

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lucie Sadílková

Intracelulární doména glutamátových iontových kanálů a její úloha při vzniku patofyziologických stavů

Intracellular domain of glutamate ion channels and its role in the emergence of pathophysiological states

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Aleš Balík, PhD.

Praha, 2019

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 8. 5. 2019

Lucie Sadílková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Aleši Balíkovi, Ph.D. za veškeré rady a trpělivé svědomité vedení mé bakalářské práce.

ABSTRAKT

Glutamát zprostředkovává většinu excitační neurotransmise v centrální nervové soustavě savců. Jeho účinek je podmíněn přítomností glutamátových receptorů na postsynaptických neuronech. NMDA receptory patří mezi ionotropní glutamátové receptory a jsou nezbytné pro normální funkce mozku, jako je synaptická plasticita, učení, paměť a správný vývoj neuronů. NMDA receptory se však také podílejí na patofyziologii řady neurodevelopmentálních a neuropsychiatrických onemocnění. Cílem práce je zhodnotit dosavadní poznatky o úloze intracelulární části NMDA receptorů pro jejich fungování, a to zejména s ohledem na regulaci jejich lokalizace na excitačních synapsích. Dále pak podat přehled o genetických změnách nalezených v této oblasti receptoru, jejich vlivu na funkční vlastnosti receptoru a popřípadě spojení s daným onemocněním.

Klíčová slova: excitační přenos, glutamátové receptory, NMDAR, intracelulární doména, mutace, neurodevelopmentální onemocnění

ABSTRACT

Glutamate mediates most of the excitatory neurotransmissions in the central nervous system of mammals. Its effect depends on the presence of glutamate receptors on postsynaptic neurons. NMDA receptors are class of the ionotropic glutamate receptors and are necessary for normal brain function such as synaptic plasticity, learning, memory and correct development of neurons. NMDA receptors are also involved in the pathophysiology of many neurodevelopmental and neuropsychiatric diseases. The aim of this work is to evaluate the current knowledge of the role of the intracellular part of NMDA receptors for their function, particularly with respect to the regulation of their localization at excitatory synapses. In addition, it also provides an overview of the genetic changes found in this part of the receptor, their effect on the functional properties of the receptor and then also a possible link to specific disease.

Keywords: excitatory transmission, glutamate receptors, NMDAR, intracellular domain, mutations, neurodevelopmental diseases

OBSAH

Úvod	1
Excitační neurotransmise	2
Ionotropní glutamátové receptory	2
AMPA, kainátové receptory – vlastnosti, exprese	3
NMDAR – vlastnosti, exprese a funkce v CNS	4
Struktura NMDA receptoru	6
Extracelulární amino-terminální doména (ATD)	7
Extracelulární ligand vazebná doména (LBD)	9
Transmembránová doména (TMD)	10
Intracelulární C-terminální doména a její interakce	10
Neurodevelopmentální a neuropsychiatrická onemocnění	14
Poškození excitační neurotransmise	14
Mutace NMDAR	17
Závěr	20
Použitá literatura	21
Přílohy	30

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ADHD	porucha pozornosti s hyperaktivitou (attention deficit hyperactivity disorder)
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
AMPAR	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionový receptor
ASD	porucha autistického spektra (autism spectrum disorder)
ATD	amino-terminální doména (amino-terminal domain)
BCECTS	benigní dětská epilepsie s centrotemporálními hroty (benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes)
CaM	kalmodulin
Ca/CaM	Ca^{2+} / kalmodulin
CaMKII	Ca^{2+} / kalmodulin dependentní kináza II
CK2	kasein kináza II
CNS	centrální nervová soustava
CTD	karboxyl-terminální doména (carboxyl-terminal domain)
D-AP5	D-2-amino-5-fosfonovalerát
DCKA	5,7-dichlorokynurenová kyselina
EC50	střední účinná koncentrace (half maximal effective concentration)
EPI	epilepsie
EPSC	excitační postsynaptický proud (excitatory post-synaptic current)
ER	endoplasmatické retikulum
ex-NMDAR	extrasynaptický NMDA receptor
GK	doména guanylát kinázy
GoF	nárůst funkce (gain of function)
ID	mentální postižení (intellectual disability)
iGluR	ionotropní glutamátový receptor

KA	kainátová kyselina
LBD	ligand vázající doména (ligand-binding domain)
LKS	Landau Kleffnerův syndrom
LoF	ztráta funkce (loss of function)
LTD	dlouhodobá deprese (long term depression)
LTP	dlouhodobá potenciace (long term potentiation)
M (1, 2, 3, 4)	membránové helixy
MAGUK	membránově asociovaná guanylát kináza
NF-L	neurofilamentální protein L
NMDA	N-methyl-D-aspartátová kyselina
NMDAR	N-methyl-D-aspartátový receptor
NSID	nesyndromická mentální retardace (non-syndromic intellectual disability)
PKA	protein kináza A
PKC	protein kináza C
PSD	postsynaptická denzita
PSD-93	protein postsynaptické denzity 93 kDa
PSD-95	protein postsynaptické denzity 95 kDa
SAP 97	synapse-asociovaný protein 97 kDa
SAP 102	synapse-asociovaný protein 102 kDa
SCZ	schizofrenie
SH3	Src homologní doména 3
syn-NMDAR	synaptický NMDA receptor
TMD	transmembránová doména (transmembrane domain)
WT	divoký typ (wild type)

ÚVOD

Rozvoj metodiky molekulární biologie a s tím spojené klonování receptorů vedlo k mimořádnému pokroku v chápání mechanismu fungování receptorů pro neurotransmitery. Do roku 1987 byly naklonovány všechny rodiny ligandem řízených iontových kanálů s výjimkou glutamátových receptorů. První práce popisující klonování podjednotky glutamátového receptoru byla publikována až v roce 1989 (Hollmann et al., 1989). Následný výzkum přinesl velký rozvoj našich znalostí o struktuře, expresi a funkci tohoto nejvýznamnějšího excitačního receptoru v centrální nervové soustavě (CNS) savců (Hollmann and Heinemann, 1994).

Podle mechanismu působení můžeme glutamátové receptory rozdělit na ionotropní a metabotropní. Metabotropní glutamátové receptory jsou receptory spřažené s heterotrimerními G-proteiny a pro jejich strukturu je charakteristické, že sedmkrát prochází přes membránu (Pin and Duvoisin, 1995). Naopak, ionotropní glutamátové receptory jsou ligandem řízené iontové kanály, které na základě afinity k jednotlivým agonistům dělíme na tři hlavní farmakologické podtypy: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát (AMPA), kainát (KA) a N-methyl-D-aspartát (NMDA) -ové receptory (Cull-Candy et al., 2001).

Receptory pro glutamát hrají klíčovou roli v synaptickém přenosu a plasticitě. Regulují aktivity důležité pro vyšší funkce mozku jako je učení a paměť prostřednictvím procesu označovaného jako dlouhodobá potenciace (long term potentiation - LTP) či dlouhodobá deprese (long term depression - LTD) (Kessels and Malinow, 2009). Nadměrná aktivace těchto receptorů však vede k excitotoxicitě, buněčné smrti neuronů, která bývá často spojena s neurodegenerativními onemocněními, jako je Huntingtonova, Parkinsonova, či Alzheimerova choroba (Traynelis et al., 2010; Waxman and Lynch, 2005). Naopak jejich nedostatečná aktivace (hypofunkce) pak souvisí s nemocemi jako je například schizofrenie (Olney et al., 1999).

Předložená bakalářská práce je přehledem současného poznání zejména o intracelulární části NMDA receptorů a jejího vlivu na lokalizaci NMDAR v excitačních synapsích. Dále se zabývá mutacemi nalezenými v této části receptoru a jejich možným spojením se změnou funkce receptoru vyvolávající patofyziologický stav.

EXCITAČNÍ NEUROTRANSMISE

Excitační aminokyseliny jsou zásadní pro fungování centrálního nervového systému. Nejen že se účastní chemického excitačního přenosu mezi neurony, ale také různými mechanismy ovlivňují přežití, růst a diferenciaci neuronů během jejich vývoje (McDonald and Johnston, 1990).

Hlavní excitační aminokyselina v centrální nervové soustavě savců je glutamát (Hayashi, 1954). Většina glutamátu v mozku je součástí metabolismu neuronů a glií, pouze malé množství se podílí přímo na signalizaci mezi neurony (McDonald and Johnston, 1990). Chemické synapse jsou komplexní molekulární struktury umožňující neuronům komunikovat a zpracovávat informace prostřednictvím chemického přenosu (neurotransmise). Při procesu neurotransmise je pod vlivem akčního potenciálu na presynaptické membráně ze synaptických váček exocytoticky uvolňován glutamát, který rychle difunduje přes synaptickou štěrbinu k membráně na postsynaptickém neuronu, kde dochází k jeho navázání na glutamátové receptory, jejich aktivaci, vtoku iontů a následně ke vzniku excitačního postsynaptického potenciálu (Fonnum, 1984). Tyto excitační postsynaptické proudy (EPSC) mohou být popsány primárně dvěma časově odlišnými složkami odpovídajícími rychlé aktivaci receptorů AMPA následované dlouho trvajícím otevřením NMDA receptorů. Oba typy receptorů jsou lokalizovány do oblasti postsynaptické denzity (PSD). Jedná se o vysoce organizovaný makromolekulární komplex skládající se z několika stovek proteinů, propojených prostřednictvím cytoplasmatických scaffold a adaptorových proteinů. Interakce receptoru s proteiny PSD má velký vliv na regulaci synaptického přenosu a také propojuje receptor s intracelulárními signálními molekulami v postsynaptickém neuronu (Sheng and Kim, 2011).

