsem molekulárně-biologických metod, pro vyrobení mutovaných cDNA konstruktů, které jsem koexprimovala s cDNA konstrukty pro přirozené podjednotky NMDA receptorů s využitím expresního systému heterologní COS-7 buněčné linie. Dále jsem použila metody imunocytochemie pro značení povrchově exprimovaných receptorů a fluorescenční mikroskopii pro vizualizaci celkové a povrchové exprese NMDA receptorů. Zjistila jsem, že některé klinicky relevantní mutace lokalizované v M3 transmembránovém helixu GluN1-1a i GluN1-4a podjednotek mají vliv na snížení povrchové exprese NMDA receptorů, přičemž toto snížení je závislé na podjednotkovém složení receptorů.



Obr. č. 11: Lokalizace klinicky relevantních mutací M641I, A645S, Y647S, N650K v M3 transmembránovém helixu GluN1 podjednotky NMDA receptorů. Konkrétní aminokyseliny jsou vyznačeny šipkami (převzato a upraveno dle Vyklicky *et al.*, 2014).

Význam TMD v regulaci povrchové exprese NMDA receptorů byl potvrzen již v předchozích studiích (Cao *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že M3 i M4 transmembránové helixy ovlivňují uvolnění receptoru z ER (Horak *et al.*, 2008b). Důvodem je maskování ER retenčních signálů, ke kterému dochází při interakci M3 a M4 helixů (Horak *et al.*, 2008a). Při studiu lidských mutací (M641I, A645S, Y647S, N650K) v M3 helixu GluN1-1a podjednotky jsem zjistila, že mutace M641I a Y647S vykazovaly statisticky významně sníženou povrchovou expresi v případě GluN1-1a-M641I/GluN2A (15 %), GluN1-1a-Y647S/GluN2A (5 %) a GluN1-1a-Y647S/GluN2B (13 %) receptorů (Obr. č. 6). Povrchová exprese těchto mutovaných receptorů (GluN1-1a-M641I/GluN2A, GluN1-1a-Y647S/GluN2A a GluN1-1a-Y647S/GluN2B) byla snížena téměř na úroveň negativní kontroly (3-8 %). Jako negativní kontrola sloužila samostatně exprimovaná fluorescenčně značená GluN1-1a podjednotka, která je zadržena v ER, dokud nevytvoří funkční NMDA receptor společně s GluN2 nebo GluN3 podjednotkou (Fukaya *et al.*, 2003).

Mé výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, ve které bylo pozorováno statisticky významné snížení povrchové exprese NMDA receptorů obsahující mutaci tyrosinu (Y647A) v GluN1-1a podjednotce koexprimované s GluN2A a GluN2B podjednotkou. Význam tyrosinu na pozici Y647 v regulaci povrchového transportu NMDA receptorů se potvrdil i v případě GluN2B a GluN2C podjednotek koexprimovaných s přirozenou GluN1-1a podjednotkou (Kaniakova *et al.*, 2012a; Lichnerova *et al.*, 2014). Dále jsem pozorovala mírné snížení povrchové exprese mutovaných NMDA receptorů v případě GluN1-1a-M641I/GluN2B, GluN1-1a-M641I/GluN3A, GluN1-1a-A645S/GluN2A a GluN1-1a-N650K/GluN2A receptorů (65 – 69 %).

Kromě TMD existují i další oblasti NMDA receptorů, které regulují jejich povrchovou expresi. Mezi tyto oblasti se řadí i C kazety v CTD, které obsahují retenční signály způsobující zadržení receptoru v ER nebo exportní motivy umožňující jejich uvolnění směrem k membráně. Různé typy GluN1 podjednotek mají odlišné uspořádání C kazet a tudíž odlišnou regulaci jejich povrchové exprese. Samostatně exprimované GluN-1 a GluN1-3 podjednotky jsou zadrženy v ER, na rozdíl od GluN1-2 a GluN1-4 podjednotek, které jsou exprimovány na povrchu buňky (Standley *et al.*, 2000; Horak *et al.*, 2008b; Horak & Wenthold, 2009). Chtěla jsem zjistit, jak bude regulována povrchová exprese NMDA receptorů obsahujících klinicky relevantní mutace (M641I, A645S, Y647S, N650K) v M3 helixu GluN1-4a podjednotky koexprimované s fluorescenčně značenými GluN2A, GluN2B a GluN3A podjednotkami. Z experimentů vyplývá, že lidské mutace v GluN1-4a podjednotce měly obdobný, avšak o něco menší vliv na snížení povrchové exprese GluN1-4a-M641I/GluN2A (32 %), GluN1-4a-Y647S/GluN2A (27 %) a GluN1-4a-Y647S/GluN2B (35 %) receptorů (Obr. č. 7), než v případě GluN1-1a podjednotky. Stejně jako v předchozí studii (Kaniakova *et al.*, 2012a), jsem potvrdila, že retenční signál v M3 transmembránovém helixu je nadřazen vlivu C kazet v CTD NMDA receptorů.

