

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



Disertační práce

Regulace transportu NMDA receptorů v savčích neuronech

Mgr. Katarína Lichnerová

Praha 2018

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

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury. Na hodnocení výsledků se podílel můj školitel Mgr. Martin Horák, Ph.D.

V Praze dne:

Podpis:

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli Mgr. Martinovi Horákovi, Ph.D. za veškerou pomoc a trpělivost. Velice si vážím jeho pozornosti, kterou mi věnuje a díky níž mohu pracovat na velmi zajímavých projektech a učit se mnoha různým metodám. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Kaniakové, Ph.D. a Mgr. Kristýně Skřenkové za veškerou pomoc, odborné konzultace a vytvoření příjemného kolektivu, ve kterém bylo, a stále je, radost pracovat. Velké poděkování patří i naší skvělé laborantce Magdě Kuntošové za profesionální laboratorní servis a unikátní péči a Mgr. Barboře Krausové za velkou pomoc a trpělivost při opravách této práce. Poděkování patří také prof. MUDr. Ladislavu Vyklickému, DrSc., vedoucímu oddělení Buněčné neurofyziologie, a celému kolektivu na oddělení Buněčné neurofyziologie za podporu a odborné konzultace. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě na mé cestě za poznáním nesmírně podporovali, a já tak mohla s radostí dělat to, co mě baví.

Abstrakt

N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory řadíme mezi ionotropní glutamátové receptory ovlivňující excitační synaptický přenos a synaptickou plasticitu v centrálním nervovém systému (CNS) savců. Aktivace NMDA receptorů hraje klíčovou roli ve vývoji mozku nebo při formování paměti. Abnormální regulace NMDA receptorů je jedna z hlavních příčin vzniku různých neurologických a psychiatrických onemocnění. NMDA receptory vytvářejí heterotetramerní komplexy složené z GluN1, GluN2(A-D) a/nebo GluN3(A a B) podjednotek. Povrchová exprese NMDA receptorů je regulovaná na mnoha úrovních, včetně zpracování a kontroly v endoplazmatickém retikulu (ER), intracelulárního transportu přes Golgiho aparát (GA), internalizace, recyklace a následné degradace. NMDA receptory jsou na úrovni časného transportu regulovány: volnou dostupností GluN podjednotek v ER, přítomností ER- retenčního a exportního signálu a posttranslačními modifikacemi, včetně fosforylace a palmitoylace. Avšak role *N*-glykosylace v regulaci transportu NMDA receptorů dosud nebyla plně objasněna. Cílem této práce proto bylo objasnění mechanismů regulace povrchové exprese a funkčních vlastností NMDA receptorů. V předložené práci jsme použili kombinaci nejmodernějších metod z oblasti molekulární biologie, mikroskopie, biochemie a elektrofyziologie. Rovněž jsme využili několik heterologních i nativních expresních systémů, včetně COS-7 a HEK293 buněk a kultur hipokampálních a granulárních mozečkových (CGC) neuronů, což nám umožnilo celistvý pohled na danou problematiku. Z výsledků naší práce vyplývá, že transport GluN1/GluN2C receptorů je regulovaný třemi specifickými oblastmi v rámci GluN2C podjednotky: i) oblastí A2 segmentu v amino-terminální doméně (ATD), ii) M3 doménou a iii) proximální částí C-terminální domény (CTD) obsahující sekvenci pěti aminokyselin, tvořících SLPSP motiv. Dále jsme zjistili, že: iv) pro regulaci transportu NMDA receptorů z ER na buněčný povrch je klíčová přítomnost dvou *N*-glykosylačních míst, N203 a N368. v) Po odstranění *N*-glykanů z nativních NMDA receptorů dojde ke změně afinity těchto receptorů ke glutamátu. vi) Mozečkové NMDA receptory asociují s 23 různými typy lektinů, které mají unikátní specifitu pro glykanové struktury a jsou schopné měnit biofyzikální vlastnosti těchto receptorů. vii) Většina predikovaných *N*-glykosylačních míst na GluN1 a GluN2B podjednotkách skutečně obsahuje glykanové struktury.

Klíčová slova: glutamátový receptor; granulární mozečkové neurony; HEK293 buňky; iontový kanál; intracelulární transport; endoplazmatické retikulum; *N*-glykosylace, biochemie, elektrofyziologie

Abstract

N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are a subclass of glutamate receptors that play an essential role in mediating excitatory neurotransmission and synaptic plasticity in the mammalian central nervous system (CNS). The activation of NMDA receptors plays a key role in brain development and memory formation. Abnormal regulation of NMDA receptors plays a critical role in the etiology of many neuropsychiatric disorders. NMDA receptors form a heterotetrameric complex composed of GluN1, GluN2(A-D) and GluN3(A, B) subunits. The NMDA receptors surface expression is regulated at multiple levels including early processing (synthesis, subunit assembly, endoplasmic reticulum (ER) processing, intracellular trafficking to the cell surface), internalization, recycling and degradation. NMDA receptors are regulated by the availability of GluN subunits within the ER, the presence of ER retention and export signals, and posttranslational modifications including phosphorylation and palmitoylation. However, the role of *N*-glycosylation in regulating of NMDA receptor processing has not been studied in detail. The aim of this study was to clarify the mechanisms of regulation of surface expression and functional properties of NMDA receptors. We used a combination of molecular biology, microscopy, biochemistry and electrophysiology in heterologous (COS-7 and HEK293 cells) and native (cerebellar granule cells (CGC) and hippocampal cultures) expression systems, which allow us the complex view of the issue. Our results show that surface delivery of GluN1/GluN2C receptors is regulated by three distinct regions within the i) A2 segment of amino-terminal domain (ATD), ii) M3 transmembrane domain and iii) proximal part of C-terminal domain (CTD), including SLPSP motif. iv) We also found that NMDA receptors are released from the ER only when two asparagine residues in the GluN1 subunit (Asn-203 and Asn-368) are *N*-glycosylated. v) Furthermore, we found that removing *N*-glycans from native NMDA receptors altered the receptor affinity for glutamate. vi) Our experiments also identified 23 different types of lectins which associate with both GluN1 and GluN2B NMDA receptor subunits and altered their biophysical properties. vii) Finally we found, that 11 out of 12 predicted *N*-glycosylation sites in GluN1 subunit and 7 out of 7 *N*-glycosylation sites in GluN2B subunit are occupied by *N*-glycans.

Key words: glutamate receptor; cerebellar granule cells; HEK293 cells; ion channel; intracellular trafficking; endoplasmic reticulum; *N*-glycosylation; biochemistry; electrophysiology

Obsah

Abstrakt	1
Abstract	2
Seznam zkratek	5
1 Literární přehled	7
1.1 Objev NMDA receptorů	7
1.2 Funkce NMDA receptorů	7
1.3 Struktura NMDA receptorů	8
1.4 Aktivace NMDA receptorů	11
1.5 Podjednotkové složení a lokalizace NMDA receptorů	13
1.6 Vznik NMDA receptorů v ER	13
1.7 Transport a cílení NMDA receptorů	16
1.8 Regulace transportu NMDA receptorů obsahujících GluN2C podjednotku	19
1.9 Glykosylace proteinů	19
1.10 <i>N</i> -glykosylace	20
1.11 <i>N</i> -glykosylace NMDA receptorů	22
2 Cíle disertační práce	25
3 Materiál a metody	26
3.1 Mutageneze NMDA receptorů	26
3.2 Příprava lentiviru	27
3.3 Roztoky a chemikálie	28
3.4 Příprava, kultivace a transfekce vybraných buněčných linií	31
3.5 Použité metody	36
3.5.1 Imunofluorescenční mikroskopie	36
3.5.2 Povrchové značení NMDA receptorů v COS-7 buňkách	37
3.5.3 Povrchové a celkové značení NMDA receptorů v hipokampálních a mozečkových neuronech	38
3.5.4 Internalizační esej pro NMDA receptory	38
3.5.5 Kolokalizační esej pro NMDA receptory	39
3.5.6 Kolorimetrická analýza povrchové a celkové exprese	39

3.5.7	SDS - elektroforéza	40
3.5.8	Western blot	40
3.5.9	Deglykosylační a lektinová analýza	41
3.5.10	Elektrofyzilogická měření	41
3.6	Analýza dat a statistika	42
4	Výsledky	44
4.1	Specifické typy GluN2 podjednotek ovlivňují povrchovou expresi NMDA receptorů	44
4.2	Různé strukturní determinanty GluN2C podjednotky regulují časný transport NMDA receptorů	47
4.3	Specifická <i>N</i> -glykosylační místa v GluN1-1a podjednotce regulují transport NMDA receptorů na buněčný povrch	57
4.4	<i>N</i> -glykosylační místa N203 a N368 v GluN1-1a podjednotce jsou nezbytná pro uvolnění NMDA receptoru z ER	61
4.5	Vliv <i>N</i> -glykosylace na funkční vlastnosti NMDA receptorů	63
4.6	Deglykosylační analýza nativních NMDA receptorů.	66
4.7	Biochemická analýza nativních NMDA receptorů.	68
4.8	Elektrofyzilogická analýza nativních NMDA receptorů.	70
4.9	Obsazenost <i>N</i> -glykany na predikovaných <i>N</i> -glykosylačních místech v GluN1 a GluN2B podjednotkách NMDA receptoru	72
5	Diskuze	74
5.1	Vliv GluN2C podjednotky na časný transport NMDA receptorů	74
5.2	<i>N</i> -glykosylační místa (N203 a N368) v GluN1 podjednotce jsou nezbytné pro uvolnění NMDA receptorů z ER	77
5.3	Charakterizace <i>N</i> -glykanového složení NMDA receptorů	80
6	Souhrn	83
7	Závěr	85
8	Seznam publikací	86
9	Použitá literatura	88

Seznam zkratek

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát
APS	amonium persulfát
ATD	amino-terminální doména
BSA	bovinní sérový albumin
CGC	granulární mozečkové neurony (cerebellum granule cells)
CNS	centrální nervová soustava
COS-7	opičí ledvinné fibroblasty (monkey kidney fibroblasts)
CTD	C-terminální doména
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EMEM	z angl. Eagle's minimum essential medium
ER	endoplazmatické retikulum
Fuc	fukóza
FTS	fetální telecí sérum
GA	Golgiho aparát
Gal	galaktóza
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalaktosamin
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
G _i	inhibiční G-protein
Glc	glukóza
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
GluN	podjednotka glutamátových NMDA receptorů
HBS	HEPES pufr (z angl. HEPES buffered saline)
HBSS	z angl. Hank's balanced salt solution
k _D a k _R	rychlostní konstanty vstupu a výstupu do a z desenzitizovaného stavu
α a β	rychlostní konstanty otevření a zavření iontového kanálu
LTD	dlouhodobá deprese (long term depression)
LTP	dlouhodobá potenciace (long term potentiation)
M1-4	mebránové domény 1-4
MAGUK	z angl. membrane-associated guanylate kinase
Man	manóza
MK-801	dizocilpin
mPINS	z angl. mammalian homologue of <i>Drosophila melanogaster</i> partner of inscuteable

NGS	kozí sérum (normal goat serum)
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NTD	N-terminální doména
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PDZ	z angl. protein density zone
PFA	paraformaldehyd
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
P _o	pravděpodobnost otevření
SAP	z angl. synapse association protein
SDS	dodecylsulfát sodný
TGN	trans-Golgiho síť (trans-Golgi network)
TX-100	Triton-X 100
YFP	z angl. yellow fluorescent protein

1 Literární přehled

1.1 Objev NMDA receptorů

V centrální nervové soustavě (CNS) savců jsou řádově stovky miliard neuronů (Kessels and Malinow, 2009). Každý neuron vytváří desítky až tisíce excitačních a inhibičních synaptických spojení. V současné době převládá názor, že na většině excitačních synapsí v CNS se jako hlavní neuropřenašeč uvolňuje L-glutamát. Tyto tzv. glutamátergní synapse hrají klíčovou roli při tvorbě paměti a schopnosti učení (Kessels and Malinow, 2009; Traynelis et al., 2010). Postupně byla prokázána existence dvou typů glutamátových receptorů, ionotropních a metabotropních (Curtis et al., 1960; Dingledine et al., 1999; Flores-Soto et al., 2012). V 60. letech minulého století, ještě předtím než byl L-glutamát popsán jako hlavní excitační neuropřenašeč v savčí CNS, byl připraven syntetický agonista *N*-methyl-*D*-aspartát (NMDA) (Curtis and Watkins, 1963; Curtis et al., 1960). V současnosti můžeme ionotropní glutamátové receptory rozdělit podle jejich specifických agonistů na kainátové, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátové (AMPA) a NMDA (McLennan et al., 1981). Tato práce se zaměřuje na NMDA receptory, které hrají významnou roli v mnoha procesech probíhajících v savčí CNS (Petralia et al., 2009; Traynelis et al., 2010). Klonování GluN1 podjednotky NMDA receptoru (Moriyoshi et al., 1991) a čtyř genů kódujících různé varianty GluN2 podjednotek (Monyer et al., 1992) pomohlo odlišit různé podtypy, nejen NMDA, ale i ostatních glutamátových receptorů. Podjednotková různorodost NMDA receptorů se projevuje nejen v jedinečné vývojové a prostorové expresi, ale i v různých mechanismech regulace jejich funkce a povrchové exprese.

1.2 Funkce NMDA receptorů

NMDA receptory jsou exprimovány prakticky ve všech neuronech v savčí CNS. Vyskytují se primárně na postsynaptické membráně většiny excitačních synapsí, ale také presynapticky, na buněčném povrchu v oblastech mimo synapsí a intracelulárně (Blanke and VanDongen, 2009; Bouvier et al., 2015; Lau and Zukin, 2007; Petralia, 2012; Petralia et al., 2005; Sans et al., 2005; Sanz-Clemente et al., 2013).

NMDA receptory jsou významnou součástí excitačního synaptického přenosu a hrají důležitou roli v synaptické plasticitě. Ovlivňují dlouhodobou potenciaci (LTP) a depresi (LTD), které se v současnosti považují za základní molekulární mechanismy zprostředkující učení a paměť (Lynch, 2004; Morris, 2013; Whitlock et al., 2006). Dlouhodobá potenciace je

proces, při kterém dochází k vysokofrekvenční stimulaci neuronů vstupem Ca^{2+} iontů do postsynaptického neuronu, čímž dochází k aktivaci NMDA receptorů a zesílení synaptického přenosu mezi neurony. Dlouhodobá deprese je naopak proces, kdy nízkofrekvenční stimulace neuronů, způsobená sníženou koncentrací Ca^{2+} iontů a zvýšenou aktivitou fosfatáz, vede k oslabení synaptického přenosu mezi neurony (Collingridge et al., 2010; Dunwiddie and Lynch, 1978; Escobar and Derrick, 2007; Migliore et al., 2015).

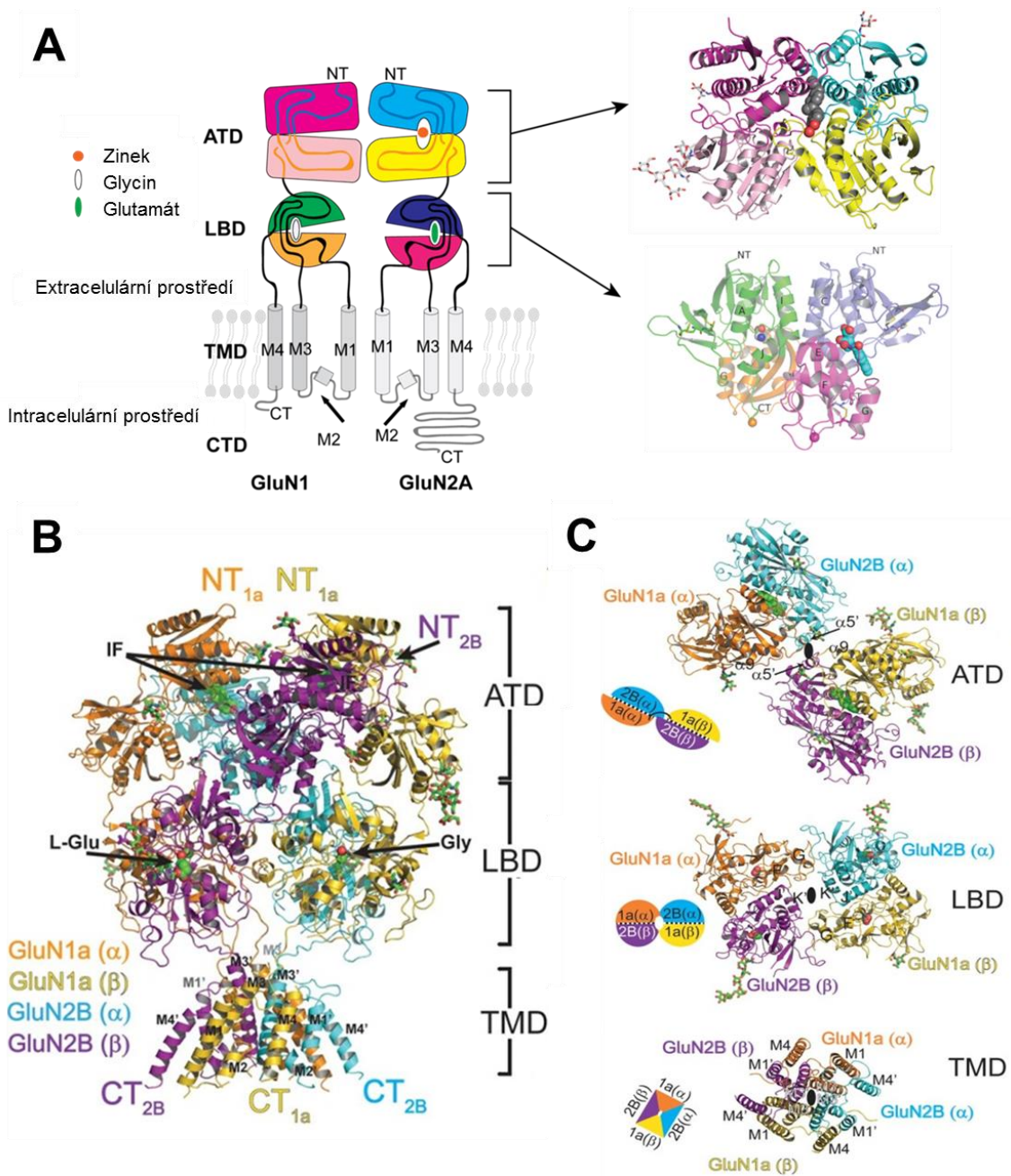
Nadměrná aktivace NMDA receptorů, jenž způsobuje zvýšený vtok Ca^{2+} iontů do buněk, však může vést až k buněčné smrti neuronů, tzv. excitotoxicitě (Choi, 1992; Olney, 1990; Traynelis et al., 2010). V předchozích studiích se předpokládalo, že každé zvýšení intracelulárních Ca^{2+} iontů může způsobit excitotoxicitu, a být tak příčinou vzniku mnoha neurodegenerativních onemocnění (Lang and Lozano, 1998; Olney, 1990). Později však bylo ukázáno, že excitotoxicita je způsobena aktivací pouze extrasynaptických NMDA receptorů a aktivace synaptických NMDA receptorů má naopak anti-apoptotický účinek (Li and Ju, 2012; Sattler et al., 2000). Detailní studium funkce NMDA receptorů vedlo k poznání, že různá neurodegenerativní onemocnění, včetně Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby, epilepsie, schizofrenie a mnoha dalších (Doraiswamy, 2003; Olney, 1990; Rotaru et al., 2011; Rothstein, 1995), mohou být způsobena právě abnormální regulací těchto receptorů (Fan and Raymond, 2007; Malinow, 2012; Selkoe, 2002; Small et al., 2001; Zhang et al., 2016).

1.3 Struktura NMDA receptorů

Předchozí studie ukázaly, že NMDA receptory jsou složené z GluN1, GluN2 a/nebo GluN3 podjednotek (Monyer et al., 1992; Ulbrich and Isacoff, 2008), které tvoří funkční heterotetramery (Meddows et al., 2001; Qiu et al., 2005; Schorge and Colquhoun, 2003). Názvosloví podjednotek NMDA receptorů je uváděno dle vědecké práce od Collingridge et al., 2009. V současné době je známo, že GluN1 podjednotka je kódována jedním genem, avšak vytváří osm různých sestřihových variant - GluN1-1a, 2a, 3a, 4a a GluN1-1b, 2b, 3b, 4b. Jednotlivé sestřihové varianty se vzájemně liší výskytem nebo absencí exonu 5 v N-terminální doméně, nebo přítomností exonů 21 a 22 v C-terminální doméně (Hollmann et al., 1993; Zukin and Bennett, 1995). Samotné GluN1 podjednotky však nejsou schopny vytvářet funkční receptor, proto musí být doplněny GluN2 a/nebo GluN3 podjednotkami (Clements and Westbrook, 1991; Vicini et al., 1998). GluN2 podjednotky jsou kódovány čtyřmi odlišnými geny, GluN2A-D, a GluN3 podjednotky dvěma různými geny, GluN3A a

GluN3B. Funkční NMDA receptory jsou nejčastěji tvořeny dvěma GluN1 a dvěma GluN2 podjednotkami. GluN1 podjednotky obsahují vazebné místo pro glycin a GluN2 podjednotky pro glutamát (Furukawa et al., 2005; Schuler et al., 2008). Bylo ukázáno, že GluN1/GluN2 receptory se aktivují pouze v přítomnosti obou agonistů, glutamátu a glycinu (Johnson and Ascher, 1987; Kleckner and Dingledine, 1988; Lerma et al., 1990). Analýza krystalografické struktury receptoru ukázala, že podjednotky jsou v rámci receptoru uspořádány v konfiguraci 1-2-1-2, tzn. GluN1-GluN2-GluN1-GluN2 (Karakas and Furukawa, 2014; Lee et al., 2014). V určitých oblastech mozku byly nalezeny i triheteromerní GluN1/GluN2/GluN3 receptory (Ulbrich and Isacoff, 2008), nebo GluN1/GluN2A/GluN2B (Chazot and Stephenson, 1997a; Lu et al., 2006; Sheng et al., 1994), GluN1/GluN2A/GluN2C (Chazot et al., 1994; Sundström et al., 1997), GluN1/GluN2A/GluN2D (Sundström et al., 1997) a GluN1/GluN2B/GluN2D receptory (Brothwell et al., 2008; Dunah et al., 1998).

Podjednotky NMDA receptorů jsou integrální membránové proteiny tvořené čtyřmi semiautonomními doménami: extracelulární N-terminální doménou (NTD), složenou z amino-terminální (ATD) a ligand-vázající domény (LBD), transmembránovými doménami a intracelulární C-terminální doménou (CTD). Všechny podjednotky obsahují tři transmembránové domény (M1, M3, M4). M2 tvoří vratnou smyčku mezi M1 a M3 doménami a je součástí selektivního póru iontového kanálu (Chen and Lipton, 2006; Sobolevsky et al., 2009). Na GluN2 podjednotce je umístěno vazebné místo pro glutamát, tvořené S1 segmentem v ligand-vázající doméně a S2 segmentem mezi M3 a M4 doménami. GluN1 podjednotka má v těchto segmentech umístěné glycinové vazebné místo (viz Obr. 1). Pór iontového kanálu NMDA receptorů je zúžením rozdělený na extracelulární a intracelulární vestibul (Kuner et al., 1996). Na hranici mezi cytoplazmatickou membránou a extracelulárním prostorem je umístěn extracelulární vestibul, tvořený M3 doménami. Intracelulární vestibul je tvořen vratnou smyčkou M2 a nachází se v napětovém poli membrány (Beck et al., 1999; Sobolevsky et al., 2002). NMDA receptory složené z různých typů GluN podjednotek mají odlišné funkční i farmakologické vlastnosti (Traynelis et al., 2010; Vicini et al., 1998). Tato rozmanitost je dále podpořena existencí podjednotkově vázaných posttranslačních modifikací, jako např. fosforylací (Crump et al., 2001; Lan et al., 2001; Wenthold et al., 2003), palmitoylací (Hayashi et al., 2009), či glykosylací (Dingledine et al., 1999; Storey et al., 2011), které jsou kritické pro správnou funkci a regulaci NMDA receptorů v savčí CNS.



Obrázek 1: Struktura a organizace domén NMDA receptoru. (A) Schematická ilustrace podjednotkové topologie. M1, M3, M4 domény a smyčka M2 jsou lokalizovány v membráně a vytvářejí pár iontového kanálu. **(B)** Krystalová struktura membránového uspořádání tetrameru. **(C)** Struktura amino-terminální domény (ATD) se podílí na formování funkčních receptorů, jejich farmakologické modulaci a transportu na povrch. Pro vazbu agonistů, kompetitivních antagonistů a aktivaci receptoru je důležitá ligand-vázací doména (LBD). Na tvorbě iontového kanálu se podílí transmembránové domény (TMD) (Jespersen et al., 2014; Karakas and Furukawa, 2014).

1.4 Aktivace NMDA receptorů

Jak již bylo zmíněno, k aktivaci NMDA receptorů složených z GluN1 a GluN2 podjednotek dochází po navázání dvou molekul glycinu (koagonisty) a dvou molekul glutamátu (agonisty). NMDA receptory složené z GluN1 a GluN3 podjednotek se aktivují pouze pomocí glycinu (Chatterton et al., 2002; Pachernegg et al., 2012). Glycin se přirozeně vyskytuje v extracelulárním prostředí CNS. Bylo zjištěno, že mozkomíšní mok obsahuje glycin v koncentraci $4,2 \pm 1,6 \mu\text{M}$ (Iijima et al., 1978). Jelikož hodnota EC_{50} pro glycin (koncentrace látky vyvolávající poloviční hodnotu maximální odpovědi) pro GluN1/GluN2 receptory je přibližně $1 \mu\text{M}$, většina glycinových vazebných míst je tedy přirozeně obsazena. Mezi další látky působící jako koagonisté NMDA receptorů patří např. D-serin, který byl nedávno popsán jako jeden z hlavních koagonistů synaptických NMDA receptorů, zatímco glycin jako hlavní koagonista extrasynaptických NMDA receptorů (Papouin et al., 2012).

Glutamát je jako hlavní excitační neuropřenašeč CNS uvolňován z presynaptických zakončení glutamátergních synapsí, kde aktivuje NMDA receptory navázáním na obě vazebná místa na GluN2 podjednotkách.

Vazbou glutamátu a glycinu do jejich vazebných míst dochází u NMDA receptorů k sérii konformačních změn, které vedou k otevření iontového kanálu. Pro vysvětlení těchto konformačních změn bylo navrženo kinetické schéma, které popisuje konformační stavy aktivovaných NMDA receptorů po obsazení pouze glutamátových vazebných míst, protože agonisté glycinového vazebného místa se v CNS vyskytují v dostatečném množství, jak již bylo uvedeno výše. Podle kinetického schématu se receptory mohou nacházet ve stavu R (bez navázaného agonisty), RA (s jedním navázaným agonistou), nebo RAA (se dvěma navázanými glutamáty/agonisty). Dále receptor může ze stavu RAA (zavřený iontový kanál) přejít do stavu O (otevřený iontový kanál) nebo do desenzitizovaného stavu D, ze kterého se iontový kanál nemůže přímo otevřít. Pravděpodobnost obsazení jednotlivých konformačních stavů je dána koncentrací agonisty (A) a rychlostními konstantami (k), které určují rychlost přechodu mezi jednotlivými konformačními stavy (Lester and Jahr, 1992).

Rychlostní konstanty vstupu (k_D) a výstupu (k_R) do a z desenzitizovaného stavu jsou mnohem pomalejší než rychlostní konstanty otevření (α) a zavření (β) iontového kanálu po navázání a odváznání agonisty. To následně vede k řadě přechodů mezi stavy RAA a O, a vznikají tak shluky otevření jednotlivých iontových kanálů (Gibb and Colquhoun, 1991). Podle vztahu $P_O = \alpha / (\alpha + \beta)$ se z rychlostních konstant α a β určuje pravděpodobnost otevření (P_O) iontového kanálu, která je při saturující koncentraci agonisty daná rovnovážným

poměrem receptorů v otevřeném a zavřeném stavu (Huettner and Bean, 1988). U NMDA receptorů je P_O iontového kanálu závislá mimo jiné i na jejich podjednotkovém složení a u jednotlivých typů receptorů se značně liší. P_O u GluN1/GluN2A receptorů je nejvyšší a dosahuje 40% (Chen et al., 1999), u GluN1/GluN2B receptorů je to přibližně 10% (Jahr, 1992; Rosenmund et al., 1995). GluN1/GluN2C a GluN1/GluN2D receptory mají P_O jen 1-2% (Dravid et al., 2008; Vance et al., 2013). K ukončení přechodu mezi RAA a O stavy dochází vstupem receptoru do desenzitizovaného stavu, který je nevodivý, nebo odvázním agonisty. Přejít do desenzitizovaného stavu se díky pomalé resenzitizační konstantě (k_R) jeví jako nevodivá doba mezi shluky otevření jednotlivých kanálů (RAA-O). Pro desenzitizaci je charakteristické, že během aplikace agonisty dochází k časově závislému snížení odpovědi, což je pro chemicky aktivované iontové kanály typické (Geoffrey et al. 1991).

Mezi další typy desenzitizace NMDA receptorů patří desenzitizace závislá na glycinu a inaktivace závislá na Ca^{2+} iontech. Glutamátové a glycinové vazebné místo se navzájem negativně ovlivňují (Mayer et al., 1989). Po navázání glutamátu do vazebného místa dojde ke snížení afinity pro glycin, který je poté uvolněn z vazebného místa, což se následně projeví snížením odpovědi NMDA receptorů. Na elektrofyziologickém záznamu při nesaturujících koncentracích glycinu lze pak pozorovat pokles makroskopické odpovědi na aplikaci glutamátu. Při fyziologické nebo zvýšené koncentraci Ca^{2+} iontů dochází u NMDA receptorů během aplikace glutamátu k postupnému snížení proudových odpovědí. Je tedy zřejmé, že zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů dochází k inaktivaci NMDA receptorů (Rosenmund and Westbrook, 1993).

V savčí CNS dochází během excitačního přenosu k uvolnění glutamátu z presynaptického zakončení. Tím se po dobu přibližně 1ms zvýší koncentrace glutamátu v synaptické štěrbině na 1mM (Clements et al., 1992). Zvýšená koncentrace glutamátu v synaptické štěrbině aktivuje ionotropní glutamátové receptory v postsynaptické membráně, a dochází tak ke vzniku excitačního postsynaptického proudu (EPSC), způsobeného aktivací rychlých (AMPA) a pomalých (NMDA) receptorů. Mechanismus kinetiky deaktivace je u AMPA a NMDA receptorů odlišný. Pro AMPA receptory je typické rychlé snížení velikosti odpovědi způsobené rychlým přechodem do desenzitizovaného stavu. Naopak u NMDA receptorů je odvázní glutamátu velmi pomalé (Iacobucci and Popescu, 2017) a rychlost deaktivace závislá na typu přítomné GluN2 podjednotky (Vicini et al., 1998).

Iontový kanál NMDA receptorů je propustný pro K^+ , Na^+ a Ca^{2+} ionty. Vodivost NMDA receptorů je závislá převážně na jejich podjednotkovém složení. Receptory

s konkrétní kombinací podjednotek mohou mít různé vodivostní stavy, od 20 do 70pS. Vodivostní stavy u GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů se pohybují nejčastěji okolo 50pS, a při méně častých podstavech okolo 40pS. U GluN1/GluN2C a GluN1/GluN2D receptorů se vodivostní stavy pohybují okolo 30pS, zatímco v méně častých případech jen okolo 20pS (Green and Gibb, 2001; Stern et al., 1992).

1.5 Podjednotkové složení a lokalizace NMDA receptorů

V průběhu ontogenetického vývoje je lokalizace i podjednotkové složení NMDA receptorů v savčí CNS specificky regulováno. Jednotlivé podjednotky se v CNS exprimují v závislosti na vývojovém stádiu jedince a na oblasti mozku, kde k expresi dochází. V neonatálním období jsou převážně exprimovány GluN2B a GluN2D podjednotky. Stárnutím CNS dochází k poklesu exprese těchto podjednotek a přednostně se exprimují GluN2A podjednotky. GluN2C podjednotka se v detekovatelném množství vyskytuje v celé CNS, ale její nejvyšší exprese byla zjištěna v mozečku (Cull-Candy et al., 2001; Paoletti, 2011; Sans et al., 2000; Watanabe et al., 1992).

Pro excitační synaptický přenos a synaptickou plasticitu je kritické, aby byl přesně regulován počet a lokalizace NMDA receptorů v synapsích (Traynelis et al., 2010). Různé složení a lokalizace jednotlivých receptorů tak poskytuje dostatečnou variabilitu v odpovědích NMDA receptorů. NMDA receptory obsahující GluN2A podjednotku jsou u dospělých jedinců lokalizovány primárně v synapsích. Mimo synapse jsou lokalizovány spíše NMDA receptory obsahující GluN2B podjednotku (Kohr, 2006; Li et al., 2002; Stocca and Vicini, 1998; Tovar and Westbrook, 1999). Na excitačních synapsích v hipokampu jsou lokalizovány hlavně GluN1/GluN2A/GluN2B receptory, v synapsích granulárních mozečkových neuronů GluN1/GluN2A/GluN2C receptory a v synapsích dopaminergních neuronů v substantia nigra jsou přítomny především GluN1/GluN2B/GluN2D receptory (Cull-Candy et al., 2001).

1.6 Vznik NMDA receptorů v ER

Podjednotky NMDA receptorů jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu (ER), kde rovněž dochází k sestavení funkčních heterotetramerů (Stephenson et al., 2008; Traynelis et al., 2010). Předpokládá se, že pouze správně sestavené funkční heterotetramery projdou kvalitativní kontrolou při výstupu z ER, odkud jsou dále transportovány do Golgiho aparátu (GA). Nesprávně zformované proteiny nebo jinak nedokonalé komplexy jsou

následně odstraněny. Bylo zjištěno, že v nepřítomnosti GluN1 podjednotky jsou GluN2 podjednotky v ER zadržovány (McIlhinney et al., 1998), podobně jako homodimerické GluN3A-B a GluN2A/GluN3A komplexy. Z toho vyplývá, že na povrchu neuronů se nachází pouze heterotetramerické komplexy obsahující GluN1 podjednotku (Farina et al., 2011; Matsuda et al., 2003; Perez-Otano et al., 2001).

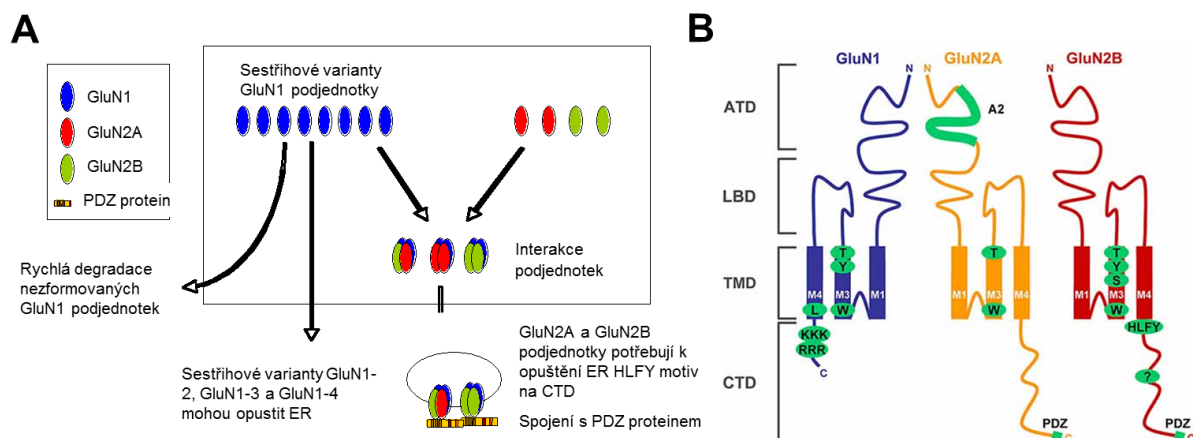
Předpokládá se, že kvartérní struktura funkčních NMDA receptorů obsahuje různé ER retenční a exportní motivy, které regulují uvolnění správně zformovaných receptorů z ER na buněčný povrch. Pomocí funkční, mikroskopické a biochemické analýzy bylo zjištěno, že GluN2A podjednotka obsahuje v rámci NTD v oblasti A2 segmentu ER retenční motiv, který je specificky maskován NTD z GluN1 podjednotky. Je zajímavé, že NTD u GluN2B podjednotky ER retenční motiv neobsahuje, a je tedy pravděpodobné, že způsob kontroly kvality v ER se u NMDA receptorů tvořených GluN2A a GluN2B podjednotkou liší (Qiu et al., 2009). Pro správné zformování heterotetramerických NMDA receptorů obsahujících GluN2 podjednotky je nezbytná NTD GluN1 podjednotek, která je zodpovědná za formování a disociaci GluN1 homodimerů. Seskupení dimerických NTD GluN1 podjednotek je mezi ionotropními glutamátovými receptory unikátní. U heterologních NMDA receptorů se struktura a mechanismus seskupení NTD značně liší od homologních AMPA a kainátových receptorů (Farina et al., 2011).

Pro formování a transport funkčních NMDA receptorů na buněčný povrch je důležitá i oblast M3 domény, která obsahuje kritické strukturní determinanty (Horak et al., 2008). Správné zformování GluN1 a GluN2B podjednotek do funkčního heterotetrameru je také závislé na konkrétní konformaci M3 domény. Je pravděpodobné, že mezi M4 doménou GluN1 podjednotky a M3 doménami GluN2 podjednotek dochází k interakci, a tím k maskování ER retenčních motivů. Naše předchozí studie ukázala, že M3 doména GluN1 a GluN2 podjednotek obsahuje důležité aminokyselinové zbytky (GluN1- W636, Y647 a T648; GluN2B- W635, S645/Y646/T647) v oblasti vysoce konzervovaného SYTAN motivu nezbytné pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch. Tyto aminokyselinové zbytky přímo regulují uvolňování NMDA receptorů z ER (Kaniakova et al., 2012a). V naší další studii bylo ukázáno, že pro uvolnění NMDA receptorů z ER má význam také M4 doména GluN1 podjednotky (Kaniakova et al., 2012b). Bylo zjištěno, že za regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch je zodpovědný aminokyselinový zbytek L830, umístěný v druhé polovině M4 domény GluN1 podjednotky. Tento aminokyselinový zbytek se účastní maskování ER retenčních motivů v ER a transportu funkčních NMDA receptorů na buněčný povrch (Kaniakova et al., 2012b).