IONOTROPNÍ GLUTAMÁTOVÉ RECEPTORY

Ionotropní glutamátové receptory (iGluRs) mezi které patří AMPA a kainátové receptory, společně označované jako non-NMDA a NMDA receptory se liší svými strukturálními, fyziologickými i farmakologickými vlastnostmi. Non-NMDAR mohou tvořit funkční homotetramery aktivující se pouze L-glutamátem (Keinanen et al., 1990; Werner et al., 1991), na rozdíl od NMDA receptorů, které jsou obligátními heterotetramery a pro svou aktivaci vyžadují současné navázání glycinu (nebo D-serinu) a L-glutamátu (Johnson and Ascher, 1987; Monyer et al., 1992).

Charakteristickým znakem NMDA receptorů je, že na rozdíl od AMPA a KA receptorů mají široké spektrum alosterických modulátorů od nanomolárních koncentrací zinku po malé molekuly ifenprodilu, polyaminů a protonů (Hansen et al., 2010), na napětí závislý blok iontového kanálu ionty Mg^{2+} a řadu syntetických blokátorů jako je MK-801, ketamin a memantin (Kashiwagi et al., 2002; Mayer et al., 1984).

AMPA, kainátové a NMDA receptory mají velmi podobnou aminokyselinovou sekvenci, avšak jejich funkční vlastnosti se odlišují. Non-NMDA receptory vykazují kinetiku aktivace, deaktivace a desensitizace v milisekundách a zprostředkovávají tak rychlou složku synaptické odpovědi (Hansen et al., 2007). Oproti tomu jsou NMDA receptory pomalejší s časovými konstantami v řádu desítek až stovek milisekund, umožňující dlouhotrvající postsynaptickou odpověď (Ascher and Nowak, 1988; Traynelis et al., 2010). Kombinace non-NMDA a NMDA receptorů tak ve výsledku určuje rozdílnou aktivitu neuronů a nervových okruhů.

AMPA, KAINÁTOVÉ RECEPTORY – VLASTNOSTI, EXPRESE

Non-NMDA receptory zprostředkovávají většinu rychlého synaptického přenosu v CNS (Kennedy, 1989). Stejně jako NMDAR se i AMPAR podílí na synaptické plasticitě. Dopravování AMPA receptorů na postsynaptickou membránu nebo jejich odstraňování je důležitým mechanismem pro regulaci síly synaptického přenosu (Barry and Ziff, 2002). Způsob transportu v synapsích a také funkční vlastnosti AMPA receptorů jsou dány jejich podjednotkovým složením (Hollmann and Heinemann, 1994). AMPA receptory se skládají z podjednotek GluA1-GluA4, které mohou tvořit jak homomery tak i heteromery (Dingledine et al., 1999). Většina AMPA receptorů se v CNS nachází ve formě heterotetramerů obsahující podjednotku GluA2 a jsou propustné pouze pro sodné a draselné ionty (Jonas and Burnashev, 1995). Zatímco receptory, které GluN2A podjednotku postrádají, jsou propustné i pro vápník (Boulter et al., 1990; Isaac et al., 2007). Tato vlastnost je podmíněna prostřednictvím RNA editace Q/R místa GluA2 mRNA transkriptů (Isaac et al., 2007). Postnatálně naprostá většina GluA2 podjednotek obsahuje argininový zbytek (R) na vrcholu membránové smyčky M2 místo genomicky kódovaného glutaminu (Q). Argininem nesený pozitivní náboj pak v oblasti póru iontového kanálu zamezuje průchodu vápenatých iontů (Sommer et al.,

1991). Ačkoliv jsou AMPAR postrádající GluA2 podjednotku permeabilní pro Ca^{2+} , je tato Ca^{2+} propustnost mnohem menší než u NMDAR.

Kainátové receptory se nachází na presynaptické i postsynaptické membráně a jsou tvořeny podjednotkami GluK1-GluK5. Podjednotky GluK1-GluK3 mohou vytvářet homomery, kdežto podjednotky GluK4 a GluK5 tvoří funkční receptory ve formě heteromerů pouze v případě jejich koexprese a skládání s GluK1-GluK3 (Fisher and Fisher, 2014).

Aktivace postsynaptických kainátových receptorů má obvykle pomalejší nástup EPSC než aktivace AMPA receptorů, ale má rychlejší časový průběh než NMDA receptory (Copits and Swanson, 2012). Homomery GluK1-GluK3 mají nízkou citlivost na aktivaci glutamátém a jsou charakterizovány rychlou a hlubokou desenzitizací (B. Sommer et al., 1992; Schiffer, Swanson, & Heinemann, 1997). Začleněním podjednotky GluK4/5 dochází ke zvýšení afinity ke glutamátu a zpomalení desenzitizace (Fisher and Fisher, 2014).

NMDAR – VLASTNOSTI, EXPRESE A FUNKCE V CNS

NMDA receptory jsou ligandem řízené iontové kanály, které zprostředkovávají hlavní složku excitační neurotransmise v centrálním nervovém systému. NMDAR jsou široce exprimovány v celé CNS, ve všech fázích vývoje. Mají zásadní význam pro normální mozkové funkce, včetně vývoje neuronů a synaptické plasticity, a také jsou považovány za součást molekulárních mechanismů procesu učení a paměti (Kessels and Malinow, 2009; Traynelis et al., 2010). Vzhledem k významné roli NMDAR je jejich dysregulace spojena s řadou patofyziologických stavů, projevujících se různými onemocněními.

NMDAR se svými unikátními vlastnostmi odlišují od ostatních receptorů pro glutamát. Pro svou aktivaci vyžadují současné navázání dvou ko-agonistů glutamátu a glycinu (nebo D-serinu) a zároveň odstranění extracelulárního hořčického bloku, který je závislý na napětí a může být odstraněn rychlou depolarizací postsynaptické membrány, zprostředkovanou AMPA receptory (Johnson and Ascher, 1987; Mayer et al., 1984). NMDAR jsou tak často označovány za koincidenční detektory, neboť jimi zprostředkovaný proud závisí jak na frekvenci presynaptického uvolňování glutamátu, tak i na postsynaptické depolarizaci odstraňující hořčický blok (Seeburg et al., 1995).

NMDA receptor tvoří transmembránový kanál, pro nějž je charakteristická vysoká vodivost a propustnost pro vápenaté, sodné i draselné ionty (Mayer and Westbrook, 1987)). Vápenatá propustnost NMDA receptoru má zásadní význam pro synaptickou plasticitu, neboť se podílí na procesech dlouhodobé synaptické potenciace a deprese. Při LTP dochází ke krátkým opakujícím se stimulům, vedoucím k dlouhotrvajícímu zvýšení synaptické síly prostřednictvím aktivace postsynaptických NMDA receptorů (Collingridge and Bliss, 1987). Vstup vápníku spouští rychlou inzerci nascentních AMPA receptorů do postsynaptické membrány. Pokud však signály ke vzniku LTP zprostředkované NMDA receptory odezní, jsou AMPAR odstraněny ze synapse (Pickard et al., 2001). Existuje řada mechanismů podílejících se na indukci LTP v závislosti na zvýšené intracelulární koncentraci vápníku, jako je Ca^{2+} /kalmodulin dependentní protein kináza II (CaMKII), protein kináza C (PKC) a protein kináza A (PKA), jenž dále aktivují níže položené signální dráhy. (Traynelis et al., 2010).