Z výsledků experimentů vyplývá, že regulace povrchové exprese závisí na podjednotkovém složení NMDA receptorů. GluN1/GluN2A receptory jsou nejvíce citlivé na přítomnost klinicky relevantních mutací v GluN1 podjednotce, na rozdíl od mutovaných GluN1/GluN3A receptorů (Obr. č. 6 a 7). Existuje mnoho rozdílů mezi receptory s různým podjednotkovým složením. Jedná se například o odlišnost vazebných míst pro agonisty glutamát na GluN2 podjednotce (Johnson & Ascher, 1987) a glycin v GluN3 podjednotce (Chatterton *et al.*, 2002). Podjednotky jsou také odlišně distribuovány v rámci CNS a během vývoje jedince. V raném neonatálním a postnatálním období dochází k dominantní expresi GluN2B a GluN3A podjednotek, zatímco zastoupení GluN2A podjednotek se zvyšuje během dospělosti jedince (Flint *et al.*, 1997; Pérez-Otaño *et al.*, 2016). Podjednotky se mezi sebou výrazně liší v aminokyselinové sekvenci a struktuře heterotetrameru (Sobolevsky *et al.*, 2009). Proto je otázkou dalších experimentů prohloubit znalosti o mechanismu, jakým M3 helix přispívá k regulaci povrchového transportu NMDA receptorů s odlišným podjednotkovým složením.

7.2 Vliv známých cysteinů tvořících disulfidické můstky v GluN1-1a, GluN2A a GluN2B podjednotkách na povrchový transport NMDA receptorů

Další faktor, který se podílí na regulaci povrchové exprese funkčních NMDA receptorů jsou disulfidické můstky tvořené thiolovými skupinami cysteinů v GluN1-1a, GluN2A a GluN2B podjednotkách. Pomocí molekulárně-biologických, imunocytochemických a mikroskopických metod jsem zjistila, že nahrazení konkrétních cysteinů v ATD a LBD GluN1-1a, GluN2A a GluN2B podjednotek má vliv na snížení povrchové exprese NMDA receptorů (Obr. č. 8, 9 a 10). V případě mutovaných cysteinů GluN1-1a podjednotky byla povrchová exprese NMDA receptorů rovněž závislá na jejich podjednotkovém složení (Obr. č. 8).

Thiolové skupiny cysteinů mohou v oxidativním prostředí vzájemně tvořit disulfidické můstky. Bylo zjištěno, že se tyto kovalentní interakce podílí na formování heterotetramerů, stabilizaci struktury proteinů, funkčních vlastnostech i na povrchové expresi NMDA receptorů (Lipton *et al.*, 2002; Papadakis *et al.*, 2004), což jsem potvrdila i ve svých experimentech. Kromě tvorby disulfidických můstků mohou být cysteiny modifikovány *S*-nitrosylací (Choi *et al.*, 2000). Dále se podílí na koordinaci zinečnatých kationtů, které inhibují aktivitu GluN1/GluN2A receptorů nezávisle na napětí (Choi *et al.*, 2001).

V případě GluN1 podjednotky bylo zjištěno, že se disulfidické můstky tvoří mezi páry cysteinů na pozicích C79-C308, C420-C454, C436-C455, C744-C798 (Furukawa & Gouaux, 2003; Karakas & Furukawa, 2014). Pro svůj experiment jsem vybrala dva páry C79-C308, C744-C798 cysteinů, jejichž funkce byla na rozdíl od C420-C454, C436-C455 studována v předchozích experimentech (Choi *et al.*, 2001; Lipton *et al.*, 2002; Papadakis *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2007). Při provádění experimentů jsem cysteiny nahrazovala serinem, neboť se jedná o polární aminokyseliny s obdobnou strukturou, avšak v případě serinu nevzniká disulfidická vazba díky absenci thiolových skupin.

Z výsledků experimentů vyplývá, že mutované cysteiny (C79S a C308S) tvořící jeden disulfidický můstek ve fluorescenčně značené GluN1-1a podjednotce snižují povrchovou expresi GluN1-1a-C79S/GluN2A (45 %), GluN1-1a-C308S/GluN2A (52 %), GluN1-1a-C79S/GluN3A (10 %) a GluN1-1a-C308S/GluN3A (33 %) receptorů. Mutace cysteinů dalšího disulfidického můstku (C744S a C798S) vykazovaly statisticky signifikantní snížení počtu povrchově exprimovaných GluN1-1a-C744S/GluN2B (50 %) a GluN1-1a-C798S/GluN2B (54 %) receptorů (Obr. č. 8). Podobné snížení povrchové

exprese v případě obou mutovaných cysteinů vzájemně tvořící disulfidický můstek může potvrdit jeho přítomnost ve struktuře proteinu. Odlišnost povrchové exprese o 23 % jsem pozorovala pouze v případě GluN1-1a-C79S/GluN3A (10 %) a GluN1-1a-C308S/GluN3A (33 %) receptorů. To může naznačovat, že C79 v GluN1-1a podjednotce má pravděpodobně další funkci v rámci GluN1-1a/GluN3A receptoru a jeho absence může snížit množství povrchově exprimovaných receptorů mnohem více, než mutace cysteinu na pozici C308.