Je pozoruhodné, že pokud je GluN1-1 podjednotka, obsahující C1 kazetu s ER retenčními motivy, exprimována v heterologních COS-7 buňkách, nedochází k transportu této podjednotky na buněčný povrch (Standley et al., 2000). Naopak, sestříhové varianty GluN1-2 a GluN1-4, které C1 kazetu neobsahují, jsou na buněčný povrch transportovány i v nepřítomnosti GluN2 podjednotky. Sestříhová varianta GluN1-3 je na buněčný povrch transportována navzdory tomu, že C1 kazetu obsahuje. V tomto případě však GluN1-3 podjednotka obsahuje také C2' kazetu s PDZ-vazebnou doménou, která slouží jako exportní signál (viz Obr. 2) (Holmes et al., 2002). Dva krátké retenční motivy zodpovědné za zadržení GluN1-1 podjednotky v ER (KKK a RRR) byly objeveny v oblasti C1 kazety na CTD (Horak and Wenthold, 2009; Standley et al., 2000; Xia et al., 2001). Uvolňování GluN1 podjednotek z ER může být dále ovlivněno např. fosforylací serinových zbytků v C1 kazetě (prostřednictvím proteinkinázy C nebo proteinkinázy A), či interakcí s COPII proteiny (viz Obr. 2) (Mu et al., 2003).

Mezi další kontrolní body uvolňování GluN1/GluN2 receptorů z ER patří i motiv HLFY v CTD GluN2 podjednotek (viz. Obr. 2), který je pravděpodobně zodpovědný za povrchovou expresi správně zformovaných NMDA receptorů. Bylo ukázáno, že mutace v tomto motivu zabránila transportu receptorů na buněčný povrch (Hawkins et al., 2004; Yang et al., 2007).

Pro regulaci povrchové exprese NMDA receptorů je rovněž důležitá i integrita glycinového a glutamátového vazebného místa v LBD. Jediná bodová mutace (D732) v glycinovém vazebném místě na GluN1-1a podjednotce výrazně snížila afinitu receptoru ke glycinu a zároveň i povrchovou expresi GluN1/GluN2A receptorů. Z toho vyplývá, že integrita glycinového místa je nezbytná pro časný transport NMDA receptorů z ER (Kenny et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že GluN1/GluN2B receptory s mutacemi v glutamátovém vazebném místě na GluN2B podjednotce měly výrazně sníženou afinitu ke glutamátu i povrchovou expresi. Pokusy s nemutovanou GluN2B podjednotkou ukázaly, že pro transport GluN1/GluN2B receptorů na buněčný povrch je nezbytná funkčnost obou glutamátových vazebných míst (She et al., 2012).



Obrázek 2: Interakce podjednotek NMDA receptorů a strukturální determinanty regulující zpracování funkčních NMDA receptorů v ER. (A) Všechny typy GluN2 podjednotek a GluN1-1 sestříhových variant jsou zadržovány v ER, dokud nedojde k správnému zformování funkčních heterotetramerů NMDA receptorů. Množství syntetizovaných GluN1 podjednotek je větší než v případě GluN2 podjednotek a většina z nich je pak v ER zadržována a rychle degradována. Některé sestříhové varianty GluN1 podjednotky neobsahují C1 kazetu s ER retenčním motivem, nebo obsahují C2' kazetu, která jim umožňuje výstup z ER i v přítomnosti C1 kazety. Interakce podjednotek může vést k vytvoření komplexu s dvěma identickými nebo různými GluN2 podjednotkami. NMDA receptory se mohou zformovat a být funkční již v ER. Transport receptorů z ER je pravděpodobně závislý na exportním motivu HLFY (na GluN2A a GluN2B podjednotce), umístěném za M4 doménou (Malenka, 2009). (B) Schematická topologie GluN podjednotek s vyznačenými motivy nezbytnými pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch (GluN1 - několik aminokyselinových zbytků v M3 doméně a dva ER retenční signály RRR a KKK v CTD; GluN2A - A2 segment v ATD a několik aminokyselinových zbytků v M3 doméně; GluN2B - několik aminokyselinových zbytků v M3 doméně, exportní motiv HLFY a neznámý ER retenční motiv v CTD). Obě GluN2 podjednotky a některé sestříhové varianty GluN1 podjednotky obsahují PDZ-vazebnou doménu na konci CTD (Karakas and Furukawa, 2014).

1.7 Transport a cílení NMDA receptorů

Správně zformované NMDA receptory jsou po kontrole kvality transportovány z ER do Golgiho aparátu (GA), kde dochází k jejich dalším úpravám. NMDA receptory jsou v trans-Golgiho síti (TGN) rozříděny do různých druhů vezikulárních nebo tubovezikulárních váčků a transportovány do endozomů, nebo přímo do plazmatické membrány. Z GA jsou váčky s nově vzniklými NMDA receptory transportovány na buněčný povrch, do excitačních synapsí, či extrasynaptických oblastí (Jeyifous et al., 2009; Standley et al., 2012). Jednotlivé kroky transportu NMDA receptorů na buněčný povrch byly částečně objasněny u mladých kortikálních neuronů (Bressloff, 2006; Washbourne et al., 2002, 2004). NMDA a AMPA receptory jsou v neuronech před i během synaptogeneze přepravovány různými vezikulárními nebo tubovezikulárními váčky. Oba typy receptorů se přepravují ve vlastních váčkách s různou rychlostí a navzájem se nemíchají. To podporuje i studie

zaměřená na recyklační endozomy, které obsahují AMPA, ale nikoliv NMDA receptory. Transport NMDA receptorů v rámci dendritů probíhá podél mikrotubulů ve velkých tubovezikulárních váčcích nesoucích antigen pro časné endozomy (EEA1). Z toho vyplývá, že k třídění AMPA a NMDA receptorů může docházet nejen v TGN, ale také ve specifických endozomech (Lee et al., 2001).

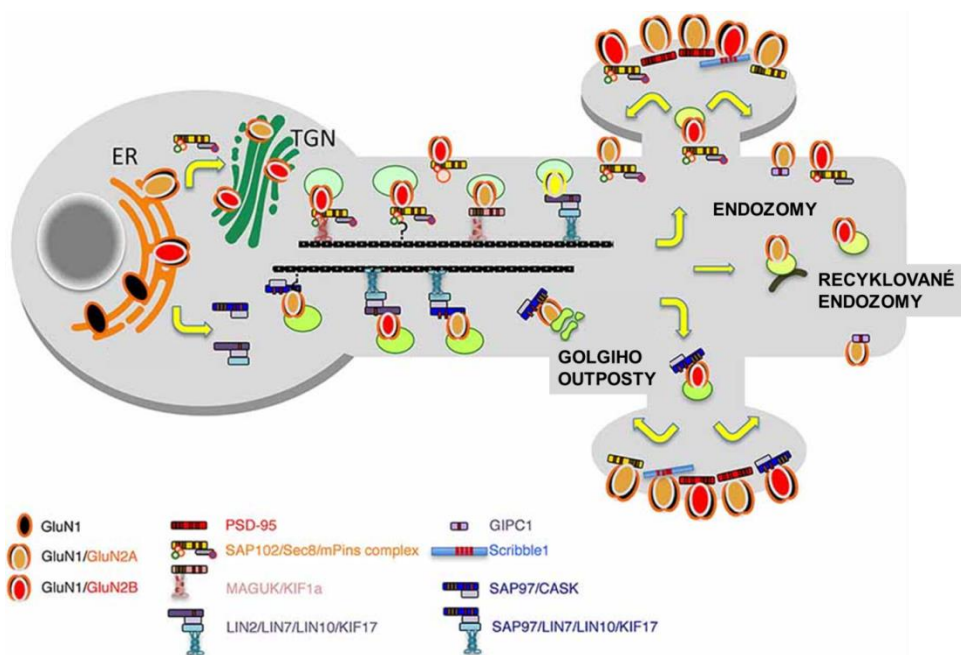
Transport NMDA receptorů do synapsí a na buněčný povrch reguluje velké množství různých proteinů a jejich komplexů (Sans et al., 2003, 2005). Mezi tyto proteiny patří i SAP102 (z angl. synapse associated protein 102) z rodiny MAGUK (z angl. membrane-associated guanylate kinase) proteinů. SAP102 primárně interaguje s GluN1/GluN2B receptory, které se vyskytují v časném postnatálním období vývoje mozku. Se SAP102 interaguje i protein Sec8 spolu s 8 dalšími proteiny. Dohromady tvoří komplex Sec6/8, který je součástí membránových váčků a cytoplazmatické membrány v savčích buňkách. Do PDZ domény SAP102 proteinu se váže jak protein Sec8, tak i GluN2 podjednotky NMDA receptorů (Sans et al., 2003). V případě GluN2B podjednotky s odstraněnou PDZ doménou je transport NMDA receptorů na buněčný povrch zajištěn procesem nezávislým na přítomnosti MAGUK proteinů a Sec6/8 komplexu (Prybylowski et al., 2002; Sans et al., 2003).

Transport NMDA receptorů na buněčný povrch může být ovlivněn i interakcí SAP102 s proteinem mPins (z angl. mammalian homologue of Drosophila melanogaster partner of inscuteable), což je savčí forma proteinu nalezeného u octomilky. Tento protein se účastní regulace polarizace buňky a buněčného dělení, a asociuje s guanylát kinázou a SH3 (z angl. Src-homology-3) doménami SAP102 proteinu. Protein mPins je schopný vázat komplex SAP102-GluN2B, a regulovat tak transport NMDA receptorů na buněčný povrch (Sans et al., 2003, 2005). K tvorbě proteinového komplexu GluN1-GluN2B-SAP102-Sec8 a mPins dochází pravděpodobně již v časných fázích transportu v ER, GA, či TGN. Tento komplex interaguje s myosiny a zprostředkovává tak transport váčků obsahujících NMDA receptory podél dendritů (Yuen et al., 2005).

Mezi další proteiny ovlivňující exocytózu a recyklaci váčků obsahujících NMDA receptory patří i různé Rab proteiny nebo proteinový komplex SNAP25-VAMP1-syntaxin4 (z angl. Synaptosomal-associated protein 25-Vesicle Associated Membrane Protein 1), který zprostředkovává dílčí exocytózu NMDA receptorů a ovlivňuje tak jejich povrchovou expresi v synaptických a extrasynaptických oblastech plazmatické membrány (Gu and Huganir, 2016).

Váčky s nově vzniklými NMDA receptory jsou obvykle transportovány z buněčného těla neuronu až do excitačních synapsí (viz Obr. 3). Bylo ukázáno, že NMDA receptory se mohou uvolnit z ER přímo do dendritů (Aridor et al., 2004; Horton and Ehlers, 2004). Rovněž se předpokládá, že v dendritech mohou být NMDA receptory syntetizovány přímo z mRNA lokalizované v blízkosti synapsí (Steward and Schuman, 2001).

Na regulaci transportu NMDA receptorů se podílejí také cytoplazmatické proteiny, jako Ca^{2+} /calmodulin-dependentní protein kináza II (CaMKII) (Barria and Malinow, 2005; Leonard et al., 1999), Arc (z angl. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein) (Steward and Schuman, 2001), cAMP dependentní proteinkináza A (PKA) (Crump et al., 2001), proteinkináza C (PKC) (Fong et al., 2002; Tingley et al., 1997), či SALM (z angl. Synaptic adhesion like molecules) (Ko et al., 2006; Seabold et al., 2008; Wang et al., 2006). Předpokládá se, že ovlivnění syntézy těchto proteinů v dendritech lze specificky regulovat transport NMDA receptorů do excitačních synapsí.



Obrázek 3: Schéma transportu NMDA receptorů. V ER jsou NMDA receptory syntetizovány a sestaveny do funkčních GluN1/GluN2 heterotetramerů. Po kontrole kvality v ER jsou receptory transportovány do GA, odkud jsou následně funkční receptory ve váčcích transportovány přes TGN do dendritických Golgiho outpostů a dále do cytoplazmatické membrány, do excitačních synapsí nebo extrasynaptických oblastí neuronů. Transportu NMDA receptorů se účastní i proteinové komplexy složené např. z MAGUK, mPINS, SAP97 a mnoho dalších. Správný počet i typy NMDA receptorů na buněčném povrchu neuronů jsou regulovány v uvedených krocích (Horak et al., 2014).

1.8 Regulace transportu NMDA receptorů obsahujících GluN2C podjednotku

K syntéze GluN2C podjednotky dochází především v mozečkových granulárních neuronech (CGC, z angl. Cerebellar Granule Cells) v pozdějších fázích vývoje CNS. V časných vývojových stádiích se v excitačních synapsích CGC nachází především GluN2B podjednotka, která je v průběhu vývoje nahrazena GluN2C podjednotkou (Lu et al., 2006; Paoletti, 2011). Myši s deletovanými CTD u GluN2A a GluN2C podjednotek mají narušenou synaptickou plasticitu v CGC (Rossi et al., 2002). Myši se sníženou expresí GluN2A a/nebo GluN2C podjednotek mají poruchy motorické koordinace a myši s chybějící nebo zablokovanou GluN2C podjednotkou mají problémy s prožíváním strachu, s pracovní pamětí a mají poškozenou motorickou koordinaci (Gupta et al., 2016; Hillman et al., 2011; Kadotani et al., 1996).

Bylo ukázáno, že transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch je výrazně regulován proteinkinázou B, která fosforyluje serin 1096 (S1096) v CTD na GluN2C podjednotce. Zvýšená aktivita NMDA receptorů a stimulace IGF-I (z angl. insulin growth factor) vede k enormnímu nárůstu fosforylace S1096, což významně zvyšuje povrchovou expresi GluN1/GluN2C receptorů v mozečku. Do fosforylačního místa na S1096 se vážou i různé isoformy proteinu 14-3-3 (Chen and Roche, 2009; Chung et al., 2015).

Na CTD GluN2C podjednotky se nachází další fosforylační místo, a sice serin 1244 (S1244), fosforylovaný prostřednictvím PKA a PKC. S1244 je umístěn v blízkosti PDZ domény, která je zodpovědná za regulaci proteinových interakcí a povrchovou expresi v případě GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů (Bard et al., 2010; Standley et al., 2012). Je překvapivé, že fosforylace S1244 nemá vliv na transport GluN1/GluN2C receptorů, ale na jejich funkční vlastnosti (Chen et al., 2006).

1.9 Glykosylace proteinů

Glykosylace proteinů je z hlediska evoluce konzervovaný proces, k němuž dochází u prokaryot i eukaryot (Schwarz and Aebi, 2011). Většina glykoproteinů se nachází na buněčném povrchu, kde se účastní množství buněčných procesů, včetně buněčné signalizace, adheze, zánětlivých a protizánětlivých reakcí, nebo interakcí s proteiny, např. lektiny. Glykosylace je rovněž důležitá pro správné formování a transport proteinů z ER (Aebi et al., 2010; Cummings, 2009). Glykosylační aparát je u savců tvořen bezmála 700 proteiny, které vytváří více než 7000 různých glykanových struktur. Základními stavebními kameny

glykanových struktur jsou monosacharidy - glukóza (Glc), galaktóza (Gal), manóza (Man), fukóza (Fuc), *N*-acetylglukosamin (GlcNAc), *N*-acetylgalaktosamin (GalNAc), xylóza a kyselina sialová, glukuronová a iduronová (Cummings, 2009; Moremen et al., 2012).

V současné době jsou známy čtyři typy glykosylací: *O*-glykosylace, *C*-manosylace, *O*-GlcNAcylylace a *N*-glykosylace. V případě *O*-glykosylace se u většiny proteinů váže glykan prostřednictvím glykosidické vazby na aminokyseliny serin nebo threonin. *O*-glykany se dále mohou vázat na tyrosin (v případě glykogeninu), nebo na hydroxylysin (v případě kolagenu). U *O*-glykosylace, na rozdíl od *N*-glykosylace, jsou monosacharidy na protein přidávány postupně a k připojení nepotřebují specifickou aminokyselinovou sekvenci (Yao et al., 2015). V případě *C*-manosylace se dva atomy uhlíku vážou pomocí kovalentní vazby na aminokyselinu tryptofan v rámci konsenzusové sekvence WXXW (Furmanek and Hofsteenge, 2000). Při *O*-GlcNAcylylaci se za pomoci *O*-GlcNAc transferázy připevní na serin nebo threonin prostřednictvím glykosidické vazby monosacharid GlcNAc (Pathak et al., 2015). Na rozdíl od *N*-glykosylací probíhá *O*-GlcNAcylylace převážně intracelulárně, např. v mitochondriích, ale také v cytoplazmě a v jádře. U *O*-glykanů nedochází k prodlužování, či větvení a nevznikají ani komplexní struktury jako v případě *N*-glykanů. Podobně jako v případě fosforylace může být monosacharid GlcNAc z nativního proteinu kdykoliv odstraněn nebo naopak přidán. *O*-GlcNAcylylace se účastní regulace mnoha buněčných procesů, včetně buněčné signalizace (Kim, 2011; Yao et al., 2015).

1.10 *N*-glykosylace

K syntéze *N*-glykanů dochází v cytoplazmě, kde dochází k navázání aktivovaného monosacharidu UDP-GlcNAc pomocí fosfodiesterové vazby na dolichol (lipid vázaný v membráně ER). Následně za přispění glykosyltransferáz vzniká glykan, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, který se přes pór Sec61 přesouvá do lumen ER, kde dochází ke vzniku $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, základního prekurzoru *N*-glykanů. Tento prekurzor pro *N*-glykosylaci je shodný u všech eukaryotických organismů, včetně živočichů, rostlin, i jednobuněčných eukaryot. Nově vytvořený prekurzor se prostřednictvím oligosacharid-peptid transferázy přenáší z dolicholu na asparagin (N), který je součástí unikátní aminokyselinové sekvence N-X-S/T v rámci vznikajícího peptidového řetězce. Po odstranění dvou molekul glukózy z glykanu dochází ke vzniku $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ struktury. Na tuto strukturu se váží chaperony, kalnexin a kalretikulin, jež zodpovídají za správné zformování a kontrolu kvality nově vznikajícího glykoproteinu (Molinari et al., 2004). Nesprávně zformované proteiny, které neprošly

kontrolou kvality v ER, rozpoznává α -manosidáza I, která je vrací zpátky do cytoplazmy, kde následně dochází k odstranění *N*-glykanů pomocí peptid-*N*-glykosidázy F (PNGázy F) a celý protein je degradován (Briant et al., 2015). Správně zformované proteiny se oddělí od chaperonů a poté jsou za enzymatického odštěpení glukózy transportovány do GA (Hiraizumi et al., 1993). Většina posttranslačních modifikací probíhá v GA, kde se *N*-glykany upravují pomocí různých glykosidáz. Tyto enzymy jsou v GA (ve směru od cis- po trans-Golgi cisterny) rozmístěny následovně: i) manosidázy, zodpovědné za štěpení manóz a vznik glykanů manózového typu, jsou umístěny v cis-Golgi cisternách, ii) ke vzniku hybridního a komplexního typu *N*-glykanů dochází větvením a fukosylací proximálního GlcNAc v mediální části Golgiho cisteren (zároveň zde *N*-glykan získává rezistenci vůči působení endoglykosidázy H (endoH)) a iii) k dalšímu větvení komplexních typů glykanů dochází v trans-Golgi cisternách prostřednictvím sialylace, galaktosylace, sulfatace, nebo fukosylace. Podle potřeby jsou nově vzniklé *N*-glykany transportovány ve váčcích buď přímo do cytoplazmatické membrány, nebo do extracelulární matrix (Freeze, 2006; Mah et al., 2005; Moremen et al., 2012; Stanley, 2011). V rámci sekreční dráhy *N*-glykoproteinů hraje zásadní roli retrogradní transport, který je v případě tzv. rezidentních proteinů, jež obsahují na CTD aminokyselinovou sekvenci KDEL, zodpovědný za jejich návrat do ER (Ong et al., 2014). *N*-glykosylace se podílí na správném složení a zformování receptorů, ovlivňuje jejich stabilitu a transport z GA na buněčný povrch (Vagin et al., 2009). *N*-glykany modulují fyzikální vlastnosti proteinů a podílí se také na ochraně proteinů před působením proteáz (Lis and Sharon, 1993). Z toho vyplývá, že funkce *N*-glykosylace je u jednotlivých proteinů různá a může být ovlivněna jedinou záměnou v konkrétním glykosylačním místě (Standley and Baudry, 2000; Taverna et al., 1994), či působením různých deglykosylačních enzymů nebo inhibitorů glykosylace, jako např. PNGázou F, endoH, nebo tunikamycinem.

N-glykosylace se podílí na regulaci celé řady biologických procesů významných pro správnou funkci CNS, včetně jejího vývoje, synaptogeneze a synaptického přenosu (Freeze, 2006; Freeze et al., 2012). Většina membránových proteinů v savčím mozku je *N*-glykosylovaná. Tyto tzv. glykoproteiny obsahují velký počet *N*-glykosylačních míst, která jsou tkáňově specifická (Zielinska et al., 2010). Předpokládá se, že v savčím CNS existuje několik tisíc různých *N*-glykanových struktur. Tato rozmanitost může být mimo jiné způsobena přítomností různých typů enzymů regulujících *N*-glykosylaci, jako např. glykosyltransferáz (Vagin et al., 2009).

1.11 *N*-glykosylace NMDA receptorů

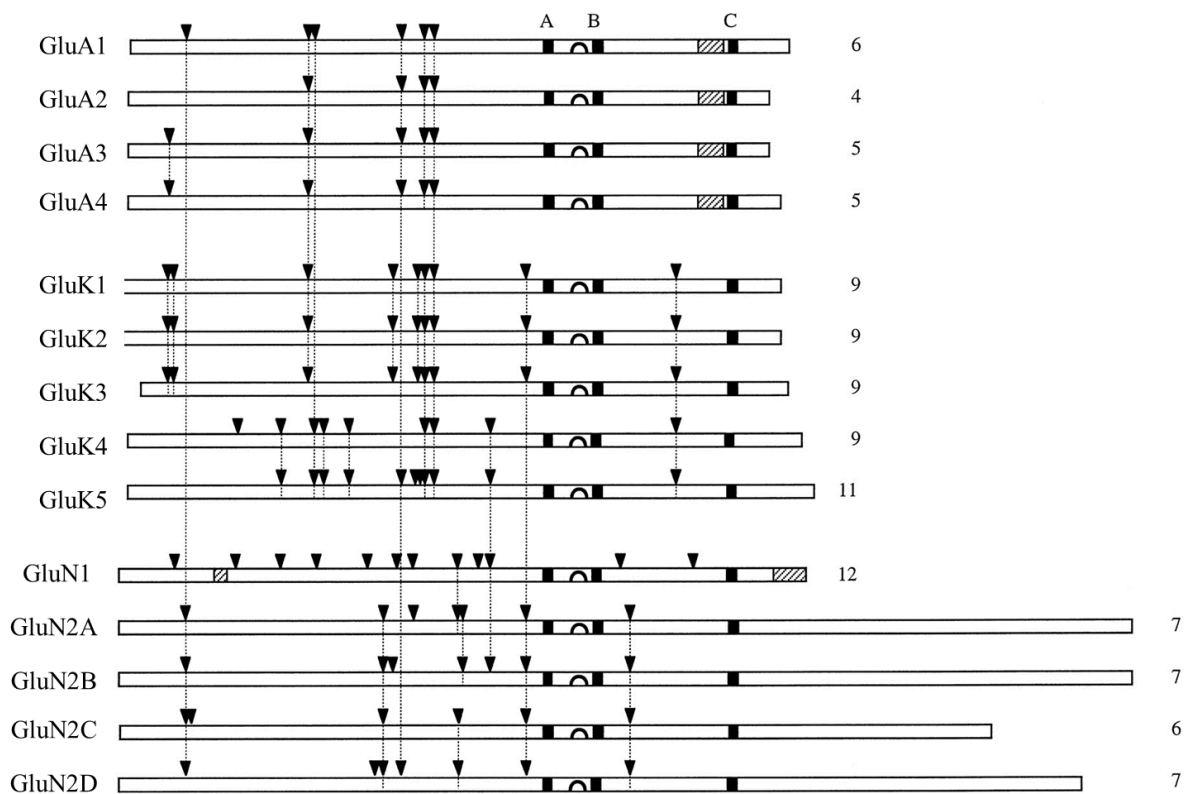
Již v 90. letech bylo ukázáno, že ionotropní glutamátové receptory, včetně NMDA receptorů, jsou *N*-glykosylovány (Blackstone et al., 1992; Everts et al., 1997; Taverna et al., 1994). Na jednotlivých podjednotkách ionotropních glutamátových receptorů se nachází 4-12 možných extracelulárně orientovaných glykosylačních míst s unikátní aminokyselinovou sekvencí N-X-S/T (viz Obr. 4). V rámci receptorových tříd je řada glykosylačních míst evolučně konzervována, avšak žádné z nich není shodné pro všechny podjednotky ionotropních glutamátových receptorů (Everts et al., 1997). Unikátní aminokyselinové sekvence *N*-glykosylačních míst se nacházejí na ATD a S2 segmentu LBD (Hollmann et al., 1994). Dříve se dokonce pro lokalizaci jednotlivých domén NMDA receptoru využívala právě predikovaná *N*-glykosylační místa (Wood et al., 1995).

V předchozích studiích bylo ukázáno, že k *N*-glykosylaci NMDA receptorů dochází jak v případě heterologních expresních systémů, tak i v savčích neuronech (Everts et al., 1997; Traynelis et al., 2010). Nejvyšší počet *N*-glykosylačních míst je obsažen v GluN1 podjednotce (12), která je pro správnou funkci NMDA receptorů nezbytná (Brose et al., 1993). Štěpením NMDA receptorů za pomoci enzymu endo H bylo ukázáno, že GluN1 podjednotka obsahuje *N*-glykany převážně manózoového typu (Clark et al., 1998). Dále bylo ukázáno, že na rozdíl od GluN1 podjednotky, je GluN2A podjednotka resistantní vůči endo H, což je pravděpodobně způsobeno přítomností komplexních a hybridních typů glykanů (Huh and Wenthold, 1999). Bylo zjištěno, že v HEK293T buňkách jsou *N*-glykany důležité pro správné zformování a expresi GluN1/GluN2A receptorů (Chazot et al., 1995). Tato zjištění podporuje i další studie na HEK293T buňkách, kdy inhibice tvorby *N*-glykanů na GluN1 a GluN2A podjednotkách měla vliv na disociační konstantu pro vazbu antagonisty NMDA receptorů, MK-801, ale nikoliv na počet jeho vazebných míst (Llansola et al., 2005). Inhibice tvorby *N*-glykanů je rovněž zodpovědná za změnu povrchové exprese NMDA receptorů v heterologním expresním systému *Xenopus laevis* i v kortikálních neuronech u potkanů (Everts et al., 1997). Zatímco syntéza GluN2 podjednotek je inhibicí *N*-glykosylace ovlivněna jen nepatrně, syntéza GluN1 podjednotky je naopak významně narušena. Při narušení tvorby *N*-glykanů dochází v neuronech k aktivaci specifické stresové dráhy ERAD (z angl. Endoplasmic Reticulum Associated Degradation), která všechny neglykosylované GluN1 podjednotky degraduje v proteasomu. Snížená tvorba GluN1 podjednotky tak negativně ovlivňuje nejen formování funkčních NMDA receptorů, ale i jejich povrchovou expresi (Gascón et al., 2007).

Transport NMDA receptorů do synapsí je ovlivněn přítomností jednotlivých GluN2 podjednotek. Například bylo ukázáno, že transport GluN1/GluN2A receptorů do synapsí je závislý na synaptické aktivitě, zatímco GluN1/GluN2B receptory synaptickou aktivitu pro jejich transport do synapsí nevyžadují (Barria and Malinow, 2002). Další studie ukázala, že pro transport GluN1/GluN2B receptorů do synapsí je kritické *N*-glykosylační místo N675, které není v rámci GluN2A podjednotky obsaženo. Je zajímavé, že po odstranění tohoto glykosylačního místa byla pro transport GluN1/GluN2B receptorů synaptická aktivita nezbytná (Storey et al., 2011).

Dále bylo ukázáno, že na NMDA receptory se váže několik typů rostlinných lektinů, včetně konkanavalinu A, což jsou proteiny rostlinného původu schopné se vázat na *N*-glykany v glykoproteinech (Everts et al., 1997; Mayer and Vyklicky, 1989; Traynelis et al., 2010). Nedávné studie ukázaly, že v mozkové tkáni u schizofrenních pacientů se na AMPA receptorech nacházejí odlišné *N*-glykanové struktury (Tucholski et al., 2013a, 2014). Navzdory tomu, že NMDA receptory hrají klíčovou roli ve zprostředkování synaptického přenosu na excitačních synapsích savčích neuronů, regulace a funkce jejich glykanového složení zůstává zatím neobjasněna.

Předložený projekt má proto význam nejen pro porozumění základním mechanismům regulace NMDA receptorů v savčím CNS, ale i pro objasnění příčiny u velkého množství lidských onemocnění způsobených abnormální regulací glutamatergního systému, včetně poruch funkce lidského CNS u tzv. kongenitálních poruch glykosylace (Moremen et al., 2012). V současné době je známo více než sto typů těchto poruch, které jsou důsledkem mutací různých enzymů v odlišných částech glykosylačních drah. U více než 80% z nich dochází k narušení funkce CNS, včetně mentální retardace, hypotonie, záchvatů, neuropatie, atd. (Freeze et al., 2015). Objasnění významu a mechanismu regulace *N*-glykosylace je tedy důležité i pro budoucí vývoj nových léčebných postupů u pacientů trpících různými neuropsychiatrickými a neurologickými poruchami (Dalmau et al., 2007; Gleichman et al., 2012; Tucholski et al., 2013b).



Obrázek 4: Schematické zobrazení glykosilačních míst na ionotropních glutamátových receptorech. Šípky označují pozici všech předpokládaných extracelulárně umístěných *N*-glykosylačních míst (N-X-S/T) a čísla napravo jejich celkový počet. Vertikální čáry spojují konzervovaná *N*-glykosylační místa na stejných pozicích u jednotlivých podjednotek. Černé čtverce představují membránové domény M1-M4. Šrafované obdélníky představují alternativní sestřihové domény (Everts et al., 1997).

2 Cíle disertační práce

- **Porovnat rozdíly povrchové exprese GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B a GluN1/GluN2C receptorů.**
- **Objasnit mechanismy regulace transportu GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch.**
- **Charakterizovat *N*-glykosylační motivy v GluN1 a GluN2 podjednotkách, nezbytné pro časný transport NMDA receptorů.**
- **Identifikovat specifické *N*-glykanové struktury důležité pro povrchovou expresi NMDA receptorů.**

3 Materiál a metody

3.1 Mutagenese NMDA receptorů

V našich experimentech jsme používali nemutované i mutované potkaní varianty podjednotek NMDA receptorů, a sice GluN1-1a, GluN2A, GluN2B a GluN2C. Na N-konci byla GluN1-1a podjednotka označena pomocí žlutého fluorescenčního proteinu (YFP) a GluN2 podjednotky byly značeny zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). V našich experimentech jsme rovněž používali neznačené podjednotky NMDA receptorů (Marshall et al., 1995; Luo et al., 2002; Chen and Roche, 2009).

Vytvořili jsme řadu mutovaných konstruktů YFP-GluN1-1a, GFP-GluN2A, GFP-GluN2B a GFP-GluN2C podjednotek. V ATD, v oblasti membránových domén a CTD GFP-GluN2C podjednotky jsme postupně vytvořili sérii mutací. V GFP-GluN2A a GFP-GluN2B podjednotkách jsme inzercí stop kodonů vyrobili konstrukty deletované za M1 doménou (Horak et al., 2008; Qiu et al., 2009). V oblasti ATD GluN2C podjednotky jsme vytvořili konkrétní delece, a to jak v nezkrácené GFP-GluN2C podjednotce (GFP-GluN2C- Δ 159-292), tak i ve zkrácené formě GFP-GluN2C konstruktu (GFP-GluN2C-M1stop- Δ 159-292 a GFP-GluN2C-M1stop- Δ 293-556)). V GluN1-1a podjednotce jsme na N-koncové části/ATD vytvořili deleci aminokyselin 32-386 (GFP-GluN1-1a- Δ 32-386). V konzervovaném VWAFFAVIFLASYTANLAAF motivu v oblasti M3 domény GFP-GluN2C podjednotky jsme bodovou záměnou aminokyselin za alanin vytvořili tři konstrukty (GFP-GluN2C-W645A, GFP-GluN2C-Y656A a GFP-GluN2C-T657A). Poté jsme v rámci CTD GFP-GluN2C podjednotky vložili stop kodon za M4 doménu (GFP-GluN2C-855stop) a deletovali posledních 10 aminokyselin (GFP-GluN2C-1241stop). Následně jsme inzercí stop kodonů postupně vytvořili sérii dalších GFP-GluN2C konstruktů (GFP-GluN2C-872stop, GFP-GluN2C-884stop, GFP-GluN2C-885stop, GFP-GluN2C-886stop, GFP-GluN2C-887stop, GFP-GluN2C-888stop, GFP-GluN2C-889stop, GFP-GluN2C-890stop, GFP-GluN2C-948stop, GFP-GluN2C-1048stop a GFP-GluN2C-1148stop).

Pomocí bodových záměn (N \rightarrow Q) jsme vyrobili sérii mutací extracelulárně umístěných *N*-glykosylačních míst v YFP-GluN1-1a podjednotce (YFP-GluN1-1a-12N \rightarrow 12Q, YFP-GluN1-1a-10N \rightarrow 10Q, YFP-GluN1-1a-N203Q-N368Q, YFP-GluN1-1a-N61Q, YFP-GluN1-1a-N203Q, YFP-GluN1-1a-N239Q, YFP-GluN1-1a-N276Q, YFP-GluN1-1a-N300Q, YFP-GluN1-1a-N350Q, YFP-GluN1-1a-N368Q, YFP-GluN1-1a-N440Q, YFP-GluN1-1a-N471Q, YFP-GluN1-1a-N491Q, YFP-GluN1-1a-N674Q a YFP-GluN1-1a-N771Q), GFP-GluN2A podjednotce (GFP-GluN2A-N75Q, GFP-GluN2A-N340Q, GFP-GluN2A-N380Q, GFP-

GluN2A-N443Q, GFP-GluN2A-N444Q, GFP-GluN2A-N541Q a GFP-GluN2A-N687Q) a GFP-GluN2B podjednotce (GFP-GluN2B-N74Q, GFP-GluN2B-N341Q, GFP-GluN2B-N348Q, GFP-GluN2B-N444Q, GFP-GluN2B-N491Q, GFP-GluN2B-N542Q a GFP-GluN2B-N688Q). Následně jsme vytvořili i bodové záměny v okolí kritických *N*-glykosylačních míst (N203 a N368) v GluN1-1a podjednotce (YFP-GluN1-1a-V204A, YFP-GluN1-1a-V204P, YFP-GluN1-1a-T205A, YFP-GluN1-1a-V204A-T205A, YFP-GluN1-1a-G369A, YFP-GluN1-1a-T370A a YFP-GluN1-1a-G369A-T370A). Jednotlivé komplementární primery jsme navrhovali o délce přibližně 30 oligonukleotidů, s umístěním záměny uprostřed oligonukleotidů.

Konkrétní aminokyselinové záměny v jednotlivých podjednotkách NMDA receptorů jsme připravili pomocí PCR reakce za použití Thermo-cycleru (Eppendorf, Hamburg, Německo). PCR reakci jsme prováděli postupem doporučeným výrobcem pomocí QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, CA, USA). Po ukončení PCR reakce jsme templátovou DNA po dobu 1 h štěpili enzymem DpnI (new England Biolabs, MA, USA). Na transformaci jsme používali kompetitivní bakterie kmene XL10-Gold (Agilent Technologies, CA, USA). PCR směs (5 μ l) jsme smíchali s bakteriemi (100 μ l) a 1 h inkubovali na ledu. Poté jsme pomocí teplotního šoku (45 s při 42 °C) provedli transformaci a buněčnou směs nechali inkubovat 2 min na ledu. Ihned po teplotním šoku jsme k LB médiu bez antibiotika (0,5 ml) přidali buněčnou suspenzi a směs nechali na třepačce (200 rpm a 37 °C) třepat 1 h. Takto připravenou buněčnou směs jsme nanесли na agarové Petriho misky s ampicilinem (100 μ g/ml) a ponechali přes noc v termostatu (37 °C). Po 14-16 h inkubace jsme do LB média obsahujícího ampicilin (100 μ g/ml) naočkovali narostlé monokolonie a kultivovali dalších 14-16 h na třepačce. K izolaci plazmidové cDNA z takto připravených bakteriálních kultur jsme použili High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, New Taipei City, Taiwan) a centrifugu (Hettich Instruments, Tuttlingen, Německo). Postup izolace jsme prováděli dle protokolu výrobce. Přítomnost mutací byla kontrolována DNA sekvenací ve společnosti GATC Biotech, (Constance, Německo). Koncentraci získané cDNA jsme měřili přístrojem Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA).

3.2 Příprava lentiviru

K vytvoření lentiviru jsme použili konstrukt lentivirového vektoru FHUGW (Schlüter et al., 2006). Pro zeslabení endogenní GluN1 podjednotky jsme v cílové sekvenci GluN1 podjednotky po směru H1 promotoru vložili 20 kódujících nukleotidů (gac cgg aag ttt gcc aac

ta, včetně krátké smyčky AAGCTT) a 20 nekódujících nukleotidů (Alvarez et al., 2007). Tzv. tiché mutace (sekvence gac cgC aaA ttC ggC aac ta; mutované nukleotidy jsou označeny velkými písmeny) jsme pomocí PCR reakce vložili do YFP-GluN1-1a podjednotky, nebo do konstruktů s mutovanými *N*-glykosylačními místy. Pro zachování mutace N350Q v GluN1-1a-10N→10Q podjednotce jsme použili primer se sekvencí gac cgC aaA ttC gcG CAA ta. Následně jsme YFP-GluN1-1a podjednotku (nebo cDNA pro tiché mutace u konstruktů s mutovanými *N*-glykosylačními místy) pod kontrolou Ub promotoru (Zheng et al., 2015) vložili do lentivirového vektoru FHUGW (pH1-GluN1::shRNA-pUb-YFP-GluN1). V rámci dané práce jsme použili následující lentivirové vektory: kontrola::GFP (GFP), GluN1-KD::GFP (GluN1-KD), GluN1-KD::YFP-rGluN1-1a (rGluN1), GluN1-KD::YFP-rGluN1-1a-N203Q-N368Q (rGluN1-N203Q-N368Q) a GluN1-KD::YFP-rGluN1-1a-10N→10Q (rGluN1-10N→10Q); KD - knockdown, r - shRNA resistantní.