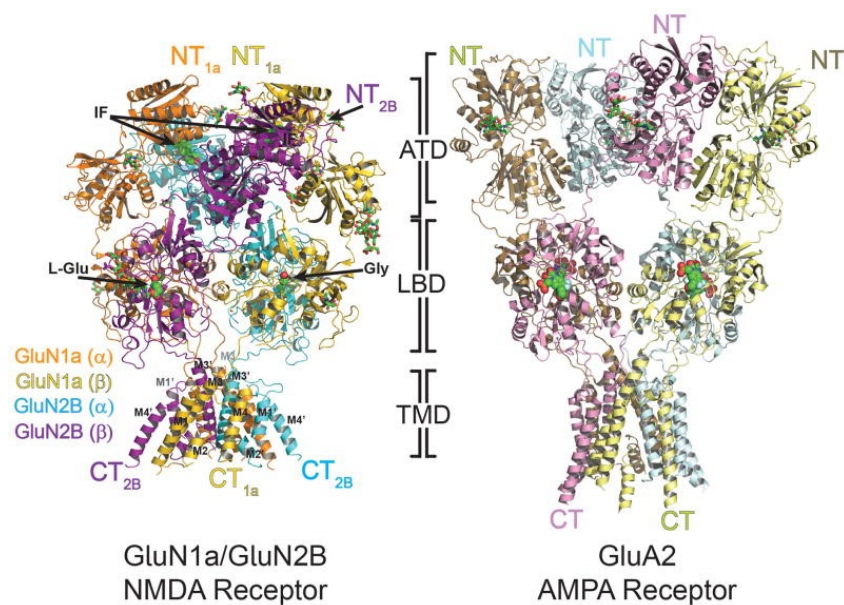
NMDA receptor tvoří obligátní heterotetramer (Monyer et al., 1992), jehož jednotlivé podjednotky jsou kódovány celkem třemi genovými rodinami. *GRIN1* má jediný gen pro GluN1 podjednotku s osmi sestříhovými variantami. *GRIN2* se skládá ze čtyř genů pro podjednotky GluN2 (A/B/C/D) a genová rodina *GRIN3* ze dvou genů pro podjednotky GluN3 (A/B) (Paoletti et al., 2013; Traynelis et al., 2010). Různá kombinace těchto podjednotek a jejich sestříhových variant dává vznik NMDA receptorům s rozdílnými funkčními vlastnostmi. Receptor je nejčastěji složen ze dvou GluN1 a dvou GluN2 podjednotek v uspořádání 1-2-1-2, nebo místo jedné GluN2 se v heterotetrameru nachází GluN3, čímž vzniká triheterotetramer. O triheteromerních NMDAR hovoříme také v případě přítomnosti dvou podtypů podjednotek stejné genové rodiny, jako je např. GluN1/2A heterodimer v kombinaci s GluN1/2B dimerem. Tato podjednotková sestava NMDA receptoru je dominantní například v hipokampálních synapsích (Tovar et al., 2013; Traynelis et al., 2010; Wenthold et al., 2003). Na podjednotkách GluN1 a GluN3 se nachází vazebné místo pro glycin, kdežto GluN2 nese vazebné místo pro glutamát (Johnson and Ascher, 1987).

Původně byly navrženy tři modely procesu skládání podjednotek NMDAR v endoplasmatickém retikulu (ER), z nichž všechny byly podpořeny experimentálními důkazy. První model předpokládal, že podjednotky nejprve vytvářejí homodimery GluN1-GluN1 a GluN2-GluN2 a následně se spojují do tetrameru (Meddows et al., 2001). Druhý model naznačoval, že se nejprve vytváří stabilní komplex homodimeru GluN1-GluN1, ke kterému se postupně přidávají dva monomery

GluN2 za vzniku tetrameru (Atlason et al., 2007). A třetí, nyní obecně přijímaný model, který vychází z krystalové struktury NMDA receptoru, říká, že se nejprve tvoří stabilní heterodimer GluN1-GluN2(-GluN3), který následně dimerizuje za vzniku diheterotetrameru (Karakas and Furukawa, 2014; Schüler et al., 2008).

STRUKTURA NMDA RECEPTORU

S ohledem na velikost a pozici na membráně bylo velmi dlouho nemožné získat dostatečně přesný popis struktury NMDA receptoru. I přes značný pokrok posledních let stále řada detailů chybí, zejména co se týká určitých funkčních stavů receptoru, ale také některých jeho částí, jako např. jeho intracelulární domény. NMDA receptory jsou stejně jako AMPA a KA receptory integrační membránové proteiny, skládající se ze čtyř podjednotek, kde každá tato podjednotka obsahuje čtyři domény: extracelulární amino-terminální doménu (ATD), extracelulární ligand vázající doménu (LBD), transmembránová doménu (TMD) a intracelulární karboxyl-terminální doménu (CTD) (Traynelis et al., 2010). NMDA receptor má celkově dvojčetnou osu symetrie, kde jsou extracelulární domény uspořádány do lokálních heterodimerů, zatímco transmembránová doména iontového kanálu vykazuje spíše čtyřčetnou osu symetrie. Mezi extracelulárními vrstvami ATD a LBD dochází v důsledku křížení podjednotek k výměně dimerových párů. Ve vrstvě ATD se páry heterodimerů sestavují jako GluN1a (α) – GluN2B (α) a GluN1a (β) – GluN2B (β), zatímco ve vrstvě LBD se sestavují jako GluN1a (α) – GluN2B (β) a GluN1a (β) – GluN2B (α) (Obr. 2, A a B) (Karakas and Furukawa, 2014). Podobnou architekturu a symetrii zahrnující i výměnu domén vykazuje také homotetramerní AMPA receptor, avšak celkový tvar NMDA receptoru je odlišný. U NMDAR připomíná „horkovzdušný balón“, kde „balón“ odpovídá extracelulárním doménám (ATD a LBD) a „koš“ vytváří TMD, naopak u AMPAR připomíná spíše písmeno „Y“. U NMDA receptoru je toto uspořádání přisuzováno těsnějšímu sbalení ATD a LBD (Obr. 1) (Karakas and Furukawa, 2014; Lee et al., 2014; Sobolevsky et al., 2009).



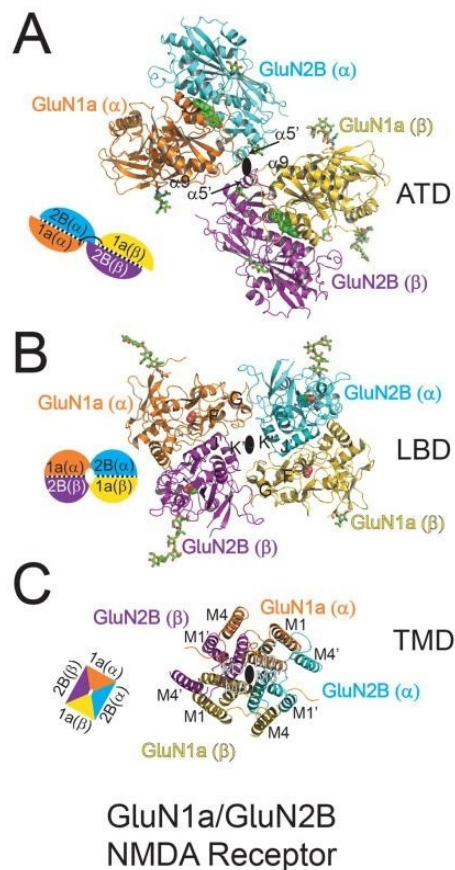
Obrázek 1: Celková struktura heterotetramerního GluN1a/GluN2B NMDA receptoru (vlevo) a porovnání s homomerním GluA2 AMPA receptorem (vpravo). GluN1a a GluN2B podjednotky, označené jako GluN1a (α), GluN1a (β), GluN2B (α), GluN2B (β) jsou znázorněny oranžovou, žlutou, azurovou a fialovou barvou. Amino (NT) a karboxylové (CT) konce jsou umístěny na vrcholu a spodu struktury. Dále jsou zde zeleně zobrazeny molekuly ifenprodilu (IF) navázané na ATD

a agonistů, glycinu (Gly) a L-glutamátu (L-Glu) umístěných v LBD heterodimeru GluN1a / GluN2B. Převzato ze (Karakas & Furukawa, 2014).

Obrázek 2: Strukturní srovnání jednotlivých domén GluN1a/GluN2B NMDA receptoru. Struktury ATD (A), LBD (B) a TMD (C) při pohledu ze shora. Všechny domény jsou sestaveny kolem celkové dvojčetné osy symetrie (černý ovál) v GluN1a / GluN2B heterotetrameru. Schematické obrázky vedle struktur představují organizaci podjednotek v každé doméně, kde podjednotky s černými tečkami mezi sebou označují dvojice dimerů. Převzato ze (Karakas and Furukawa, 2014).

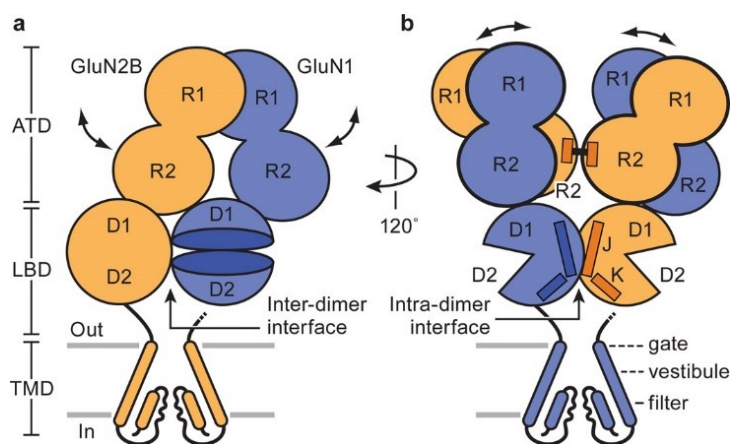
EXTRACELULÁRNÍ AMINO-TERMINÁLNÍ DOMÉNA (ATD)

Kompaktnější sbalení ATD a LBD u NMDA receptoru souvisí také s jedním z hlavních funkčních rozdílů mezi NMDA a non-NMDA receptory, kdy u NMDA receptorů je umožněna alosterická regulace aktivity iontového kanálu prostřednictvím amino-terminální domény (Karakas and Furukawa, 2014). Amino-terminální doména NMDA receptoru tak přispívá k řízení pravděpodobnosti otevření a rychlosti deaktivace iontových kanálů a obsahuje vazebná místa pro velké množství malých



ligandů, jako jsou například polyaminy, fenolethanolaminové sloučeniny (ifenprodil) nebo zinečnaté ionty (Hansen et al., 2010; Karakas et al., 2011, 2009; Mony et al., 2011).