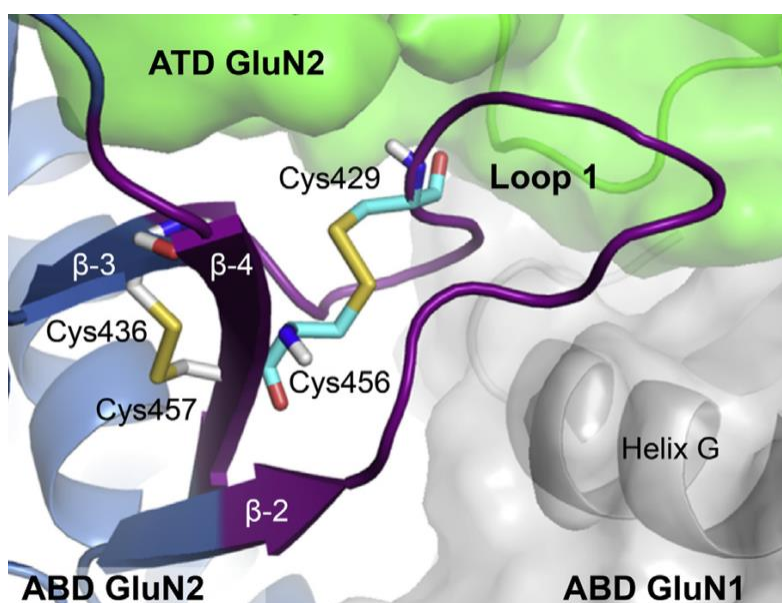
V předchozích studiích bylo zjištěno, že redoxní stav cysteinů (C79, C308, C744, C798) v ATD GluN1 podjednotky moduluje senzitivitu NMDA receptorů vůči zinečnatým kationtům (Choi *et al.*, 2001). Thiolové skupiny cysteinů na pozicích C744, C798 jsou navíc modifikovány i *S*-nitrosylací (Choi *et al.*, 2000). Mé výsledky jsou v rozporu se studií, která prokázala vliv mutovaných cysteinů C79A a C308A v GluN1-2a podjednotce na snížení povrchové exprese GluN1-2a-C79A/GluN2B a GluN1-2a-C308A/GluN2B receptorů na 45 % v expresním systému HEK 293 buněk (Papadakis *et al.*, 2004). V rámci svých experimentů jsem pozorovala snížení povrchové exprese GluN1-1a-C79S/GluN2B a GluN1-1a-C308S/GluN2B pouze na 89 – 96 % oproti přirozenému GluN1-1a/GluN2B receptoru. Důvodem může být exprese odlišného typu GluN1 podjednotky (GluN1-1a a GluN1-2a), užitím odlišného expresního systému (HEK 293 a COS-7 buněčná linie) či odlišný způsob detekce povrchově exprimovaných receptorů (biochemické metody a fluorescenční mikroskopie). Dalším rozdílem bylo nahrazení cysteinů za alanin, zatímco ve svých experimentech, jsem mutovala aminokyselinu cystein za serin, který je strukturou i vlastnostmi mnohem podobnější cysteinu.

Z výsledků experimentů obdobně jako v případě klinicky relevantních mutací v GluN1-1a podjednotce (Obr. č. 6 a 7) vyplývá, že regulace povrchové exprese závisí na podjednotkovém složení NMDA receptorů. Receptory složené z různých typů podjednotek se mezi sebou liší v celé škále vlastností například přítomnost odlišných vazebných míst pro ligandy, struktura, funkce, exprese ve specifické vývojové periodě jedince, lokalizace v CNS (Johnson & Ascher, 1987; Chatterton *et al.*, 2002; Sobolevsky *et al.*, 2009; Pérez-Otaño *et al.*, 2016). Pro hlubší pochopení je tudíž potřeba dále zkoumat konkrétní mechanismy, které se podílejí na této regulaci.

U GluN2A podjednotky byly disulfidické můstky zjištěny mezi páry cysteinů na pozicích C87-C320, C429-C455, C436-C456 a C745-C800 (Zhang *et al.*, 2013; Swanger *et al.*, 2016; Volgraf *et al.*, 2016). Pozorovala jsem vliv na snížení povrchové exprese

receptorů v případě mutovaných cysteinů na pozicích C429S, C455S, C436S, C456S GluN2A podjednotky koexprimované s GluN1-4a podjednotkou (12 – 17 %), (Obr. č. 12). Mírně sníženou povrchovou expresi způsobily mutace cysteinů C745S a C800S v GluN2A podjednotce (63 – 66 %), (Obr. č. 9). Mutované GluN2A podjednotky jsem koexprimovala s GluN1-4a podjednotkou, kvůli lepší účinnosti transfekce a lepší vizualizaci povrchově exprimovaných NMDA receptorů, v porovnání s GluN1-1a podjednotkou. Výsledky experimentu jsou v souladu s předchozími studiemi (Zhang *et al.*, 2013; Volgraf *et al.*, 2016), které prokázaly přítomnost disulfidických můstků v GluN2A podjednotce, jelikož došlo k velmi obdobnému snížení povrchové exprese vždy u obou cysteinů tvořících jednu disulfidickou vazbu.