Lentivirové partikule jsme vyrobili dle protokolu výrobce pomocí kotransfekce virového glykoproteinu Δ8.9 a lentivirového vektoru do HEK293 buněk za použití XtremeGENE HD (Roche). Po 12 h inkubace jsme původní médium vyměnili za neurobazální médium (Life Technologies, CA, USA) obsahující 2 mM L-glutamin a 1x ITS (5 μg/ml transferin a 5 ng/ml seleničitan sodný). Buněčný supernatant obsahující lentivirové partikule jsme 36 h po inkubaci odsáli a centrifugovali ve vychlazené centrifuze při otáčkách 1800g po dobu 15 min. Supernatant jsme poté rozplnili do mikrozkuvek se zámečkem a uskladnili do -80 °C.

3.3 Roztoky a chemikálie

Pokud není uvedeno jinak, použité roztoky a chemické látky jsme získali od firmy Sigma Aldrich (MO, USA).

Molekulární biologie

Agarové plotny jsme připravovali následovně: do 300 ml destilované vody jsme přidali 12 g agaru (Serva, Heidelberg, Německo) a 15 min autoklávovali při teplotě 121 °C. Poté jsme agar ve vodní lázni zchladili na 50°C, přidali ampicilin (100 μg/1 ml agaru) a nalili na Petriho misky.

LB médium jsme připravili smícháním 3 g peptonu (Serva), 1,5 g kvasničného extraktu (Serva), 3 g NaCl a doplnili do 300 ml destilovanou vodou a médium jsme autoklávovali při teplotě 121°C po dobu 15 min. Ampicilin (100 μg/1 ml) jsme přidávali

bezprostředně před použitím.

Buněčné kultury

Disekční roztok (100 ml) – 1 ml 1M HEPES, 10 ml 10× HBSS a 89 ml sterilní H₂O.

Kultivační roztok (500 ml) – v EMEM (z angl. Eagle's minimal essential medium; Life Technologies) jsme rozpustili 825 mg KCl a zfiltrovali; sterilně jsme přidali 10 mg gentamycinu (Life Technologies), 50 ml 10% FTS (fetální telecí sérum; Kysilka Michal, Brno), 5 ml 200mM L-glutaminu (Life Technologies) a 10 ml neuronálního suplementa B27 (Life Technologies).

DMEM (z angl. Dulbecco's modified Eagle medium; Life Technologies).

Opti MEM (Life Technologies)

PBS (z angl. phosphate buffer saline) – 138 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,4 mM KH₂PO₄ (pH 7.3); 7,8 mM Na₂HPO₄.12H₂O.

Trypsin – 0,05% trypsin v PBS (pH 7.3).

Denaturační roztok (na 1 jamku) – 88 µl H₂O; 10 µl 10x koncentrovaného denaturačního pufru a 2 µl 50x koncentrovaného inhibitoru proteáz.

Homogenizační roztok – 2,5 ml 1M Tris-HCl (pH 7.5); 100 µl 0,5M EDTA; 50x koncentrovaný inhibitor proteáz, doplněno H₂O do 50 ml.

Imunocytochemické barvení

BSA (z angl. bovine serum albumin; MP medicals, CA, USA) – 0,2% roztok BSA v PBS.

NGS (z angl. normal goat serum, Life Technologies) – 3% a 10% roztok NGS v PBS.

Paraformaldehyd (PFA) – 4% roztok PFA v PBS.

Sacharóza – 2% roztok v 4% roztoku PFA (2 g/100 ml).

Primární protilátka – anti-GFP (Millipore, MA, USA), 1:1000 v BSA.

Sekundární protilátky – Alexa Fluor 488, 555 a 647 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies), 1:1000 v BSA.

Triton X-100 (Serva) – 0,1% a 0,25% roztok v PBS.

Biochemie

Tris-HCl(1M) - 121,14 g Tris (Serva) a 1 l H₂O (pH 6.8).

EDTA - 46,53 g EDTA a 250 ml H₂O (pH 8.0 upraveno pomocí 37 % HCl) a sterilizace přes 20 µm filtr.

Elektrodotový pufr (10x) - 60,6 g Tris, 288 g glycin (Serva), 20 g SDS (dodecylsulfát sodný) a 2 l H₂O.

Elektrodotový pufr (1x) – 200 ml 10x elektrodotového pufru a 1,8 l H₂O.

Blokovací pufr (10x) - 60,6 g Tris, 288 g glycin a 2 l H₂O.

Blokovací pufr (1x) – 200 ml 10x blokovacího pufru, 400 ml methanolu (Penta) a 1,4 l H₂O (udržováno v chladu).

TBS (10x) - 48,46 g Tris, 175,32 g NaCl a 2 l H₂O (pH 7.5 upraveno pomocí HCl).

TBST (1x) - 200 ml 10x TBS, 2 ml Tweenu (Serva) a 1,8 l H₂O.

SDS (20%) – 20 g SDS a 100 ml H₂O.

Vzorkovací pufr (4x; 20 ml) – 4 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8); 1,6 g SDS; 8 ml 100% glycerolu; 0,8 ml 14,7M β-merkaptóethanolu; 2 ml 0,5M EDTA a 16 mg bromphenolové modři.

7% rozdělovací gel (10 ml) - 5,1 ml H₂O; 2,3 ml akrylamidu; 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 6.8); 50 µl 20% SDS; 50 µl 10% amonium persulfát (APS) (100 mg/1 ml H₂O) a 5 µl TEMED.

5% rozdělovací gel (10 ml) – 5,7 ml H₂O; 1,7 ml akrylamidu; 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 50 µl 20% SDS; 50 µl 10% APS a 5 µl TEMED.

4% zaostřovací gel (10 ml) - 6,1 ml H₂O; 1,3 ml akrylamidu; 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8.8); 50 µl 20% SDS; 50 µl 10% APS; a 10 µl TEMED.

Elektrofyzologie

Extracelulární roztok bez Mg²⁺- 160mM NaCl; 2,5mM KCl; 1mM D-glukóza; 10mM HEPES; 700µM CaCl₂.2H₂O; 200µM EDTA; 0,5% fenolová červeň; doplněno destilovanou H₂O, pH upraveno na 7.3 pomocí NaOH a zfiltrováno.

Extracelulární roztok s Mg²⁺- 160mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM D-glukóza; 10mM

HEPES; 2mM CaCl₂.2H₂O; 1mM MgCl₂.6H₂O; doplněno destilovanou H₂O (pH = 7.3 upraveno pomocí NaOH) a zfiltrováno.

Intracelulární roztok – 120mM CsMeSO₃; 15mM CsCl; 10mM BAPTA; 10mM HEPES; 1mM CaCl₂.2H₂O; 3mM MgCl₂.6H₂O; doplněno destilovanou H₂O (pH = 7.2 upraveno pomocí CsOH); necháno přes noc pufrovat, druhý den přidána 2mM ATP-Mg sůl; dopufrováno a zfiltrováno.

Zásobní roztoky NMDA, glutamátu a glycinu jsme připravili rozpuštěním v destilované H₂O.

Zásobný roztok MK-801 (Tocris) – rozpuštěno v dimethyl sulfoxidu.

Zásobný roztok PNGázy F – 1mM MgCl₂ a 0,1mM CaCl₂ v PBS.

Zásobní roztoky lektinů – rozpuštěny dle protokolu výrobce (Vector laboratories) a následně ředěny na konečnou koncentraci 20 nebo 200 µg/ml v PBS obsahujícím 1mM MgCl₂ a 0,1mM CaCl₂.

3.4 Příprava, kultivace a transfekce vybraných buněčných linií

Transfekce COS-7 buněk

Plazmidy jednotlivých GluN podjednotek jsme do COS-7 buněk narostlých na kultivačních 12-ti jamkových destičkách s vloženými sklíčky pokrytými poly-L-lyzínem vnášeli pomocí transfekčního činidla LipofectaminTM2000 (Life Technologies). Před začátkem transfekce jsme buňkám vyměnili původní médium za 1 ml Opti-MEM (37°C; Life Technologies). V případě mikroskopie jsme si v jedné mikroskopické nádobě namíchali transfekční směs složenou z 25 µl Opti-MEM a 0,45 µg cDNA. V druhé mikroskopické nádobě jsme do 25 µl Opti-MEM přidali 1 µl Lipofectaminu. Pro kvantitativní analýzu jsme si v jedné mikroskopické nádobě namíchali transfekční směs složenou ze 150 µl Opti-MEM a 1,8 µg cDNA. V druhé jsme smíchali 150 µl Opti-MEM se 4 µl Lipofectaminu. Takto připravenou transfekční směs jsme při pokojové teplotě inkubovali 5 min. Následně jsme obsah obou mikroskopických nádob pečlivě promíchali, a při pokojové teplotě inkubovali dalších 20 min. Poté jsme transfekční směs přidali ke COS-7 buňkám na jamičce a nechali v inkubátoru (5% CO₂ a 37 °C) 5 h inkubovat. Podle počtu transfekovaných jamiček (2 ml/jamička) jsme si připravili kultivační médium (5% FTS v MEM) obsahující 197 µg APV, 1 µg

ketamin, 20 μ l 1M MgCl₂, 567 μ g kyseliny kynurenovou a antibiotikum (100 μ g penicilin a 100 μ g streptomycin)/1 ml média. Po 5 h inkubace jsme transfekční směs odsáli a nahradili kultivačním médiem. Pro experimenty byly COS-7 buňky použity 24 h po transfekci.

Kultivace COS-7 buněk

Pro naše experimenty jsme si zvolili heterologní buněčnou linii COS-7 buněk pocházejících z opičích ledvinných fibroblastů. Tyto buňky, na rozdíl od neuronů, přirozeně neexprimují glutamátové receptory, proto se běžně používají pro jejich studium. COS-7 buňky jsme udržovali pravidelným pasážováním, které začíná odsátím média, následuje opláchnutí v PBS, inkubace s trypsinem po dobu 2 min, disociace v novém kultivačním médiu a nasazení buněk do nových lahviček. Buňky byly pěstovány v plastových lahvičkách o objemu 25ml nebo 75ml, podle potřeby. Takto kultivované buňky jsme 1-2 dny před transfekcí nasadili na 12-ti jamkové kultivační destičky. COS-7 buňky jsme kultivovali při teplotě 37 °C, 5% koncentraci CO₂ a absolutní vlhkosti v inkubátoru SANYO MCO-18AIC (SANYO E&E Europe BV).

Kultivace HEK293 buněk

HEK293 buňky byly kultivovány v kultivačním médiu Opti-MEM obohaceném o 5% FTS a pravidelně pasážovány. Buňky jsme pěstovali v kultivačních lahvičkách s různými objemy, dle potřeby. HEK293 buňky jsme kultivovali při teplotě 37 °C, 5% koncentraci CO₂ a absolutní vlhkosti v inkubátoru.

Transfekce HEK293 buněk

Plazmidy jednotlivých GluN podjednotek jsme pro biochemické experimenty vnašeli do HEK293 buněk narostlých v kultivačních lahvičkách pomocí transfekčního činidla LipofectaminTM2000 a v případě elektrofyziologických experimentů jsme transfekovali HEK293 buňky narostlé na 24 jamkových destičkách pomocí činidla Matra A (IBA, Goettingen, Německo). Pro biochemické experimenty jsme před začátkem transfekce ve vodní lázni (37 °C) nechali ohřát PBS, Trypsin (0,04 %) a Opti-MEM a v inkubátoru předeřhřáli 6-ti jamkové destičky pokryté poly-L-lysinem. Na začátku transfekce jsme do každé jamky přidali 250 μ l ohřátého Opti-MEM a 1,5 μ g cDNA. Zvláště v mikrozkuhavce jsme si namíchali směs 250 μ l Opti-MEM s 3,75 μ l Lipofectaminu a nechali 5 min inkubovat při pokojové teplotě. Následně jsme směs Opti-MEM/Lipofectamin přidali

k transfekční směsi v jamičce, řádně promíchali a inkubovali 20 min při pokojové teplotě. Z HEK293 buněk v kultivačních lahvičkách jsme odsáli kultivační médium a buňky opláchli ohřátým PBS. Poté jsme do lahvičky přidali ohřátý trypsin a nechali inkubovat přibližně 2 min v inkubátoru, než se buňky uvolnily ze dna lahvičky. Následně jsme do lahvičky přidali kultivační médium Opti-MEM s 5% FTS (obohacené o 197 µg APV, 1 µg ketamin, 20 µl 1M MgCl₂, 567 µg kyseliny kynurenovou a antibiotikum (100 µg penicilin a 100 µg streptomycin)/1 ml média). Buňky jsme pečlivě rozsuspendovali a do každé jamičky na 6-ti jamkové destičce přidali 1,5 ml buněčné suspenze. Poté jsme transfekované HEK293 buňky nechali 24 h inkubovat v inkubátoru (37 °C a 5% CO₂).

Pro elektrofyzilogická měření jsme do HEK293 buněk narostlých v 24 jamkových destičkách vnášeli plazmidy jednotlivých GluN podjednotek pomocí transfekčního činidla Matra-A. Na začátku transfekce jsme si ve vodní lázni (37 °C) nechali ohřát PBS a Trypsin (0,04 %). Následně jsme do mikrozkušavek přidali 50 µl Opti-MEM, 0,9 µg cDNA (350 µg GluN1, 350 µg GluN2 a 200 µg eGFP) a 0,9 µl Matra-A. Transfekční směs jsme jemně promíchali a nechali stát při pokojové teplotě 20 min. Mezitím jsme si do lahvičky připravili kultivační médium složené z 2 ml Opti-MEM, 0,2 ml APV, 20 µl FTS a 40 µl 1M MgCl₂/jamičku a nechali temperovat v inkubátoru (37 °C a 5% CO₂). Poté jsme transfekční směs přidali na buňky a vložili na 15-25 min na neodymový magnet do inkubátoru. Následně jsme z buněk odsáli transfekční směs, opláchli 0,5 ml PBS, přidali 2-3 kapky ohřátého trypsinu, vložili na 1-2 min zpátky do inkubátoru. Poté jsme na každou jamičku přidali 0,7 ml připraveného kultivačního média a buňky pečlivě a jemně rozsuspendovali. Na kultivační mističku s vloženým sklíčkem pokrytím kolagenem a poly-L-lysinem jsme podle potřeby přidali 2-3 kapky buněčné suspenze do 1,5 ml kultivačního média a ponechali na 22-24 h v inkubátoru (37 °C a 5% CO₂).

Příprava buněčného lyzátu z HEK293 buněk

Před přípravou buněčného lyzátu jsme předchladili centrifugu na 4°C a na ledu vychladili PBS, mikrozkušavky a denaturační roztok, 6-ti jamková platíčka s transfekovanými HEK293 buňkami jsme přenesli na led, odsáli kultivační médium a opatrně opláchli vychlazeným PBS. Poté jsme do každé jamky přidali 0,5 ml PBS, buňky důkladně vyškrábali škrabkou a přenesli do vychlazených mikrozkušavek. Jamky jsme vypláchli dalším přidáním PBS a suspenzi přidali do mikrozkušavek. Buněčnou suspenzi jsme centrifugovali 3-5 min při 4 °C a otáčkách 1500g. Poté jsme odsáli supernatant a k peletce přidali 100 µl vychlazeného denaturačního roztoku. Poté jsme peletky po dobu

15 s důkladně sonikovali a krátce při pokojové teplotě centrifugovali. Buněčný lyzát jsme 10 min povařili při 99 °C a uskladnili do -20 °C.

Kultivace a příprava CGC kultur

Nejprve jsme do Petriho misek s průměrem 4 mm přidali 4 ml disekčního roztoku (na ledu). Z 6-8 denních potkanů kmene WISTAR jsme vypreparovali mozeček a očistili ho od mozkových cév a plen. V laminárním boxu za sterilních podmínek jsme mozečky přemístili na Petriho misku (35 mm) a lihem opálenou žiletkou nasekali mozečky v různých úhlech. Následně jsme na ledu k mozečkům přidali vychlazený disekční roztok (10 ml), přemístili jej do plastové zkumavky (50 ml) a centrifugovali 1 min při 4°C a otáčkách 200g. K peletě jsme následně přidali 5 ml roztoku, obsahujícího 4,5 ml disekčního roztoku a 0,5 ml trypsinu. Buněčnou suspenzi jsme za občasného míchání resuspendovali a inkubovali 15 min při 37 °C. Poté jsme k buněčné suspenzi přidali 15 ml vychlazeného kultivačního média a centrifugovali 7 min při 4 °C a otáčkách 1500g. Supernatant jsme opatrně odsáli a přidali vychlazené kultivační médium (2 ml). Buněčnou suspenzi jsme postupně rozdisociovali pomocí sady skleněných pipet se zmenšujícím se otvorem a centrifugovali 5 min při 4 °C a otáčkách 300g. Po odstranění supernatantu jsme přidali 4 ml ohřátého kultivačního média (37 °C) a buňky rozdisociovali. Do počítací komůrky jsme odebrali 15 µl buněčné suspenze. Na jamku o velikosti 12 mm jsme spolu s 1 ml kultivačního média nasadili přibližně 2 miliony buněk a nechali inkubovat 24 h v inkubátoru (37 °C a 5% CO₂). Následující den jsme buňkám vyměnili kultivační médium za nové.

Transfekce CGC kultur

V našich experimentech jsme pro transfekci využívali 5-6 dní staré CGC. Přibližně 1 h před začátkem transfekce jsme při pokojové teplotě nechali temperovat HEPES pufr (HBS), sterilní vodu, 2M roztok transfekčního činidla CalPhos a cDNA. Část EMEM média (cca 2 ml na jamku) jsme si předehřáli v inkubátoru s 5% CO₂ (37°C) a část (cca 0,5 ml na jamku) v inkubátoru s 10% CO₂ (37°C). Do transfekční směsi jsme si připravili 1,8 µl 2M roztoku CalPhos, 3 µg cDNA a doplnili sterilní vodou do celkového objemu 15 µl. Na každou jamku jsme použili 15 µl HBS. K roztoku HBS jsme za stálého vortexování (1400 otáček) pomalu přikapávali směs cDNA/CalPhos, a takto připravenou transfekční směs jsme inkubovali 25 min v laminárním boxu. Mezitím jsme z neuronů

odsáli stávající kultivační médium a odložili jej do inkubátoru (5% CO₂). Následně jsme každou jamičku s neurony opláchli 0,5 ml EMEM média inkubovaného v 5% CO₂ a nahradili ho za 0,5 ml čerstvého kultivačního média. Transfekční směs jsme pomalu přikapali k neuronům na 24 jamkové destičce za stálého třesení a následně inkubovali po dobu 1 h v inkubátoru (37°C a 5% CO₂). Pomocí mikroskopu jsme zkontrolovali, zda na buňkách vznikla sraženina v podobě písku. Poté jsme transfekční směs s kultivačním/EMEM médiem odsáli, přidali 0,5 ml EMEM média (10% CO₂) na jamku a inkubovali dalších 20 min v inkubátoru při 37°C a 5% CO₂, aby se vzniklá sraženina rozpustila. Následně jsme neurony dvakrát opláchli pomocí EMEM média (5% CO₂) a přidali na jamičku 0,5 ml kultivačního média odloženého na začátku transfekce.

Kultivace a příprava primárních kultur hipokampálních neuronů

Primární kultury hipokampálních neuronů jsme připravovali z 18-ti denních embryí potkanů kmene Sprague-Dawley. Fetální potkaní hipokampy jsme izolovali ve vychlazeném disekčním médiu, složeném z HBSS média (z angl. Hank's balanced salt solution), 10mM roztoku HEPES (pH 7.4) a obohaceném o kombinaci antibiotik penicilin-streptomycin (Life Technologies). Odebranou tkáň jsme inkubovali po dobu 12 min při teplotě 37 °C v inkubačním roztoku složeném z disekčního média, roztoku DNAázy I (0,1 mg/ml; New England Biolabs) a 0,05% roztoku trypsinu (Sigma Aldrich). Neurony jsme třikrát opláchli inkubačním roztokem a opatrně rozdisociovali opálenou skleněnou pipetou. Disociované neurony jsme 3 min centrifugovali při 4 °C a otáčkách 900G a vzniklou peletu následně rozsuspendovali v kultivačním médiu, obsahujícím neurobazální médium bez séra, suplement B-27 a L-glutamin (Life Technologies). Poté jsme neurony v koncentraci přibližně 2·10⁴ buněk/cm² nasadili na misky potažené poly-D-lyzinem. Neuronům jsme každé 2-3 dny vyměňovali kultivační médium za čerstvé.

Transfekce primárních kultur hipokampálních neuronů

Plazmidy kódující jednotlivé GluN podjednotky jsme do hipokampálních neuronů na 24 jamkových destičkách vnášeli pomocí transfekčního činidla LipofectaminTM2000 (Life Technologies). Před transfekcí jsme ve vodní lázni (37 °C) ohřáli Opti-MEM medium. Do jedné mikrozkušavky jsme přidali 12,5 µl ohřátého Opti-MEM a 0,75 µg cDNA. Do druhé mikrozkušavky jsme smíchali 12,5 µl Opti-MEM s 0,5 µl Lipofectaminu (na jamku) a nechali 5 min inkubovat při pokojové teplotě. Následně jsme

směs Opti-MEM/Lipofectamin přidali k cDNA směsi v mikrozkušavkách, pečlivě promíchali a inkubovali 20 min při pokojové teplotě. Následně jsme transfekční směs přidali k hipokampálním neuronům a podle potřeby nechali inkubovat 48-72 h (v případě mikroskopických experimentů) a/nebo 6-8 dní (v případě elektrofyziologických experimentů) v inkubátoru (5% CO₂ a 37 °C).

Příprava mozečkových a kortexových lyzátů

Pro přípravu lyzátů jsme používali mozečky a kortexy z 5-8 dní starých a dospělých potkanů. V obou případech byl postup přípravy shodný. Odebrali jsme mozečky nebo kortexy a umístili je do předem zvážených a vychlazených flakonek na suchém ledu. Vzorky a nástroje jsme neustále udržovali na ledu, aby nedocházelo k štěpení proteinů. K odebrané tkáni jsme přidali 15 ml homogenizačního roztoku a směs zhomogenizovali. Suspenzi jsme přesunuli do mikrozkušavek (1,5 ml) a 30 min centrifugovali při 30 000 otáčkách v předem vychlazené centrifuze (4 °C). Poté jsme odstranili supernatant a peletku rozpustili v homogenizačním roztoku (1 ml). Suspenzi ze všech mikrozkušavek jsme spojili do jedné flakonky, podle váhy doplnili homogenizačním roztokem na patřičný objem (1,6 ml homogenizačního roztoku na 100 mg tkáně) a sonikovali. Následně jsme k suspenzi přidali deoxycholát sodný (1,8 ml na 16 ml suspenze) a 45 min inkubovali ve vodní lázni (37 °C). Falconku se suspenzí jsme každých 10 min promísili. Po inkubaci jsme k suspenzi přidali 10% Triton-X 100 (TX-100; 1,8 ml na 16 ml suspenze) o finální koncentraci 1% a zamíchali. Poté jsme suspenzi přesunuli do malých mikrozkušavek a 30 min centrifugovali při 30 000 otáčkách na předchlazené centrifuze (4 °C). Supernatant jsme odsáli, přesunuli do nové mikrozkušavky a skladovali při -80 °C.

3.5 Použité metody

Imunofluorescenční mikroskopie

Povrchovou expresi NMDA receptorů jsme v jednotlivých buněčných typech studovali metodou imunocytochemického značení pomocí protilátek. V případě COS-7 buněk jsme použili povrchové značení, zatímco v případě hipokampálních a mozečkových granulárních neuronů jsme z důvodu slabého GFP signálu využili kombinací povrchového a celkového značení.

Povrchové značení NMDA receptorů v COS-7 buňkách

Povrchové NMDA receptory jsme značili 22-24 h po skončení transfekce. Před začátkem značení jsme si připravili BSA roztok (0,02 g BSA v 10ml PBS), který jsme používali jako základ pro všechny roztoky během značení. Připravili jsme si roztoky s primární anti-GFP protilátkou (1:1000) a sekundární Alexa Fluor 555 protilátkou (1:1000). Buňky a roztoky jsme po celou dobu imunocytochemického značení udržovali na ledu, abychom zabránili značeným receptorům internalizovat. Na začátku značení jsme přemístili sklíčka s transfekovanými COS-7 buňkami na plastovou desku potaženou parafilmem do předem připravených kapek vychlazeného PBS roztoku. Poté jsme PBS roztok odsáli, buňky omyli vychlazeným BSA roztokem a 10 min inkubovali. BSA roztok jsme následně odsáli, k buňkám přidali vychlazený roztok s primární protilátkou (200 μ l/sklíčko) a nechali 30 min inkubovat. Poté jsme odsáli roztok s primární protilátkou, buňky dvakrát po dobu 2 min omyli vychlazeným BSA roztokem, přidali připravený roztok se sekundární protilátkou (200 μ l/sklíčko) a inkubovali dalších 30 min. Buňky jsme poté třikrát po dobu 2 min omyli vychlazeným PBS roztokem a 20 min fixovali v 4% PFA v PBS. Následně jsme buňky ještě třikrát omyli PBS roztokem a sklíčka plochou s buňkami vložili do zalévacího média ProLong Antifade (Life Technologies), umístěném na podložních sklíčkách. Podložní sklíčka se značenými buňkami jsme uchovávali v lednici.

Mikroskopické snímky jsme získávali pomocí systému Cell[^]R (Olympus), který se skládá z digitální kamery Hamamatsu Orca ER (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japonsko), invertovaného mikroskopu IX81 (Olympus), monochromátoru Polychrome V (Till Photonics, Gräfelfing, Německo) a adaptéru DualView (Optical Insights, NM, USA) pro poměrové zobrazování ve dvou různých vlnových délkách. Jednotlivé optické řezy jsme snímali v Z-ose ve vzdálenosti 0,1 μ m. NMDA receptory jsme vizualizovali prostřednictvím excitace zeleného signálu (celkový) při vlnové délce 475 ± 10 nm (emise při vlnových délkách >510 nm) a excitace červeného signálu (povrchový) při vlnové délce 555 ± 10 nm (emise při vlnových délkách >570 nm).

Povrchové a celkové značení NMDA receptorů v hipokampálních a mozečkových granulárních neuronech

Na plastovou desku potaženou parafilmem jsme opatrně přenesli sklíčka s neurony a dvakrát je omyli PBS roztokem. K neuronům jsme přidali 10% BSA roztok a nechali 10 min inkubovat. Následně jsme BSA roztok odsáli a na 20 min přidali primární králičí anti-GFP protilátku (1:1000) v 3% BSA roztoku (100 μ l/sklíčko). Roztok s primární protilátkou jsme po inkubaci odebrali zpátky do zkumavky a neurony ještě dvakrát po dobu 2 min omyli PBS roztokem. Poté jsme neurony 20 min inkubovali se sekundární králičí Alexa Fluor 647 protilátkou (1:1000) v 3% BSA roztoku. Neurony jsme třikrát po dobu 2 min omyli PBS roztokem a následně 20 min fixovali v 4% PFA a 2% sacharóze v PBS. Poté jsme neurony třikrát omyli PBS roztokem a nechali 5 min inkubovat s 0,25% TX-100 roztokem, aby došlo k permeabilizaci buněčné membrány. Následně jsme 0,25% TX-100 roztok odsáli, přidali 0,1% TX-100 roztok v 10% BSA a nechali 30 min inkubovat. Po permeabilizaci jsme neurony nechali 1 h inkubovat s primární protilátkou v 3% BSA a 0,1% TX-100. Neurony jsme poté třikrát po dobu 5 min omyli PBS roztokem a 30 min inkubovali se sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 (1:1000) v 3% BSA a 0,1% TX-100. Na závěr jsme neurony ještě třikrát po dobu 5 min omyli PBS roztokem a sklíčka přemístili do zalévacího média ProLong Antifade na podložních sklíčkách. Kombinované značení obou typů neuronů probíhalo při pokojové teplotě za stejných experimentálních podmínek.

Mikroskopické snímky jsme získávali za použití konfokálního mikroskopu Leica TCS SPE a Leica DM 2500 CSQ V-VIS. Jednotlivé optické řezy byly snímány v rámci Z-osy ve vzdálenosti 0,38 μ m. Pro naše experimenty jsme používali apochromatický objektiv se zvětšením x63/1.30 s imerzním olejem a lasery využívající pevné látky s excitací zeleného signálu při 488 nm (emise při 500-600 nm) a excitací červeného signálu při 635 nm (emise při 650-700 nm).

Internalizační esej pro NMDA receptory

Pro povrchové značení NMDA receptorů jsme využili živé buňky, které jsme 22-24 h po transfekci opláchli v PBS roztoku a 30 min inkubovali na ledu s primární králičí anti-GFP protilátkou. Poté jsme buňky opláchli v PBS roztoku a sklíčka s neurony vrátili na 30 min zpět do kultivačního média v termostatu (37 °C). Následně jsme buňky opět opláchli v PBS roztoku a 30 min inkubovali na ledu s neznačenou sekundární králičí protilátkou (Invitrogen). Poté jsme buňky 20 min fixovali v 4% PFA, třikrát opláchli v PBS

roztoku a 5 min inkubovali s 0,25% TX-100 roztokem. Následně jsme 0,25% TX-100 roztok odsáli a buňky 30 min inkubovali v roztoku 10% BSA s 0,1% TX-100. Poté jsme roztok odsáli a buňky 1 h inkubovali v roztoku 3% BSA, 0,1% TX-100 a sekundární protilátky. Poté jsme buňky opět třikrát po dobu 5 min opláchli v PBS roztoku a sklíčka stranou s buňkami přemístili do zalévacího média. Pro detekci povrchových a celkových NMDA receptorů jsme v případě COS-7 buněk použili fluorescenční mikroskop Olympus a v případě CGC kultur konfokální mikroskop Leica SPE.

Kolokalizační esej pro NMDA receptory

Po vyjmutí sklíček z jamek jsme COS-7 buňky dvakrát opláchli v PBS roztoku a 20 min fixovali v 4% PFA. Poté jsme buňky třikrát opláchli v PBS roztoku a 5 min permeabilizovali pomocí 0,25% TX-100 roztoku. Následně jsme buňky 1 h inkubovali v roztoku 0,2% BSA s 0,1% TX-100. Poté jsme buňky 1 h inkubovali v roztoku 0,2% BSA, 0,1% TX-100, primární králičí anti-GFP protilátky a primární myší anti-PDI protilátky (1:200; Abcam, Cambridge, UK; značí ER) nebo primární myší anti-58K protilátky (1:200; Abcam; značí GA). Buňky jsme čtyřikrát po dobu 5 min opláchli v PBS roztoku a 30 min inkubovali v roztoku 0,2% BSA, 0,1% TX-100, sekundární myší protilátky Alexa Fluor 647 a sekundární králičí protilátky Alexa Fluor 488. Poté jsme buňky čtyřikrát po dobu 5 min opláchli v PBS roztoku a sklíčka stranou s buňkami vložili do zalévacího média ProLong Antifade.

Kolorimetrická analýza povrchové a celkové exprese

COS-7 buňky kultivované na 12-ti jamkových destičkách jsme 22-24 h po transfekci třikrát omyli v PBS roztoku a 15 min fixovali v 4% PFA v PBS. Poté jsme buňky 1 h inkubovali v 10% BSA roztoku v PBS, v případě celkového barvení jsme přidali ještě 0,1% TX-100 roztok. Následně jsme buňky 1h inkubovali v roztoku s primární anti-GFP protilátkou a 3% BSA v PBS (Horak and Wenthold, 2009). Poté jsme buňky omyli v PBS a 1h inkubovali s křenovou peroxidázou navázanou na anti-IgG protilátku. Následně jsme buňky omyli v PBS roztoku a 30 min inkubovali ve fosfát-citrátovém pufru, obsahujícím ortho-fenylendiamin a fosforečnan sodný (Sigma). Peroxidační reakci jsme ukončili pomocí inkubace v 3M HCl. Optickou denzitu jsme měřili při vlnové délce 492 nm použitím přístroje Personal Densitometer SI (Molecular Dynamics, CA, USA).

SDS - elektroforéza

Podle návodu jsme připravili 7% rozdělovací gel, nalili ho mezi skla, převrstvili deionizovanou vodou a nechali 45 min polymerizovat. Po zatuhnutí gelu jsme deionizovanou vodu odsáli pomocí filtračního papíru, dle návodu jsme připravili 4% zaostřovací gel, promíchali ho a rychle nalili mezi skla. Do zaostřovacího gelu jsme vložili hřebínky pro vytvoření 10 nebo 15 jamiček a nechali 15 min polymerizovat. Skla s gely jsme opatrně vyjmuli z držáku a přemístili do elektroforetické vany. Do prostoru mezi skly s gely a do celé vany jsme nalili 1x koncentrovaný elektrodoový pufr. Připravili jsme si vzorky buněčných lyzátů, které jsme po vyjmutí z mrazáku vortexovali, centrifugovali a povařili po dobu 5 min při 90 °C. Před nanesením na gel jsme vzorky znovu centrifugovali. Do první jamičky jsme nanесли molekulárního markr (8 µl) a do dalších jamiček připravené vzorky ve vzorkovacím pufru (15 µl). Elektroforetickou vanu jsme přikryli víkem, připojili ke zdroji napětí (100 V) a vzorky nechali putovat v gelu po dobu 60-180 min, podle velikosti proteinů.

Western blot

„Blotování“ je proces, při kterém působením elektrického proudu dochází k přenosu elektroforézou rozdělených proteinů z gelu na polyvinylidénovou membránu. Po skončení elektroforézy jsme opatrně vyjmuli skla s gely z elektroforetické vany a gely opatrně přemístili na polyvinylidénovou membránu tak, aby nedošlo k jejich poškození. Membrány jsme přemístili do blotovací apartury s vychlazeným blokovacím roztokem, připraveným dle návodu. Blotování probíhalo po dobu 180 min při 4°C za konstantního napětí 60 V.

Po skončení blotování jsme membrány přemístili do malých nádobek, dvakrát opláchli v TBST pufru a 1 h nechali inkubovat v blokovacím pufru (5 g sušeného mléka s 1,3 % tuku/100ml TBST pufru). Poté jsme si namíchali roztok s primární protilátkou a nechali 1 h inkubovat s membránami. Membrány jsme poté třikrát po dobu 10 min opláchli v TBST pufru. Namíchali jsme si roztok se sekundární protilátkou a nechali 1 h inkubovat s membránami. Poté, jsme membrány pětkrát po dobu 5 min opláchli v TBST pufru. V temné místnosti jsme membrány 1 min inkubovali v roztoku Super Femto Signal (Thermo Scientific, MA, USA) a následně vyvolali na film.

Deglykosylační a lektinová analýza

Deglykosylaci NMDA receptorů jsme prováděli na mozečkových lyzátech, připravených z mladých (5-8 dní starých) a dospělých potkanů. Při těchto experimentech jsme denaturovali 10 µg celkového proteinu v denaturačním roztoku (New England Biolabs) po dobu 10 min při 100 °C. Do štěpící reakce s endoglykosidázou H (endo H) jsme přidali 10x koncentrovaný G5 reakční pufr a 1000 jednotek enzymu. Do štěpící reakce s Peptid-*N*-glykosydázou F (PNGázou F) jsme přidali 10x koncentrovaný G7 pufr, 10% (v/v) Nonidet P-40 a 500 jednotek enzymu. Vzorky jsme inkubovali 2 h při 37 °C. Jako negativní kontrolu jsme použili vzorky bez přítomnosti konkrétního enzymu.

Pro experimenty s biotinylovanými lektiny jsme použili mozečkové lyzáty z 5-8 dní starých potkanů. Tyto lyzáty jsme solubilizovali 30 min při 37 °C v roztoku s 1% (w/v) deoxycholátem sodným, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 7.3) a inhibitory proteáz (Roche). Poté jsme lyzáty 30 min centrifugovali při 4 °C a otáčkách 30 000 g. Mozečkový lyzáty (800 µg celkového proteinu) jsme přes noc při 4 °C za současné rotace inkubovali s biotinylovanými lektiny (v celkovém objemu 40 µl). Vzorky jsme poté při pokojové teplotě 2 h inkubovali s 40 µl agarosových kuliček s navázaným streptavidinem. Jako negativní kontrolu jsme použili vzorek, který byl inkubován s agarosovými kuličkami se streptavidinem bez přidaného lektinu. Vzorky jsme poté třikrát opláchli omývacím pufrům (0,1% TX-100 (w/v) v TBS (pH 7.4) s inhibitory proteáz) a 3 min povařili při 80 °C v 2x koncentrovaném SDS pufru (25 µl/vzorek). Proteiny jsme separovali v rozdělovacím gelu (7 %), přenesli na polyvinylidendifluoridovou membránu (PVDF) a inkubovali s následujícími primárními protilátkami: myší anti-GluN1 (1:1000; klon 54.2; z kolekce Dr. Wentholda, NIDCD/NIH), myší anti-GluN2B (1:500; Neuromab) a králičí anti-GFP (1:1000; Merck Millipore). PVDF membrány jsme inkubovali s příslušnou myší (1:10 000) a/nebo králičí (1:5000) křenovou peroxidázou (Amersham). Signál jsme detekovali z BioMax MR rentgenových snímků (Estman Kodak) pomocí chemiluminiscence.

Elektrofyzilogická měření

Elektrofyzilogická měření proudových odpovědí NMDA receptorů exprimovaných v neuronech nebo HEK293 buňkách jsme prováděli metodou terčíkového zámku v konfiguraci snímání z celé buňky (anglicky „whole cell patch clamp“) a v režimu napěťového zámku (Hamill et al., 1981). Pro snímání jsme použili aparaturu skládající se ze zesilovače Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) a A/D převodníku

Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Aparatura byla umístěna na antivibrační stůl TMC (Technical Manufacturing Co., MA, USA) do Faradayovy klece. Pro elektrofyziologická snímání jsme používali mikropipety z borosilikátového skla (BioMedical Instrument, Zölnitz, Německo), které byly vytaženy do žádaného průměru na hrotu (odpor cca 4 M Ω) pomocí horizontálního tahače P-1000 (Sutter Instrument, Novato, USA). Abychom propojili intracelulární roztok ve skleněné mikropipetě se vstupem do zesilovače, použili jsme stříbrný drátek potažený vrstvou chloridu stříbrného. Miska s buňkami a extracelulárním roztokem byla pomocí agarového solného můstku elektricky propojena s referenční elektrodou. Elektrofyziologická snímání jsme prováděli na buňkách exprimujících GFP a umístěných samostatně. Experimentální měření probíhalo následovně: pomocí mikromanipulátoru (SD Instruments, OH, USA) jsme skleněnou mikroelektrodu přiblížili k vybrané buňce. Kontaktem mikroelektrody s membránou buňky došlo ke zvýšení odporu mikroelektrody. Vytvořením mírného podtlaku došlo k přilnutí hrotu mikroelektrody k buněčné membráně (anglicky „gigaseal“). Následným silnějším podtlakem se buněčná membrána protrhla a došlo k propojení mikroelektrody s intracelulárním prostředím buňky. Takto je možné při definovaném složení extracelulárního roztoku snímat sumární proudy z celé buňky. Měření jsme prováděli při pokojové teplotě (23-25 °C) a za konstantního membránového potenciálu (-60 mV, pokud není uvedeno jinak). Sériový odpor mikroelektrody a kapacitu buňky, odpovídající její velikosti, jsme u všech buněk kompenzovali z 80-90 %.