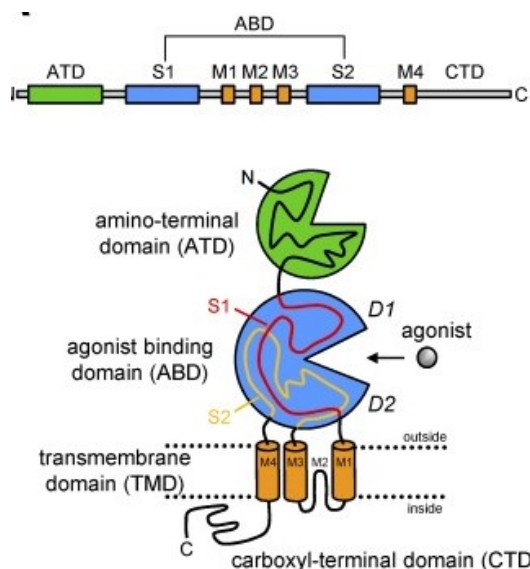
Přestože byla stejně jako u AMPAR krystalograficky zjištěna škebli podobná struktura amino-terminální domény NMDA receptoru, tvořená horním (R1) a spodním lalokem (R2), mají mezi sebou ATD AMPA a NMDA receptorů na rozdíl od ostatních domén velmi nízkou sekvenční homologii. Liší se také svým uspořádáním mezi dimery v oblasti ATD, které je u NMDAR charakterizováno podjednotkovým rozhraním s rozsáhlými kontakty mezi horními laloky R1, zatímco spodní laloky R2 jsou odděleny a propojují ATD s D1 laloky LBD (Obr. 3) (Hansen et al., 2017; Jin et al., 2009; Karakas et al., 2011, 2009).



Obrázek 3: Schéma NMDA receptoru. a) Zobrazení jednoho heterodimeru ATD, dvou škebliovitých struktur z různých heterodimerů LBD a TMD GluN2B podjednotek. Dvojitě šipky naznačují možné pohyby ATD v rámci heterodimeru ATD. b) Rotace schématu receptoru znázorněného na obrázku a) o $\sim 120^\circ$, ukazující dva heterodimery ATD, jeden heterodimer LBD a TMD podjednotek GluN1. Dvojitě šipky znázorňují konformační pohyby mezi dvěma heterodimery ATD. V obou schématech je důraz na umístění R2 laloků ATD, umožňující modulaci inter- a intradimerového rozhraní LBD a následně i brány iontového kanálu. Převzato ze (Lee et al., 2014).

EXTRACELULÁRNÍ LIGAND VAZEBNÁ DOMÉNA (LBD)

Ligand vazebná doména má mezi iGluRs vysoce konzervovanou sekvenční homologii, LBD AMPA a NMDA receptorů tak sdílí podobnou strukturu. LBD NMDA receptoru je tvořena dvěma polypeptidovými segmenty (S1 a S2), které se skládají do struktury připomínající škebli složené z horního laloku (D1) a dolního laloku (D2). Ve štěrbině mezi laloky se pak nachází vazebné místo pro agonisty (Furukawa et al., 2005; Lee et al., 2014). Po navázání obou agonistů, glycinu a glutamátu na LBD podjednotek GluN1 a GluN2 dochází k přeskupení LBD vedoucí k přiblížení D1 a D2 laloku k sobě a uzavření škeblovité struktury (Paganelli et al., 2013). Uzavření škeblovité struktury LBD spouští přeskupení krátkých segmentů (linkerů) spojujících TMD s LBD, přičemž nejvýznamnější pohyb zahrnuje M3-S2 linker, jenž změní tvar a postavení transmembránového M3 helixu, což vede k otevření iontového kanálu tvořeného čtyřmi těmito helixy. Je to základní

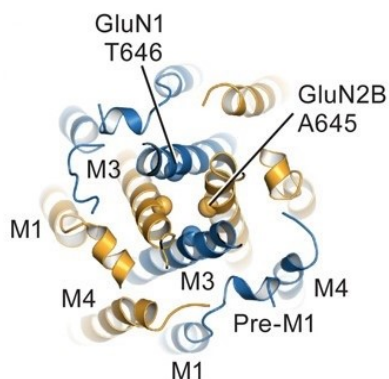


konformační změna v rámci ligand vazebných domén, která přeměňuje energii získanou vazbou agonisty a uzavřením škeblovité struktury LBD na konformační změny vedoucí k otevření póru iontového kanálu. Naopak vazba kompetitivních antagonistů, jako je DCKA obsazující vazebné místo glycinu a antagonist glutamátového místa D-AP5 stabilizuje otevřenou konformaci LBD, která není schopna zprostředkovat otevření kanálu (Hansen et al., 2018, 2017; Lee et al., 2014).

Obrázek 4: Lineární reprezentace a kreslená ilustrace polypeptidového řetězce v podjednotkách iGluRs. Každá podjednotka sestává z ATD, LBD, TMD a CTD. TMD je tvořen třemi transmembránovými helixy (M1, M3 a M4) a zpětnou membránovou smyčkou (M2). LBD je tvořen dvěma segmenty polypeptidového řetězce (S1 a S2), které se skládají do tvaru škeblovité struktury složené z horního laloku (D1) a dolního laloku (D2). Vazebné místo pro agonisty je umístěno ve štěrbině mezi dvěma laloky. Převzato ze (Hansen et al., 2017).

TRANSMEMBRÁNOVÁ DOMÉNA (TMD)

Transmembránové domény čtyř podjednotek jsou uspořádány okolo čtyřčetné osy symetrie a vytvářejí iontový kanál NMDA receptoru procházející přes membránu. Každá podjednotka obsahuje tři transmembránové helixy (M1, M3 a M4) a jednu zpětnou membránovou smyčku (M2), jejichž uspořádání je podobné tomu jako u AMPA receptorů (Hollmann et al., 1994; Lee et al., 2014; Sobolevsky et al., 2009). Na vnější straně iontového kanálu jsou umístěny M1 a M4 helixy, přičemž segmenty M4 spolu navzájem interagují a propojují tak jednotlivé podjednotky. M3 helix obsahuje vysoce konzervovaný motiv devíti aminokyselinových zbytků (SYTANLAAF), který byl na základě strukturních a funkčních studií označen za aktivační bránu NMDA receptoru (Chang and Kuo, 2008). Tetramerní křížení M3 helixů uzavírá pór iontového kanálu a pro jeho otevření musí dojít k přeskupení M3 helixů (Karakas and Furukawa, 2014). M2 vytváří smyčku, která začíná i končí v intracelulární části receptoru. Aminokyselinové zbytky v M2 smyčce lemují pór iontového kanálu a podílejí se tak na jeho selektivitě. Na vrcholu smyčky M2 se pak nachází místo označované jako Q/R/N na základě aminokyselinových zbytků nalezených v této oblasti (Q/R u AMPAR, N u NMDAR), které určují propustnost pro Ca^{2+} ionty, a také se podílejí na vazbě blokátorů včetně Mg^{2+} (Burnashev et al., 1992; Hansen et al., 2017; Kuner et al., 1996).



Obrázek 5: Architektura transmembránových domén. Uspořádání M3 helixů jednotlivých podjednotek tvoří bránu iontového kanálu. Převzato ze (Lee et al., 2014).

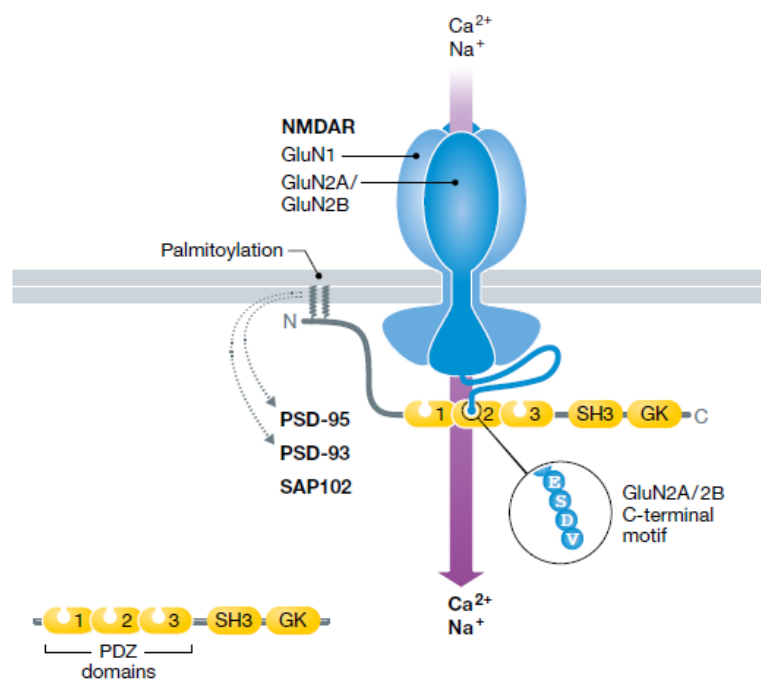
INTRACELULÁRNÍ C-TERMINÁLNÍ DOMÉNA A JEJÍ INTERAKCE

Karboxy-terminální doména je nejméně homologní oblastí NMDA receptoru. Doposud nebylo možno získat její krystalovou strukturu. Jsou však známy její rozměry. C-konce NMDAR jsou 17–20 nm × 13–14 nm široké a dlouhé 13–16 nm, jedná se o největší CTD mezi iGluRs (Chen et al.,

2015, 2008). Svou délkou se liší mezi jednotlivými podjednotkami NMDAR, například podjednotka GluN2A obsahuje 627 aminokyselin, zatímco podjednotka GluN1-1 má jen pouhých 105 aminokyselin (Wenthold et al., 2003). CTD má vliv na transport receptoru na synapse, na jeho lokalizaci, stabilizaci, regulaci funkce prostřednictvím posttranslačních modifikací i na jeho degradaci. Obsahuje také různá vazebná místa pro další intracelulární proteiny, čímž receptor spojuje s intracelulárními signálními kaskádami (Traynelis et al., 2010).