Z mých výsledků vyplývá, podobně jako z předchozí studie, že narušení disulfidického můstku C79-C320 neovlivní formování receptoru, ani jeho povrchový transport. Tyto cysteiny (C87 a C320) v ATD GluN2A podjednotky se naopak účastní tvorby GluN2A ATD homodimerů (Zhang *et al.*, 2013). Mezi další funkce cysteinů C79 a C320 patří modulace senzitivity receptoru k zinečnatým kationtům a jejich modifikace S-nitrosylací usnadňuje tvorbu disulfidického můstku (Choi *et al.*, 2001; Lipton *et al.*, 2002). Mé výsledky jsou v souladu i s další studií, ve které byla detekována snížená povrchová exprese NMDA receptorů obsahující klinicky relevantní mutaci C436R v GluN2A podjednotce (Swanger *et al.*, 2016).



Obr. č. 12: Strukturální model disulfidických můstků tvořených mezi cysteiny C429-C456, C436-C457 v GluN2A podjednotce NMDA receptoru (převzato dle Swanger *et al.*, 2016).

Studovala jsem cysteiny tvořící disulfidické můstky i u GluN2B podjednotky NMDA receptorů. Kovalentní vazby se tvoří mezi páry cysteinů na pozicích C86-C321, C429-C456, C436-C457 a C746-C801 (Karakas *et al.*, 2009; Karakas & Furukawa, 2014). Obdobně jako v předchozím experimentu s GluN2A podjednotkou (Obr. č. 9) jsem pozorovala statisticky významné snížení povrchové exprese u mutovaných cysteinů C429S, C456S, C436S, C457S GluN2B podjednotky koexprimované s GluN1-4a podjednotkou (12 – 14 %), (Obr. č. 10). Mutované GluN2A podjednotky jsem také koexprimovala s GluN1-4a podjednotkou, kvůli lepší účinnosti transfekce a lepší vizualizaci povrchově exprimovaných NMDA receptorů, ve srovnání s GluN1-1a podjednotkou.

Výsledky mých pokusů se shodují s předchozími studii, které potvrdily přítomnost disulfidických můstků v GluN2B podjednotce (Karakas *et al.*, 2009; Karakas & Furukawa, 2014). Většinou docházelo ke snížení množství povrchově exprimovaných receptorů u dvojice cysteinů tvořící jeden pár podobným způsobem. Pouze u mutace C801S jsem pozorovala zvýšení povrchové exprese v porovnání s přirozeným GluN1-4a/GluN2B receptorem. Mé výsledky se shodují i s další studií, která se věnovala vlivu klinicky relevantních mutací cysteinů C436R, C456Y na povrchovou expresi GluN1/GluN2B receptorů. Bylo zjištěno, že mutace cysteinů na pozicích C436 a C456 snižují povrchový transport NMDA receptorů (Swanger *et al.*, 2016). Na základě experimentů jsem zjistila, že cysteiny jsou velmi důležité pro formování a strukturní stabilitu NMDA receptorů, neboť jejich absence narušila transport NMDA receptorů na buněčný povrch. Zjištění více podrobností o regulaci NMDA receptorů pomocí cysteinů a jejich modifikací bude vyžadovat další zkoumání.

8 Závěr

Ve své diplomové práci jsem se zabývala vlivem M3 transmembránového helixu a známých cysteinů tvořících disulfidické můstky na povrchovou expresi NMDA receptorů v savčích buňkách.

- Zjistila jsem, že klinicky známé mutace M641I a Y647S v M3 transmembránovém helixu GluN1-1a podjednotky snižují povrchovou expresi NMDA receptorů v savčích buňkách. Dále, že toto snížení povrchové exprese závisí na podjednotkovém složení NMDA receptorů, přičemž přítomnost klinicky relevantních mutací nejvíce ovlivnila povrchový transport GluN1-1a/GluN2A receptorů.
- Ověřila jsem, že zkoumané klinicky relevantní mutace v M3 transmembránovém helixu GluN1-4a podjednotky mají v porovnání s mutovanou GluN1-1a podjednotkou podobný vliv na snížení povrchové exprese NMDA receptorů v savčích buňkách.
- Prokázala jsem, že mutace cysteinů C79S, C308S, C744S, C798S tvořící disulfidické můstky v GluN1-1a podjednotce mají vliv na snížení povrchové exprese NMDA receptorů v savčích buňkách. Snížení množství povrchově exprimovaných receptorů bylo závislé na podjednotkovém složení receptorů.
- Nakonec jsem charakterizovala vliv mutací cysteinů C429S, C436S, C455S, C456S tvořících disulfidické můstky v GluN2A a zároveň vliv mutovaných cysteinů C429S, C436S, C456S, C457S v GluN2B podjednotce na snížení povrchového transportu NMDA receptorů.