Experimentální roztoky jsme na buňky aplikovali pomocí rychlého aplikačního systému, navrženého v naší laboratoři. Tento systém je složený z elektricky ovládaných ventilků, které regulují průtok roztoků přes propojený systém hadiček a kapilár, a umožňuje aplikaci až deseti různých roztoků s časovou konstantou výměny roztoků v okolí buňky přibližně 10 ms.

3.6 Analýza dat a statistika

Pro kontrolu přítomnosti žádané mutace v sekvenované cDNA jsme využívali volně přístupný program BioEdit (Ibis Therapeutics, CA, USA).

Mikroskopické snímky jsme analyzovali pomocí programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Hodnoty intenzity fluorescenčních signálů z povrchové a celkové exprese NMDA receptorů v COS-7 buňkách a CGC kulturách jsme získávali z vybraných oblastí značených buněk. Od těchto hodnot jsme odečetli hodnotu intenzity pozadí. Tímto způsobem

jsme získali průměrnou hodnotu celkového a povrchového signálu, porovnatelnou s ostatními naměřenými buňkami. Analyzovali jsme celkem 3×15 COS-7 buněk ze třech nezávislých pokusů a 2×8 neuronů ze dvou nezávislých pokusů.

V případě internalizační eseje jsme povrchový a celkový GFP signál v COS-7 buňkách analyzovali jako počet pozitivních GFP teček/bodů na vybranou plochu. Analyzovali jsme 3×15 COS-7 buněk ze třech nezávislých pokusů a 2×10 neuronů ze dvou nezávislých pokusů.

V případě hipokampálních neuronů jsme povrchový a celkový YFP signál snímali na segmentech sekundárních a terciárních dendritů, kde jsme analyzovali počet PSD-95 a YFP pozitivních teček/bodů z oblasti o velikosti 10 μm^2 .

V případě kvantitativní analýzy jsme vypočítali průměrnou hodnotu pozadí, povrchového a celkového signálu ze tří různých jamek s buňkami exprimujícími prázdný pcDNA3 vektor. Tyto hodnoty jsme poté odečetli od hodnot získaných z buněk exprimujících různé podjednotky NMDA receptorů. Experiment pro každou kombinaci GluN podjednotek byl proveden ve třech různých jamkách a ve třech nezávislých pokusech. Výsledné hodnoty jsme vyjádřili jako průměr povrchové/celkové exprese a normalizovali vůči průměrným hodnotám, získaným z buněk exprimujících kontrolní kombinaci podjednotek NMDA receptorů.

Intenzitu proteinových bandů/proužků na snímcích z Western blotu jsme kvantifikovali pomocí programu ImageJ a normalizovali vůči hodnotám získaným z příslušných negativních kontrol.

Elektrofyzilogická data jsme analyzovali pomocí programu pClamp 10 (Molecular Devices).

Získaná data jsme statisticky zpracovali (Dunn's test, Studentův t-test, Student-Newman-Keuls test, ANOVA) pomocí programů Sigma Plot 10 a Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific, CA, USA).

4 Výsledky

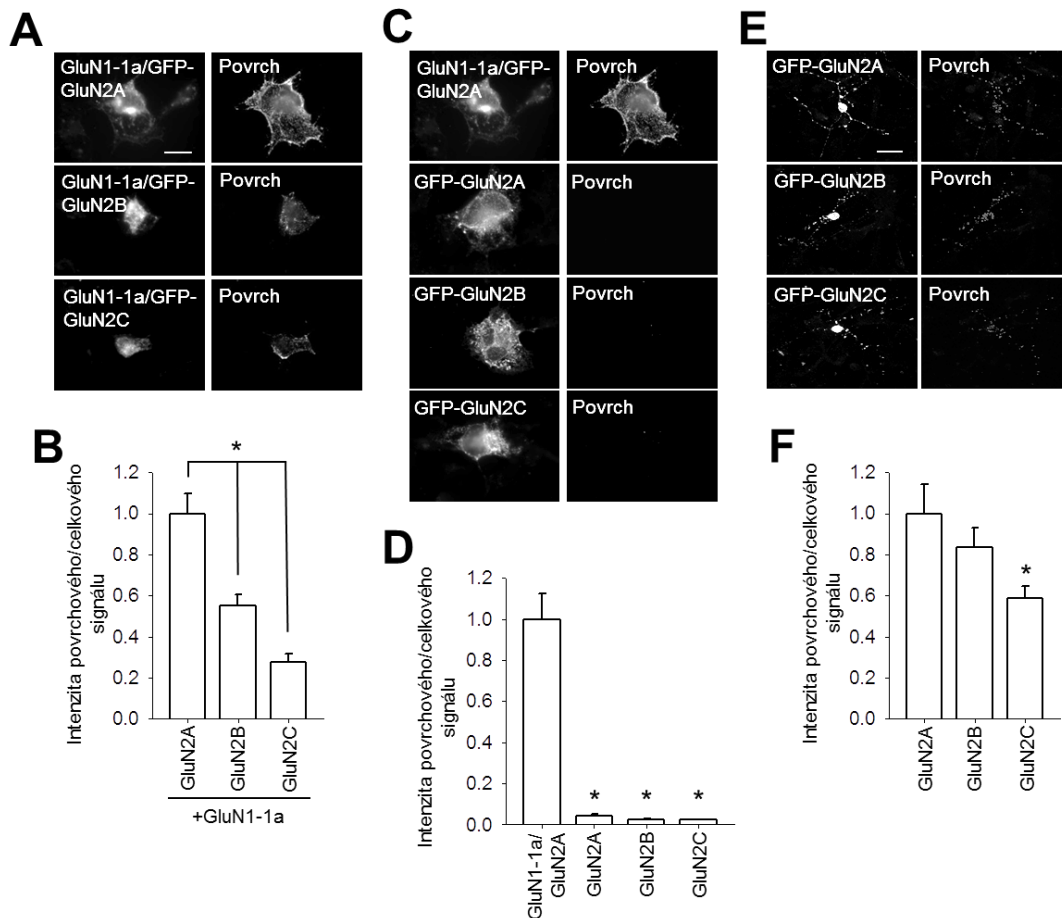
4.1 Specifické typy GluN2 podjednotek ovlivňují povrchovou expresi NMDA receptorů

Molekulární mechanismy regulující časný transport GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů byly detailně zkoumány v mnoha předchozích studiích (Chen et al., 1999; Fukaya et al., 2003; Okabe et al., 1999; Stephenson et al., 2008; Xia et al., 2001). Naproti tomu, mechanismu regulace transportu GluN1-1a/GluN2C receptorů se věnuje pouze několik studií (Chen and Roche, 2009; Chen et al., 2006; Chung et al., 2015) a zůstává z větší části neobjasněn. Z toho důvodu jsme se v první části této dizertační práce zaměřili na studium strukturních determinant GluN podjednotek, jež přispívají k regulaci transportu GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch v savčích heterologních buněčných kulturách a v kultivovaných CGC. CGC přirozeně exprimují GluN2C podjednotku a jsou tedy nejvhodnějším systémem pro studium GluN1/GluN2C receptorů (Prybylowski et al., 2002; Traynelis et al., 2010).

Nejdříve jsme porovnávali povrchovou a celkovou expresi GluN1-1a/GFP-GluN2A, GluN1-1a/GFP-GluN2B a GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách (viz Obr. 5A, B). Zjistili jsme, že povrchová exprese GluN1-1a/GFP-GluN2A receptorů je signifikantně vyšší v porovnání s GluN1-1a/GFP-GluN2B receptory, což je v souladu s předchozími výsledky (Chen et al., 1999). Povrchová exprese GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů byla signifikantně nižší v porovnání s GluN1-1a/GFP-GluN2A a GluN1-1a/GFP-GluN2B receptory, přestože všechny GFP-GluN2 podjednotky vykazovaly podobnou míru celkové exprese (viz Obr. 5A, B). V souladu s předchozí literaturou (Horak et al., 2008; McIlhinney et al., 1998), samostatně exprimované GFP-GluN2A, GFP-GluN2B a GFP-GluN2C podjednotky nebyly na buněčném povrchu lokalizovány (viz Obr. 5C, D).

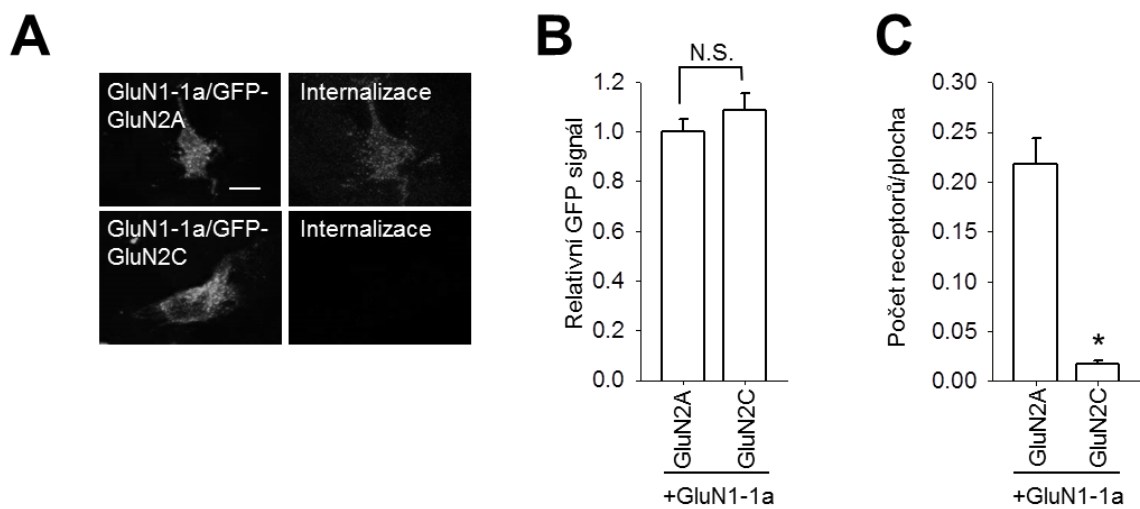
V dalších pokusech jsme zjišťovali, zda i v přirozeném systému CGC bude GluN2C podjednotka vykazovat nižší míru povrchové exprese, v porovnání s GluN2A a GluN2B podjednotkami. CGC kultury jsme transfekovali 5. den jejich kultivace (DIV5) pomocí cDNA vektorů nesoucích GFP-GluN2A-C podjednotky a následně jsme označili celkovou a povrchovou populaci GFP-GluN2 podjednotek pomocí anti-GFP protilátky (DIV7). Tyto pokusy ukázaly, že povrchová exprese GFP-GluN2C podjednotek je signifikantně nižší v porovnání s GFP-GluN2A a GFP-GluN2B podjednotkami, přestože celková exprese jednotlivých GFP-GluN2 podjednotek se statisticky významně nelišila (viz Obr. 5E, F). Tyto

výsledky ukazují, že jak v COS-7 buňkách, tak CGC kulturách, je transport GluN2C podjednotky na buněčný povrch unikátně regulován v porovnání s GluN2A a GluN2B podjednotkami.



Obrázek 5: GluN1-1a/GFP-GluN2A, GluN1-1a/GFP-GluN2B a GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory jsou na buněčném povrchu různě exprimovány. (A) Repräsentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu z GluN1-1a/GFP-GluN2A, GluN1-1a/GFP-GluN2B a GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách. Měřítka odpovídá 20 μ m. **(B)** Graf zobrazuje normalizované hodnoty intenzity povrchového/celkového signálů z NMDA receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách a vizualizovaných pomocí imunofluorescence. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2A). **(C)** Repräsentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu z GFP-GluN2A-C podjednotek exprimovaných v COS-7 buňkách. **(D)** Souhrn normalizovaných hodnot povrchové/celkové exprese GFP-GluN2A-C podjednotek exprimovaných v COS-7 buňkách a měřených fluorescenční mikroskopií. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2A). **(E)** Repräsentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu NMDA receptorů exprimovaných v CGC. Měřítka odpovídá 20 μ m. **(F)** Shrnutí hodnot povrchové/celkové exprese NMDA receptorů vizualizovaných pomocí konfokální mikroskopie. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2A).

V dalších pokusech jsme ověřovali možnost, zda je snížená povrchová exprese GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů způsobena rychlejší internalizací receptorů v porovnání s GluN1-1a/GFP-GluN2A a GluN1-1a/GFP-GluN2B receptory. Za tímto účelem jsme provedli internalizační esej (viz Kapitola 3.5.4) v COS-7 buňkách exprimujících GluN1-1a/GFP-GluN2A a GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory (viz Obr. 6A-C). Z těchto pokusů vyplývá, že GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory jsou z buněčného povrchu internalizovány v menší míře než GluN1-1a/GFP-GluN2A receptory, což naznačuje, že přítomnost GluN2C podjednotky reguluje počet povrchových NMDA receptorů na úrovni časného transportu, aniž by měla vliv na stabilitu NMDA receptorů na buněčném povrchu.



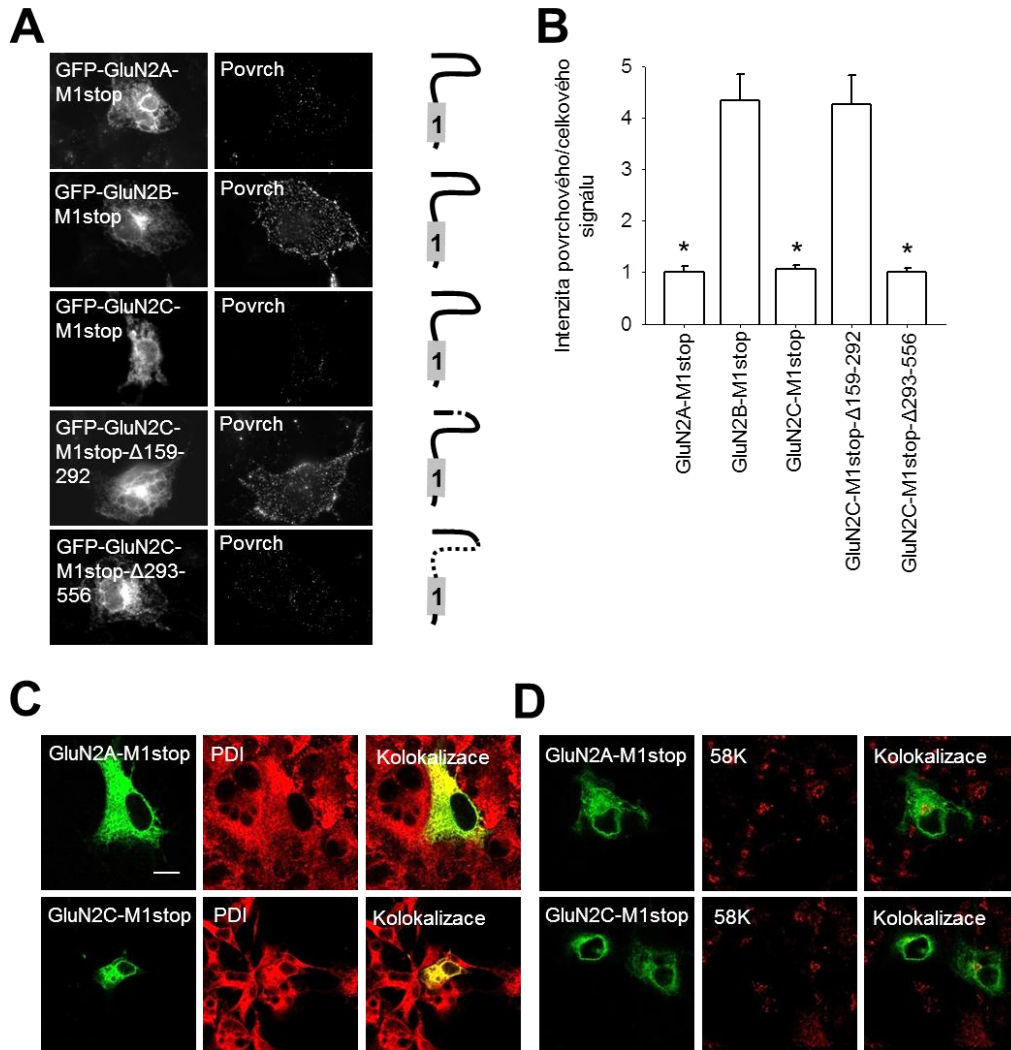
Obrázek 6: GluN1-1a/GFP-GluN2A, GluN1-1a/GFP-GluN2B a GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory jsou na buněčném povrchu různě exprimovány. (A) Internalizace GluN1-1a/GFP-GluN2A-C receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách. Živé buňky byly při 37°C, 30 min inkubovány s fluorescenční sekundární protilátkou. Na obrázku jsou ukázány reprezentativní snímky celkového GFP signálu (levá část) a internalizovaných receptorů (pravá část). Měřítko odpovídá 20µm. **(B, C)** Kvantifikace (počet buněk ≥ 40 , ze tří nezávislých pokusů) exprese GFP proteinu **(B)** a průměrný počet vezikulárních váček s receptory/jednotku plochy **(C)** pro GluN1-1a/GFP-GluN2A a GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory. T-test; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2A).

4.2 Různé strukturní determinanty GluN2C podjednotky regulují časný transport NMDA receptorů

ATD

V předchozích studiích byly identifikovány některé strukturní determinanty GluN2 podjednotek, odpovědné za transport NMDA receptorů na buněčný povrch, včetně ATD, TMD a CTD u GluN2A a GluN2B podjednotek (Stephenson et al., 2008; Traynelis et al., 2010). Bylo například ukázáno, že GluN2A podjednotka, na rozdíl od GluN2B podjednotky, obsahuje v A2 segmentu ATD ER retenční motiv, který reguluje počet povrchových NMDA receptorů (Horak et al., 2008; Qiu et al., 2009). Nejdříve jsme chtěli zjistit, zda je počet povrchových GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů regulován ER retenčním motivem v A2 segmentu, podobně jako u GluN1-1a/GluN2A receptorů. Abychom eliminovali interferenci případného ER retenčního motivu v A2 segmentu s dalšími signály ve zbytku GluN2C podjednotky, vyrobili jsme GFP-GluN2A-C konstrukty zkrácené za M1 doménou (GFP-GluN2-M1stop). Zjistili jsme, že GFP-GluN2A-M1stop konstrukt, na rozdíl od GFP-GluN2B-M1stop konstrukt, není přítomný na buněčném povrchu (viz Obr. 7A, B), což je v souladu s předchozí literaturou (Horak et al., 2008; Qiu et al., 2009). Zkrácená forma GFP-GluN2C podjednotky (GFP-GluN2C-M1stop) byla zadržena intracelulárně, podobně jako GFP-GluN2A-M1stop konstrukt. Pomocí konfokální mikroskopie jsme potvrdili, že GFP-GluN2A-M1stop a GFP-GluN2C-M1stop konstrukty kolokalizují s ER, ale nikoliv s GA, což potvrzuje naši hypotézu, že ATD u GluN2A a GluN2C podjednotek obsahují ER retenční motivy (viz Obr. 7C, D).

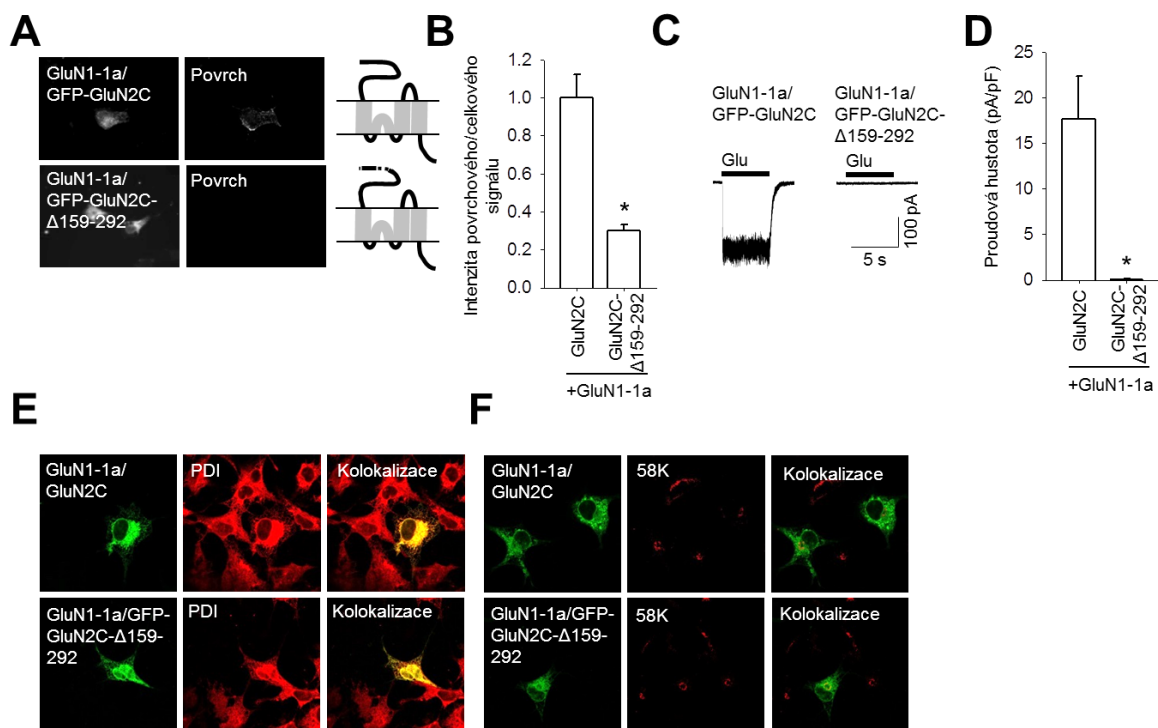
Z našich pokusů vyplývá, že ATD a/nebo M1 doména podobným mechanismem regulují časný transport u obou GluN2A a GluN2C podjednotek (viz Obr. 7A, B). V následujících pokusech jsme vytvořili deletované formy GFP-GluN2C-M1stop podjednotky, a sice konstrukt s deletovaným A2 segmentem v ATD (GFP-GluN2C-M1stop- Δ 159-292), či konstrukt s delecí bezprostředně za A2 segmentem v ATD (GFP-GluN2C-M1stop- Δ 293-556). Prostřednictvím povrchového značení GFP-GluN2 podjednotek exprimovaných v COS-7 buňkách jsme zjistili, že delece A2 segmentu umožnila povrchovou expresi GFP-GluN2C-M1stop- Δ 159-292 konstrukt, podobně jak bylo ukázáno v předchozí studii v případě GluN2A podjednotky (Qiu et al., 2009). Naopak, delece oblasti za A2 segmentem neovlivnila transport GFP-GluN2C-M1stop- Δ 293-556 konstrukt na buněčný povrch (viz Obr. 7A, B).



Obrázek 7: Povrchová exprese zkrácených forem GluN2 podjednotek. (A) Schematický náčrt membránové topologie uvedených zkrácených forem GluN2 podjednotek a reprezentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu z NMDA receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách a vizualizovaných pomocí fluorescenční mikroskopie. (B) Sloupcový graf znázorňuje normalizované hodnoty povrchové/celkové exprese uvedených forem podjednotek NMDA receptorů. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GFP-GluN2A-M1stop). (C, D) Kolokalizace GFP-GluN2A-M1stop a GluN2C-M1stop konstruktů s PDI značením v ER (C) a se 58K značením v GA (D). Reprezentativní snímky transfekovaných a fixovaných COS-7 buněk, vizualizovaných pomocí konfokálního mikroskopu. Měřítko odpovídá 20 μ m.

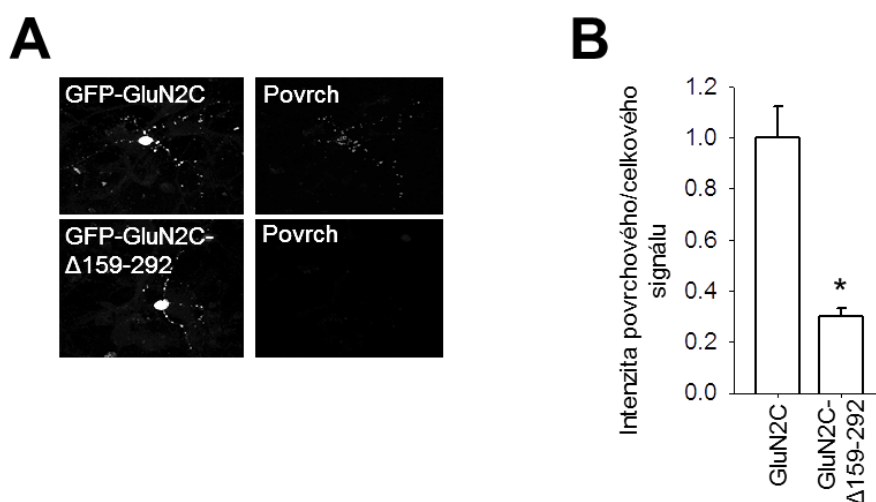
Předchozí studie ukázala, že odstranění A2 segmentu v ATD snižuje povrchovou expresi GluN1/GluN2A receptorů (Qiu et al., 2009). Proto jsme tuto oblast odstranili i v nezkrácené formě GluN2C podjednotky (GFP-GluN2C- Δ 159-292), kterou jsme exprimovali spolu s GluN1-1a podjednotkou v COS-7 buňkách a provedli mikroskopická měření. Tyto pokusy ukázaly, že GluN1-1a/GFP-GluN2C- Δ 159-292 receptory byly na buněčném povrchu exprimovány ve snížené míře v porovnání s GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory (viz Obr. 8A, B). Mikroskopické pokusy jsme následně doplnili i o

elektrofyzilogická snímání z HEK293 buněk transfekovaných GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory. Zjistili jsme, že hodnoty proudových odpovědí vyvolané aplikací 1mM glutamátu byly v případě GluN1-1a/GFP-GluN2C- Δ 159-292 receptorů signifikantně nižší v porovnání s nemutovanými GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory (viz Obr. 8C, D). Protože GluN1-1a/GFP-GluN2C- Δ 159-292 receptory byly na buněčném povrchu přítomny ve snížené míře, zajímalo nás, v jakém buněčném kompartmentu byly zadrženy. Provedli jsme proto imunofluorescenční značení s protilátkami značícími ER a GA v COS-7 buňkách exprimujících GluN1-1a/GFP-GluN2C nebo GluN1-1a/GFP-GluN2C- Δ 159-292 receptory. Tyto experimenty ukázaly, že oba typy receptorů kolokalizují s ER, ale nikoliv s GA (viz Obr. 8E, F).



Obrázek 8: Specifická oblast v ATD GluN2C podjednotky je nezbytná pro transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. (A) Schematický náčrt membránové topologie uvedených GluN2C podjednotek a reprezentativní snímky celkového (levá část) a povrchového signálu GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách. **(B)** Graf zobrazuje přehled normalizovaných hodnot povrchové/celkové exprese uvedených podjednotek GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů měřených pomocí fluorescenční mikroskopie. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2C). **(C)** Ukázky reprezentativních záznamů proudových odpovědí z HEK293 buněk exprimujících uvedené podjednotkové kombinace GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů, vyvolané 5s aplikací 1mM glutamátu (plná čára). **(D)** Graf zobrazuje hodnoty kvantitativní analýzy hustoty proudových odpovědí (pA/pF) zprostředkovaných uvedenými GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory ($n \geq 21$). Studentův t-test; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2C). **(E, F)** Kolokalizace vybraných GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů s PDI značením v ER **(E)** a s 58K značením v GA **(F)**.

Nakonec jsme pomocí konfokální mikroskopie porovnali povrchovou expresi GFP-GluN2C podjednotek v CGC kulturách. Zjistili jsme, že zatímco povrchová exprese GFP-GluN2C- Δ 159-292 podjednotky byla oproti kontrole (GFP-GluN2C) signifikantně snížena (viz Obr. 9A, B), celková exprese GFP-GluN2C podjednotky naopak nevykazovala statisticky významný rozdíl. Naše pokusy ukázaly, že ATD hraje důležitou roli v transportu GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch, podobně jako u GluN1/GluN2A-B receptorů. Vzhledem k tomu, že obě GluN2A a GluN2C podjednotky obsahují podobný ER retenční motiv v A2 segmentu, je pravděpodobné, že strukturní rozdíly v ATD jednotlivých GluN2 podjednotek nemohou plně vysvětlit zjištěné rozdíly povrchové exprese v případě GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2C receptorů.



Obrázek 9: Specifická oblast v ATD GluN2C podjednotky je nezbytná pro transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Repräsentativní snímky transfekovaných a fixovaných COS-7 buněk vizualizovaných pomocí konfokálního mikroskopu. (A) Repräsentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu GluN1-1a/GFP-GluN2Creceptorů v CGC kulturách. (B) Přehled normalizovaných hodnot povrchové/celkové exprese GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů získaných pomocí konfokální mikroskopie. Studentův t-test; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GFP-GluN2C).

TMD

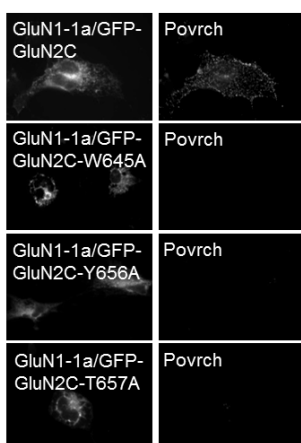
Naše nedávné pokusy ukázaly, že strukturní integrita M3 domény GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů je důležitá pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch (Kaniakova et al., 2012a). V následujících pokusech jsme testovali hypotézu, zda se struktura M3 domény u GluN2C podjednotky také podílí na regulaci povrchové exprese NMDA receptorů. V oblasti M3 domény GFP-GluN2C podjednotky jsme provedli tři aminokyselinové záměny za alanin v pozicích 645, 656 a 657 (GFP-GluN2C-W645A, GFP-GluN2C-Y656A a GFP-GluN2C-T657A), které odpovídají identifikovaným

aminokyselinovým zbytkům v GluN2A a GluN2B podjednotkách (viz Obr. 10A). Mutované varianty GFP-GluN2C podjednotky jsme koexprimovali s GluN1-1a podjednotkou v COS-7 buňkách a imunofluorescenčně označili celkovou a povrchovou populaci NMDA receptorů. Tyto pokusy ukázaly, že povrchová exprese mutovaných GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů je v porovnání s nemutovanými receptory významně snížena (viz Obr. 10B, C). V souladu s mikroskopickými daty jsme rovněž pozorovali signifikantně snížené proudové odpovědi vyvolané glutamátem v HEK293 buňkách exprimujících GluN1-1a/GFP-GluN2C-W645A, GluN1-1a/GFP-GluN2C-Y656A, či GluN1-1a/GFP-GluN2C-T657A receptory (viz Obr. 10D, E).

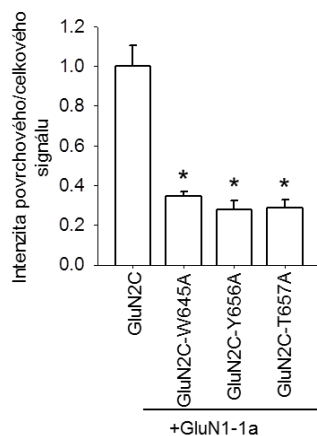
A

GluN2A M3 629-IMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAF-652
 GluN2B M3 630-IMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAF-653
 GluN2C M3 640-IMVLVAFFAVIFLASYTANLAAF-663

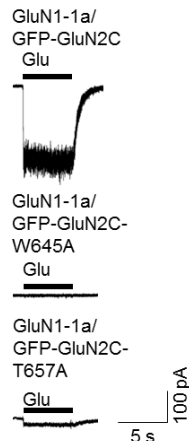
B



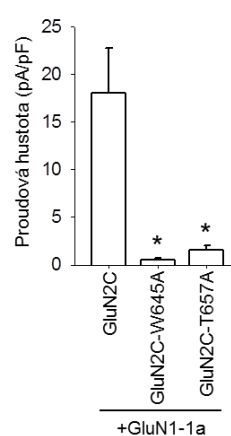
C



D

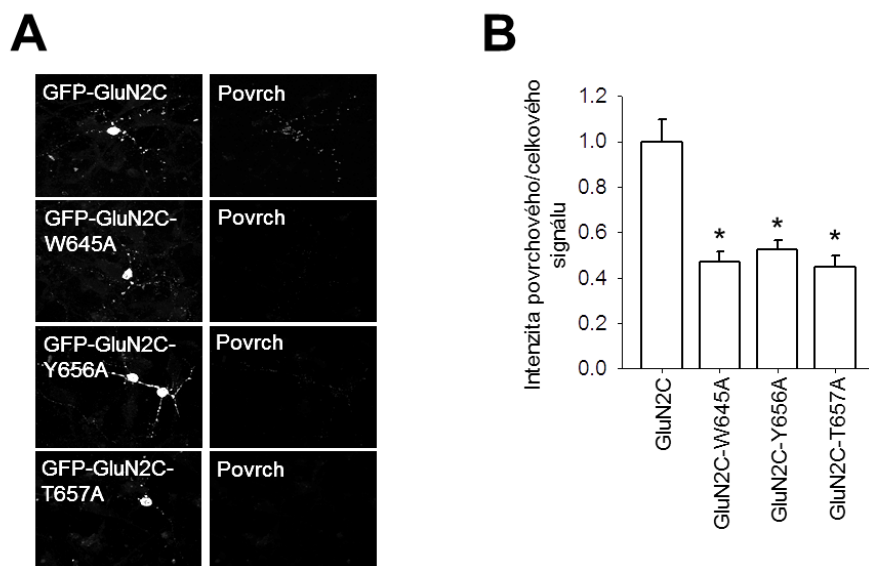


E



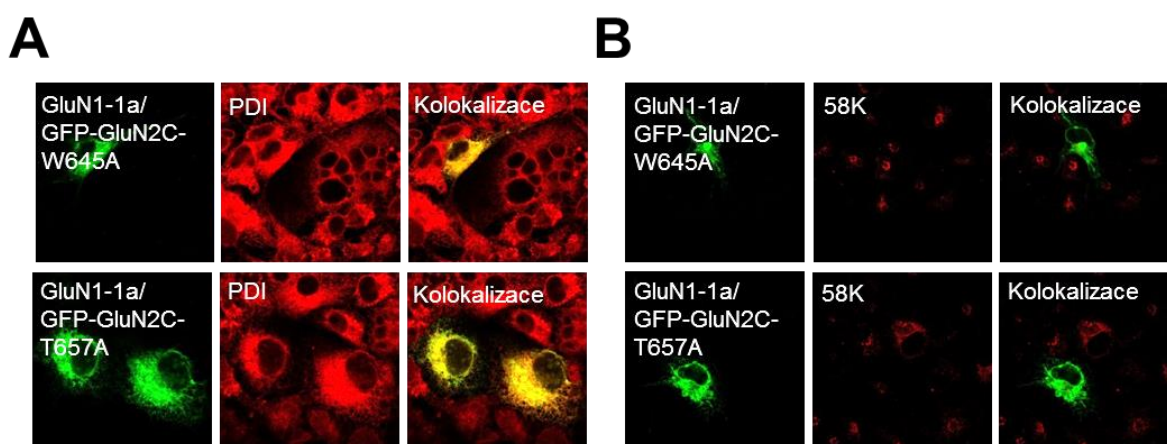
Obrázek 10: Aminokyselinové zbytky v M3 doméně GluN2C podjednotky jsou nezbytné pro transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. (A) Schematický náčrt aminokyselinové sekvence M3 domény u GluN2A, GluN2B, GluN2C podjednotek; zvýrazněny jsou tři aminokyselinové zbytky, u nichž došlo k záměně za alanin. **(B)** Reprezentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách. **(C)** Graf zobrazuje přehled normalizovaných hodnot povrchové/celkové exprese uvedených variant GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů získaných pomocí fluorescenční mikroskopie. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2C). **(D)** Reprezentativní záznamy proudových odpovědí vyvolaných 5s aplikací 1mM glutamátu (plná čára) u HEK293 buněk exprimujících uvedené varianty GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů. **(E)** graf zobrazuje výsledky kvantitativní analýzy hustoty proudových odpovědí (pA/pF) zprostředkovaných uvedenými GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory ($n \geq 21$). ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2C).

Podobný výsledek jako u COS-7 buněk jsme pozorovali i v případě CGC transfekovaných pomocí GFP-GluN2C-W645A, GFP-GluN2C-Y656A, nebo GFP-GluN2C-T657A podjednotky (viz Obr. 11A, B).



Obrázek 11: Aminokyselinové zbytky v M3 doméně GluN2C podjednotky jsou nezbytné pro transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. (A) Reprezentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu z GFP-GluN2C podjednotek exprimovaných v CGC. **(B)** Graf znázorňuje souhrn normalizovaných hodnot povrchové/celkové exprese uvedených variant GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů získaných pomocí konfokální mikroskopie. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GFP-GluN2C).

Následné kolokalizační experimenty ukázaly, že všechny mutované formy GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů jsou zadržovány převážně v ER (viz Obr. 12A, B). Tato zjištění podpořila hypotézu, že strukturální integrita M3 domény u GluN2C podjednotky rovněž reguluje transport NMDA receptorů na buněčný povrch.



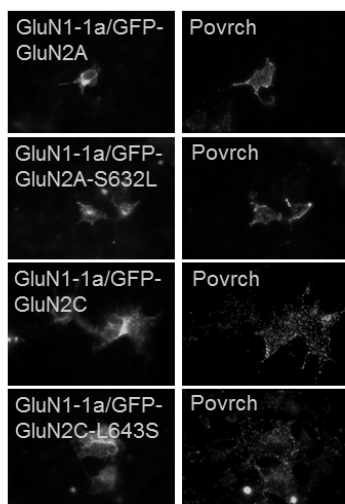
Obrázek 12: Aminokyselinové zbytky v M3 doméně GluN2C podjednotky jsou nezbytné pro transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. (A, B) Kolokalizace vybraných GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů s PDI značením v ER **(B)** a s 58K značením v GA **(A)**. Reprezentativní snímky transfekovaných a fixovaných COS-7 buněk, vizualizovaných pomocí konfokálního mikroskopu.