C-konce mají zásadní význam pro lokalizaci a ukotvení NMDA receptorů v excitačních synapsích. Receptory jsou umístovány do oblasti postsynaptické denzity v rámci nanoklastrů společně s membránově asociovanými guanylát kinázami (MAGUK), přičemž jejich vzájemná interakce umožňuje stabilizaci receptoru. Třída scaffold proteinů PSD-MAGUK, mezi které patří PSD-95, PSD-93, SAP102, SAP97 a další sdílí konzervovanou strukturu tvořenou třemi PDZ doménami následované SH3 a neaktivní doménou guanylát kinázy (GK) (Chen et al., 2015; Wenthold et al., 2003). První dvě PDZ domény přímo interagují s NMDA receptorem prostřednictvím vazebného motivu (PDZ

ligand), který je tvořen posledními čtyřmi aminokyselinami (ESDV; 1479 – 1482) na C- konci GluN2A a 2B podjednotek. Zatímco domény SH3 a GK interagují s cytoskeletálními proteiny a intracelulárními signálními komplexy (Kornau et al., 1995; Lim et al., 2002). Postsynaptické kotvení pomocí proteinů PSD-95 a PSD-93, ale nikoliv SAP102 vyžaduje také palmitoylaci jejich N-konce, díky které získávají konformaci nezbytnou pro vazbu na AMPA a NMDA receptory (Obr. 6) (Jeyifous et al., 2016).

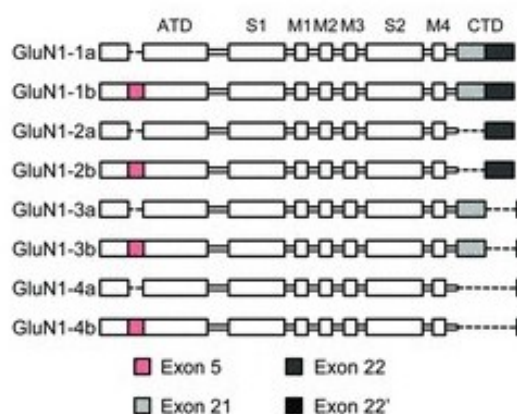


Obrázek 6: Postsynaptické NMDA receptory a PSD-95. Podjednotky GluN2A / 2B (modře) se přímo váží přes svůj C-terminální motiv (ESDV) na PSD-93 / PSD-95 / SAP102, které obsahují tři PDZ domény, SH3 a GK doménu (žlutě). Palmitoylace N-konců PSD-93 a PSD-95 je znázorněna klikatým tvarem. Převzato ze (Patriarchi et al., 2018).

Proteiny rodiny PSD-95 se kromě ukotvení receptoru mohou nepřímo podílet na postsynaptickém počtu a dostupnosti funkčních NMDAR. Uvnitř PDZ-vazebného motivu na C-konci GluN2B podjednotky se nachází serinový zbytek (S1480), který může být fosforylován kasein kinázou II (CK2). Tato fosforylace narušuje interakce GluN2B s PSD-95 a SAP102 a snižuje tak povrchovou expresi GluN2B NMDAR (Chung et al., 2004). Dochází k tomu například při výměně receptorů během vývoje, kdy tato fosforylace umožňuje laterální pohyb GluN2B NMDAR z PSD do extrasynaptických míst, kde podléhá endocytóze (Chen et al., 2012). Odstranění NMDAR obsahujících GluN2B umožňuje vložení NMDAR s GluN2A podjednotkami (Bar-Shira et al., 2015).

Na postsynaptickém kotvení NMDAR se podílí také aktin vazebný protein α -aktinin-2, který umožňuje propojení NMDAR s aktinovým cytoskeletem postsynaptické denzity (Rosenmund and Westbrook, 1993). α -aktinin-2 se přímo váže svou centrální doménou na cytoplazmatický konec GluN1 a GluN2B podjednotek NMDA receptoru, konkrétně na C0 segment GluN1 a na PDZ ligand (ESDV) GluN2B podjednotky (Wyszynski et al., 1997). Je zajímavé, že vazba GluN1 podjednotky a α -aktininu je přímo antagonizována Ca^{2+} / kalmodulem (Ca/CaM), který svým navázáním na GluN1 podjednotku inhibuje aktivitu receptoru (Ehlers et al., 1996). α -aktinin se tak podílí na lokalizaci NMDA receptorů v závislosti na intracelulární koncentraci vápníku (Wyszynski et al., 1997). Oproti GluN1 se Ca/CaM neváže na C-konec GluN2B podjednotky, a proto nemá přímý vliv na jeho interakci s α -aktininem. Přesto mohou být GluN2B podjednotky regulovány Ca/CaM a to prostřednictvím Ca/kalmodulin-dependentní protein kinázy II. CaMKII se svou katalytickou doménou váže na C-konec podjednotky GluN2B, která má na rozdíl od podjednotky GluN2A pro CaMKII vysokou afinitu. Vazba mezi aktivními CaMKII a GluN2B společně se vstupem vápníku přes NMDAR a následná aktivace CaMKII jsou naprosto kritické pro LTP (Barria and Malinow, 2005).

Alternativní sestřih mRNA mění strukturní, fyziologické i farmakologické vlastnosti receptorů, které obsahují GluN1 podjednotky. Je známo osm sestřihových variant GluN1 podjednotky, sestávající ze dvou variant na N-konci, lišící se přítomností nebo nepřítomností exonu 5 v amino-terminální doméně (označené "a" nebo "b") a čtyř variant C-konce GluN1, označené jako GluN1-(1-4), které se liší přítomností exonu 21 a 22 v C-terminální doméně. Jedná se o dva nezávislé po sobě jdoucí exony, které tvoří poslední úsek CTD. Tyto exony kódují sekvence 37 a 38 aminokyselin označené jako C1 a C2. Sestřihové varianty C-konce jsou vytvářeny delecí exonu C1 nebo využitím



alternativního sestřihového místa uvnitř exonu C2, či využitím obou variant (Hollmann et al., 1993). Vystřihováním exonového segmentu kódujícího C2 kazetu dojde k odstranění prvního stop kodonu, což vede k otevření dalšího nového čtecího rámce, který kóduje sekvenci 22 aminokyselin (C2') (Zukin and Bennett, 1995).

Obrázek 7: Lineární reprezentace polypeptidového řetězce GluN1 podjednotky s 8 sestřihovými variantami.

Exon 5 (červeně) kóduje sekvenci 21 aminokyselin uvnitř ATD. Exon 21 (světle šedá) kóduje 37-aminokyselinový segment a exon 22 (tmavě šedá) kóduje 38-aminokyselin dlouhý segment nacházející se v CTD. Odstranění exonu 22 vede ke vzniku exonu 22' (černě), který kóduje oblast 22 aminokyselin. Převzato ze (Vance et al., 2012).

Sestřihové varianty GluN1 podjednotky se liší svou časovou i prostorovou expresí (Laurie and Seeburg, 1994), a také regulují množství funkčních NMDA receptorů přítomných v synapsích. Bylo zjištěno, že sestřihové varianty s nejdelším cytoplasmatickým C-koncem (NR1-1a a NR1-1b) vykazují nejnižší expresi a naopak ty s nejkratším C-koncem (NR1-4a a NR1-4b) nejvyšší expresi na buněčném povrchu (Okabe et al., 1999). To je dáno přítomností C1 exonové kazety, která obsahuje retenční signál pro ER, takže sestřihové varianty s touto doménou vykazují nižší expresi než ty, jež ji postrádají. Naopak přítomnost C2' kazety zvyšuje povrchovou expresi GluN1 podjednotky, neboť zahrnuje terminální 4 aminokyselinovou sekvenci interagující s PDZ doménou. Interakce s proteinem s PDZ doménou uvolňuje receptor z ER a umožňuje jeho transport na plazmatickou membránu. Tyto dva signály tak regulují odlišnou povrchovou expresi GluN1 sestřihových variant (Standley et al., 2000).