Výsledky provedených experimentů přispěly k hlubšímu pochopení regulace povrchové exprese NMDA receptorů v savčích buňkách. Znalost mechanismů regulace povrchového transportu je důležitá pro zjištění příčin, které se podílí na vzniku a rozvoji neurologických a psychiatrických onemocnění a následně pro vývoj nových léčebných postupů pro tyto pacienty.

9 Seznam použité literatury

Addis, L., Virdee, J. K., Vidler, L. R., Collier, D. A., Pal, D. K. and Ursu, D. (2017) Epilepsy-associated GRIN2A mutations reduce NMDA receptor trafficking and agonist potency-molecular profiling and functional rescue. *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–14.

Bellone, C. and Nicoll, R. A. (2007) Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron*, 55(5), pp. 779–785.

Bowie, D. (2008) Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS & neurological disorders drug targets*, 7(2), pp. 129–143.

Cao, J. Y., Qiu, S., Zhang, J., Wang, J. J., Zhang, X. M. and Luo, J. H. (2011) Transmembrane region of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) subunit is required for receptor subunit assembly. 286(31), pp. 27698–27705.

Coley, A. A. and Gao, W. J. (2018) PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 82, pp. 187–194.

Domingues, A. M. de J., Neugebauer, K. M. and Fern, R. (2011) Identification of four functional NR3B isoforms in developing white matter reveals unexpected diversity among glutamate receptors. *Journal of Neurochemistry*, 117(3), pp. 449–460.

Ehlers, M. D., Fung, E. T., O'Brien, R. J. and Huganir, R. L. (1998) Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *The Journal of Neuroscience*, 18(2), pp. 720–730.

Flint, A. C., Maisch, U. S., Weishaupt, J. H., Kriegstein, A. R. and Monyer, H. (1997) NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *Journal of Neuroscience*, 17(7), pp. 2469–2476.

Fukaya, M., Kato, A., Lovett, C., Tonegawa, S. and Watanabe, M. (2003) Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), pp. 4855–4560.

Furukawa, H. and Gouaux, E. (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: Crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *The EMBO journal*, 22(12), pp. 2873–2885.

Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R. and Gouaux, E. (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438(7065), pp. 185–192.

Guillaud, L., Wong, R. and Hirokawa, N. (2008) Disruption of KIF17–Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: A molecular model of kinesin–cargo release. *Nature Cell Biology*, 10(1), pp. 19–29.

- Gupta, K., Hardingham, G. E. and Chandran, S. (2013) NMDA receptor-dependent glutamate excitotoxicity in human embryonic stem cell-derived neurons. *Neuroscience Letters*, 543, pp. 95–100.
- Hansen, K. B., Ogden, K. K., Yuan, H. and Traynelis, S. F. (2014) Distinct functional and pharmacological properties of triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors. *Neuron*, 81(5), pp. 1084–1096.
- Hawkins, L. M., Prybylowski, K., Chang, K., Moussan, C., Stephenson, F. A. and Wenthold, R. J. (2004) Export from the endoplasmic reticulum of assembled N-methyl-D-aspartic acid receptors is controlled by a motif in the C terminus of the NR2 subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(28), pp. 28903–28910.
- Hayashi, T., Thomas, G. M. and Huganir, R. L. (2010) Dual palmitoylation of NR2 subunits regulates NMDA receptor trafficking. *Neuron*, 64(2), pp. 213–226.
- Hogan-Cann, A. D. and Anderson, C. M. (2016) Physiological roles of non-neuronal NMDA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(9), pp. 750–767.
- Hollmann, M., Boulter, J., Maron, C., Beasley, L., Sullivan, J., Pecht, G. and Heinemann, S. (1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron*, 10(5), pp. 943–954.
- Hollmann, M., Maron, C. and Heinemann, S. (1994) N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron*, 13(6), pp. 1331–1343.
- Horak, M., Al-Hallaq, R. A., Chang, K. and Wenthold, R. J. (2008a) Role of the fourth membrane domain of the NR2B subunit in the assembly of the NMDA receptor. *Channels*, 360(9346), pp. 1640–1645.
- Horak, M., Chang, K. and Wenthold, R. J. (2008b) Masking of the endoplasmic reticulum retention signals during assembly of the NMDA receptor. *The Journal of Neuroscience*, 28(13), pp. 3500–3509.
- Horak, M., Petralia, R. S., Kaniakova, M. and Sans, N. (2014) ER to synapse trafficking of NMDA receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, p. 394.
- Horak, M. and Wenthold, R. J. (2009) Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), pp. 9683–9691.
- Huggins, D. J. and Grant, G. H. (2005) The function of the amino terminal domain in NMDA receptor modulation. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23(4), pp. 381–388.

- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. and Zhang, D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415(6873), pp. 793–798.
- Chazot, P. L., Cik, M. and Stephenson, F. A. (1995) An investigation into the role of N-glycosylation in the functional expression of a recombinant heteromeric NMDA receptor. *Molecular Membrane Biology*, pp. 331–337.
- Chazot, P. L. and Stephenson, F. A. (1997) Biochemical evidence for the existence of a pool of unassembled C2 exon-containing NR1 subunits of the mammalian forebrain NMDA receptor. *Journal of Neurochemistry*, 68(2), pp. 507–516.
- Chen, B. S., Braud, S., Badger, J. D., Isaac, J. T. R. and Roche, K. W. (2006) Regulation of NR1/NR2C N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), pp. 16583–16590.
- Chen, W., Shieh, C., Swanger, S. A., Tankovic, A., Au, M., McGuire, M., Tagliati, M., Graham, J. M., Madan-Khetarpal, S., Traynelis, S. F., Yuan, H. and Pierson, T. M. (2017) GRIN1 mutation associated with intellectual disability alters NMDA receptor trafficking and function. *Journal of Human Genetics*, pp. 1–9.
- Cheriyian, J., Mezes, C., Zhou, N., Balsara, R. D. and Castellino, F. J. (2015) Heteromerization of ligand binding domains of N-methyl-D-aspartate receptor requires both coagonists, L-glutamate and glycine. *Biochemistry*, 54(3), pp. 787–794.
- Choi, Y. B., Tenneti, L., Le, D. A., Ortiz, J., Bai, G., Chen, H. S. and Lipton, S. A. (2000) Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nature Neuroscience*, 3(1), pp. 15–21.
- Choi, Y., Chen, H. V and Lipton, S. a (2001) Three pairs of cysteine residues mediate both redox and Zn²⁺ modulation of the nmda receptor. *The Journal of Neuroscience*, 21(2), pp. 392–400.
- Johnson, J. W. and Ascher, P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325(6104), pp. 529–531.
- Kaniakova, M., Krausova, B., Vyklicky, V., Korinek, M., Lichnerova, K., Vyklicky, L. and Horak, M. (2012a) 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. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), pp. 26423–26434.
- Kaniakova, M., Lichnerova, K., Vyklicky, L. and Horak, M. (2012b) Single amino acid residue in the M4 domain of GluN1 subunit regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry*, 123(3), pp. 385–395.
- Kapitein, L. C. and Hoogenraad, C. C. (2011) Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(1), pp. 9–20.

- Karakas, E. and Furukawa, H. (2014) Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science*, 344(6187), pp. 992–997.
- Karakas, E., Simorowski, N. and Furukawa, H. (2009) Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *The EMBO Journal*, 28(24), pp. 3910–3920.
- Karakas, E., Simorowski, N. and Furukawa, H. (2011) Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature*, 475(7355), pp. 249–253.
- Kaye, S. L., Sansom, M. S. P. and Biggin, P. C. (2007) In Silico mutation of cysteine residues in the ligand-binding domain of an N-methyl-D-aspartate receptor. *Biochemistry*, 46(8), pp. 2136–2145.
- Kenny, A. V., Cousins, S. L., Pinho, L. and Stephenson, F. A. (2009) The integrity of the glycine co-agonist binding site of N-methyl-D-aspartate receptors is a functional quality control checkpoint for cell surface delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), pp. 324–333.
- Kumar, J., Schuck, P., Jin, R. and Mayer, M. L. (2009) The N-terminal domain of GluR6-subtype glutamate receptor ion channels. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), pp. 631–638.
- Laube, B., Kuryatov, A., Kuhse, J. and Betz, H. (1993) Glycine-glutamate interactions at the NMDA receptor: Role of cysteine residues. *FEBS Letters*, 335(3), pp. 331–334.
- Lemke, J. R., Geider, K., Helbig, K. L., Heyne, H. O., Schütz, H., Hentschel, J., Courage, C., Depienne, C., Nava, C., Heron, D., Møller, R. S., Hjalgrim, H., Lal, D., Neubauer B. A., Nürnberg, P., Thiele, H., Kurlemann, G., Arnold, G. L., Bhambhani, V., Bartholdi, D., Pedurupillay, C. R., Misceo, D., Frengen, E., Strømme, P., Dlugos, D. J., Doherty, E. S., Bijlsma, E. K., Ruivenkamp, C. A., Hoffer, M. J., Goldstein, A., Rajan, D. S., Narayanan, V., Ramsey, K., Belnap, N., Schrauwen, I., Richholt, R., Koeleman, B. P., Sá, J., Mendonça, C., de Kovel, C. G., Weckhuysen, S., Hardies, K., De Jonghe, P., De Meirleir, L., Milh, M., Badens, C., Lebrun, M., Busa, T., Francannet, C., Piton, A., Riesch, E., Biskup, S., Vogt, H., Dorn, T., Helbig, I., Michaud, J.L., Laube, B. and Syrbe, S. (2016) Delineating the GRIN1 phenotypic spectrum: A distinct genetic NMDA receptor encephalopathy. *Neurology*, 86(23), pp. 2171–2178.
- Lichnerova, K., Kaniakova, M., Park, S. P., Skrenkova, K., Wang, Y. X., Petralia, R. S., Suh, Y. H. and Horak, M. (2015) Two N-glycosylation sites in the GluN1 subunit are essential for releasing N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors from the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 290(30), pp. 18379–18390.
- Lichnerova, K., Kaniakova, M., Skrenkova, K., Vyklicky, L. and Horak, M. (2014) Distinct regions within the GluN2C subunit regulate the surface delivery of NMDA receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, p. 375.