Následně jsme zkoumali, zda strukturální rozdíly v M3 doméně mezi jednotlivými GluN2A-C podjednotkami mohou vysvětlit zjištěné rozdíly povrchové exprese u GluN1-1a/GluN2A-C receptorů. Vzhledem k tomu, že se aminokyselinové sekvence M3 domén u GluN2A-B a GluN2C podjednotek liší pouze v jediném zbytku (viz Obr. 13A), vytvořili jsme i) GFP-GluN2A podjednotku s M3 doménou z GluN2C podjednotky (GFP-GluN2A-S632L) a ii) GFP-GluN2C podjednotku s M3 doménou z GluN2A podjednotky (GFP-GluN2C-L634S). Obě podjednotky jsme koexprimovali s GluN1-1a podjednotkou v COS-7 buňkách a provedli mikroskopická měření. Vzhledem k tomu, že jsme nepozorovali změnu povrchové exprese mutovaných GluN1-1a/GFP-GluN2A-S632L a GluN1-1a/GFP-GluN2C-L634S receptorů vůči nemutovaným receptorům (viz Obr. 13B, C) předpokládáme, že existují další oblasti GluN2C podjednotky, které jsou zodpovědné za rozdíly v povrchové expresi jednotlivých podtypů GluN1-1a/GluN2A-C receptorů.

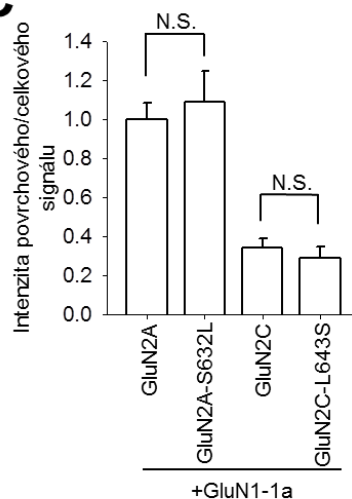
A

GluN2A M3 629–IMV[S]WAFFFAVIFLASYTANLAAF–652
 GluN2B M3 630–IMV[S]WAFFFAVIFLASYTANLAAF–653
 GluN2C M3 640–IMV[L]WAFFFAVIFLASYTANLAAF–663

B



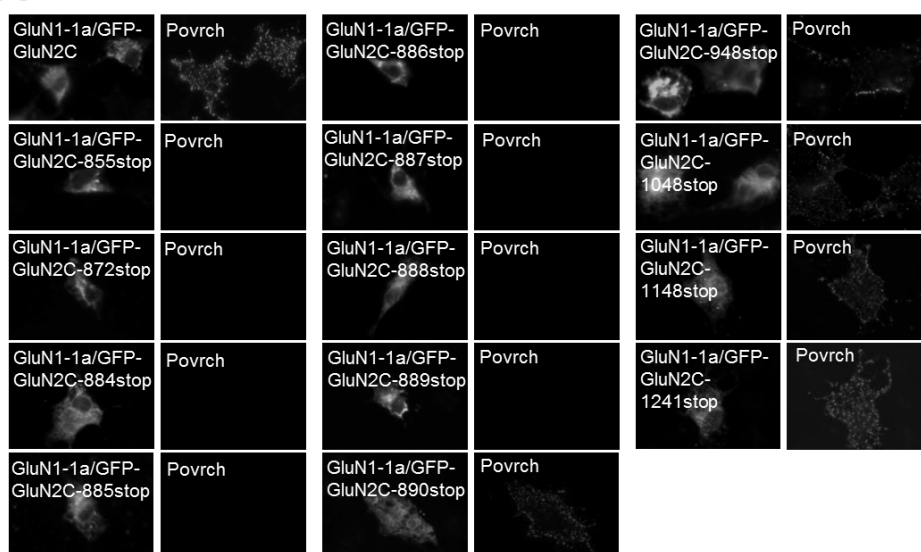
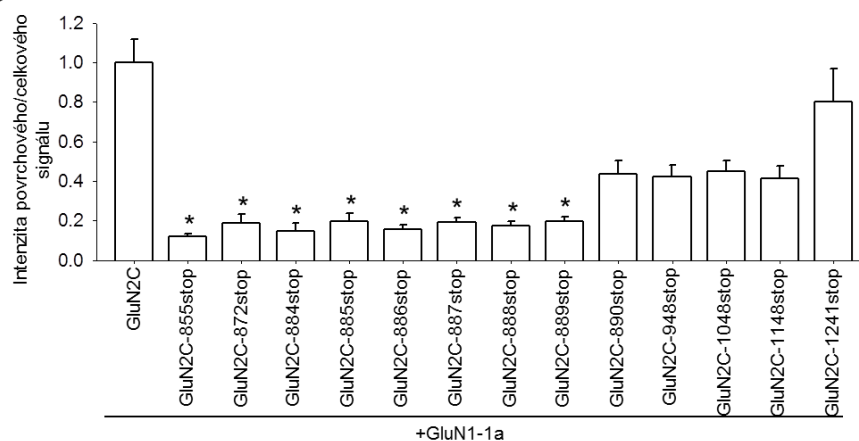
C



Obrázek 13: Aminokyselinové zbytky v M3 doméně GluN2C podjednotky jsou nezbytné pro transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. (A) Aminokyselinové sekvence M3 domén u GluN2A, GluN2B a GluN2C podjednotek. Aminokyselinový zbytek, který se v rámci GluN2A-C podjednotek liší, je vyznačen orámováním. **(B)** Reprezentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu z jednotlivých variant GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách. **(C)** Souhrn normalizovaných hodnot povrchové/celkové exprese vybraných GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů získaných pomocí fluorescenční mikroskopie. Studentův t-test; $p > 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2A nebo GluN1-1a/GFP-GluN2C).

CTD

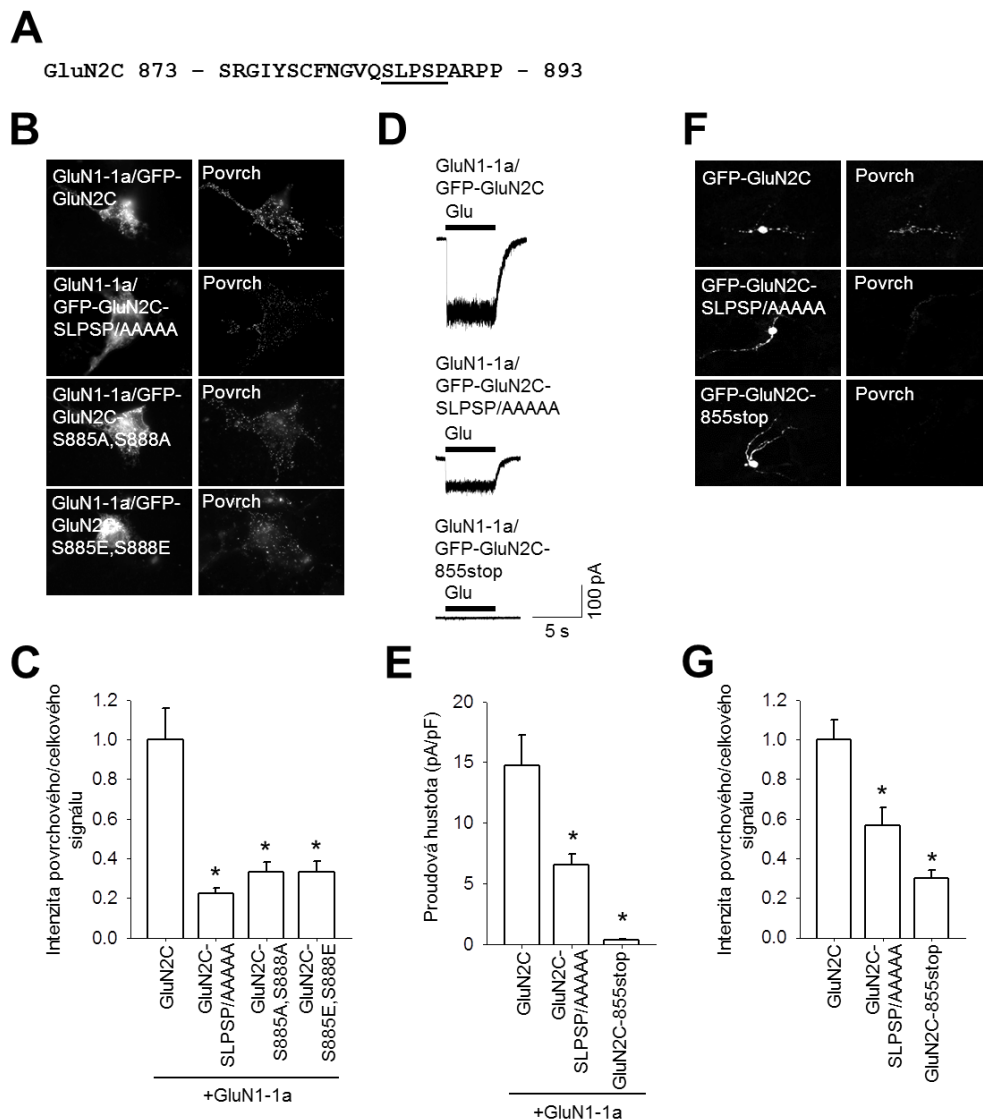
Předchozí studie ukázaly, že oblast CTD u GluN1 (Horak and Wenthold, 2009; Sanz-Clemente et al., 2013; Traynelis et al., 2010), GluN2A i GluN2B podjednotek (Hawkins et al., 2004; Yang et al., 2007) reguluje transport NMDA receptorů na buněčný povrch. Vzhledem k tomu, že aminokyselinová sekvence CTD u GluN2C podjednotky se výrazně odlišuje od GluN2A i GluN2B podjednotek, vytvořili jsme GFP-GluN2C podjednotku s delecí za M4 doménou (GFP-GluN2C-855stop), podobně jako u předchozích studií v případě deletovaných forem GluN2A a GluN2B podjednotek (Horak et al., 2008; Vissel et al., 2001). GFP-GluN2C-855stop konstrukt jsme koexprimovali s GluN1-1a podjednotkou v COS-7 buňkách a zjistili jsme, že překvapivě není na buněčném povrchu lokalizován (viz Obr. 14A, B). V dalších pokusech jsme zkoumali, zda je v CTD GluN2C podjednotky přítomna specifická oblast, nezbytná pro transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Vytvořili jsme sérii GFP-GluN2C konstruktů s různě zkrácenou CTD (Obr. 14A, B) a provedli imunofluorescenční značení v COS-7 buňkách exprimujících GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory. Tyto pokusy ukázaly, že povrchová exprese zkrácených forem GFP-GluN2C podjednotky je až po aminokyselinový zbytek na pozici 889 signifikantně snižena, zatímco povrchová exprese konstruktů zkrácených za aminokyselinovými zbytky v pozicích 889 až 1124 není ovlivněna (viz Obr. 14A, B). Tyto pokusy ukázaly, že oblast CTD v okolí aminokyselinového zbytku v pozici 889 u GluN2C podjednotky je důležitá pro regulaci povrchové exprese GluN1-1a/GluN2C receptorů.

A**B**

Obrázek 14: CTD u GluN2C podjednotky je nezbytná pro transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. (A) Reprezentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu z jednotlivých variant GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách. **(B)** Graf znázorňuje přehled normalizovaných hodnot povrchové/celkové exprese GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů získaných pomocí fluorescenční mikroskopie. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2C).

Pro potvrzení této hypotézy jsme v GFP-GluN2C podjednotce zaměnili 5 aminokyselinových zbytků (v pozicích 885-889) za alanin (GFP-GluN2C-SLPSP/AAAAA) a tento konstrukt jsme koexprimovali s GluN1-1a podjednotkou v COS-7 buňkách (viz Obr. 15A). Pomocí imunofluorescenční mikroskopie jsme zjistili, že povrchová exprese GluN1-1a/GFP-GluN2C-SLPSP/AAAAA receptorů je signifikantně snižena v porovnání s nemutovanými receptory (viz Obr. 15B, C). Tyto výsledky jsme potvrdili i pomocí elektrofyziologických snímání z HEK293 buněk (viz Obr. 15D, E) a konfokální mikroskopie na CGC transfekovaných GFP-GluN2C podjednotkami (viz Obr. 15F, G). Naše

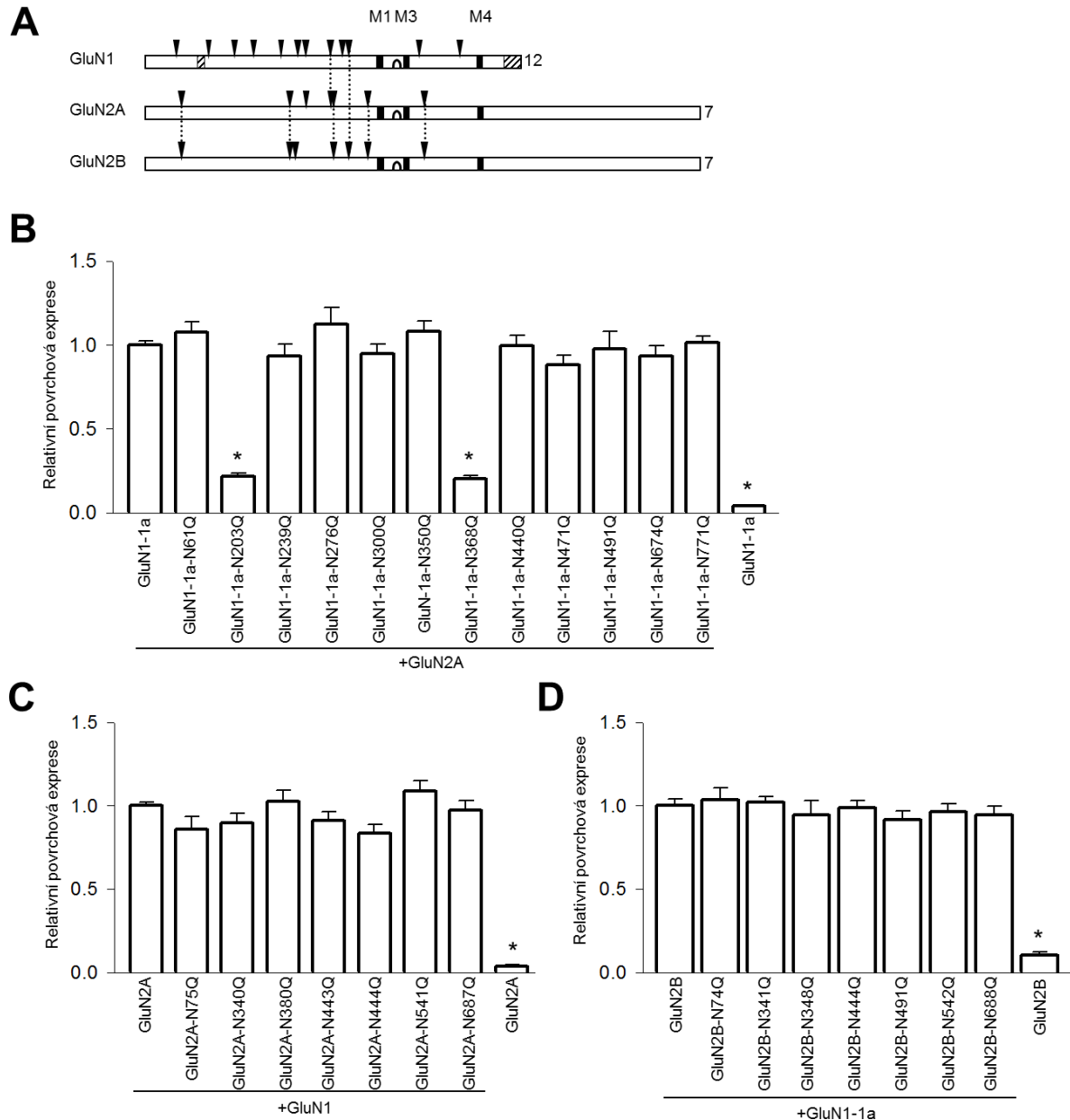
pokusy ukázaly, že proximální část CTD u GluN2C podjednotky, konkrétně motiv SLPSP, reguluje transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch.



Obrázek 15: Aminokyselinová sekvence v proximální části CTD u GluN2C podjednotky je nezbytná pro transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. (A) Schéma aminokyselinové sekvence v proximální části CTD GluN2C podjednotky; aminokyselinové zbytky zaměněné za alanin jsou vyznačeny podtržením. **(B)** Reprezentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu z GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách. **(C)** Graf zobrazuje souhrn normalizovaných hodnot povrchové/celkové exprese uvedených podjednotek GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů, získaných pomocí fluorescenční mikroskopie. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2C). **(D)** Reprezentativní záznamy proudových odpovědí na 1mM glutamát (plná čára) z HEK293 buněk exprimujících uvedené varianty GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů. **(E)** Přehled výsledků z kvantitativní analýzy hustoty proudových odpovědí (pA/pF) zprostředkovaných uvedenými GluN1-1a/GFP-GluN2C receptory ($n \geq 19$). ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GFP-GluN2C). **(F)** Reprezentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu z GFP-GluN2C podjednotek exprimovaných v CGC. **(G)** Graf znázorňující přehled normalizovaných hodnot povrchové/celkové exprese pro varianty GluN1-1a/GFP-GluN2C receptorů, získaných pomocí konfokální mikroskopie. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GFP-GluN2C).

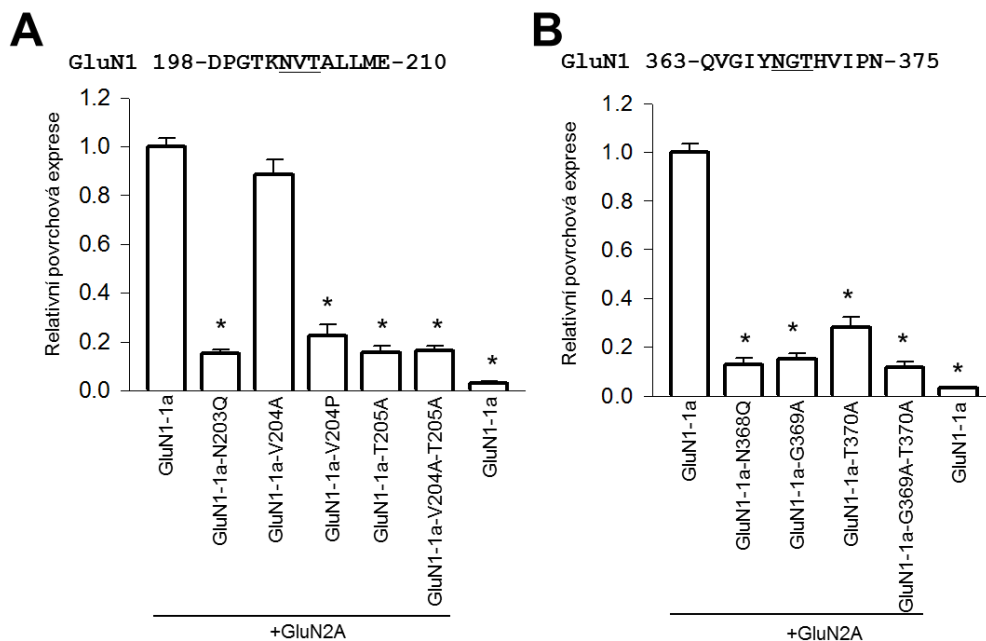
4.3 Specifická *N*-glykosylační místa v GluN1-1a podjednotce regulují transport NMDA receptorů na buněčný povrch

Jednotlivé podjednotky NMDA receptorů obsahují různý počet konzervovaných *N*-glykosylačních míst (N-X-S/T) ve svých extracelulárních doménách. U potkaní varianty GluN1-1a podjednotky je přítomno 12 *N*-glykosylačních míst, v případě GluN2A a GluN2B podjednotek pouze 7 *N*-glykosylačních míst (viz Obr. 16A). V další fázi dizertační práce jsme testovali hypotézu, zda jsou specifická *N*-glykosylační místa v GluN1-1a a/nebo GluN2A-B podjednotkách klíčová pro časný transport NMDA receptorů. Za tímto účelem jsme vytvořili sérii bodových mutací v GluN1-1a a GluN2A-B podjednotkách, kde byly jednotlivé asparaginové zbytky (N), tvořící *N*-glykosylační místa, nahrazeny za glutamin (Q), který brání vazbě *N*-glykanů. Tyto mutované receptory jsme exprimovali v COS-7 buňkách a za použití kolorimetrické metody (Kaniakova et al., 2012a) kvantitativně stanovili jejich povrchovou expresi. Tyto pokusy ukázaly, že v GluN1-1a podjednotce se nachází dvě důležitá *N*-glykosylační místa, jejichž mutace vede k výraznému snížení povrchové exprese GluN1-1a/GluN2A receptorů a sice GluN1-1a-N203 a GluN1-1a-N368 (viz Obr. 16B). Mutace *N*-glykosylačních míst v případě GluN2A a GluN2B podjednotek nezpůsobily statisticky významné snížení povrchové exprese GluN1/GluN2A-B receptorů (viz Obr. 16C, D).



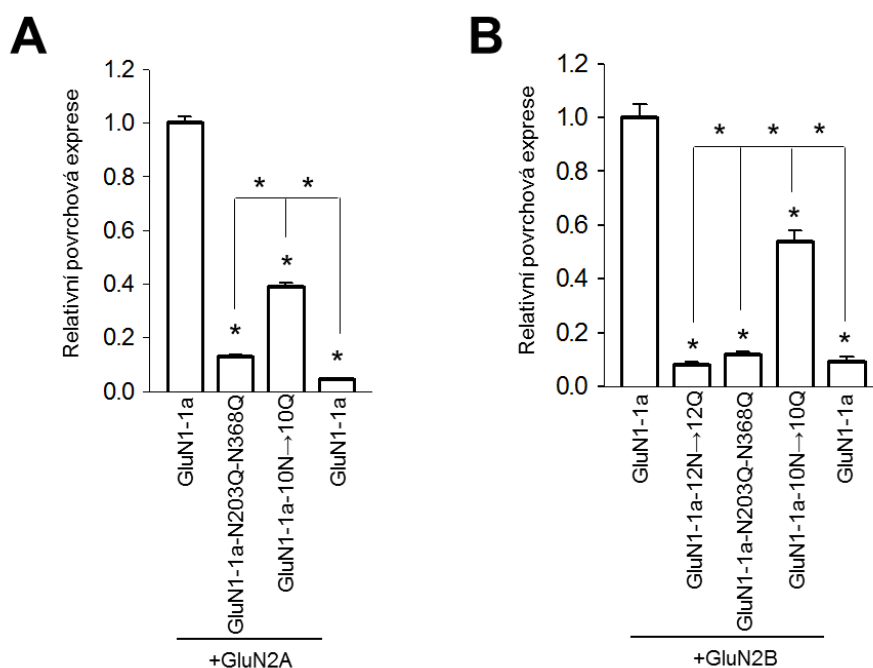
Obrázek 16: Specifická *N*-glykosylační místa na GluN1-1a podjednotce regulují povrchovou expresi NMDA receptorů. (A) Schematický náčrt GluN1-1a, GluN2A a GluN2B podjednotek. Plné šipky vyznačují predikovaná *N*-glykosylační místa (N-X-S/T), lokalizovaná extracelulárně. Celkový počet *N*-glykosylačních míst je zobrazen vpravo. Svislé čáry spojují místa, která jsou mezi uvedenými podjednotkami konzervována. Černé čtverce označují TMD (M1, M3, M4). M2 je znázorněna jako vratná smyčka mezi M3 a M4 doménou. Šrafované obdélníky označují jednotlivé sestřihové varianty GluN1 podjednotky (Everts et al., 1997). (B-D) Kolorimetrická analýza na COS-7 buňkách; nemutované nebo mutované formy YFP-GluN1-1a podjednotky (GluN1-1a; B), exprimované samostatně, nebo spolu s GluN2A podjednotkou; nemutované nebo mutované formy GFP-GluN2A (GluN2A; C) a GFP-GluN2B (GluN2B; D) podjednotek, exprimované samostatně, či spolu s GluN1-1a podjednotkou. Grafy ukazují přehled normalizovaných hodnot relativní povrchové/celkové exprese uvedených variant NMDA receptorů. Kvantifikace ukázala statisticky významný rozdíl mezi kontrolními (GluN1-1a/GluN2A nebo GluN1-1a/GluN2B) a mutovanými receptory (ANOVA; * $p < 0,05$).

Abychom potvrdili, že snížená povrchová exprese GluN1-1a-N203Q/GluN2A a GluN1-1a-N368Q/GluN2A receptorů je důsledkem chybějícího *N*-glykanu, nahradili jsme přilehlé aminokyselinové zbytky za alanin (A) nebo prolin (P), čímž dojde k narušení rozpoznání *N*-glykosylačního místa prostřednictvím oligosacharid-peptid transferázy, podobně jako bylo ukázáno v nedávné studii (Gleichman et al., 2012). Kvantitativní analýza odhalila, že záměna valinu v pozici 204 za alanin (GluN1-1a-V204A), nemá vliv na transport NMDA receptorů na buněčný povrch. Avšak jednobodová mutace GluN1-1a-V405P, či dvojbodová záměna v pozicích V204P a T205A (GluN1-1a-V204P/T205A) způsobily signifikantně sníženou povrchovou expresi GluN1-1a/GluN2A receptorů. Tyto pokusy podpořily naši hypotézu, že glykosylace na pozici N203 v GluN1-1a podjednotce je nezbytná pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch (viz Obr. 17A). Obdobným způsobem jsme postupovali i v případě *N*-glykosylačního místa na pozici N368 v GluN1-1a podjednotce. Dle očekávání, obě jednobodové mutace (GluN1-1a-G369A a GluN1-1a-T370A) i dvojbodová mutace (GluN1-1a-G369A/T370A) významně snížily transport GluN1-1a/GluN2A receptorů na buněčný povrch (viz Obr. 17B).



Obrázek 17: Specifická *N*-glykosylační místa na GluN1-1a podjednotce regulují povrchovou expresi NMDA receptorů. (A a B) Sekvence GluN1-1a podjednotky v okolí asparaginových zbytků v pozici N203 (A) a N368 (B). Predikovaná *N*-glykosylační místa jsou vyznačena podtržením. (A, B) Kolorimetrická analýza na COS-7 buňkách; nemutované nebo mutované formy YFP-GluN1-1a podjednotky (GluN1-1a), exprimované samostatně, nebo spolu s GluN2A podjednotkou. Grafy ukazují přehled normalizovaných hodnot relativní povrchové/celkové exprese. Kvantifikace ukázala statisticky významný rozdíl mezi kontrolními (GluN1-1a/GluN2A) a mutovanými receptory (ANOVA; * $p < 0,05$).

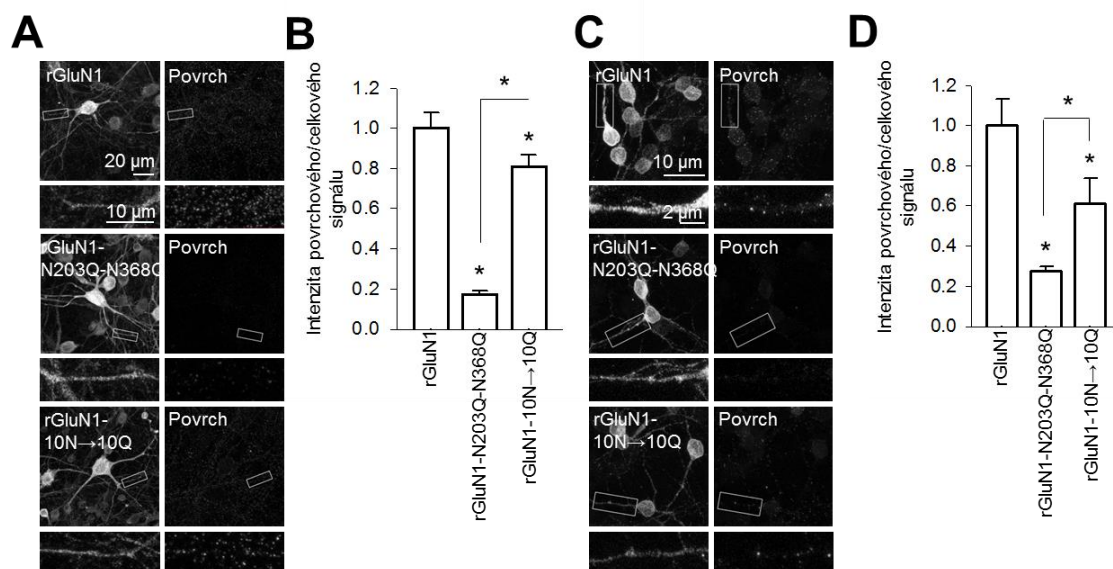
V další fázi jsme zkoumali, zda jsou *N*-glykosylační místa na pozicích N203 a N368 v GluN1-1a podjednotce nezbytná i pro povrchovou expresi GluN1-1a/GluN2B receptorů, a zároveň, jaký vliv na transport GluN1-1a/GluN2B receptorů mají další *N*-glykosylační místa v GluN1-1a podjednotce. Pro zodpovězení této otázky jsme vytvořili GluN1-1a podjednotku s dvojbodovou mutací N203Q/N368Q (GluN1-1a-N203Q-N368Q) a GluN1-1a podjednotku se záměnami zbylých 10 asparaginových zbytků na predikovaných *N*-glykosylačních místech (GluN1-1a-10N→10Q). Pomocí kolorimetrické metody na COS-7 buňkách jsme zjistili, že povrchová exprese GluN1-1a-N203Q-N368Q/GluN2A receptorů byla v porovnání s GluN1-1a/GluN2A a GluN1-1a-10N→10Q/GluN2A receptory výrazně snížena (viz Obr. 18A). Koexpresí mutovaných forem GluN1-1a podjednotky s GluN2B podjednotkou v COS-7 buňkách a pomocí kolorimetrické analýzy jsme získali podobné výsledky (viz Obr. 18B). Tyto pokusy ukázaly, že asparaginové zbytky na pozicích N203 a N368 v GluN1-1a podjednotce jsou nezbytné pro transport i GluN1-1a/GluN2B receptorů na buněčný povrch.



Obr. 18: Povrchová exprese NMDA receptorů obsahujících GluN1-1a podjednotku bez kritických *N*-glykosylačních míst. (A a B) COS-7 buňky jsme transfekovali pomocí nemutovaných nebo mutovaných forem YFP-GluN1-1a podjednotky (GluN1-1a) buď samostatně, nebo spolu s GluN2A (A), či GluN2B (B) podjednotkou. Receptory byly detekovány pomocí anti-GFP protilátky. Sloupcové grafy ukazují přehled normalizovaných hodnot relativní povrchové/celkové exprese vybraných GluN podjednotkových kombinací. ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (GluN1-1a/GluN2A nebo GluN1-1a/GluN2B).

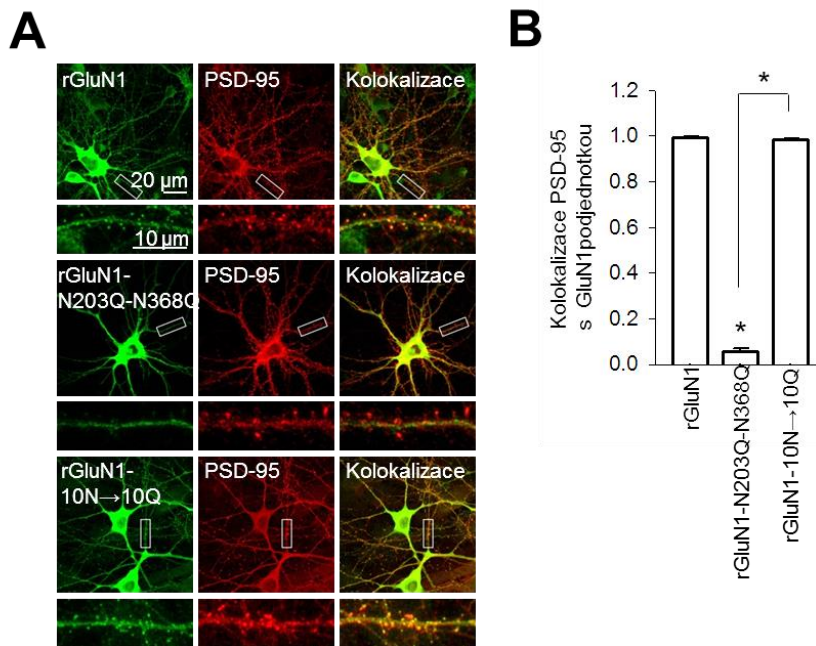
4.4 *N*-glykosylační místa N203 a N368 v GluN1-1a podjednotce jsou nezbytná pro uvolnění NMDA receptoru z ER

V dalších pokusech jsme se zabývali otázkou, zda je přítomnost glykanů na *N*-glykosylačních místech v pozicích N203 a N368 na GluN1-1a podjednotce nezbytná pro transport NMDA receptorů v primárních kulturách neuronů. Jako reprezentativní skupinu neuronů jsme nejprve zvolili kultivované hipokampální neurony izolované z potkaních embryí (E18). Jelikož je známo, že GluN1 podjednotka je v neuronech exprimována v nadbytku, použili jsme lentivirový expresní systém, pomocí nějž dochází ke snížení exprese endogenní GluN1-1a podjednotky prostřednictvím specifické shRNA (GluN1-1a-KD) a zároveň k expresi shRNA-rezistentní formy GluN1-1a podjednotky (rGluN1-1a). Následně jsme vyrobili lentivirové konstrukty, které exprimují GluN1-1a podjednotky se záměnami v pozicích N203Q a N368Q (rGluN1-1a-N203Q-N368Q) a se záměnami 10 asparaginových zbytků na zbylých *N*-glykosylačních místech (rGluN1-1a-10N→10Q) (Zheng et al., 2015). U infikovaných hipokampálních neuronů jsme pomocí konfokální mikroskopie potvrdili, že rGluN1-1a-N203Q-N368Q podjednotka vykazuje sníženou povrchovou expresi, v porovnání s nemutovanou formou rGluN1-1a podjednotky, či rGluN1-1a-10N→10Q podjednotkou (viz Obr. 19A, B), podobně jako jsme ukázali v případě heterologních buněčných linií (viz Obr. 18A, B). Tyto výsledky prokázaly, že i u nativního systému hipokampálních neuronů je přítomnost asparaginových zbytků na pozicích N203 a N368 nezbytná pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch. Tato zjištění se nám podařilo potvrdit i v případě CGC kultur (viz Obr. 19C, D).



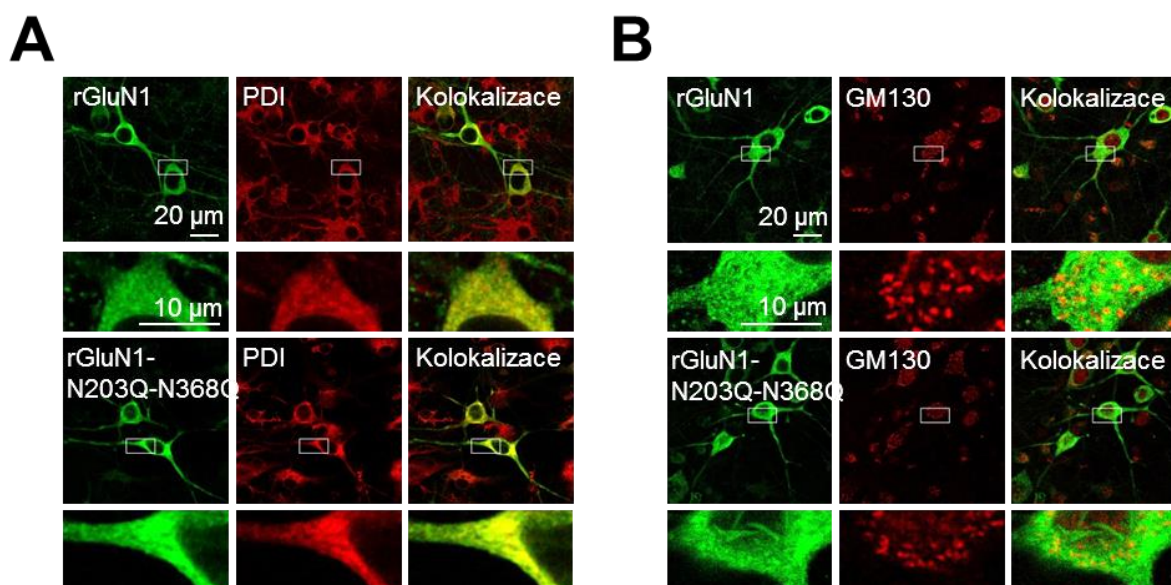
Obrázek 19: GluN1-1a-N203Q-N368Q podjednotka snižuje povrchovou expresi NMDA receptorů v neuronech. (A, C) Reprezentativní snímky celkového (levá část) a povrchového (pravá část) signálu z uvedených rGluN1-1a podjednotek v kulturách hipokampálních neuronů (A) a v CGC kulturách (C). Pod každým snímekem je vybraná reprezentativní oblast ukázána zvětšeně. (B, D) graf zobrazuje hodnoty intenzity povrchové/celkové exprese uvedených rGluN1-1a podjednotek exprimovaných v hipokampálních (B) i CGC kulturách (D). Výsledné hodnoty byly získány ze segmentů primárních dendritů, z jednotlivých oblastí o velikosti 10 μm^2 . ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (rGluN1-1a).

Následně jsme pomocí konfokální mikroskopie zjišťovali, ve kterém buněčném kompartmentu jsou rGluN1-1a-N203Q-N368Q podjednotky lokalizovány. Abychom zjistili, zda je rGluN1-1a-N203Q-N368Q podjednotka přítomna i na excitačních synapsích, použili jsme anti-PSD-95 protilátku, která na excitačních synapsích značí postsynaptickou densitu (viz Obr. 20A, B). Zjistili jsme, že zatímco rGluN1-1a a rGluN1-1a-10N \rightarrow 10Q podjednotky výrazně kolokalizovaly s PSD-95 značením, rGluN1-1a -N203Q-N368Q podjednotka byla lokalizována do jiných buněčných kompartmentů neuronu a to jak na těle, tak i na dendritech.