Dále bylo identifikováno několik regulačních a cytoskeletálních proteinů interagujících se specifickými sekvencemi na alternativně sestřihovaném C-konci GluN1 podjednotky. Například neurofilamentální protein L (NF-L) interaguje s oblastí exonové kazety C1, což umožňuje propojení NMDA receptoru s neuronálním cytoskeletem (Ehlers et al., 1998). Dalším proteinem interagujícím s CTD GluN1 podjednotky je již zmiňovaný kalmodulin. Kalmodulin (CaM) je součástí procesu na Ca^{2+} závislé inaktivaci NMDA receptorů (Legendre et al., 1993). Poskytuje tak zpětnovazebný mechanismus schopný regulovat následný vstup Ca^{2+} do postsynaptické buňky prostřednictvím

NMDAR kanálů. Jedno z vazebných míst pro CaM se nachází v alternativně sestřihované C1 exonové kazetě, zatímco druhé vazebné místo bylo nalezeno v oblasti společné pro všechny sestřihové varianty GluN1. Jedná se o prvních 30 aminokyselinových zbytků v C-konci GluN1, označených jako C0 (Ehlers et al., 1996; Hollmann et al., 1993; Wyszynski et al., 1997). Po influxu vápníku vyvolává CaM inaktivaci NMDAR těsným navázáním na C0 a C1 domény NR1 podjednotky. CaM inaktivace uvolňuje NMDAR z neuronálního cytoskeletu narušením interakcí mezi GluN1 a α -aktininem 2 (Krupp et al., 1999; Zhang et al., 1998). Výsledkem navázání CaM na GluN1 podjednotku je jak snížení frekvence otevírání, tak i střední doby otevření jednotlivých kanálů NMDAR (Ehlers et al., 1996).

Posttranslační modifikace C-konců jednotlivých podjednotek, jako je palmitoylace či fosforylace, se také podílejí na funkci glutamátových receptorů a regulaci synaptické plasticity. Palmitoylace podjednotek GluN2 má velký význam v přenosu NMDA receptorů do synapsí. Podjednotky GluN2A a GluN2B mají ve své C-terminální doméně dva odlišné klastry palmitoylačních míst, které se svou modifikací podílejí na synaptické plasticitě. Palmitoylace na prvním místě, jenž se nachází proximálně od membrány, zvyšuje prostřednictvím tyrosinových kináz rodiny Src fosforylaci tyrosinů, což vede ke zvýšení povrchové exprese NMDAR, a navíc reguluje internalizaci NMDA receptorů do vyvíjejících se neuronů. Palmitoylace druhého klastru nacházejícího se uprostřed C-konce naopak vede ke snížení exprese receptoru (Hayashi et al., 2009).

NEURODEVELOPMENTÁLNÍ A NEUROPSYCHIATRICKÁ ONEMOCNĚNÍ

POŠKOZENÍ EXCITAČNÍ NEUROTRANSMISE

Přestože fyziologicky regulovaná aktivace NMDA receptorů dává neuronům signály pro přežití a je tak nezbytná pro normální funkci CNS, jejich nadměrná aktivace je příčinou buněčné smrti (Lynch and Guttman, 2002). Díky své všudypřítomné distribuci v CNS a vysoké propustnosti pro vápník jsou NMDAR považovány za hlavní mediátory excitotoxicity. Při hyperaktivitě NMDAR dochází ke zvýšení hladiny intracelulárního vápníku aktivující řadu intracelulárních signálních drah podílejících se na excitotoxicitě. Mezi důsledky aktivace těchto drah patří mitochondriální dysfunkce spojená s produkcí kyslíkových radikálů, dále může docházet k aktivaci syntézy oxidu dusnatého, či nadměrné aktivaci enzymů závislých na vápníku, jako je CaMKII, PKC, PKA a dalších kináz

fosforylující C-konce podjednotek NMDA receptoru, což může vést ke změně fyziologických vlastností receptoru (Dong et al., 2009; Waxman and Lynch, 2005).

NMDA receptory se nachází na synaptických (syn-NMDAR) i extrasynaptických místech (ex-NMDAR). Syn-NMDAR jsou umístěny do oblasti PSD, naproti aktivní zóně, kde za fyziologických podmínek dochází k jejich aktivaci krátkými pulsy vysoké koncentrace glutamátu. Oproti tomu ex-NMDAR se nachází mimo PSD, na periférii dendritického trnu nebo na dendritu, přičemž se předpokládá existence alespoň dvou populací ex-NMDAR. Jedny jsou citlivé na nízké hladiny glutamátu a jsou dlouhodobě aktivovány již při jeho malých koncentracích, čímž přispívají k tonickým proudům. Druhé jsou aktivovány pouze vysokou hladinou glutamátu, která nastává buď přechodně za fyziologických podmínek, anebo chronicky při různých neurodegenerativních onemocnění (Meur et al., 2007; Zhou et al., 2015, 2013).

Ex- a syn- NMDAR mají rozdílné role v přežití a smrti neuronů za fyziologických i patologických stavů. Funkční rozdíly mezi těmito dvěma populacemi NMDAR jsou z velké části dány jejich podjednotkovým složením. V dospělém mozku se na synaptických místech nachází převážně receptory obsahující GluN2A podjednotky, zatímco receptory obsahující GluN2B jsou většinou extrasynaptické. Ex-receptory s GluN2B vykazují výrazněji pomalejší kinetiku a také vyšší afinitu pro glutamát než synaptické GluN2A (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). Ex- a syn- NMDAR se liší také svou preferencí k agonistům, která odpovídá jejich lokální dostupnosti, kdy se v synaptických oblastech vyskytuje převážně D-serin, zatímco v extrasynaptických místech glycin (Papouin et al., 2012).

Extracelulární koncentrace glutamátu se pohybuje okolo 0,5 až 5 uM, přičemž EC50 (střední účinná koncentrace) glutamátu pro aktivaci NMDAR je přibližně 2 až 4 uM. Za klidových podmínek tak může vlivem okolní hladiny glutamátu docházet k aktivaci nízkého počtu syn-NMDAR, stejně jako ex-NMDAR. Hladiny glutamátu (<15 uM) zprostředkované jeho uvolněním z presynaptického terminálu jsou dostatečné pro aktivaci většiny syn-NMDAR, které působí spíše neuroprotektivně. Pro aktivaci patogenně působících ex-NMDAR je zapotřebí vyšších hladin agonisty (> 20 uM), které nastávají po efluxu glutamátu jak z presynaptického neuronu, tak z astrocytů (Zhou et al., 2015).

Ačkoli většina dřívějších studií předpokládala, že buněčná smrt je způsobena především aktivací ex-NMDAR (Hardingham and Bading, 2010), je tato teorie vzhledem k jejich fyziologickým funkcím ve zdravém mozku nepravděpodobná. Ex-NMDAR jsou zapojeny v procesu dlouhodobé

deprese a u vyvíjejících se neuronů jsou hlavními zprostředkovateli synaptického přenosu, kde ani při vysokých koncentracích glutamátu nezpůsobují buněčnou smrt (Papouin et al., 2012; Zhou et al., 2013). Novější studie prokázala, že samotná aktivace synaptických nebo jen extrasynaptických NMDAR nemůže vést ke značné excitotoxicitě. Ani krátkodobá ko-aktivace, která může nastat během intenzivní mozkové aktivity, nemusí nutně vést k významné smrti buněk. Pouze masivní a dlouhotrvající ko-aktivace syn- a ex-NMDAR vyvolává excitotoxicitu, přičemž její stupeň závisí na síle a délce trvání jejich společné aktivace. Pro zmírnění excitotoxicity se tak používají antagonisté NMDAR, jako je například memantin, který blokuje intracelulární signalizaci zprostředkovanou buď ex- nebo syn-NMDAR (Zhou et al., 2015, 2013).

Excitotoxicita nastává při akutních poškození mozku, jako je hypoxie, ischemie, traumatické poranění mozku, epilepsie, ale také v průběhu chronických neurodegenerativních poruch, jako je Alzheimerova, Parkinsonova, či Huntingtonova choroba, u kterých se předpokládá dlouhodobější excitotoxické působení NMDAR s mírnějším účinkem (Paoletti et al., 2013; Traynelis et al., 2010; Waxman and Lynch, 2005).

Naopak hypofunkce NMDA receptorů je například jednou z hlavních hypotéz vysvětlující schizofrenii. Tato teorie byla mimo jiné navržena na základě podobnosti symptomů navozených u zdravých lidí podáním nekompetitivních antagonistů NMDAR se symptomy projevujícími se u pacientů se schizofrenií (Olney et al., 1999). U schizofrenních pacientů byly nalezeny spíše abnormality proteinů PSD interagujících s NMDAR než změny v samotných receptorových podjednotkách. Snížená i zvýšená exprese proteinů PSD-95, PSD-93, SAP102 a NF-L byla zjištěna v závislosti na věku daného jedince. U pacientů se schizofrenií, ale také s poruchami autistického spektra a mentálním postižením pak byly v genech kódující scaffold proteiny objeveny jednonukleotidové polymorfismy spojené s těmito nemocemi. Jak již bylo zmíněno, interakce mezi synaptickými scaffold proteiny a C-konci NR2 podjednotek je kritická pro povrchovou expresi, subcelulární lokalizaci a stabilizaci receptorů na membráně. Snížená exprese těchto proteinů tak může přispět k hypofunkci receptoru (Clinton & Meador-Woodruff, 2004; Kristiansen, Beneyto, Haroutunian, & Meador-Woodruff, 2006; Soler et al., 2018).