- Lin, Y., Jover-Mengual, T., Wong, J., Bennett, M. V. L. and Zukin, R. S. (2006) PSD-95 and PKC converge in regulating NMDA receptor trafficking and gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), pp. 19902–19907.
- Lipton, S. A., Choi, Y. B., Takahashi, H., Zhang, D., Li, W., Godzik, A. and Bankston, L. A. (2002) Cysteine regulation of protein function - As exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends in Neurosciences*, 25(9), pp. 474–480.
- Lipton, S. A., Rayudu, P. V., Choi, Y. B., Sucher, N. J. and Chen, H. S. (1998) Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 118, pp. 73–82.
- Liu, S., Zhou, L., Yuan, H., Vieira, M., Sanz-Clemente, A., Badger, J. D., Lu, W., Traynelis, S. F. and Roche, K. W. (2017) A rare variant identified within the GluN2B C-terminus in a patient with autism affects NMDA receptor surface expression and spine density. *The Journal of Neuroscience*, 37(15), pp. 4093–4102.
- Luo, J. H., Fu, Z. Y., Losi, G., Kim, B. G., Prybylowski, K., Vissel, B. and Vicini, S. (2002) Functional expression of distinct NMDA channel subunits tagged with green fluorescent protein in hippocampal neurons in culture. *Neuropharmacology*, 42(3), pp. 306–318.
- Maki, B. A., Aman, T. K., Amico-Ruvio, S. A., Kussius, C. L. and Popescu, G. K. (2012) C-terminal domains of N-methyl-D-aspartic acid receptor modulate unitary channel conductance and gating. *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), pp. 36071–36080.
- Matsuda, K., Miura, E., Miyazaki, T., Kakegawa, W., Emi, K., Narumi, S., Fukazawa, Y., Ito-Ishida, A., Kondo, T., Shigemoto, R., Watanabe, M. and Yuzaki, M. (2010) Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor 2, a bidirectional synapse organizer. *Science*, 328(5976), pp. 363–368.
- Mattison, H. A., Hayashi, T. and Barria, A. (2012) Palmitoylation at two cysteine clusters on the C-terminus of GluN2A and GluN2B differentially control synaptic targeting of NMDA receptors. *PLoS ONE*, 7(11).
- Migliore, M., De Simone, G. and Migliore, R. (2015) Effect of the initial synaptic state on the probability to induce long-term potentiation and depression. *Biophysical Journal*, 108(5), pp. 1038–1046.
- Naur, P., Hansen, K. B., Kristensen, A. S., Dravid, S. M., Pickering, D. S., Olsen, L., Vestergaard, B., Egebjerg, J., Gajhede, M., Traynelis, S. F. and Kastrup, J. S. (2007) Ionotropic glutamate-like receptor 2 binds D-serine and glycine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(35), pp. 14116–14121.
- Niciu, M. J., Kelmendi, B. and Sanacora, G. (2012) Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 100(4), pp. 656–664.

- Oka, O. B. V and Bulleid, N. J. (2013) Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(11), pp. 2425–2429.
- Okabe, S., Miwa, A. and Okado, H. (1999) Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *Journal of Neuroscience*, 19(18), pp. 7781–7792.
- Pachernegg, S., Strutz-Seebohm, N. and Hollmann, M. (2012) GluN3 subunit-containing NMDA receptors: Not just one-trick ponies. *Trends in Neurosciences*, 35(4), pp. 240–249.
- Papadakis, M., Hawkins, L. M. and Stephenson, F. A. (2004) Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), pp. 14703–14712.
- Pérez-Otaño, I., Larsen, R. S. and Wesseling, J. F. (2016) Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(10), pp. 623–635.
- Qiu, S., Zhang, X. M., Cao, J. Y., Yang, W., Yan, Y. G., Shan, L., Zheng, J. and Luo, J. H. (2009) An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(30), pp. 20285–20298.
- Ronzoni, R., Berardelli, R., Medicina, D., Sitia, R., Gooptu, B. and Fra, A. M. (2016) Aberrant disulphide bonding contributes to the ER retention of alpha1-antitrypsin deficiency variants. *Human Molecular Genetics*, 25(4), pp. 642–650.
- Ruggiano, A., Foresti, O. and Carvalho, P. (2014) Quality control: ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *The Journal of Cell Biology*, 204(6), pp. 869–879.
- Salussolia, C. L., Gan, Q., Kazi, R., Singh, P., Allopenna, J., Furukawa, H. and Wollmuth, L. P. (2013) A eukaryotic specific transmembrane segment is required for tetramerization in AMPA receptors. *The Journal of Neuroscience*, 33(23), pp. 9840–9845.
- Scott, D. B., Blanpied, T. A. and Ehlers, M. D. (2003) Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology*, 45(6), pp. 755–767.
- Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D. H. and Hirokawa, N. (2000) Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science*, 288, pp. 1796–1802.
- She, K., Ferreira, J. S., Carvalhos, A. and Craig, A. M. (2012) Glutamate binding to the GluN2B subunit controls surface trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), pp. 27432–27445.