Obrázek 20: Kolokalizační analýza na fixovaných hipokampálních neuronech exprimujících rekombinantní rGluN1-1a podjednotky. (A) Reprezentativní snímky hipokampálních neuronů: YFP signál (levá část), PSD-95 signál (střední část) a kolokalizace signálů (pravá část). Pod každým snímekem je vybraná reprezentativní oblast ukázána zvětšeně. (B) Graf znázorňuje kvantifikaci pozitivní PSD-95 frakce, kolokalizující s vybranými rGluN1-1a podjednotkami. Výsledné hodnoty byly získány ze segmentů sekundárních a terciárních dendritů, z jednotlivých oblastí o velikosti 10 μm^2 . ANOVA; * $p < 0.05$ vůči kontrole (rGluN1-1a).

V dalších pokusech jsme použili selektivní protilátky proti strukturám ER a GA. Zjistili jsme, že rGluN1-1a-N203Q-N368Q podjednotka, podobně jako rGluN1-1a podjednotka, kolokalizuje s anti-PDI protilátkou, vázající proteiny v ER (viz Obr. 21A). Barvení anti-GM130 protilátkou, vázající proteiny v GA, neukázalo na snímcích z konfokálního mikroskopu výraznou kolokalizaci ani s rGluN1-1a, ani s rGluN1-1a-N203Q-N368Q podjednotkou (viz Obr. 21B). Vzhledem k tomu, že rGluN1-1a-N203Q-N368Q podjednotka nebyla výrazně lokalizovaná ani na buněčném povrchu, ani v GA, je pravděpodobné, že zůstala zadržena ve strukturách ER.

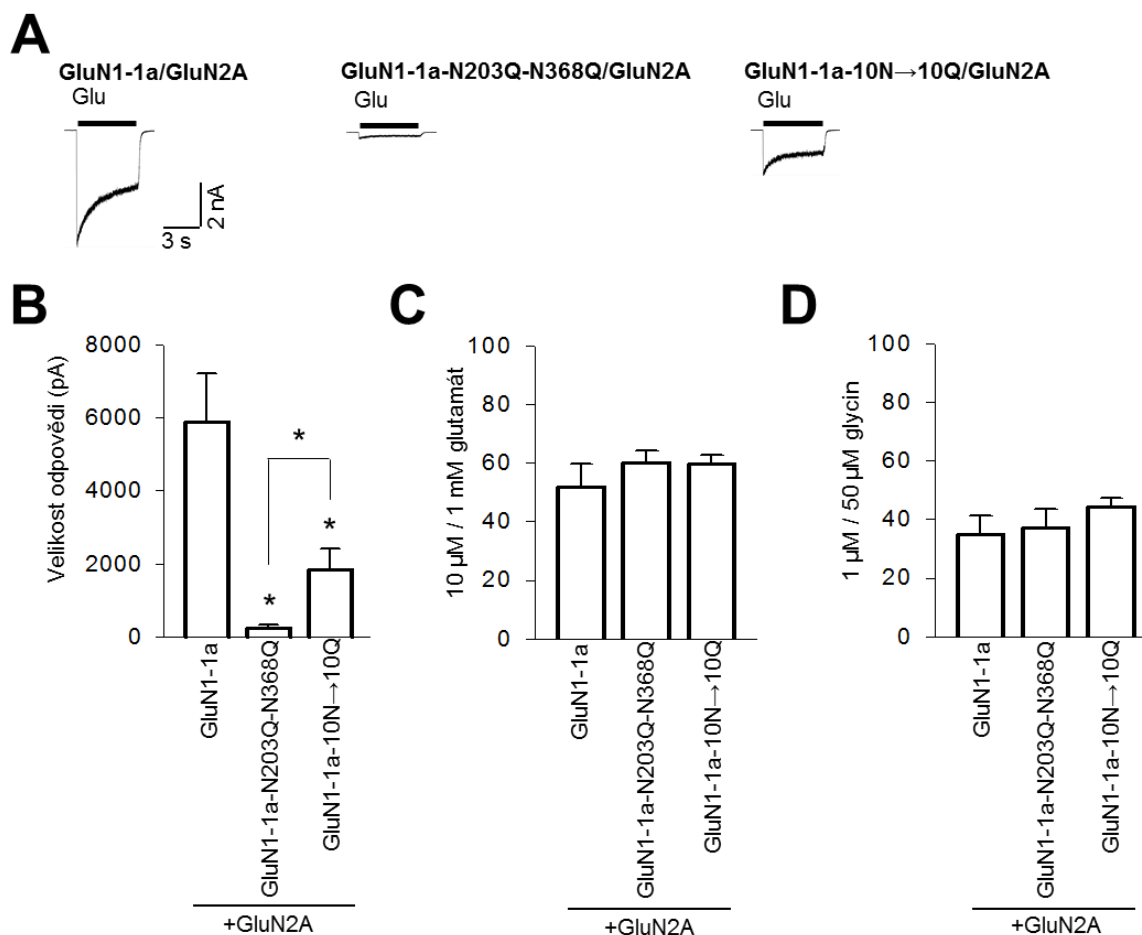


Obrázek 21: Kolokalizační analýza na fixovaných hipokampálních neuronech exprimujících rekombinantní rGluN1-1a podjednotky. (A aB) Uvedené rGluN1-1a podjednotky exprimované v hipokampálních neuronech kolokalizují s anti-PDI protilátkou proti ER (A), ale ne s anti-GM130 protilátkou proti GA (B). Na snímcích je zobrazen YFP signál (levý sloupec), PDI nebo GM130 signál (střední sloupec) a sloučení signálů (pravý sloupec). Pod každým snímkem je vybraná reprezentativní oblast ukázána zvětšeně.

4.5 Vliv *N*-glykosylace na funkční vlastnosti NMDA receptorů

Dále jsme pomocí elektrofyziologických měření na HEK293 buňkách zjišťovali, zda *N*-glykosylace ovlivňuje také funkční vlastnosti NMDA receptorů (viz Obr. 22A-D). Zjistili jsme, že receptory obsahující mutovanou rGluN1-1a-N203Q-N368Q podjednotku mají významně sníženou velikost proudových odpovědí, v porovnání s GluN1-1a/GluN2A a GluN1-1a-10N→10Q/GluN2A receptory (viz Obr. 22A, B). Poté jsme hodnotili poměr proudových odpovědí v rovnovážném stavu, vyvolaných aplikací 10 μM a 1 mM glutamátu v přítomnosti saturující koncentrace (50 μM) glycinu, mezi nemutovanými a mutovanými

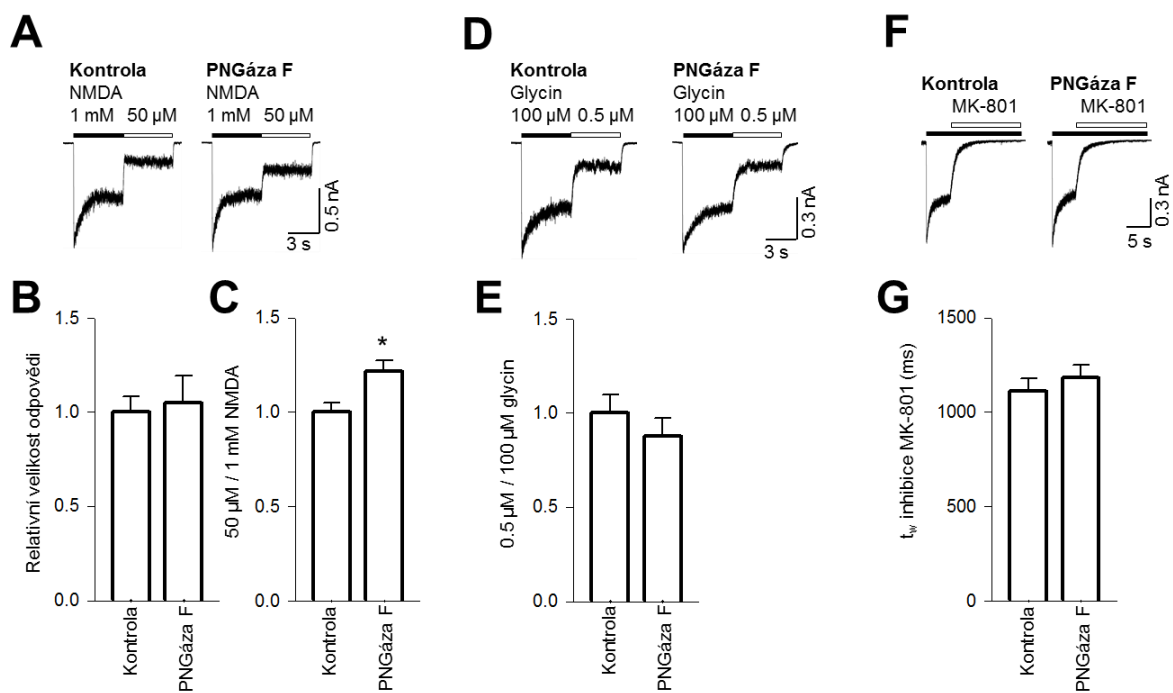
GluN1-1a/GluN2A receptory (viz Obr. 22C). Porovnávali jsme také poměr proudových odpovědí v rovnovážném stavu, vyvolaných aplikací 1 μ M a 50 μ M glycínu za přítomnosti saturující koncentrace (1mM) glutamátu (viz Obr. 22D). Pro žádnou z testovaných podjednotkových kombinací GluN1-1a/GluN2A receptorů jsme nepozorovali rozdílnou citlivost vůči glutamátu, či glycínu.



Obrázek 22: N-glykosylace reguluje funkční vlastnosti NMDA receptorů. (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí z HEK293 buněk exprimujících nemutované nebo mutované GluN1-1a/GluN2A receptory. Proudy byly vyvolány 5s aplikací 1mM glutamátu (černý obdélník) za přítomnosti 50 μ M glycínu. (B) Graf znázorňuje přehled hodnot proudových odpovědí pro nemutované a mutované GluN1-1a/GluN2A receptory. ANOVA; * p <0.05 vůči kontrole (GluN1-1a/GluN2A). (C) a (D) Sloupcové grafy shrnují hodnoty poměru proudových odpovědí v rovnovážném stavu, vyvolaných aplikací (C) 10 μ M a 1mM glutamátu, nebo (D) 0,5 μ M a 100 μ M glycínu pro uvedené GluN1-1a/GluN2A receptory. ANOVA; * p <0,05 vůči kontrole (GluN1-1a/GluN2A).

Nakonec jsme zkoumali, zda přítomnost N-glykanů ovlivňuje funkční vlastnosti nativních NMDA receptorů. Elektrofyzilogická měření jsme prováděli na CGC kulturách, které jsme předem inkubovali spolu s PNGázou F (deglykosylační enzym). První pokusy ukázaly, že došlo ke změně poměru proudových odpovědí v rovnovážném stavu vyvolaných

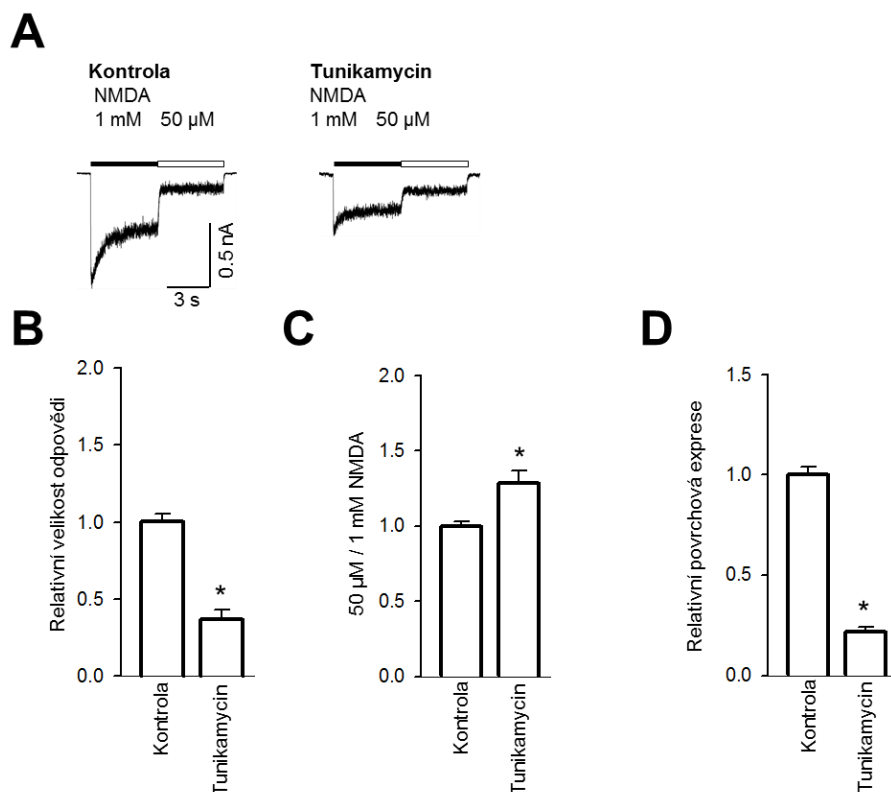
aplikací NMDA v koncentraci 50 μM a 1 mM (v přítomnosti 10 μM glycinu). Naproti tomu, časová konstanta nástupu inhibice prostřednictvím MK-801 (Chen et al., 1999), který působí jako blokátor otevřeného iontového kanálu NMDA receptoru a změny v nástupu jeho inhibice odrážejí změny v P_o , ani poměr proudových odpovědí v rovnovážném stavu, vyvolaných aplikací 0,5 μM a 100 μM glycinu, změněny nebyly (viz Obr. 23A-G).



Obrázek 23: N-glykosylace reguluje funkční vlastnosti NMDA receptorů. (A), (D) a (F) CGC kultury inkubované po dobu 60 min buď s PNGázou F, nebo bez (kontrola). Reprezentativní záznamy proudových odpovědí vyvolaných aplikací: (A) 50 μM a 1mM NMDA (bílý a černý obdélník, respektive) za přítomnosti 10 μM glycinu, (D) 0,5 μM a 100 μM glycinu (bílý a černý obdélník, respektive) za přítomnosti 1mM NMDA a (F) 1mM NMDA (černý obdélník) a 1 μM MK-801 (bílý obdélník). (B), (C), (E) a (G) Sloupcové grafy reprezentují: (B) velikosti proudových odpovědí vyvolaných 1mM NMDA; poměr hodnot proudových odpovědí v rovnovážném stavu, vyvolaných aplikací (C) 50 μM a 1mM NMDA nebo (E) 0,5 μM a 100 μM glycinu a (G) hodnoty časových konstant nástupu inhibice vyvolané 1 μM MK-801. V grafech jsme hodnoty naměřené na CGC kulturách inkubovaných s PNGázou F normalizovali vůči kontrolním odpovědím, naměřeným ve stejný den. Studentův t-test; * $p < 0,05$ vůči kontrolním CGC kulturám.

Následně jsme CGC kultury inkubovali také s inhibitorem N-glykosylace, tunikamycinem (zabraňuje N-glykosylaci již v ER). Po inkubaci se významně snížila velikost proudových odpovědí i poměr proudových odpovědí v rovnovážném stavu vyvolaných aplikací 50 μM a 1mM NMDA (viz Obr. 24A-C), avšak poměr proudových odpovědí v rovnovážném stavu vyvolaných aplikací 0,5 μM a 100 μM glycinu nebyl změněn (Vagin et al., 2009). Abychom podpořili předchozí výsledky, s tunikamycinem jsme inkubovali také COS-7 buňky exprimující GluN1-1a/GluN2A receptory. Za pomoci kolorimetrické metody jsme zjistili, že po inkubaci je počet GluN1-1a/GluN2A receptorů na buněčném povrchu

významně snižen (viz Obr. 24D). Tyto výsledky ukázaly, že přítomnost *N*-glykanů u nativních NMDA receptorů ovlivňuje nejen transport, ale i funkční vlastnosti NMDA receptorů.

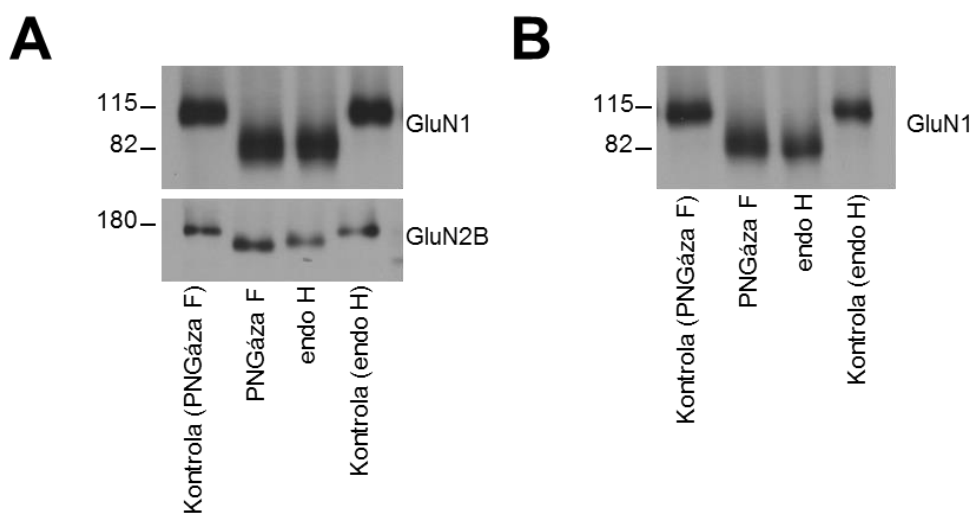


Obrázek 24: *N*-glykosylace reguluje funkční vlastnosti NMDA receptorů. (A-D) Elektrofyziologická měření na CGC kulturách 48 h inkubovaných s tunikamycinem (1 μ g/ml). (B a C) Sloupcové grafy reprezentují: (B) souhrn velikosti proudových odpovědí vyvolaných 1mM NMDA a (C) poměr hodnot proudových odpovědí v rovnovážném stavu vyvolaných aplikací 50 μ M a 1mM NMDA. Hodnoty naměřené na CGC kulturách inkubovaných s tunikamycinem jsou normalizované vůči kontrolním odpovědím naměřeným ve stejný den. Studentův t-test; * $p < 0,05$ vůči kontrolním CGC kulturám. (D) COS-7 buňky exprimující GluN1-1a/GluN2A receptory byly 36 h inkubovány s tunikamycinem (1 μ g/ml). Sloupcový graf představuje hodnoty relativní povrchové exprese (povrchový/celkový signál) GluN1-1a/GFP-GluN2A receptorů normalizované vůči kontrolním buňkám, jež nebyly inkubovány s tunikamycinem. Studentův t-test; * $p < 0,05$ vůči kontrolním (neinkubovaným) COS-7 buňkám.

4.6 Deglykosylační analýza nativních NMDA receptorů

Podle místa jejich vzniku můžeme *N*-glykany rozdělit do dvou skupin: i) manózoový typ, zodpovědný za správné zformování a rozdělení proteinů v ER, a ii) komplexní a hybridní typy *N*-glykanů, které vznikají v GA (Moremen et al., 2012; Vagin et al., 2009). Je známo, že GluN1 a GluN2 podjednotky jsou citlivé jak vůči PNGáze F (odštěpuje všechny typy *N*-glykanů), tak endo H (odštěpuje manózoový a hybridní, ale ne komplexní typ *N*-glykanů) (Clark et al., 1998; Huh and Wenthold, 1999; Kaniakova et al., 2012b). Pro

charakterizaci *N*-glykanových struktur na nativních NMDA receptorech jsme použili mozečkový lyzát, připravený z 5-8 denních potkanů. Stáří potkanů bylo vybráno s ohledem na následná elektrofyziologická měření (limitace velikostí proudů). Mozečkové lyzáty jsme inkubovali s PNGázou F a endo H a následně pomocí SDS-elektroforézy a Western blotu detekovali pohyblivost GluN1 a GluN2B podjednotek v gelu. Nativní GluN1 podjednotky, štěpené PNGázou F, měly podobnou pohyblivost v gelu jako GluN1 podjednotky, štěpené endo H (viz Obr. 25A). Z toho vyplývá, že endo H kompletně odštěpila všechny dostupné *N*-glykany na nativní GluN1 podjednotce. Deglykosylační analýzou jsme obdrželi podobné výsledky také v případě GluN1 podjednotek získaných z mozečků dospělých jedinců (viz Obr. 25B). U GluN2B podjednotky jsme překvapivě zjistili, že její mobilita je po inkubaci s endo H značně snížena, v porovnání s mobilitou po inkubaci s PNGázou F (viz Obr. 25A). Na základě těchto výsledků předpokládáme, že GluN1 a GluN2B podjednotky v mozečkových neuronech obsahují rozdílné typy *N*-glykanových struktur.



Obrázek 25: Deglykosylační analýza NMDA receptorů. Mozečkové lyzáty, získané z: 5-8 denních potkanů (**A**) a z dospělých jedinců (**B**), byly inkubovány s PNGázou F nebo s endo H. Vzorky s GluN1 a GluN2B podjednotkami byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy a detekovány anti-GluN1 a anti-GluN2B protilátkami. Expres GluN2B podjednotky u dospělých jedinců nebyla na imunoblotech detekována, v důsledku výskytu této podjednotky převážně prenatálně a po narození. (**A**, **B**) Reprezentativní snímky imunoblotů zobrazují relativní pohyblivost vybraných GluN podjednotek štěpených pomocí PNGázy F, nebo endo H. Relativní pohyblivost v gelu pro GluN podjednotky štěpené endo H (hodnoceno jako poměr mezi vzorky inkubovanými v endo H a v PNGáze) byla následující: GluN1 (5-8 denní potkani): 1 ± 0 ; GluN2B (5-8 denní potkani): $0,6 \pm 0,05$; GluN1 (dospělí jedinci): 1 ± 0 ; $n=3$.

4.7 Biochemická analýza nativních NMDA receptorů

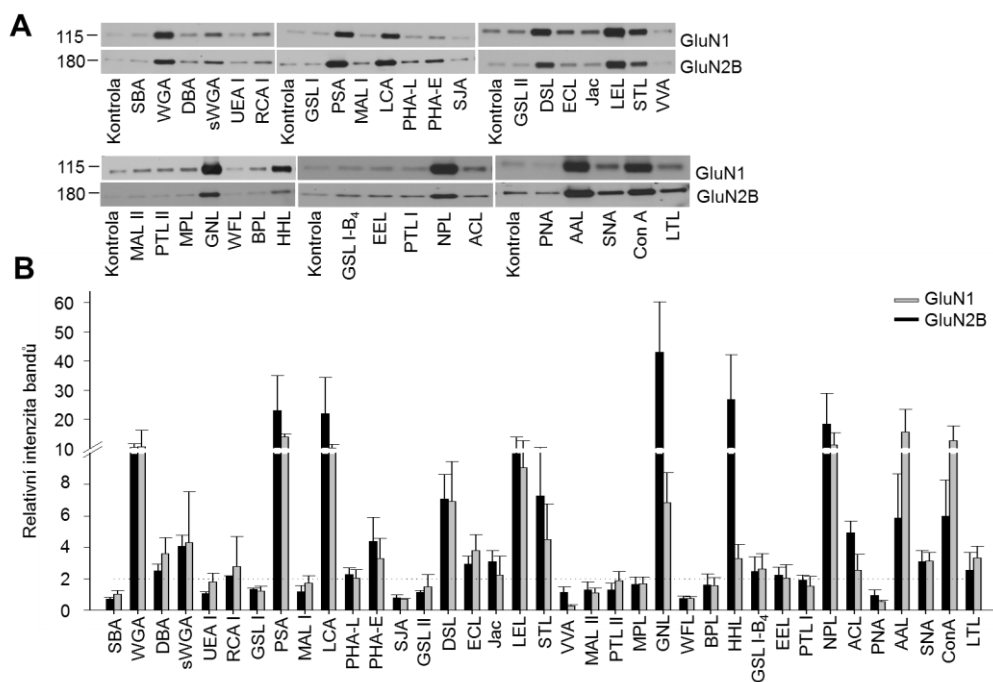
V další fázi jsme prostřednictvím široké škály lektinů charakterizovali glykanové struktury na NMDA receptorech. Pomocí biochemických metod jsme zkoumali, které lektiny (konjugované s agarózou) mají schopnost asociovat s konkrétními glykanovými strukturami na nativních NMDA receptorech. Lektinovou esej jsme prováděli na mozečkových lyzátech, připravených z 5-8 denních potkanů. Mozečkový lyzát (500 μ g) jsme přes noc inkubovali s 37 druhy lektinů (viz Tab. 1). Pomocí biochemické analýzy jsme zjistili, že s GluN1 i GluN2B podjednotkami asociovalo 23 druhů lektinů z 37 testovaných (viz Obr. 26A, B). Mezi pozitivními lektiny byli zástupci, rozpoznávající *N*-glykanové struktury obsahující α -manózu (ConA, PSA, LCA, GNL, HHL, NPL) a *N*-acetylglukosamin (WGA, sWGA), jenž se nacházejí ve všech typech *N*-glykanů. Patří sem také lektiny, které rozpoznávají struktury hybridních a/nebo komplexních typů *N*-glykanů, včetně galaktózy (RCA I), α -galaktózy (GSL-I-B₄), Gal β 4GlcNAc β 6(GlcNAc β 2Man α 3)Man α 3 (PHA-L), Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 4)(GlcNAc β 4Man α 3)Man β 4 (PHA-E), (GlcNAc)₂₋₄ (DSL, LEL, STL), Gal β 4GlcNAc (ECL), Fuc α 6GlcNAc (AAL), Neu5Ac α 6Gal/GalNAc (SNA), α Fuc (LTL), Gal β 3GalNAc (Jac, ACL), α GalNAc (DBA) a Gal α 3Gal (EEL). Daná zjištění ukázala, že *N*-glykanové složení NMDA receptorů je s největší pravděpodobností modifikováno v GA, kde vzniká většina hybridních a/nebo komplexních *N*-glykanových struktur.

Tabulka 1: Specificita lektinů pro glykany vázané na podjednotky NMDA receptorů.

POZITIVNÍ LEKTINY	PREFEROVANÝ TYP GLYKANU (<i>N/O</i> -GLYCOSYLACE)
Concanavalin A (Con A), <i>Pisum sativum</i> (PSA), <i>Lens culinaris</i> (LCA), <i>Galanthus nivalis</i> (GNL), <i>Hippeastrum hybrid</i> (HHL), <i>Narcissus pseudonarcissus</i> (NPL)	α Man – M, H, C (N)
Wheat Germ (WGA), sukcinylovaný Wheat Germ (sWGA)	GlcNAc – M, H, C (N)
<i>Ricinus communis</i> I (RCA I)	Gal – H, C (N)
<i>Phaseolus vulgaris</i> Leucoagglutinin (PHA-L)	Gal β 4GlcNAc β 6(GlcNAc β 2Man α 3)Man α 3 – H, C (N)
<i>Phaseolus vulgaris</i> Erythroagglutinin (PHA-E)	Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 4)(GlcNAc β 4Man α 3)M an β 4 – H, C (N)
<i>Datura stramonium</i> (DSL), <i>Lycopersicon esculentum</i> (LEL), <i>Solanum tuberosum</i> (STL)	(GlcNAc) ₂₋₄ – H, C (N)

<i>Erythrina crystagalli</i> (ECL)	Gal β 4GlcNAc – H, C (N)
<i>Aleuria aurantia</i> (AAL)	Fuc α 6GlcNAc – H, C (N)
<i>Sambucus nigra</i> (SNA)	Neu5Ac α 6Gal/GalNAc – H, C (N) a C (O)
<i>Lotus tetragonolobus</i> (LTL)	α Fuc – H, C (N) a C (O)
Jacalin (Jac), <i>Amaranthus caudatus</i> (ACL)	Gal β 3GalNAc – C (O)
<i>Dolichos biflorus</i> (DBA)	α GalNAc – C (O)
<i>Euonymus europaeus</i> (EEL)	Gal α 3Gal – H, C (N)
<i>Griffonia simplicifolia</i> I Isolektin B ₄ (GSL I-B ₄)	α Gal – H, C (N)
NEGATIVNÍ LEKTINY	
<i>Griffonia simplicifolia</i> II (GSL II)	α/β GlcNAc – M, H, C (N)
<i>Maackia amurensis</i> I (MAL I)	Gal β 4GlcNAc – H, C (N)
<i>Griffonia simplicifolia</i> I (GSL I)	α Gal/ α GalNAc – H, C (N) a C (O)
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> I (PTL I), <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> II (PTL II)	Gal, GalNAc – H, C (N) a C (O)
<i>Maackia amurensis</i> II (MAL II)	Neu5Ac α 3Gal β 4GalNAc – C (O)
<i>Maclura pomifera</i> (MPL), <i>Bauhinia purpurea</i> (BPL), Peanut (PNA)	Gal β 3GalNAc – C (O)
<i>Sophora japonica</i> (SJA)	β GalNAc – C (O)
Soybean (SBA), <i>Vicia villosa</i> (VVA), <i>Wisteria floribunda</i> (WFL)	α/β GalNAc – C (O)
<i>Ulex europaeus</i> I (UEA I)	α Fuc – H, C (N) a C (O)

Intenzita bandů (viz. Obr. 17) představuje množství GluN1 a GluN2B podjednotek vyvázaných prostřednictvím lektinů. Lektiny s intenzitou převyšující hodnotu negativní kontroly (tzn. jsou > 2), a tedy vázající se na N-glykany na GluN1 a GluN2B podjednotkách, jsou označeny jako pozitivní. Lektiny, které se na podjednotky NMDA receptorů nevázaly, jsou označeny jako negativní. V tabulce jsou uvedeny typy glykanů, preferované jednotlivými lektiny (Man, manóza; GlcNAc, N-acetylglukosamin; Gal, galaktóza; GalNAc, N-acetylgalaktosamin; Fuc, fukóza; Neu5Ac, N-acetylneuraminová kyselina) a formy rozpoznávaných glykanů (M, manózový; H, hybridní; C, komplexní; N, N-glykan; O, O-glykan). Převzato z manuálu Vector Laboratories a Varki et al., 2009.

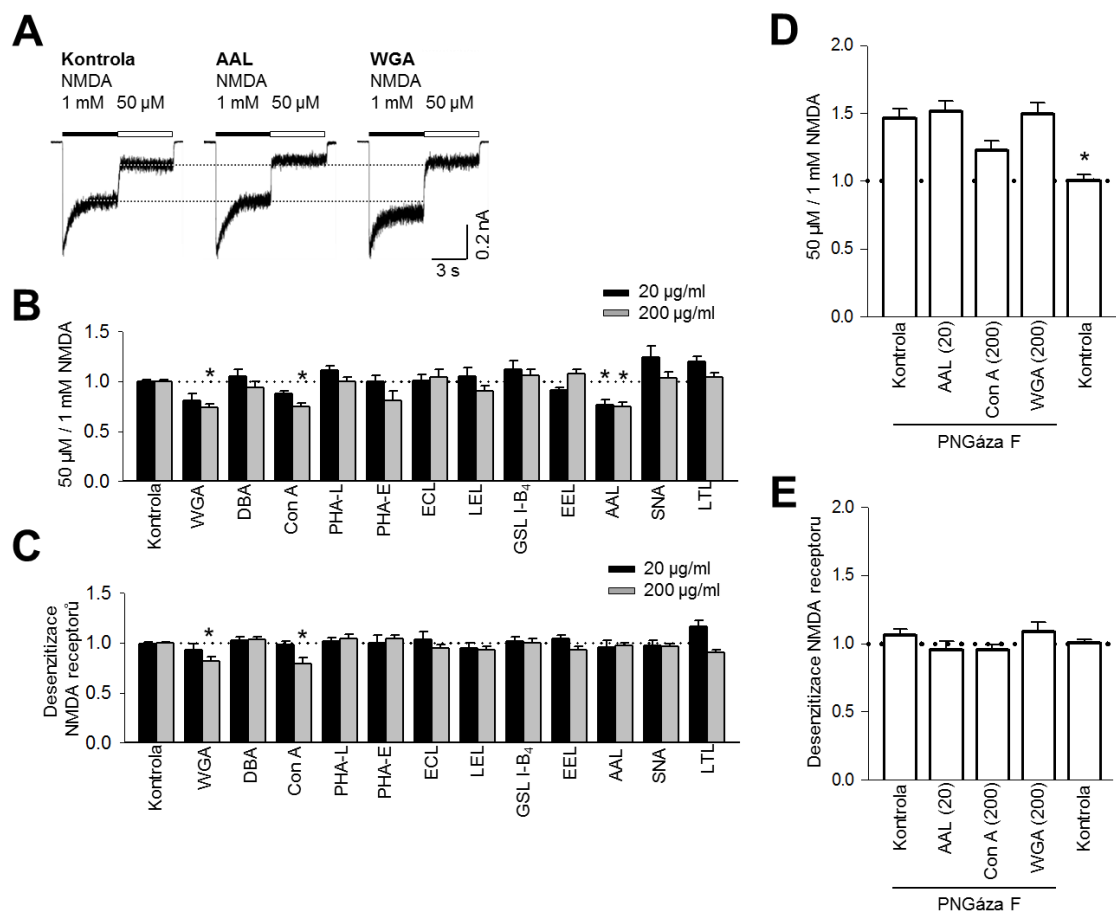


Obrázek 26: Biochemická lektinová analýza nativních NMDA receptorů. (A) Mozečkové lyzáty, získané z 5-8 denních potkanů, byly inkubovány s jednotlivými biotinylovanými lektiny. Vzorokly s biotinylovanými GluN1 a GluN2B podjednotkami jsme analyzovali prostřednictvím SDS elektroforózy a detekovali pomocí anti-GluN1 a anti-GluN2B protilátek. (B) Graf zobrazuje hodnoty relativní intenzity bandů, jež byla kvantifikována na základě vazby uvedených lektinů na GluN1 a GluN2B podjednotky. Hodnoty intenzity bandů jsme normalizovali vůči negativnímu kontrolnímu signálu z odpovídajícího imunoblotu. Přerušovaná čára vyznačuje stanovenou hodnotu negativní kontroly, tzn. > 2.

4.8 Elektrofyziologická analýza nativních NMDA receptorů

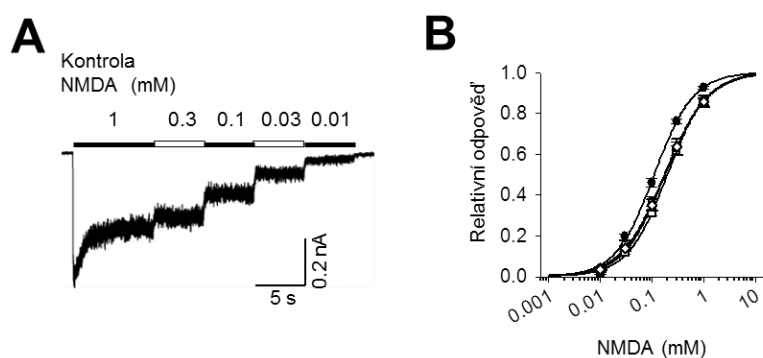
Předešlé výsledky ukázaly, že NMDA receptory obsahují širokou škálu různých *N*-glykanových struktur. Proto jsme se zaměřili na otázku, zda vybrané lektiny ovlivňují i funkční vlastnosti NMDA receptorů. Elektrofyziologická měření jsme prováděli na CGC kulturách z 5-8 denních potkanů. Výhodou CGC je jejich relativně malá velikost, která umožňuje během snímání lépe kompenzovat kapacitu buňky. Před začátkem elektrofyziologického snímání jsme neurony 8 min inkubovali s lektiny v roztoku, který neobsahoval žádné sacharidy, abychom vyloučili jejich případnou nespecifickou interakci. Lektiny jsme vybrali na základě biochemické analýzy a měřili při dvou různých koncentracích (20 a 200 $\mu\text{g/ml}$). Zkoumali jsme vliv vybraných lektinů na velikost proudových odpovědí, relativní afinitu pro NMDA a míru desenzitizace při saturující koncentraci agonistů. Tato analýza ukázala, že žádný ze studovaných lektinů neměl vliv na velikost proudových odpovědí. Ve většině případů také nedošlo po pre-inkubaci s lektiny ke změně funkčních vlastností NMDA receptorů (viz Obr. 27A-E), avšak v případě AAL

lektinu došlo při obou koncentracích (20 i 200 μ g/ml) ke změně poměru hodnot proudových odpovědí v ustáleném stavu, vyvolaných aplikací 50 μ M a 1mM NMDA (viz Obr. 27D). WGA a ConA lektiny při koncentraci 200 μ g/ml měly vliv jak na změnu poměru hodnot proudových odpovědí vyvolaných aplikací 50 μ M a 1mM NMDA, tak i na desenzitizaci NMDA receptorů (viz Obr. 27E).



Obrázek 27: Specifické lektiny ovlivňují funkční vlastnosti NMDA receptorů. (A) Repräsentativní záznamy proudových odpovědí z CGC, vyvolaných 5s aplikací 50 μ M a 1mM NMDA (vyznačeno bílými a černými obdélníky, respektive) v přítomnosti 10 μ M glycinu. Proudové odpovědi jsme snímali na kontrolních CGC kulturách (inkubovaných bez lektinů) a na CGC kulturách inkubovaných 8 min s AAL nebo WGA lektiny (20 a 200 μ g/ml). (B) Sloupcový graf zobrazuje hodnoty relativní afinity pro NMDA, stanovené jako poměr hodnot proudových odpovědí v rovnovážném stavu, vyvolaných aplikací 50 μ M a 1mM NMDA. (C) Sloupcový graf znázorňuje míru desenzitizace NMDA receptorů, stanovenou jako poměr hodnot proudových odpovědí v rovnovážném stavu vůči maximálnímu proudu, vyvolanému aplikací 1mM NMDA a 10 μ M glycinu. Uvedené lektiny byly testovány ve dvou koncentracích (20 μ g/ml a 200 μ g/ml). (D) a (E) Sloupcové grafy znázorňují poměry hodnot proudových odpovědí v rovnovážném stavu, vyvolaných aplikací 50 μ M a 1mM NMDA (D) a míru desenzitizace receptoru (E) po inkubaci CGC kultur s vybranými lektiny v koncentracích 20 a 200 μ g/ml. (B-E) Získané hodnoty jsou prezentovány se střední odchylkou \pm SEM; $n \geq 6$. * $p = 0,001-0,05$, ** $p < 0,001$ vůči kontrolním CGC kulturám, inkubovaným bez lektinů (ANOVA; Student-Newman-Keuls metoda; (v případě (B) pro 200 μ g/ml a (D)); nebo Dunnova metoda (v případě (B) pro 20 μ g/ml a (C))).