Dysfunkce NMDAR může ovlivnit různé buněčné procesy, včetně synaptické signalizace, množství AMPAR na synapsích, dále může narušit rovnováhu mezi excitační a inhibiční synapsí, či genovou expresí. Existuje tedy velice jemná rovnováha mezi mechanismy zprostředkovanými NMDA receptory ve zdravém mozku a v nemocných stavech, kde je narušena homeostáza receptoru.

MUTACE NMDAR

První mutace v genové rodině *GRIN*, spojené s onemocněním, byly popsány u podjednotek GluN2A a GluN2B (Endele et al., 2010). Od té doby bylo identifikováno velké množství mutací souvisejících s řadou neurodevelopmentálních a neuropsychiatrických poruch, jako je epilepsie (EPI), mentální postižení (ID), porucha pozornosti s hyperaktivitou (ADHD), porucha autistického spektra (ASD), či schizofrenie (SCZ) (Burnashev and Szepetowski, 2015; Hu et al., 2016; XiangWei et al., 2018; Yuan et al., 2015). Mutace byly zjištěny ve všech podjednotkách, i v jednotlivých doménách NMDA receptoru (Yuan et al., 2015), přičemž nejvíce jich bylo nalezeno v podjednotkách GluN2B a GluN2A, a to především v jejich ligand vazebných a transmembránových doménách, a také v oblasti linkerů spojující tyto dvě domény (XiangWei et al., 2018). Z těchto dat vyplývá, že neurologické poruchy jsou spjaty s poškozením selektivity a vodivosti kanálu NMDAR a mutace v LBD a TMD jsou tedy pod větším negativním selekčním tlakem, než mutace nacházející se v amino-terminální a intracelulární doméně, které mají zřejmě méně závažnou úlohu při vzniku a průběhu onemocnění (Soto et al., 2014; Swanger et al., 2016).

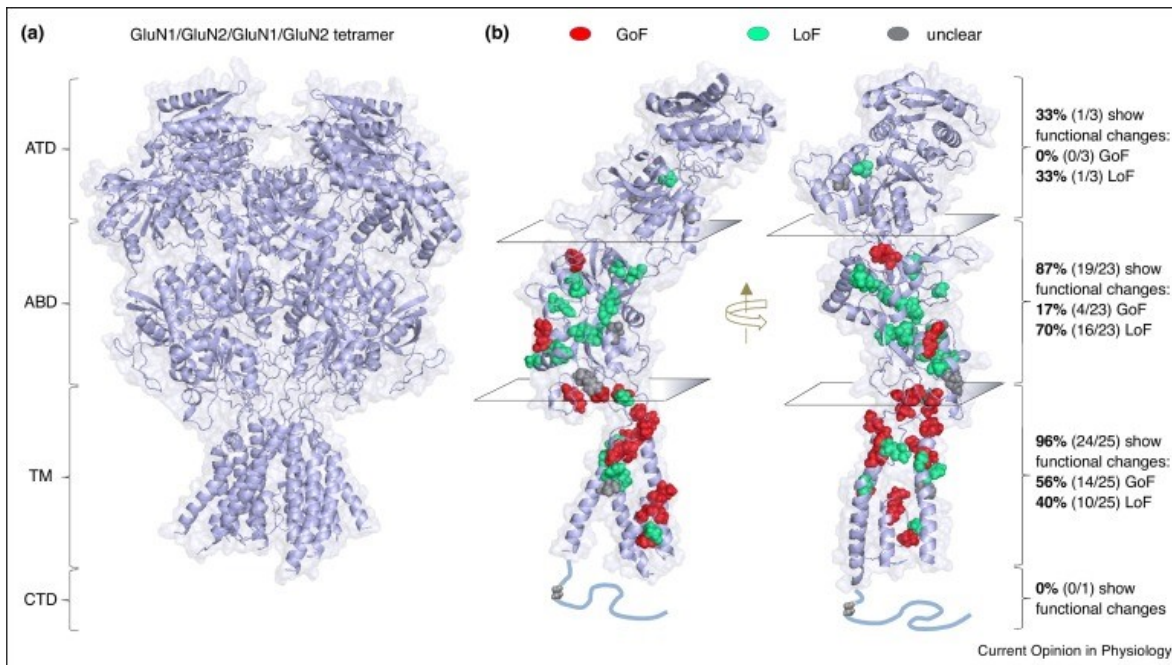
Jednotlivé podjednotky NMDA receptorů se liší svými farmakologickými a biofyzikálními vlastnostmi, vývojovými profily, a také povrchovou expresí (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). Mutace v různých podjednotkách tedy působí odlišné poruchy ve funkci receptorů a mají tak různý dopad na neuronální vývoj a aktivitu mozku. Například GluN2B podjednotka je vysoce exprimována prenatálně a její úroveň exprese začíná klesat ještě před narozením ve většině oblastí mozku (Bar-Shira et al., 2015). Mutace v genu *GRIN2B* tak byly nalezeny u pacientů s vývojovými poruchami, jako je mentální postižení, ASD, či Westův syndrom (Endele et al., 2010; Hu et al., 2016; Lemke et al., 2014; Soto et al., 2014). Zatímco mutace v GluN2A podjednotce, jejíž vysoké hladiny jsou nalézány především v postnatálním období (Bar-Shira et al., 2015) jsou nejčastěji spojovány s epilepsií (Lemke et al., 2013; XiangWei et al., 2018). V porovnání s GluN2 podjednotkami, které

se liší svou časovou i prostorovou expresí, je GluN1 podjednotka distribuována ve všech oblastech mozku (Akazawa et al., 1994). Mutace v genu *GRIN1* jsou méně časté, neboť GluN1 podjednotka je esenciální součástí NMDA receptoru a její poškození má fatální následky na funkci receptoru. U mutací *GRIN1* bylo zjištěno, že způsobují například nesyndromickou mentální retardaci (NSID) (Hamdan et al., 2011), či polymikrogrii (Fry et al., 2018).

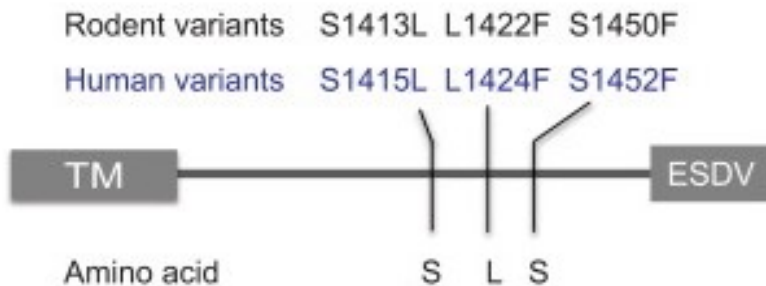
Přestože obsah dat popisující mutace NMDA receptorů spojených s onemocněními neustále narůstá, existuje pouze malé množství funkčních analýz a minimum znalostí o účincích těchto mutací na komplexní procesy, jako je například regulace množství a transportu receptorů na synapse (Yuan et al., 2015). Mutace mohou vést k záměně kódující aminokyseliny za jinou (missense), předčasnému ukončení translace vznikem stopkodonu (nonsense), inserce či delece mohou způsobit posun čtecího rámce (frameshift), nebo může dojít k narušení sestřihu genů. Všechny tyto změny mohou mít za následek různé fenotypové projevy, jako je narušení proteinové struktury, konformace, funkce, lokalizace, či povrchové exprese NMDA receptorů. Funkční data jsou nezbytná především pro porozumění mechanismu jakým daná mutace mění vlastnosti a funkci receptoru, což umožňuje cílené hledání vhodné léčby pro tyto nemoci (XiangWei et al., 2018).

Funkční důsledky mutací se liší mezi jednotlivými doménami. Změny funkce receptoru byly nalezeny především u LBD a TMD, kdy většina mutací v LBD vykazovala ztrátu funkce receptoru (loss of action), naopak v TMD mutace vykazovaly spíše nárůst aktivity receptoru (gain of action) (Obr. 8). Mutací v ATD a CTD, u kterých byla provedena funkční analýza, existuje velmi omezené množství, neboť většina mutací nacházejících se v těchto doménách nemá jasně patrný vliv na funkci NMDAR (XiangWei et al., 2018). Z dostupných zdrojů se zdá, že funkční studie zabývající se mutacemi v C-terminální doméně byla dosud publikována pouze jedna. Jednalo se o tři missense varianty v genu *GRIN2B* nalezené u pacientů s autismem (S1415L) a schizofrenií (L1424F a S1452F) (Obr. 9). Všechny tyto varianty C-konce vykazovaly zhoršenou vazebnou afinitu k proteinům membránově asociované guanylát kinázy (PSD-95 a SAP102). Mutace S1415L, nalezená u pacienta s autismem, navíc vykazovala sníženou povrchovou expresi (o 30 %) v hipokampálních neuronech, a také GluN2B S1415L-exprimující neurony měly redukovaný počet dendritických trnů (o 20 %) ve srovnání s neurony exprimujícími GluN2B WT. To souvisí se zjištěním, že změny v dendritických trnech jsou často pozorovány při poruchách autistického spektra, což naznačuje, že mutace v CTD mohou mít vliv na tuto patofyziologii. U žádné z mutací však nebyly detekované

změny v amplitudě odezvy, ani v době jejího nástupu. Hlavní farmakologické vlastnosti NMDAR obsahující některou z těchto tří variant C-konce tak nejsou změněny (Liu et al., 2017).