- Schauder, D. M., Kuybeda, O., Zhang, J., Klymko, K., Bartesaghi, A., Borgnia, M. J., Mayer, M. L. and Subramaniam, S. (2013) Glutamate receptor desensitization is mediated by changes in quaternary structure of the ligand binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), pp. 5921–5926.
- Schorge, S. and Colquhoun, D. (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *Journal of Neuroscience*, 23(4), pp. 1151–1158.
- Sobolevsky, A. I. (2015) Structure and gating of tetrameric glutamate receptors. *The Journal of Physiology*, 593(1), pp. 29–38.
- Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P. and Gouaux, E. (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*, 462(7274), pp. 745–756.
- Sprengel, R., Suchanek, B., Amico, C., Brusa, R., Burnashev, N., Rozov, A., Hvalby, Ø., Jensen, V., Paulsen, O., Andersen, P., Kim, J. J., Thompson, R. F., Sun, W., Webster, L. C., Grant, S. G. ., Eilers, J., Konnerth, A., Li, J., McNamara, J. O. and Seeburg, P. H. (1998) Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell*, 92(2), pp. 279–289.
- Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N. and Wenthold, R. J. (2000) PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron*, 28(3), pp. 887–898.
- Sun, L., Margolis, F. L., Shipley, M. T. and Lidow, M. S. (1998) Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: Its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 441(3), pp. 392–396.
- Swanger, S. A., Chen, W., Wells, G., Burger, P. B., Tankovic, A., Bhattacharya, S., Strong, K. L., Hu, C., Kusumoto, H., Zhang, J., Adams, D. R., Millichap, J. J., Petrovski, S., Traynelis, S. F. and 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(6), pp. 1261–1280.
- Takahashi, H., Shin, Y., Cho, S., Zago, W. M., Gu, Z., Ma, Y., Furukawa, H., Liddington, R., Tong, G., Chen, H. V. and Lipton, S. A. (2007) A novel thiol oxygen sensor: hypoxia enhances S-nitrosylation-mediated inhibition of NMDA receptor activity. *Neuron*, 53(1), pp. 53–64.
- Traynelis, S. F. (2010) Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 14(1), pp. 405–496.
- Traynelis, S. F., Hartley, M. and Heinemann, S. F. (1995) Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*, 268(5212), pp. 873–876.
- Vance, K. M., Hansen, K. B. and Traynelis, S. F. (2012) GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *The Journal of Physiology*, 590(16), pp. 3857–3875.

Volgraf, M., Sellers, B. D., Jiang, Y., Wu, G., Ly, C. Q., Villemure, E., Pastor, R. M., Yuen, P. wai, Lu, A., Luo, X., Liu, M., Zhang, S., Sun, L., Fu, Y., Lupardus, P. J., Wallweber, H. J. A., Liederer, B. M., Deshmukh, G., Plise, E., Tay, S., Reynen, P., Herrington, J., Gustafson, A., Liu, Y., Dirksen, A., Dietz, M. G. A., Liu, Y., Wang, T. M., Hanson, J. E., Hackos, D., Scarce-Levie, K. and Schwarz, J. B. (2016) Discovery of GluN2A-selective NMDA receptor positive allosteric modulators (PAMs): Tuning deactivation kinetics via structure-based design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(6), pp. 2760–2779.

Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M. and Vyklicky, L. (2014) Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research*, 63, pp. S191-203.

Vyklicky, V., Krausova, B., Cerny, J., Ladislav, M., Smejkalova, T., Kysilov, B., Korinek, M., Danacikova, S., Horak, M., Chodounska, H., Kudova, E. and Vyklicky, L. (2018) Surface expression, function, and pharmacology of disease-associated mutations in the membrane domain of the human GluN2B subunit. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, pp. 1–20.

Wei, Z., Behrman, B., Wu, W. H. and Chen, B. S. (2015) Subunit-specific regulation of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor trafficking by SAP102 protein splice variants. *Journal of Biological Chemistry*, 290(8), pp. 5105–5116.

Wong, H.-K., Liu, X.-B., Matos, M. F., Chan, S. F., Pérez-Otaño, I., Boysen, M., Cui, J., Nakanishi, N., Trimmer, J. S., Jones, E. G., Lipton, S. A. and Sucher, N. J. (2002) Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *Journal of Comparative Neurology*, 450(4), pp. 303–317.

Yamamoto, H., Hagino, Y., Kasai, S. and Ikeda, K. (2015) Specific roles of NMDA receptor subunits in mental disorders. *Current Molecular Medicine*, 15(3), pp. 193–205.

Zhang, X. M., Lv, X. Y., Tang, Y., Zhu, L. J. and Luo, J. H. (2013) Cysteine residues 87 and 320 in the amino terminal domain of NMDA receptor GluN2A govern its homodimerization but do not influence GluN2A/GluN1 heteromeric assembly. *Neuroscience Bulletin*, 29(6), pp. 671–684.

Zhu, S., Stein, R. A., Yoshioka, C., Lee, C., Goehring, A. and Mchaourab, H. S. (2016) Mechanism of NMDA receptor inhibition and activation. *Cell*, 165(3), pp. 704–714.