Naše předchozí experimenty ukázali, že enzym PNGáza F mění poměr proudových odpovědí v rovnovážném stavu, vyvolaných aplikací 50 μ M a 1mM NMDA (viz Obr. 23A-G). Abychom ověřili, zda změna funkčních vlastností NMDA receptorů, vyvolaná AAL, ConA a WGA lektiny, je způsobena přítomností *N*-glykanů na receptorech, inkubovali jsme CGC kultury s PNGázou F. Odštěpení všech glykanů vedlo k eliminaci vlivu AAL při koncentraci 20 μ g/ml (viz Obr. 28A, B). Podobné výsledky jsme obdrželi i pro WGA a ConA v koncentraci 200 μ g/ml (viz Obr. 28A, B). Tyto výsledky ukázaly, že AAL, WGA a ConA lektiny mohou prostřednictvím přímé interakce lektin-receptor měnit funkční vlastnosti nativních NMDA receptorů.

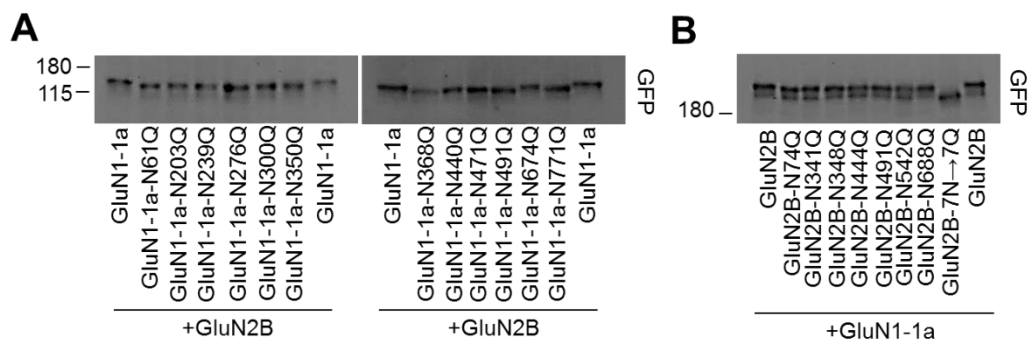


Obrázek 28: Specifické lektiny ovlivňují funkční vlastnosti NMDA receptorů. (A) Reprezentativní záznam proudové odpovědi kontrolního (neinkubovaného) CGC neuronu, vyvolané aplikací NMDA v koncentracích 0,01–1 mM za přítomnosti 10 μ M glycinu. (B) V případě CGC kultur inkubovaných s lektiny (v μ g/ml: 20 AAL, 200 ConA a 200 WGA) došlo k posunu křivky koncentrační závislosti pro účinek NMDA směrem doprava. Hodnoty EC_{50} pro NMDA (kontrola: $112,5 \pm 7,0 \mu$ M; AAL: $200,6 \pm 13,4 \mu$ M; WGA: $188,6 \pm 29,0 \mu$ M; ConA: $180,6 \pm 21,4 \mu$ M; $n \geq 5$), získané z CGC inkubovaných s lektiny, se významně liší od kontrolních CGC, inkubovaných bez lektinu (ANOVA; Student-Newman-Keulsova metoda; $p < 0,05$).

4.9 Obsazenost *N*-glykany na predikovaných *N*-glykosylačních místech v GluN1 a GluN2B podjednotkách NMDA receptoru

Předchozí studie z naší i ze zahraničních laboratoří ukázaly, že NMDA receptory jsou *N*-glykosylovány (Everts et al., 1997; Huh and Wenthold, 1999; Kenny et al., 2009). Předpokládá se, že pouze některá z predikovaných *N*-glykosylačních míst jsou obsazena *N*-glykany. Avšak to, zda jsou predikovaná *N*-glykosylační místa na GluN podjednotkách skutečně obsazena *N*-glykany, není doposud známo. Za tímto účelem jsme použili mutované GluN1-1a a GluN2B podjednotky se N \rightarrow Q záměnou v jednotlivých predikovaných *N*-glykosylačních motivech (N-X-S/T), které jsme exprimovali v heterologních HEK293 buňkách a následně zkoumali jejich pohyblivost v polyakrylamidovém gelu. Na základě

pohybu mutovaných GluN1-1a podjednotek v gelu jsme zjistili, že 11 ze 12 predikovaných *N*-glykosylačních míst je skutečně obsazeno glykany (na pozicích: N61, N203, N239, N276, N300, N350, N368, N440, N471, N491 a N771). *N*-glykosylační místo na pozici N674 obsahuje v rámci motivu prolin, což znemožňuje navázání *N*-glykanu a zřejmě z toho důvodu není místo obsazeno (viz Obr. 29A). Přítomnost *N*-glykanů na asparaginových zbytcích v pozicích N203 a N368 na GluN1 podjednotce potvrdila naše předchozí výsledky, a sice že tyto zbytky jsou důležité pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch. Pohyblivost mutovaných GluN2B podjednotek v polyakrylamidovém gelu ukázala, že všech 7 predikovaných *N*-glykosylačních míst (N74, N341, N348, N444, N491, N542, N688) je obsazeno glykany (viz Obr. 29B). Naše výsledky ukázaly, že většina predikovaných *N*-glykosylačních míst skutečně obsahuje glykanové struktury, které regulují povrchovou expresi i funkční vlastnosti NMDA receptorů.



Obrázek 29: Obsazenost *N*-glykosylačních míst na GluN1-1a a GluN2B podjednotkách prostřednictvím *N*-glykanů. (A) a (B) HEK293 buňky byly kotransfekovány nemutovanou, či mutovanou variantou (A) YFP-GluN1-1a (GluN1) a (B) GFP-GluN2B (GluN2B) podjednotky. 24 h po transfekci byly GluN podjednotky analyzovány pomocí SDS elektroforézy a detekovány specifickými protilátkami. V mnoha případech byla změněna mobilita mutovaných GluN podjednotek, v porovnání s nemutovanými podjednotkami.

5 Diskuze

Časný transport NMDA receptorů je regulován specifickými kontrolními mechanismy, které zajišťují, že pouze správně složené receptory jsou uvolněny z ER na buněčný povrch. V dané dizertační práci jsme pomocí moderních biochemických, mikroskopických a elektrofyziologických technik zkoumali: i) mechanismus regulace povrchové exprese GluN1/GluN2C receptorů, ii) vliv *N*-glykanů na časný transport GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů, a iii) *N*-glykanové struktury přítomné na nativních NMDA receptorech a vliv různých druhů lektinů na funkční vlastnosti NMDA receptorů.

5.1 Vliv GluN2C podjednotky na časný transport NMDA receptorů

Naše zjištění, že GluN1-1a/GluN2A a GluN1-1a/GluN2B receptory jsou v savčích buněčných liniích odlišným způsobem transportovány na buněčný povrch (Obr. 5A, B), je konzistentní s výsledky předchozí studie (Chen et al., 1999). Nicméně, v nativním systému kultivovaných CGC jsme nepozorovali rozdíl v míře povrchové exprese pro GluN2A a GluN2B podjednotky. Tyto rozdílné výsledky mohou být způsobeny přítomností endogenních GluN2 podjednotek v kultivovaných CGC, které tvoří různé NMDA receptorové komplexy, včetně triheteromerních receptorů (Hansen et al., 2014; Ulbrich and Isacoff, 2008). V porovnání s GluN1-1a/GluN2A a GluN1-1a/GluN2B receptory, je povrchová exprese GluN1-1a/GluN2C receptorů v savčích buněčných liniích i CGC značně snížena. Z toho vyplývá, že GluN2C podjednotka pravděpodobně obsahuje strukturní determinanty, které jsou nezbytné pro regulaci transportu GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Samostatně exprimovaná GluN2C podjednotka byla, podobně jako GluN2A a GluN2B podjednotka, zadržena v intracelulárních kompartmentech (Obr. 8E, F) (Horak et al., 2008; McIlhinney et al., 1998). Tento závěr je v souladu s hypotézou, že interakce GluN2 podjednotek s GluN1 podjednotkou je nezbytná pro uvolnění všech typů GluN1/GluN2 receptorů z ER (Fukaya et al., 2003; Okabe et al., 1999; Perez-Otano et al., 2001). Na GluN2C podjednotce jsme identifikovali tři různé oblasti (v rámci ATD, TMD a CTD), které jsou nezbytné pro normální transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Z toho vyplývá, že GluN2C podjednotka významným způsobem přispívá k regulaci časného transportu NMDA receptorů na buněčný povrch.

Naše pokusy ukázaly, že zkrácení GluN2C podjednotky za M1 doménou způsobilo její zadržení v intracelulárních kompartmentech. To naznačuje, že N-koncová část GluN2C podjednotky obsahuje ER retenční motiv. Předchozí studie ukázala, že A2 segment na GluN2A podjednotce, avšak nikoli na GluN2B podjednotce, působí jako podjednotkově-vázaný ER retenční motiv (Qiu et al., 2009). Naše výsledky ukázaly, že rovněž GluN2C podjednotka obsahuje v A2 segmentu ER retenční motiv, neboť delece A2 segmentu v ATD umožňuje expresi zkrácené formy GluN2C podjednotky na buněčném povrchu. Je zajímavé, že delece A2 segmentu v nezkrácené formě GluN2C podjednotky naopak povrchovou expresi GluN1-1a/GluN2C receptorů snižuje (Obr. 8A, B). Tato pozorování jsou v souladu s předchozími výsledky, získanými pro GluN1/GluN2A receptory. Z našich a již dříve publikovaných výsledků tedy vyplývá, že GluN2A i GluN2C podjednotky obsahují v A2 segmentu specifický ER retenční motiv, nezbytný pro regulaci povrchové exprese NMDA receptorů, který je vyrušen vzájemnou interakcí mezi správně zformovanými podjednotkami GluN1-1a/GluN2A a GluN1-1a/GluN2C receptorů. I přesto, že oblast A2 segmentu je mezi jednotlivými GluN2 podjednotkami vysoce konzervovaná, není doposud známo, proč tato oblast reguluje transport u GluN1-1a/GluN2A a GluN1-1a/GluN2C receptorů odlišným způsobem než u GluN1-1a/GluN2B receptorů. Příčinu můžeme hledat např. v různých specifických proteinových vazebných partnerech pro A2 segment na jednotlivých GluN2 podjednotkách, nebo také, že A2 segment je u GluN1-1a/GluN2A a GluN1-1a/GluN2C receptorů nezbytný pro správné zformování heterotetramerů a pro jejich uvolnění z ER. Druhou možností podporuje i skutečnost, že pro správné zformování GluN1/GluN2 heterotetramerů je zapotřebí rozpojení homodimerů GluN1 podjednotky (Farina et al., 2011).

Naše experimenty ukázaly, že pro transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch jsou nezbytné také tři aminokyselinové zbytky (W645, Y656 a T657) v M3 doméně GluN2C podjednotky. Výsledky naší předchozí studie ukázaly, že identické aminokyselinové zbytky v GluN1-1a, GluN2A a GluN2B podjednotkách jsou rovněž nezbytné pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch (Kaniakova et al., 2012a). Na rozdíl od GluN2A a GluN2B podjednotek, měla GluN2C podjednotka s mutacemi v M3 doméně extrémně snížené proudové odpovědi v porovnání s nemutovanou GluN2C podjednotkou (Obr. 10A-E). To může být způsobeno sníženou povrchovou expresí mutovaných GluN1-1a/GluN2C receptorů. K tomuto snížení dochází pravděpodobně stejným mechanismem jako v případě GluN1-1a/GluN2A a GluN1-1a/GluN2B receptorů. Další možné vysvětlení pro rozdíly ve snížení expresi může být, že regulace povrchové exprese v případě GluN1-1a/GluN2C receptorů je mnohem těsněji spojena s integritou membránových domén, než je tomu u jiných podtypů

NMDA receptorů. TMD u GluN podjednotek jsou obecně pro regulaci regulaci NMDA receptorů nezbytné (Ren et al., 2007; Salous et al., 2009). Nedávno bylo navíc ukázáno, že M4 doména u GluN1 a GluN2 podjednotek je nezbytná pro správné zformování funkčních receptorů (Schorge and Colquhoun, 2003). Z našich a předchozích pozorování tedy vyplývá, že interakce mezi jednotlivými TMD jsou klíčové pro regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch. Zatím není zcela jasné, zda k vzájemným interakcím mezi podjednotkami, jež jsou nezbytné pro regulaci transportu NMDA receptorů, dochází ve specifických kompartmentech ER, nebo později v průběhu transportu na buněčný povrch (Cao et al., 2011; Greger et al., 2003; Kaniakova et al., 2012b; Salussolia et al., 2011).

V našich závěrečných pokusech pro určení strukturálních determinant jsme zjistili, že delece celé CTD u GluN2C podjednotky vedla k významnému snížení počtu funkčních GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčném povrchu. Naproti tomu, delece CTD u GluN2A a GluN2B podjednotek nemá na počet povrchových GluN1-1a/GluN2A a GluN1-1a/GluN2B receptorů zásadní vliv (Horak et al., 2008; Vissel et al., 2001). Pomocí série různých delecí a mutací jsme odhalili kritický strukturální motiv SLPSP v proximální části CTD u GluN2C podjednotky, který je zodpovědný za regulaci povrchové exprese GluN1-1a/GluN2C receptorů. Zatím není známo, zda se na tento motiv váže některý ze specifických proteinových vazebných partnerů, který ovlivňuje transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Nelze také vyloučit možnost, že CTD u GluN2C podjednotky obsahuje kromě SLPSP motivu ještě další strukturální determinanty, regulující transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Tuto variantu podporuje také studie, zaměřená na CTD u GluN2C podjednotky, v níž byl identifikován strukturální motiv RHASLP, na který se pravděpodobně váže jako vazebný partner protein 14-3-3-ε (Chen and Roche, 2009). Dále jsme zjistili, že delece PDZ-vazebné domény na CTD u GluN2C podjednotky (GluN2C-1241stop) nemá na povrchovou expresi GluN1-1a/GluN2C receptorů vliv. Toto pozorování je v souladu s předchozími výsledky, kdy fosforylace serinových zbytků v blízkosti PDZ-vazebné domény na GluN2C podjednotce nemá na regulaci transportu GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch vliv (Chen et al., 2006).

Na základě těchto pozorování jsme dospěli k závěru, že CTD, včetně motivu SLPSP, hraje specifickou roli v regulaci transportu GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Z našich výsledků však nelze určit, zda strukturální motiv SLPSP má význam pro regulaci intracelulárního transportu GluN1/GluN2C receptorů a/nebo pro zpracování na úrovni ER. Aminokyselinová sekvence CTD u GluN2C podjednotky vykazuje nízkou homologii v porovnání s CTD u GluN2A a GluN2B podjednotek (Ishii et al., 1993).

Vzhledem k tomu, že se strukturní motiv SLPSP nachází pouze v aminokyselinové sekvenci CTD u GluN2C podjednotky, předpokládáme, že reguluje transport GluN1/GluN2C receptorů unikátním, podjednotkově-specifickým mechanismem.

5.2 *N*-glykosylační místa (N203 a N368) v GluN1 podjednotce jsou nezbytné pro uvolnění NMDA receptorů z ER

V dané části dizertační práce jsme se pokoušeli objasnit význam predikovaných *N*-glykosylačních míst na GluN1, GluN2A a GluN2B podjednotkách pro regulaci transportu a funkci NMDA receptorů. Naše výsledky ukázaly, že *N*-glykosylační místa hrají zásadní úlohu nejen v uvolňování NMDA receptorů z ER, ale ovlivňují také funkční vlastnosti rekombinantních i nativních NMDA receptorů.

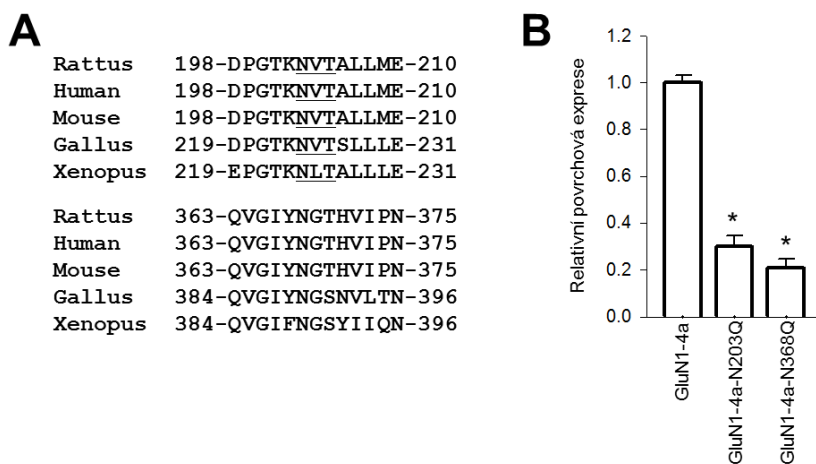
Předchozí studie ukázaly, že některé sestřihové varianty GluN1 podjednotky a všechny typy GluN2 podjednotek jsou zadržovány v ER, než dojde k jejich sestavení do funkčních heterotetramerů (Fukaya et al., 2003; McIlhinney et al., 1998; Okabe et al., 1999). Navíc byly identifikovány specifické oblasti v GluN podjednotkách, které regulují správné zformování a/nebo zadržování NMDA receptorů v ER, např. A2 segment v ATD u GluN2A (Qiu et al., 2009) a GluN2C podjednotek, vazebné místo pro glycin na GluN1 podjednotce (Kenny et al., 2009), vazebné místo pro glutamát na GluN2B podjednotce (She et al., 2012), TMD u GluN1 i GluN2 podjednotek (Horak et al., 2008; Kaniakova et al., 2012a) a CTD u některých sestřihových variant GluN1 podjednotky (Horak and Wenthold, 2009; Scott et al., 2001; Standley et al., 2000).

V této části dizertační práce se nám podařilo zjistit, že dvě specifická *N*-glykosylační místa na pozicích N203 a N368 v GluN1 podjednotce regulují uvolňování NMDA receptorů z ER. Abychom podpořili naši hypotézu, že mechanismus kontroly kvality v ER, který se zaměřuje na strukturu a/nebo přítomnost *N*-glykanů na dvou kritických asparaginových zbytcích v GluN1 podjednotce, je univerzální pro všechny savčí buňky, použili jsme v experimentech různé buněčné typy, včetně heterologních COS-7 a HEK293 buněk a nativních kultur CGC a hipokampálních neuronů.

Biotinylační analýza, provedená ve spolupráci s Dr. Suhem z Koreje ukázala, že po odstranění jednoho (GluN1-1a-N203Q a GluN1-1a-N368Q), dvou (GluN1-1a-N203Q-N368Q), deseti (GluN1-1a-10N→10Q), či dvanácti (GluN1-1a-12N→12Q) *N*-glykosylačních míst došlo ke změně pohyblivosti jednotlivých mutovaných GluN1-1a podjednotek v gelu. Z toho vyplývá, že asparaginové zbytky na pozicích N203 a N368

v GluN1 podjednotce jsou v expresním systému HEK293 buněk i neuronů obsazeny pomocí *N*-glykanů, což je v souladu se současným strukturním modelem NMDA receptoru, jenž ukazuje, že daná místa jsou *N*-glykosylována (Blackstone et al., 1992; Everts et al., 1997; Taverna et al., 1994) a rovněž s nedávnou studií zaměřenou na asparaginový zbytek v pozici N368 na GluN1 podjednotce (Gleichman et al., 2012).

Bioinformační analýza ukázala, že obě *N*-glykosylační místa na pozicích N203 a N368 jsou v GluN1 podjednotce vysoce konzervovaná, což podporuje jejich funkční význam (viz Obr. 30A). Předchozí studie ukázaly, že některé sestřihové varianty GluN1 podjednotky se mohou dostat na buněčný povrch i bez spojení s GluN2 podjednotkou. To je pravděpodobně způsobeno nepřítomností ER retenčního motivu v C1 kazetě CTD a/nebo naopak přítomností PDZ-vazebného motivu v C2' kazetě (Horak and Wenthold, 2009; Standley et al., 2000). Zjistili jsme, že bodová záměna (N→Q) na pozicích N203 a N398 v GluN1-4a podjednotce významně snižuje povrchovou expresi GluN1-4a-N203Q a GluN1-4a-N368Q podjednotek v savčích buněčných liniích (viz Obr. 30B). Vzhledem k tomu, že GluN1 podjednotka, v porovnání s GluN2 podjednotkou, je v ER přítomná ve větším množství, její *N*-glykosylace může být jedním z dalších kontrolních mechanismů zpracování NMDA receptorů v ER (Chazot and Stephenson, 1997b; Huh and Wenthold, 1999).



Obrázek 30: *N*-glykosylační místa N203 a N368 v GluN1 podjednotce jsou konzervována po celou dobu evoluce. (A) Aminokyselinová sekvence GluN1 podjednotky vybraných zvířecích druhů. Set sekvencí vlevo a vpravo obsahuje *N*-glykosylační místa N203 a N368, které v potkaních GluN1 podjednotkách významně ovlivňovali transport NMDA receptorů na buněčný povrch. Konvenční, konzervativní *N*-glykosylační místa jsou podtržena. **(B)** Kolorimetrická analýza COS-7 buněk exprimovaných nemutovanými a mutovanými YFP-GluN1-4a (GluN1-4a) podjednotkami. Hodnoty relativní povrchové exprese (povrchový/celkový signál) vybraných podjednotkových kombinací byly normalizovány k hodnotám relativní povrchové exprese nemutované GluN1-4a podjednotky. Výsledné hodnoty jsme získali ze třech nezávislých pokusů (n=9). *p<0,05, vzhledem k nemutované GluN1-4a podjednotce; ANOVA.

Přestože byl účinek eliminace *N*-glykosylačních míst na pozicích N203 a N368 na funkční vlastnosti NMDA receptorů byl statisticky významný, nedošlo u mutovaných receptorů k úplnému vymizení proudových odpovědí. Z toho vyplývá, že ačkoliv jsou funkční vlastnosti těchto receptorů zachovány, pravděpodobně nejsou schopny projít kontrolou kvality, a tak jsou zadrženy v ER. Podobné zjištění bylo pozorováno i v případě některých AMPA receptorů (Penn et al., 2008). Ve spolupráci s Dr. Petraliou z USA se nám pomocí elektronové mikroskopie podařilo lokalizovat GluN1-1a-N203Q-N368Q podjednotku v drsném ER neuronů, na rozdíl od nemutované GluN1 podjednotky, jež byla detekována převážně v synapsích, časných endozomech a v drsném ER. Ze získaných výsledků je patrné, že *N*-glykosylační místa na pozicích N203 a N368 v GluN1 podjednotce jsou nezbytná pro uvolnění NMDA receptorů z ER.

Je známo, že přesné načasování otevírání iontového kanálu NMDA receptorů je nezbytné pro správnou funkci excitačních synapsí (Traynelis et al., 2010). NMDA receptory zaujímají specifickou strukturní konformaci, spojenou se zavřeným, otevřeným a desenzitizovaným stavem iontového kanálu. Funkční vlastnosti NMDA receptorů jsou ovlivněny několika strukturními determinantami v rámci GluN podjednotek, včetně extracelulární ATD (Borschel et al., 2011; Yuan et al., 2009; Zhu et al., 2013). Řada důkazů podporuje hypotézu, že *N*-glykosylace má vliv na regulaci otevírání iontového kanálu NMDA receptoru, a sice: i) několik *N*-glykosylačních míst se nachází v kritických oblastech, které se podílejí na regulaci funkčních vlastností NMDA receptorů, včetně LBD (viz Obr. 16) a ii) elektrofyziologická snímání z oocytů *Xenopus laevis* ukázala, že inkubace oocytů, transfekovaných pomocí GluN1/GluN2B receptorů, s tunikamycinem (inhibitor *N*-glykosylace) vedla k významnému snížení hodnoty EC₅₀ pro glutamát (Everts et al., 1997). Naše experimenty ukázaly, že odstranění všech *N*-glykanových struktur u nativních NMDA receptorů pomocí PNGázy F nebo tunikamycinu, ovlivňuje hodnoty EC₅₀ pro NMDA. Tato zjištění jsou konzistentní s předchozími výsledky získanými na rekombinantních receptorech, exprimovaných v oocytech (Everts et al., 1997).

Naše výsledky tedy ukazují, že NMDA receptory mají na různých *N*-glykosylačních místech pravděpodobně navázané *N*-glykany, včetně pozic N203 a N368 v GluN1 podjednotce. Dosud však není známo, na které další asparaginové zbytky v nativní GluN1 podjednotce se váží *N*-glykany, neboť ve skutečnosti jsou obsazeny pouze 2/3 z predikovaných *N*-glykosylačních míst (Moremen et al., 2012; Vagin et al., 2009). Rovněž nemůžeme vyloučit možnost, že *N*-glykany se nacházejí i na nekonvenčních *N*-glykosylačních místech a/nebo přítomnost jiných glykanových struktur (včetně *O*-glykanů),

kteře mohou být pro transport a funkci NMDA receptorů rovněž nezbytné. Tuto možnost potvrzuje i studie, zaměřená na nekonvenční *N*-glykosylační místo v GluN2B podjednotce, které se podílí na úspěšném doručení GluN1/GluN2B receptorů do synapsí mechanismem nezávislým na aktivitě těchto receptorů (Storey et al., 2011). Naše experimenty ukázaly, že u různých buněčných typů došlo po odstranění zbylých deseti *N*-glykosylačních míst (mimo pozic N203 a N368) v různé míře ke snížení povrchové exprese NMDA receptorů. Tyto rozdílné výsledky by mohly být způsobeny odlišnou expresí v nativních systémech a/nebo přítomností specifických proteinových komplexů, které regulují formování NMDA receptorů, jejich retenci v ER a/nebo intracelulární transport v případě různých buněčných typů.

5.3 Charakterizace *N*-glykanového složení NMDA receptorů

V závěrečné části dizertační práce jsme charakterizovali *N*-glykanové struktury na NMDA receptorech pomocí široké škály dostupných lektinů. Překvapivě, většina z testovaných lektinů (viz Tabulka 1) asociovala s GluN1 i GluN2B podjednotkami, získanými z mozečkového lyzátu. Zjistili jsme například, že testované podjednotky NMDA receptorů silně interagují s lektiny, jež rozeznávají manózoový typ *N*-glykanů. To může souviset se skutečností, že podstatná část NMDA receptorů je lokalizována v ER, kde tento typ *N*-glykanů vzniká (Prybylowski et al., 2002).

Dále jsme identifikovali několik lektinů, které rozpoznávají pouze hybridní a/nebo komplexní typy *N*-glykanů, vznikajících v GA. Z toho vyplývá, že složení *N*-glykanů je pravděpodobně upravováno na základě aktuální potřeby v průběhu transportu NMDA receptorů z ER, přes GA, až na buněčnou membránu.

Dosud není zcela objasněno, zda je *N*-glykanové složení NMDA receptorů upravováno ve strukturách GA (Mikhaylova et al., 2016). Dle značně diskutované studie Jeyifous et al., 2009 jsou NMDA receptory, na rozdíl od AMPA receptorů, schopny obejít somatický GA. Je možné, že pro modifikaci *N*-glykanového složení NMDA receptorů je zapotřebí pouze GA v dendritech, neboť *N*-glykosylační aparát se nachází také v dendritech hipokampálních neuronů (Mikhaylova et al., 2016; Torre and Steward, 1996). Na základě citlivosti AMPA a kainátových receptorů vůči enzymu endo H bylo ukázáno, že u těchto receptorů lze snadno rozlišit zralé a nezralé formy *N*-glykanů (Coleman et al., 2006; Greger et al., 2003; Mah et al., 2005; Standley et al., 1998). Dosud se však nepodařilo rozlišit zralé a nezralé formy *N*-glykanů v případě NMDA receptorů (Huh and Wenthold, 1999; Kaniakova et al., 2012b). Z toho vyplývá, že proces zpracování *N*-glykanů u NMDA receptorů je odlišný

od AMPA a kainátových receptorů. Z toho důvodu je potřeba pro detekci zralosti *N*-glykanů u NMDA receptorů využít ještě jiných, pokročilých glykobiologických metod.

V předchozí studii jsme zjistili, že inkubace CGC s tunikamycinem (inhibitorem *N*-glykosylace v ER) snižuje počet NMDA receptorů na buněčném povrchu. V současnosti však není jasné, zda následné zpracování *N*-glykanů v GA rovněž reguluje povrchovou expresi NMDA receptorů. V této dizertační práci se nám podařilo objevit silnou interakci mezi podjednotkami NMDA receptorů a AAL lektinem, který rozeznává fukózu, přítomnou v hybridních a komplexních typech *N*-glykanových struktur. Bylo ukázáno, že *N*-glykany obsahující fukózu jsou součástí řady jiných glykoproteinů v mozku, které plní různé specifické funkce, včetně regulace formování axonů (Gu et al., 2013). Není známo, zda změny ve složení *N*-glykanů mohou hrát roli v regulaci funkce NMDA receptorů na buněčném povrchu. Stabilita NMDA receptorů na buněčném povrchu a/nebo v synapsi může být ovlivněna přítomností specifických *N*-glykanových struktur, či vazbou endogenních lektinů, např. galektinu-1, který specificky ovlivňuje funkční vlastnosti některých typů glutamátových receptorů (Copits et al., 2014). Je známo, že mnoho regulačních proteinů interaguje s NMDA receptory, včetně SALM proteinů, které jsou rovněž silně *N*-glykosylovány (Horak et al., 2014; Lussier et al., 2015; Seabold et al., 2008). V tuto chvíli proto nelze vyloučit, že některé objevené účinky lektinů mohou být zprostředkovány nepřímou interakcí mezi lektinem a proteiny, asociovanými s NMDA receptory.

V současnosti jsou NMDA receptory považovány za slibný farmakologický cíl, neboť se podílí na patologii řady neuropsychiatrických onemocnění (Lau and Zukin, 2007; Traynelis et al., 2010). *N*-glykanové struktury na NMDA receptorech by proto mohly být cílem různých farmakologických intervencí, neboť jsme ukázali, že několik lektinů mělo vliv na funkční vlastnosti NMDA receptorů. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi na AMPA a kainátových receptorech, které byly modulovány prostřednictvím specifických lektinů již v mikromolárních koncentracích (Everts et al., 1997; Mayer and Vyklicky, 1989; Shen et al., 1999; Traynelis et al., 2010; Wong and Mayer, 1993). V našich pokusech jsme vybrané lektiny použili ve dvou různých koncentracích (20 a 200 μg/ml), jež byly shodné nebo větší, než koncentrace použité ve zmiňovaných studiích na AMPA a kainátových receptorech. Z předchozích studií je zřejmé, že jednotlivé lektiny mají různou afinitu pro odlišné *N*-glykanové struktury (Dam and Brewer, 2010; Moremen et al., 2012; Varki et al., 2009), a také, že mají schopnost tetramerizovat. Z toho důvodu je velmi obtížné stanovit vhodnou koncentraci lektinů pro elektrofyzilogická měření. Bylo také ukázáno, že specifické protilátky mohou rozpoznávat *N*-glykanové struktury na NMDA receptorech a je velmi

pravděpodobné, že tato interakce může mít vliv i na funkční vlastnosti NMDA receptorů (Gleichman et al., 2012). V mozku u schizofrenních pacientů byly objeveny odlišné *N*-glykanové struktury na AMPA receptorech (Tucholski et al., 2013a). Daná skutečnost, spolu s výsledky této dizertační práce, podporují hypotézu, že *N*-glykosylace ovlivňuje transport a funkci NMDA receptorů za normálních i patofyziologických stavů.

6 Souhrn

✓ Podařilo se nám ukázat, že GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B a GluN1/GluN2C receptory vykazují rozdílnou míru povrchové exprese v heterologních buněčných liniích i v neuronech. Předpokládáme, že GluN2 podjednotky mají klíčový význam pro regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch.

✓ Objasnili jsme význam delece aminokyselin na pozicích 159-292 v ATD u GluN2C podjednotky, které jsou klíčové pro regulaci povrchové exprese GluN1/GluN2C receptorů. Nepřítomnost těchto aminokyselin v GluN2C podjednotce nebo nepřítomnost komplementární oblasti v GluN1 podjednotce má za následek nedostatečné maskování ER retenčního motivu v GluN2C podjednotce, což má přímý vliv na regulaci transportu GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch.

✓ Pomocí bodových mutací tří aminokyselin (W645A, Y656A a T657A) v M3 doméně u GluN2C podjednotky jsme prokázali, že narušení integrity M3 domény v GluN2C podjednotce má pro regulaci transportu GluN1/GluN2C receptorů zásadní význam, neboť mutované receptory nejsou na buněčném povrchu přítomné.

✓ Delece téměř celé CTD u GluN2C podjednotky prokázala, že CTD obsahuje motivy důležité pro regulaci transportu GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Delece posledních deseti aminokyselin (tzv. PDZ vazebné domény) na CTD u GluN2C podjednotky neovlivnila transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Zkoumáním úlohy CTD v GluN2C podjednotce se nám podařilo identifikovat specifické místo (SLPSP motiv), důležité pro regulaci transportu GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Tento motiv se v aminokyselinové sekvenci CTD u GluN2A a GluN2B podjednotek nevyskytuje, což může vysvětlit podjednotkově-vázaný rozdíl v povrchové expresi u jednotlivých typů NMDA receptorů.

✓ Pomocí pokročilých molekulárních, mikroskopických, biochemických a elektrofyziologických technik se nám podařilo identifikovat dva *N*-glykosylované asparaginové zbytky (N203 a N368) v GluN1 podjednotce, zodpovědné za uvolnění NMDA receptorů z ER na buněčný povrch.

✓ Ukázali jsme, že GluN2A a GluN2B podjednotky jsou rovněž *N*-glykosylovány, jejich *N*-glykosylační místa však nejsou nezbytná pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch.

✓ Odstranění všech *N*-glykanových struktur z nativních NMDA receptorů vedlo ke

změně afinity receptorů vůči glutamátu.

✓ Pomocí lektinové analýzy se nám podařilo určit, že na GluN1 podjednotce se nachází manósový typ *N*-glykanů, zatímco GluN2B podjednotky obsahují také komplexní a hybridní typ *N*-glykanů

✓ Elektrofyzilogické experimenty ukázaly, že po inkubaci CGC s AAL lektinem (rozpoznávající fukózu v komplexních a hybridních typech *N*-glykanů) dochází ke změně funkčních vlastností nativních NMDA receptorů. To ukazuje na přítomnost komplexních a hybridních typů *N*-glykanových struktur u nativních NMDA receptorů.

✓ Ukázali jsme, že zatímco GluN2B podjednotka má všech 7 predikovaných *N*-glykosylačních míst obsazených pomocí *N*-glykanových struktur (N74, N341, N348, N444, N491, N542, N688), GluN1 podjednotka má obsazených pouze 11 z 12 predikovaných *N*-glykosylačních míst (N61, N203, N239, N276, N300, N350, N368, N440, N471, N491, N771). *N*-glykosylační místo na pozici N674 v GluN1 podjednotce obsahuje ve svém motivu prolin (N-X-S/T; X≠P), který navázání *N*-glykanové struktury brání.

7 Závěr

Správná regulace NMDA receptorů je nezbytná pro mnoho různých procesů včetně excitačního synaptického přenosu, synaptické plasticity, učení, či formování paměti v CNS savců. Naše výsledky přispěly k objasnění molekulárních mechanismů regulace povrchové exprese a funkčních vlastností různých podtypů NMDA receptorů v savčích neuronech. Jsem přesvědčena, že tyto poznatky mohou rovněž pomoci k případnému porozumění vzniku různých neurologických a psychiatrických onemocnění, spojených s abnormální regulací NMDA receptorů, jakými jsou například Alzheimerova a Parkinsonova demence, Huntingtonova nemoc, epilepsie, ischemie, deprese, schizofrenie, či závislost na kokainu.

8 Seznam publikací

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem této disertační práce

LICHNEROVA, K., KANIAKOVA, M., SKRENKOVA, K., VYKLIČKY, L., AND HORAK, M. (2014). Distinct regions within the GluN2C subunit regulate the surface delivery of NMDA receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**, 375.

(LK - molekulární biologie a příprava mutací, fluorescenční a konfokální mikroskopie, analýza dat a statistika)

(IF = 4.3, rok 2014)

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**, 18379–18390.

(LK – molekulární biologie a příprava mutací, fluorescenční a konfokální mikroskopie, kolorimetrická analýza, podílení se na elektrofyziologických experimentech, analýza dat a statistika)

(IF = 4.3, rok 2015)

KANIAKOVA, M., LICHNEROVA, K., SKRENKOVA, K., VYKLIČKY, L., AND HORAK, M. (2016). Biochemical and electrophysiological characterization of N-glycans on NMDA receptor subunits. *Journal of Neurochemistry* **546–556**.

(LK - molekulární biologie a příprava mutací, příprava buněčných lyzátů, biochemická, deglykosylační a lektinová analýza nativních NMDA receptorů, kolorimetrická analýza, podílení se na elektrofyziologických experimentech, analýza dat a statistika)

(IF = 4.0, rok 2016)

Publikace *in extenso*, které nejsou podkladem této disertační práce

KANIAKOVA, M., KRAUSOVA, B., VYKLIČKY, V., KORINEK, M., **LICHNEROVA, K.**, VYKLIČKY, L., AND HORAK, M. (2012). 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**, 26423–26434.

(IF = 4.7, rok 2012)

KANIAKOVA, M., **LICHNEROVA, K.**, VYKLIČKY, L., AND HORAK, M. (2012). Single amino acid residue in the M4 domain of GluN1 subunit regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry* **123**, 385–395.

(IF = 4.0, rok 2012)

KORINEK, M., VYKLIČKY, V., BOROVSKA, J., **LICHNEROVA, K.**, KANIAKOVA, M., KRAUSOVA, B., KRUSEK, J., BALIK, A., SMEJKALOVA, T., HORAK, M., ET AL. (2015). Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. *The Journal of Physiology* **593**, 2279–2293.

(IF = 4.7, rok 2015)

VYKLIČKY, V., KRAUSOVA, B., CERNY, J., BALIK, A., ZAPOTOCKY, M., NOVOTNY, M., **LICHNEROVA, K.**, SMEJKALOVA, T., KANIAKOVA, M., KORINEK, M., ET AL. (2015). Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the agonist induced conformational states of the channel vestibule. *Scientific Reports* **5**, 10935.

(IF = 5.2, rok 2015)

SKRENKOVA, K., LEE, S., **LICHNEROVA, K.**, KANIAKOVA, M., HANSIKOVA, H., ZAPOTOCKY, M., SUH, Z.H., AND HORAK, M. (2018). N-Glycosylation Regulates the Trafficking and Surface Mobility of GluN3A-Containing NMDA Receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **11**, 188.

(IF = 5.1, year 2018)

9 Použitá literatura

- AEBI, M., BERNASCONI, R., CLERC, S., AND MOLINARI, M. (2010). N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 74–82.
- ALVAREZ, V.A., RIDENOUR, D.A., AND SABATINI, B.L. (2007). Distinct structural and ionotropic roles of NMDA receptors in controlling spine and synapse stability. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **27**, 7365–7376.
- ARIDOR, M., GUZIK, A.K., BIELLI, A., AND FISH, K.N. (2004). Endoplasmic reticulum export site formation and function in dendrites. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24**, 3770–3776.
- BARD, L., SAINLOS, M., BOUCHET, D., COUSINS, S., MIKASOVA, L., BREILLAT, C., STEPHENSON, F.A., IMPERIALI, B., CHOQUET, D., AND GROG, L. (2010). Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 19561–19566.
- BARRIA, A., AND MALINOW, R. (2002). Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* **35**, 345–353.
- BARRIA, A., AND MALINOW, R. (2005). NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* **48**, 289–301.
- BECK, C., WOLLMUTH, L.P., SEEBURG, P.H., SAKMANN, B., AND KUNER, T. (1999). NMDAR channel segments forming the extracellular vestibule inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* **22**, 559–570.
- BLACKSTONE, C.D., MOSS, S.J., MARTIN, L.J., LEVEY, A.I., PRICE, D.L., AND HUGANIR, R.L. (1992). Biochemical characterization and localization of a non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor in rat brain. *Journal of Neurochemistry* **58**, 1118–1126.
- BLANKE, M.L., AND VANDONGEN, A.M.J. (2009). Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. *A.M. Van Dongen, ed. (Boca Raton (FL))*.
- BORSCHEL, W.F., MURTHY, S.E., KASPEREK, E.M., AND POPESCU, G.K. (2011). NMDA receptor activation requires remodelling of intersubunit contacts within ligand-binding heterodimers. *Nature Communications* **2**, 498.

- BOUVIER, G., BIDORET, C., CASADO, M., AND PAOLETTI, P. (2015). Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules. *Neuroscience* **311**, 322–340.
- BRESSLOFF, P.C. (2006). Stochastic model of protein receptor trafficking prior to synaptogenesis. *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **74**, 31910.
- BRIANT, K., KOAY, Y.-H., OTSUKA, Y., AND SWANTON, E. (2015). ERAD of proteins containing aberrant transmembrane domains requires ubiquitylation of cytoplasmic lysine residues. *Journal of Cell Science* **128**, 4112–4125.
- BROSE, N., GASIC, G.P., VETTER, D.E., SULLIVAN, J.M., AND HEINEMANN, S.F. (1993). Protein chemical characterization and immunocytochemical localization of the NMDA receptor subunit NMDA R1. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 22663–22671.
- BROTHWELL, S.L.C., BARBER, J.L., MONAGHAN, D.T., JANE, D.E., GIBB, A.J., AND JONES, S. (2008). NR2B- and NR2D-containing synaptic NMDA receptors in developing rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. *The Journal of Physiology* **586**, 739–750.
- CAO, J., QIU, S., ZHANG, J., WANG, J., ZHANG, X., AND LUO, J. (2011). Transmembrane region of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) subunit is required for receptor subunit assembly. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 27698–27705.
- CHATTERTON, J.E., AWOBULUYI, M., PREMKUMAR, L.S., TAKAHASHI, H., TALANTOVA, M., SHIN, Y., CUI, J., TU, S., SEVARINO, K.A., NAKANISHI, N., ET AL. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**, 793–798.
- CHAZOT, P.L., AND STEPHENSON, F.A. (1997a). Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *Journal of Neurochemistry* **69**, 2138–2144.
- CHAZOT, P.L., AND STEPHENSON, F.A. (1997b). 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**, 507–516.
- CHAZOT, P.L., COLEMAN, S.K., CIK, M., AND STEPHENSON, F.A. (1994). Molecular characterization of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in mammalian cells yields evidence for the coexistence of three subunit types within a discrete receptor

- molecule. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 24403–24409.
- 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* **12**, 331–337.
- CHEN, B.S., AND ROCHE, K.W. (2009). Growth factor-dependent trafficking of cerebellar NMDA receptors via protein kinase B/Akt phosphorylation of NR2C. *Neuron* **62**, 471–478.
- CHEN, H.S.V., AND LIPTON, S.A. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry* **97**, 1611–1626.
- CHEN, B.S., BRAUD, S., BADGER, J.D. 2ND, ISAAC, J.T.R., AND ROCHE, K.W. (2006). Regulation of NR1/NR2C N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 16583–16590.
- CHEN, N., LUO, T., AND RAYMOND, L.A. (1999). Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **19**, 6844–6854.
- CHOI, D.W. (1992). Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology* **23**, 1261–1276.
- CHUNG, C., WU, W.-H., AND CHEN, B.-S. (2015). Identification of Novel 14-3-3 Residues That Are Critical for Isoform-specific Interaction with GluN2C to Regulate N-Methyl-D-aspartate (NMDA) Receptor Trafficking. *The Journal of Biological Chemistry* **290**, 23188–23200.
- CLARK, R.A.C., GURD, J.W., BISSOON, N., TRICAUD, N., MOLNAR, E., ZAMZE, S.E., DWEK, R.A., MCILHINNEY, R.A.J., AND WING, D.R. (1998). Identification of Lectin-Purified Neural Glycoproteins, GPs 180, 116, and 110, with NMDA and AMPA Receptor Subunits: Conservation of Glycosylation at the Synapse. *Journal of Neurochemistry* **70**, 2594–2605.
- CLEMENTS, J.D., AND WESTBROOK, G.L. (1991). Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* **7**, 605–613.
- CLEMENTS, J.D., LESTER, R.A., TONG, G., JAHR, C.E., AND WESTBROOK, G.L. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science (New York, N.Y.)* **258**, 1498–1501.
- COLEMAN, S.K., MÖYKKYNNEN, T., CAI, C., VON OSSOWSKI, L., KUISMANEN, E., KORPI, E.R., AND KEINÄNEN, K. (2006). Isoform-specific early trafficking of AMPA receptor flip and flop variants. *The Journal of Neuroscience: The Official*

- Journal of the Society for Neuroscience* **26**, 11220–11229.
- COLLINGRIDGE, G.L., OLSEN, R.W., PETERS, J., AND SPEDDING, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**, 2–5.
- COLLINGRIDGE, G.L., PEINEAU, S., HOWLAND, J.G., AND WANG, Y.T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience* **11**, 459–473.
- COPITS, B.A., VERNON, C.G., SAKAI, R., AND SWANSON, G.T. (2014). Modulation of ionotropic glutamate receptor function by vertebrate galectins. *The Journal of Physiology* **592**, 2079–2096.
- CRUMP, F.T., DILLMAN, K.S., AND CRAIG, A.M. (2001). cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **21**, 5079–5088.
- CULL-CANDY, S., BRICKLEY, S., AND FARRANT, M. (2001). NMDA receptor subunits: Diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* **11**, 327–335.
- CUMMINGS, R.D. (2009). The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Molecular BioSystems* **5**, 1087.
- CURTIS, D.R., AND WATKINS, J.C. (1963). Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *The Journal of Physiology* **166**, 1–14.
- CURTIS, D.R., PHILLIS, J.W., AND WATKINS, J.C. (1960). The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *The Journal of Physiology* **150**, 656–682.
- DALMAU, J., TÜZÜN, E., WU, H., MASJUAN, J., ROSSI, J.E., VOLOSCHIN, A., BAEHRING, J.M., SHIMAZAKI, H., KOIDE, R., KING, D., ET AL. (2007). Paraneoplastic anti- *N* -methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Annals of Neurology* **61**, 25–36.
- DAM, T.K., AND BREWER, C.F. (2010). Lectins as pattern recognition molecules: The effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology* **20**, 270–279.
- DINGLELINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., AND TRAYNELIS, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* **51**, 7–61.
- DORAISWAMY, P.M. (2003). The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in Alzheimer's disease: therapeutic potential. *Current Neurology and Neuroscience Reports* **3**, 373–378.
- DRAVID, S.M., PRAKASH, A., AND TRAYNELIS, S.F. (2008). Activation of recombinant NR1/NR2C NMDA receptors. *The Journal of Physiology* **586**, 4425–4439.

- DUNAH, A.W., LUO, J., WANG, Y.H., YASUDA, R.P., AND WOLFE, B.B. (1998). Subunit composition of N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system that contain the NR2D subunit. *Molecular Pharmacology* **53**, 429–437.
- DUNWIDDIE, T., AND LYNCH, G. (1978). Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: Localization and frequency dependency. *Journal of Physiology* **276**, 353–367.
- ESCOBAR, M.L., AND DERRICK, B. (2007). Long-Term Potentiation and Depression as Putative Mechanisms for Memory Formation.
- EVERTS, I., VILLMANN, C., AND HOLLMANN, M. (1997). N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Molecular Pharmacology* **52**, 861–873.
- FAN, M.M.Y., AND RAYMOND, L.A. (2007). N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology* **81**, 272–293.
- FARINA, A.N., BLAIN, K.Y., MARUO, T., KWIATKOWSKI, W., CHOE, S., AND NAKAGAWA, T. (2011). Separation of domain contacts is required for heterotetrameric assembly of functional NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **31**, 3565–3579.
- FLORES-SOTO, M.E., CHAPARRO-HUERTA, V., ESCOTO-DELGADILLO, M., VAZQUEZ-VALLS, E., GONZALEZ-CASTANEDA, R.E., AND BEAS-ZARATE, C. (2012). Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurologia (Barcelona, Spain)* **27**, 301–310.
- FONG, D.K., RAO, A., CRUMP, F.T., AND CRAIG, A.M. (2002). Rapid synaptic remodeling by protein kinase C: reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependent kinase II. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 2153–2164.
- FREEZE, H.H. (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nature Reviews. Genetics* **7**, 537–551.
- FREEZE, H.H., EKLUND, E.A., NG, B.G., AND PATTERSON, M.C. (2012). Neurology of inherited glycosylation disorders. *The Lancet Neurology* **11**, 453–466.
- FREEZE, H.H., EKLUND, E.A., NG, B.G., AND PATTERSON, M.C. (2015). Neurological Aspects of Human Glycosylation Disorders. *Annual Review of Neuroscience* **38**, 105–125.

- 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**, 4855–4860.
- FURMANEK, A., AND HOFSTEENGE, J. (2000). Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochimica Polonica* **47**, 781–789.
- FURUKAWA, H., SINGH, S.K., MANCUSO, R., AND GOUAUX, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**, 185–192.
- GASCÓN, S., GARCÍA-GALLO, M., RENART, J., AND DÍAZ-GUERRA, M. (2007). Endoplasmic reticulum-associated degradation of the NR1 but not the NR2 subunits of the N-methyl-D-aspartate receptor induced by inhibition of the N-glycosylation in cortical neurons. *Journal of Neuroscience Research* **85**, 1713–1723.
- GIBB, A.J., AND COLQUHOUN, D. (1991). Glutamate activation of a single NMDA receptor-channel produces a cluster of channel openings. *Proceedings. Biological Sciences* **243**, 39–45.
- GLEICHMAN, A.J., SPRUCE, L.A., DALMAU, J., SEEHOLZER, S.H., AND LYNCH, D.R. (2012). Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **32**, 11082–11094.
- GREEN, G.M., AND GIBB, A.J. (2001). Characterization of the single-channel properties of NMDA receptors in laminae I and II of the dorsal horn of neonatal rat spinal cord. *The European Journal of Neuroscience* **14**, 1590–1602.
- GREGER, I.H., KHATRI, L., KONG, X., AND ZIFF, E.B. (2003). AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* **40**, 763–774.
- GU, Y., AND HUGANIR, R.L. (2016). Identification of the SNARE complex mediating the exocytosis of NMDA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 12280–12285.
- GU, W., FUKUDA, T., ISAJI, T., HASHIMOTO, H., WANG, Y., AND GU, J. (2013). α 1,6-Fucosylation regulates neurite formation via the activin/phospho-Smad2 pathway in PC12 cells: the implicated dual effects of Fut8 for TGF- β /activin-mediated signaling. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **27**, 3947–3958.

- GUPTA, S.C., RAVIKRISHNAN, A., LIU, J., MAO, Z., PAVULURI, R., HILLMAN, B.G., GANDHI, P.J., STAIRS, D.J., LI, M., UGALE, R.R., ET AL. (2016). The NMDA receptor GluN2C subunit controls cortical excitatory-inhibitory balance, neuronal oscillations and cognitive function. *Scientific Reports* **6**, 38321.
- HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., AND SIGWORTH, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* **391**, 85–100.
- 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**, 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**, 28903–28910.
- HAYASHI, T., THOMAS, G.M., AND HUGANIR, R.L. (2009). Dual palmitoylation of NR2 subunits regulates NMDA receptor trafficking. *Neuron* **64**, 213–226.
- HILLMAN, B.G., GUPTA, S.C., STAIRS, D.J., BUONANNO, A., AND DRAVID, S.M. (2011). Behavioral analysis of NR2C knockout mouse reveals deficit in acquisition of conditioned fear and working memory. *Neurobiology of Learning and Memory* **95**, 404–414.
- HIRAIZUMI, S., SPOHR, U., AND SPIRO, R.G. (1993). Characterization of endomannosidase inhibitors and evaluation of their effect on N-linked oligosaccharide processing during glycoprotein biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 9927–9935.
- 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**, 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**, 1331–1343.
- HOLMES, K.D., MATTAR, P.A., MARSH, D.R., WEAVER, L.C., AND DEKABAN, G.A. (2002). The N-methyl-D-aspartate receptor splice variant NR1-4 C-terminal domain.

- Deletion analysis and role in subcellular distribution. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 1457–1468.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 9683–9691.
- HORAK, M., CHANG, K., AND WENTHOLD, R.J. (2008). Masking of the endoplasmic reticulum retention signals during assembly of the NMDA receptor. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **28**, 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**, 394.
- HORTON, A.C., AND EHLERS, M.D. (2004). Secretory trafficking in neuronal dendrites. *Nature Cell Biology* **6**, 585–591.
- HUETTNER, J.E., AND BEAN, B.P. (1988). Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 1307–1311.
- HUH, K.H., AND WENTHOLD, R.J. (1999). Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit, NR1, in cultured cerebellar granule cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 151–157.
- IACOBUCCI, G.J., AND POPESCU, G.K. (2017). NMDA receptors: linking physiological output to biophysical operation. *Nature Reviews Neuroscience* **18**, 236–249.
- IJIMA, K., TAKASE, S., TSUMURAYA, K., ENDO, M., AND ITAHARA, K. (1978). Changes in free amino acids of cerebrospinal fluid and plasma in various neurological diseases. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **126**, 133–150.
- ISHII, T., MORIYOSHI, K., SUGIHARA, H., SAKURADA, K., KADOTANI, H., YOKOI, M., AKAZAWA, C., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N., AND MASU, M. (1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 2836–2843.
- JAHR, C.E. (1992). High probability opening of NMDA receptor channels by L-glutamate. *Science (New York, N.Y.)* **255**, 470–472.
- JESPERSEN, A., TAJIMA, N., FERNANDEZ-CUERVO, G., GARNIER-AMBLARD, E.C., AND FURUKAWA, H. (2014). Structural Insights into Competitive Antagonism in NMDA Receptors. *Neuron* **81**, 366–378.

- JEYIFOUS, O., WAITES, C.L., SPECHT, C.G., FUJISAWA, S., SCHUBERT, M., LIN, E.I., MARSHALL, J., AOKI, C., DE SILVA, T., MONTGOMERY, J.M., ET AL. (2009). SAP97 and CASK mediate sorting of NMDA receptors through a previously unknown secretory pathway. *Nature Neuroscience* **12**, 1011–1019.
- JOHNSON, J.W., AND ASCHER, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**, 529–531.
- KADOTANI, H., HIRANO, T., MASUGI, M., NAKAMURA, K., NAKAO, K., KATSUKI, M., AND NAKANISHI, S. (1996). Motor discoordination results from combined gene disruption of the NMDA receptor NR2A and NR2C subunits, but not from single disruption of the NR2A or NR2C subunit. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **16**, 7859–7867.
- KANIAKOVA, M., KRAUSOVA, B., VYKLYCKY, V., KORINEK, M., LICHNEROVA, K., VYKLYCKY, 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**, 26423–26434.
- KANIAKOVA, M., LICHNEROVA, K., VYKLYCKY, 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**, 385–395.
- KARAKAS, E., AND FURUKAWA, H. (2014). Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science (New York, N.Y.)* **344**, 992–997.
- KENNY, A. V., COUSINS, S.L., PINHO, L., AND ANNE STEPHENSON, F. (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**, 324–333.
- KESSELS, H.W., AND MALINOW, R. (2009). Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron* **61**, 340–350.
- KIM, E.J. (2011). Chemical Arsenal for the Study of O-GlcNAc. *Molecules* **16**, 1987–2022.
- KLECKNER, N.W., AND DINGLEDINE, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science (New York, N.Y.)* **241**, 835–837.
- KO, J., KIM, S., CHUNG, H.S., KIM, K., HAN, K., KIM, H., JUN, H., KAANG, B.-K., AND KIM, E. (2006). SALM synaptic cell adhesion-like molecules regulate the differentiation of excitatory synapses. *Neuron* **50**, 233–245.

- KOHR, G. (2006). NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell and Tissue Research* **326**, 439–446.
- KUNER, T., WOLLMUTH, L.P., KARLIN, A., SEEBURG, P.H., AND SAKMANN, B. (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* **17**, 343–352.
- LAN, J.Y., SKEBERDIS, V.A., JOVER, T., GROOMS, S.Y., LIN, Y., ARANEDA, R.C., ZHENG, X., BENNETT, M. V, AND ZUKIN, R.S. (2001). Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nature Neuroscience* **4**, 382–390.
- LANG, A.E., AND LOZANO, A.M. (1998). Parkinson’s disease. First of two parts. *The New England Journal of Medicine* **339**, 1044–1053.
- LAU, C.G., AND ZUKIN, R.S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews. Neuroscience* **8**, 413–426.
- LEE, C.H., LU, W., MICHEL, J.C., GOEHRING, A., DU, J., SONG, X., AND GOUAUX, E. (2014). NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature* **511**, 191–197.
- LEE, S.H., VALTSCHANOFF, J.G., KHARAZIA, V.N., WEINBERG, R., AND SHENG, M. (2001). Biochemical and morphological characterization of an intracellular membrane compartment containing AMPA receptors. *Neuropharmacology* **41**, 680–692.
- LEONARD, A.S., LIM, I.A., HEMSWORTH, D.E., HORNE, M.C., AND HELL, J.W. (1999). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 3239–3244.
- LERMA, J., ZUKIN, R.S., AND BENNETT, M. V (1990). Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 2354–2358.
- LESTER, R.A., AND JAHR, C.E. (1992). NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **12**, 635–643.
- LI, S.T., AND JU, J.G. (2012). Functional Roles of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Physiological and Pathological Neuronal Activities. *Current Drug Targets* **13**, 207–221.

- LI, B., CHEN, N., LUO, T., OTSU, Y., MURPHY, T.H., AND RAYMOND, L.A. (2002). Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors. *Nature Neuroscience* **5**, 833–834.
- LIS, H., AND SHARON, N. (1993). Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *European Journal of Biochemistry* **218**, 1–27.
- LLANSOLA, M., SANCHEZ-PEREZ, A., CAULI, O., AND FELIPO, V. (2005). Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *The Cerebellum* **4**, 154–161.
- LU, C., FU, Z., KARAVANOV, I., YASUDA, R.P., WOLFE, B.B., BUONANNO, A., AND VICINI, S. (2006). NMDA receptor subtypes at autaptic synapses of cerebellar granule neurons. *Journal of Neurophysiology* **96**, 2282–2294.
- LUSSIER, M.P., SANZ-CLEMENTE, A., AND ROCHE, K.W. (2015). Dynamic Regulation of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) and α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Posttranslational Modifications. *The Journal of Biological Chemistry* **290**, 28596–28603.
- LYNCH, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews* **84**, 87–136.
- MAH, S.J., CORNELL, E., MITCHELL, N.A., AND FLECK, M.W. (2005). Glutamate receptor trafficking: endoplasmic reticulum quality control involves ligand binding and receptor function. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **25**, 2215–2225.
- MALENKA, R.C. (2009). Intercellular communication in the nervous system (Academic).
- MALINOW, R. (2012). New developments on the role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology* **22**, 559–563.
- MATSUDA, K., FLETCHER, M., KAMIYA, Y., AND YUZAKI, M. (2003). Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 10064–10073.
- MAYER, M.L., AND VYKLICKY, L. (1989). Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1411–1415.
- MAYER, M.L., VYKLICKY, L., AND CLEMENTS, J. (1989). Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* **338**, 425–427.

- MCILHINNEY, R.A., LE BOURDELLES, B., MOLNAR, E., TRICAUD, N., STREIT, P., AND WHITING, P.J. (1998). Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. *Neuropharmacology* **37**, 1355–1367.
- MCLENNAN, H., HICKS, T.P., AND HALL, J.G. (1981). Receptors for the excitatory amino acids. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* **29**, 213–221.
- MEDDOWS, E., LE BOURDELLES, B., GRIMWOOD, S., WAFFORD, K., SANDHU, S., WHITING, P., AND MCILHINNEY, R.A. (2001). Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 18795–18803.
- 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**, 1038–1046.
- MIKHAYLOVA, M., BERA, S., KOBLER, O., FRISCHKNECHT, R., AND KREUTZ, M.R. (2016). A Dendritic Golgi Satellite between ERGIC and Retromer. *Cell Reports* **14**, 189–199.
- MOLINARI, M., ERIKSSON, K.K., CALANCA, V., GALLI, C., CRESSWELL, P., MICHALAK, M., AND HELENIUS, A. (2004). Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control. *Molecular Cell* **13**, 125–135.
- MONYER, H., SPRENGEL, R., SCHOEPFER, R., HERB, A., HIGUCHI, M., LOMELI, H., BURNASHEV, N., SAKMANN, B., AND SEEBURG, P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science (New York, N.Y.)* **256**, 1217–1221.
- MOREMEN, K.W., TIEMEYER, M., AND NAIRN, A. V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 448–462.
- MORIYOSHI, K., MASU, M., ISHII, T., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N., AND NAKANISHI, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**, 31–37.
- MORRIS, R.G.M. (2013). NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology* **74**, 32–40.
- MU, Y., OTSUKA, T., HORTON, A.C., SCOTT, D.B., AND EHLERS, M.D. (2003). Activity-dependent mRNA splicing controls ER export and synaptic delivery of

- NMDA receptors. *Neuron* **40**, 581–594.
- 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. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **19**, 7781–7792.
- OLNEY, J.W. (1990). Excitotoxicity: an overview. *Canada Diseases Weekly Report = Rapport Hebdomadaire Des Maladies Au Canada* **16** Suppl 1, 47–48.
- ONG, Y.S., TRAN, T.H.T., GOUNKO, N. V, AND HONG, W. (2014). TMEM115 is an integral membrane protein of the Golgi complex involved in retrograde transport. *Journal of Cell Science* **127**, 2825–2839.
- PACHERNEGG, S., STRUTZ-SEEBOHM, N., AND HOLLMANN, M. (2012). GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in Neurosciences* **35**, 240–249.
- PAOLETTI, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *The European Journal of Neuroscience* **33**, 1351–1365.
- PAPOUIN, T., LADEPECHE, L., RUEL, J., SACCHI, S., LABASQUE, M., HANINI, M., GROG, L., POLLEGIONI, L., MOTHET, J.-P., AND OLIET, S.H.R. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* **150**, 633–646.
- PATHAK, S., ALONSO, J., SCHIMPL, M., RAFIE, K., BLAIR, D.E., BORODKIN, V.S., SCHÜTTELKOPF, A.W., ALBARBARAWI, O., AND VAN AALTEN, D.M.F. (2015). The active site of O-GlcNAc transferase imposes constraints on substrate sequence. *Nature Structural & Molecular Biology* **22**, 744–750.
- PENN, A.C., WILLIAMS, S.R., AND GREGER, I.H. (2008). Gating motions underlie AMPA receptor secretion from the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal* **27**, 3056–3068.
- PEREZ-OTANO, I., SCHULTEIS, C.T., CONTRACTOR, A., LIPTON, S.A., TRIMMER, J.S., SUCHER, N.J., AND HEINEMANN, S.F. (2001). Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **21**, 1228–1237.
- PETRALIA, R.S. (2012). Distribution of Extrasynaptic NMDA Receptors on Neurons. *The Scientific World Journal* **2012**, 1–11.

- PETRALIA, R.S., SANS, N., WANG, Y.-X., AND WENTHOLD, R.J. (2005). Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Molecular and Cellular Neurosciences* **29**, 436–452.
- PETRALIA, R.S., AL-HALLAQ, R.A., AND WENTHOLD, R.J. (2009). Trafficking and Targeting of NMDA Receptors. *A.M. Van Dongen, ed. (Boca Raton (FL))*, p.
- PRYBYŁOWSKI, K., FU, Z., LOSI, G., HAWKINS, L.M., LUO, J., CHANG, K., WENTHOLD, R.J., AND VICINI, S. (2002). Relationship between availability of NMDA receptor subunits and their expression at the synapse. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 8902–8910.
- QIU, S., HUA, Y.-L., YANG, F., CHEN, Y.-Z., AND LUO, J.-H. (2005). Subunit assembly of N-methyl-d-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 24923–24930.
- QIU, S., ZHANG, X., CAO, J., YANG, W., YAN, Y., SHAN, L., ZHENG, J., AND LUO, J. (2009). An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-Methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 20285–20298.
- REN, H., SALOUS, A.K., PAUL, J.M., LIPSKY, R.H., AND PEOPLES, R.W. (2007). Mutations at F637 in the NMDA receptor NR2A subunit M3 domain influence agonist potency, ion channel gating and alcohol action. *British Journal of Pharmacology* **151**, 749–757.
- ROSENMUND, C., AND WESTBROOK, G.L. (1993). Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. *Neuron* **10**, 805–814.
- ROSENMUND, C., FELTZ, A., AND WESTBROOK, G.L. (1995). Synaptic NMDA receptor channels have a low open probability. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **15**, 2788–2795.
- ROSSI, P., SOLA, E., TAGLIETTI, V., BORCHARDT, T., STEIGERWALD, F., UTVIK, J.K., OTTERSEN, O.P., KOHR, G., AND D'ANGELO, E. (2002). NMDA receptor 2 (NR2) C-terminal control of NR open probability regulates synaptic transmission and plasticity at a cerebellar synapse. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 9687–9697.
- ROTARU, D.C., YOSHINO, H., LEWIS, D.A., ERMENTROUT, G.B., AND GONZALEZ-BURGOS, G. (2011). Glutamate receptor subtypes mediating synaptic activation of prefrontal cortex neurons: relevance for schizophrenia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **31**, 142–156.

- ROTHSTEIN, J.D. (1995). Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neuroscience (New York, N.Y.)* **3**, 348–359.
- SALOUS, A.K., REN, H., LAMB, K.A., HU, X.-Q., LIPSKY, R.H., AND PEOPLES, R.W. (2009). Differential actions of ethanol and trichloroethanol at sites in the M3 and M4 domains of the NMDA receptor GluN2A (NR2A) subunit. *British Journal of Pharmacology* **158**, 1395–1404.
- SALUSSOLIA, C.L., CORRALES, A., TALUKDER, I., KAZI, R., AKGUL, G., BOWEN, M., AND WOLLMUTH, L.P. (2011). Interaction of the M4 Segment with Other Transmembrane Segments Is Required for Surface Expression of Mammalian - Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 40205–40218.
- SANS, N., PETRALIA, R.S., WANG, Y.X., BLAHOS, J. 2ND, HELL, J.W., AND WENTHOLD, R.J. (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **20**, 1260–1271.
- SANS, N., PRYBYLOWSKI, K., PETRALIA, R.S., CHANG, K., WANG, Y.-X., RACCA, C., VICINI, S., AND WENTHOLD, R.J. (2003). NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nature Cell Biology* **5**, 520–530.
- SANS, N., WANG, P.Y., DU, Q., PETRALIA, R.S., WANG, Y.-X., NAKKA, S., BLUMER, J.B., MACARA, I.G., AND WENTHOLD, R.J. (2005). mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nature Cell Biology* **7**, 1179–1190.
- SANZ-CLEMENTE, A., NICOLL, R.A., AND ROCHE, K.W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* **19**, 62–75.
- SATTLER, R., XIONG, Z., LU, W.Y., MACDONALD, J.F., AND TYMIANSKI, M. (2000). Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **20**, 22–33.
- SCHLÜTER, O.M., XU, W., AND MALENKA, R.C. (2006). Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. *Neuron* **51**, 99–111.

- SCHORGE, S., AND COLQUHOUN, D. (2003). Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 1151–1158.
- SCHULER, T., MESIC, I., MADRY, C., BARTHOLOMAUS, I., AND LAUBE, B. (2008). Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 37–46.
- SCHWARZ, F., AND AEBI, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology* **21**, 576–582.
- SCOTT, D.B., BLANPIED, T.A., SWANSON, G.T., ZHANG, C., AND EHLERS, M.D. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **21**, 3063–3072.
- SEABOLD, G.K., WANG, P.Y., CHANG, K., WANG, C.-Y., WANG, Y.-X., PETRALIA, R.S., AND WENTHOLD, R.J. (2008). The SALM Family of Adhesion-like Molecules Forms Heteromeric and Homomeric Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 8395–8405.
- SELKOE, D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science (New York, N.Y.)* **298**, 789–791.
- SHE, K., FERREIRA, J.S., CARVALHO, A.L., AND CRAIG, A.M. (2012). Glutamate binding to the GluN2B subunit controls surface trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 27432–27445.
- SHEN, Y., LU, T., AND YANG, X.L. (1999). Modulation of desensitization at glutamate receptors in isolated crucian carp horizontal cells by concanavalin A, cyclothiazide, aniracetam and PEPA. *Neuroscience* **89**, 979–990.
- SHENG, M., CUMMINGS, J., ROLDAN, L.A., JAN, Y.N., AND JAN, L.Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* **368**, 144–147.
- SMALL, D.H., MOK, S.S., AND BORNSTEIN, J.C. (2001). Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nature Reviews. Neuroscience* **2**, 595–598.
- SOBOLEVSKY, A.I., BECK, C., AND WOLLMUTH, L.P. (2002). Molecular rearrangements of the extracellular vestibule in NMDAR channels during gating. *Neuron* **33**, 75–85.

- SOBOLEVSKY, A.I., ROSCONI, M.P., AND GOUAUX, E. (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **462**, 745–756.
- STANDLEY, S., AND BAUDRY, M. (2000). The role of glycosylation in ionotropic glutamate receptor ligand binding, function, and trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* **57**, 1508–1516.
- STANDLEY, S., TOCCO, G., WAGLE, N., AND BAUDRY, M. (1998). High- and low-affinity alpha-[3H]amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid ([3H]AMPA) binding sites represent immature and mature forms of AMPA receptors and are composed of differentially glycosylated subunits. *Journal of Neurochemistry* **70**, 2434–2445.
- 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**, 887–898.
- STANDLEY, S., PETRALIA, R.S., GRAVELL, M., HAMILTON, R., WANG, Y.-X., SCHUBERT, M., AND WENTHOLD, R.J. (2012). Trafficking of the NMDAR2B receptor subunit distal cytoplasmic tail from endoplasmic reticulum to the synapse. *PLoS One* **7**, e39585.
- STANLEY, P. (2011). Golgi Glycosylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a005199–a005199.
- STEPHENSON, F.A., COUSINS, S.L., AND KENNY, A. V (2008). Assembly and forward trafficking of NMDA receptors (Review). *Molecular Membrane Biology* **25**, 311–320.
- STERN, P., BÉHÉ, P., SCHOEPFER, R., AND COLQUHOUN, D. (1992). Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proceedings. Biological Sciences* **250**, 271–277.
- STEWART, O., AND SCHUMAN, E.M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annual Review of Neuroscience* **24**, 299–325.
- STOCCA, G., AND VICINI, S. (1998). Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *The Journal of Physiology* **507** (Pt 1), 13–24.
- STOREY, G.P., OPITZ-ARAYA, X., AND BARRIA, A. (2011). Molecular determinants controlling NMDA receptor synaptic incorporation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **31**, 6311–6316.

- SUNDSTRÖM, E., WHITTEMORE, S., MO, L.-L., AND SEIGER, Å. (1997). Analysis of NMDA Receptors in the Human Spinal Cord. *Experimental Neurology* **148**, 407–413.
- TAVERNA, F.A., WANG, L.Y., MACDONALD, J.F., AND HAMPSON, D.R. (1994). A transmembrane model for an ionotropic glutamate receptor predicted on the basis of the location of asparagine-linked oligosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 14159–14164.
- TINGLEY, W.G., EHLERS, M.D., KAMEYAMA, K., DOHERTY, C., PTAK, J.B., RILEY, C.T., AND HUGANIR, R.L. (1997). Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 5157–5166.
- TORRE, E.R., AND STEWARD, O. (1996). Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **16**, 5967–5978.
- TOVAR, K.R., AND WESTBROOK, G.L. (1999). The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **19**, 4180–4188.
- TRAYNELIS, S.F., WOLLMUTH, L.P., MCBAIN, C.J., MENNITI, F.S., VANCE, K.M., OGDEN, K.K., HANSEN, K.B., YUAN, H., MYERS, S.J., AND DINGLEDDINE, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews* **62**, 405–496.
- TUCHOLSKI, J., SIMMONS, M.S., PINNER, A.L., HAROUTUNIAN, V., MCCULLUMSMITH, R.E., AND MEADOR-WOODRUFF, J.H. (2013a). Abnormal N-linked glycosylation of cortical AMPA receptor subunits in schizophrenia. *Schizophrenia Research* **146**, 177–183.
- TUCHOLSKI, J., SIMMONS, M.S., PINNER, A.L., MCMILLAN, L.D., HAROUTUNIAN, V., AND MEADOR-WOODRUFF, J.H. (2013b). N-linked glycosylation of cortical N-methyl-D-aspartate and kainate receptor subunits in schizophrenia. *NeuroReport* **24**, 688–691.
- TUCHOLSKI, J., PINNER, A.L., SIMMONS, M.S., AND MEADOR-WOODRUFF, J.H. (2014). Evolutionarily conserved pattern of AMPA receptor subunit glycosylation in

- Mammalian frontal cortex. *PloS One* **9**, e94255.
- ULBRICH, M.H., AND ISACOFF, E.Y. (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14163–14168.
- VAGIN, O., KRAUT, J.A., AND SACHS, G. (2009). Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* **296**, F459–F469.
- VANCE, K.M., HANSEN, K.B., AND TRAYNELIS, S.F. (2013). Modal gating of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *Neuropharmacology* **71**, 184–190.
- VARKI, A., FREEZE, H.H., AND VACQUIER, V.D. (2009). Glycans in Development and Systemic Physiology. *Essentials in Glycobiology*, 2nd edition, chapter 38, *Cold Spring Harbor (NY)*
- VICINI, S., WANG, J.F., LI, J.H., ZHU, W.J., WANG, Y.H., LUO, J.H., WOLFE, B.B., AND GRAYSON, D.R. (1998). Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Neurophysiology* **79**, 555–566.
- VISSEL, B., KRUPP, J.J., HEINEMANN, S.F., AND WESTBROOK, G.L. (2001). A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nature Neuroscience* **4**, 587–596.
- WANG, C.Y., CHANG, K., PETRALIA, R.S., WANG, Y.X., SEABOLD, G.K., AND WENTHOLD, R.J. (2006). A novel family of adhesion-like molecules that interacts with the NMDA receptor. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **26**, 2174–2183.
- WASHBOURNE, P., BENNETT, J.E., AND MCALLISTER, A.K. (2002). Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nature Neuroscience* **5**, 751–759.
- WASHBOURNE, P., LIU, X.-B., JONES, E.G., AND MCALLISTER, A.K. (2004). Cycling of NMDA receptors during trafficking in neurons before synapse formation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24**, 8253–8264.
- WATANABE, M., INOUE, Y., SAKIMURA, K., AND MISHINA, M. (1992). Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* **3**, 1138–1140.

- WENTHOLD, R.J., PRYBYLOWSKI, K., STANDLEY, S., SANS, N., AND PETRALIA, R.S. (2003). Trafficking of NMDA receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **43**, 335–358.
- WHITLOCK, J.R., HEYNEN, A.J., SHULER, M.G., AND BEAR, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)* **313**, 1093–1097.
- WONG, L.A., AND MAYER, M.L. (1993). Differential modulation by cyclothiazide and concanavalin A of desensitization at native alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid- and kainate-preferring glutamate receptors. *Molecular Pharmacology* **44**, 504–510.
- WOOD, M.W., VANDONGEN, H.M., AND VANDONGEN, A.M. (1995). Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4882–4886.
- XIA, H., HORNBY, Z.D., AND MALENKA, R.C. (2001). An ER retention signal explains differences in surface expression of NMDA and AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology* **41**, 714–723.
- YANG, W., ZHENG, C., SONG, Q., YANG, X., QIU, S., LIU, C., CHEN, Z., DUAN, S., AND LUO, J. (2007). A three amino acid tail following the TM4 region of the N-methyl-D-aspartate receptor (NR) 2 subunits is sufficient to overcome endoplasmic reticulum retention of NR1-1a subunit. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 9269–9278.
- YAO, H., LI, A., AND WANG, M. (2015). Systematic Analysis and Prediction of In Situ Cross Talk of O-GlcNAcylation and Phosphorylation. *BioMed Research International* 2015, **279823**.
- YUAN, H., HANSEN, K.B., VANCE, K.M., OGDEN, K.K., AND TRAYNELIS, S.F. (2009). Control of NMDA Receptor Function by the NR2 Subunit Amino-Terminal Domain. *Journal of Neuroscience* **29**, 12045–12058.
- YUEN, E.Y., JIANG, Q., CHEN, P., GU, Z., FENG, J., AND YAN, Z. (2005). Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **25**, 5488–5501.
- ZHANG, Y., LI, P., FENG, J., AND WU, M. (2016). Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurological Sciences* **37**, 1039–1047.

- ZHENG, C.-Y., CHANG, K., SUH, Y.H., AND ROCHE, K.W. (2015). TARP gamma-8 glycosylation regulates the surface expression of AMPA receptors. *The Biochemical Journal* **465**, 471–477.
- ZHU, S., STROEBEL, D., YAO, C.A., TALY, A., AND PAOLETTI, P. (2013). Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**, 477–485.
- ZIELINSKA, D.F., GNAD, F., WISNIEWSKI, J.R., AND MANN, M. (2010). Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell* **141**, 897–907.
- ZUKIN, R.S., AND BENNETT, M. V. (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends in Neurosciences* **18**, 306–313.