Obrázek 8: Funkční důsledky mutací lišící se mezi doménami. CTD není přítomna v krystalové struktuře, a proto zde není zobrazena. Zbytky nesoucí missense mutace s různými funkčními důsledky jsou zvýrazněny různými barvami: červená = nárůst funkce (GoF), zelená = ztráta funkce (LoF) a šedá = funkční stav nejasný. Mutace s funkční studií jediného parametru jsou z tohoto souhru vyloučeny. Převzato ze (XiangWei et al., 2018).



Obrázek 9: Tři vzácné varianty C-konce identifikované v GluN2B podjednotce NMDA receptoru. Lidský S1415 je analogický ke S1413 u krys; L1424 je analogický krysímu L1422; a S1452 odpovídá krysímu S1450. Převzato z (Liu et al., 2017).

ZÁVĚR

NMDA receptory mají zcela zásadní úlohu v normálních mozkových funkcích, jako je synaptická plasticita, kognitivní procesy a správný vývoj neuronů, stejně jako v patologických stavech při různých neurologických a psychiatrických onemocnění.

Analýza celo-genomových dat u zdravé populace ukázala, že *GRIN* geny kódující podjednotky NMDA receptoru jsou jedny z nejvíce intolerantních genů vůči variacím u člověka, neboť u nich bylo nalezeno mnohem méně nesynonymních variací, než by se očekávalo (Petrovski et al., 2013; Swanger et al., 2016). Intolerance genetické variace se významně liší mezi doménami NMDA receptoru. Oblast transmembránových helixů a linkerů, spojující LBD s TMD, nevykazuje prakticky žádné variace ve zdravé populaci, ale u pacientů s projevy různých neurologických poruch byl v těchto oblastech identifikován velký počet vzácných variant a mutací. C-terminální doména je na rozdíl od ostatních domén NMDA receptoru velice variabilní ve své aminokyselinové sekvenci a do značné míry se zdá být tolerantní k různým genetickým změnám (Swanger et al., 2016).

V C-terminální doméně se nachází mnoho míst, které jsou cílem posttranslačních modifikací regulující funkci receptoru. Nachází se zde také krátké vazebné motivy pro intracelulární proteiny, jako jsou různé adaptorové, scaffold, kotvící a cytoskeletální proteiny, jenž hrají důležitou roli v transportu receptoru na synapse, jeho lokalizaci a stabilizaci (Traynelis et al., 2010). To naznačuje, že některé genetické variace v C-terminální doméně mohou ovlivnit celkovou funkci excitační signalizace skrze změněné množství receptorů na synapsi, a podnítit tak daný patofyziologický stav. Navzdory značnému počtu mutací identifikovaných v CTD NMDAR u nemocných pacientů (Tabulka 1.) (Hu et al., 2016; XiangWei et al., 2018; Yuan et al., 2015), existuje pouze minimum funkčních analýz zabývajících se účinkem těchto variant. U několika mutací v CTD však byly prokázány změny v povrchové expresi a subcelulární lokalizaci NMDA receptoru, které by mohly přispívat k rozvoji onemocnění (Liu et al., 2017).

POUŽITÁ LITERATURA

- Addis, L., Virdee, J.K., Vidler, L.R., Collier, D.A., Pal, D.K., Ursu, D., 2017. Epilepsy-associated GRIN2A mutations reduce NMDA receptor trafficking and agonist potency – molecular profiling and functional rescue. *Sci. Rep.* 7, 66. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00115-w>
- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1994. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J. Comp. Neurol.* 347, 150–160. <https://doi.org/10.1002/cne.903470112>
- Andreoli, V., De Marco, E.V., Trecroci, F., Cittadella, R., Di Palma, G., Gambardella, A., 2014. Potential involvement of GRIN2B encoding the NMDA receptor subunit NR2B in the spectrum of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 121, 533–542. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-1125-7>
- Ascher, P., Nowak, L., 1988. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J. Physiol.* 399, 247–266. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017078>
- Atlason, P.T., Garside, M.L., Meddows, E., Whiting, P., McIlhinney, R.A.J., 2007. N-Methyl-d-aspartate (NMDA) Receptor Subunit NR1 Forms the Substrate for Oligomeric Assembly of the NMDA Receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 25299–25307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702778200>
- Barria, A., Malinow, R., 2005. NMDA Receptor Subunit Composition Controls Synaptic Plasticity by Regulating Binding to CaMKII. *Neuron* 48, 289–301. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.034>
- Barry, M.F., Ziff, E.B., 2002. Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 279–286. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00329-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00329-X)
- Bar-Shira, O., Maor, R., Chechik, G., 2015. Gene Expression Switching of Receptor Subunits in Human Brain Development. *PLOS Comput. Biol.* 11, e1004559. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004559>
- Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., Heinemann, S., 1990. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science* 249, 1033–1037. <https://doi.org/10.1126/science.2168579>
- Bramswig, N.C., Lüdecke, H.-J., Alanay, Y., Albrecht, B., Barthelmie, A., Boduroglu, K., Braunholz, D., Caliebe, A., Chrzanowska, K.H., Czeschik, J.C., Ende, S., Graf, E., Guillén-Navarro, E., Kiper, P.Ö.S., López-González, V., Parenti, I., Pozojevic, J., Utine, G.E., Wieland, T., Kaiser, F.J., Wollnik, B., Strom, T.M., Wiczorek, D., 2015. Exome sequencing unravels unexpected differential diagnoses in individuals with the tentative diagnosis of Coffin–Siris and Nicolaides–Baraitser syndromes. *Hum. Genet.* 134, 553–568. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1535-8>
- Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J.P., Gunther, W., Seeburg, P.H., Sakmann, B., 1992. Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257, 1415–1419. <https://doi.org/10.1126/science.1382314>
- Burnashev, N., Szepietowski, P., 2015. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Pharmacol., Neurosciences* 20, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.11.008>
- Chang, H.-R., Kuo, C.-C., 2008. The Activation Gate and Gating Mechanism of the NMDA Receptor. *J. Neurosci.* 28, 1546–1556. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3485-07.2008>
- Chen, B.-S., Gray, J.A., Sanz-Clemente, A., Wei, Z., Thomas, E.V., Nicoll, R.A., Roche, K.W., 2012. SAP102 Mediates Synaptic Clearance of NMDA Receptors. *Cell Rep.* 2, 1120–1128. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.024>
- Chen, X., Levy, J.M., Hou, A., Winters, C., Azzam, R., Sousa, A.A., Leapman, R.D., Nicoll, R.A., Reese, T.S., 2015. PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E6983–E6992. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517045112>

- Chen, X., Winters, C., Azzam, R., Li, X., Galbraith, J.A., Leapman, R.D., Reese, T.S., 2008. Organization of the core structure of the postsynaptic density. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4453–4458. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800897105>
- Chen, X.S., Reader, R.H., Hoischen, A., Veltman, J.A., Simpson, N.H., Francks, C., Newbury, D.F., Fisher, S.E., 2017. Next-generation DNA sequencing identifies novel gene variants and pathways involved in specific language impairment. *Sci. Rep.* 7, 46105. <https://doi.org/10.1038/srep46105>
- Chung, H.J., Huang, Y.H., Lau, L.-F., Haganir, R.L., 2004. Regulation of the NMDA Receptor Complex and Trafficking by Activity-Dependent Phosphorylation of the NR2B Subunit PDZ Ligand. *J. Neurosci.* 24, 10248–10259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0546-04.2004>
- Clinton, S.M., Meador-Woodruff, J.H., 2004. Abnormalities of the NMDA Receptor and Associated Intracellular Molecules in the Thalamus in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology* 29, 1353–1362. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300451>
- Collingridge, G.L., Bliss, T.V.P., 1987. NMDA receptors - their role in long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 10, 288–293. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90175-5)
- Copits, B.A., Swanson, G.T., 2012. Dancing partners at the synapse: auxiliary subunits that shape kainate receptor function. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 675–686. <https://doi.org/10.1038/nrn3335>
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00215-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4)
- Cull-Candy, S.G., Leszkiewicz, D.N., 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2004, re16. <https://doi.org/10.1126/stke.2552004re16>
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., 1999. The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7–62.
- Dong, X., Wang, Y., Qin, Z., 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 30, 379–387. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.24>
- Ehlers, M.D., Fung, E.T., O'Brien, R.J., Haganir, R.L., 1998. Splice Variant-Specific Interaction of the NMDA Receptor Subunit NR1 with Neuronal Intermediate Filaments. *J. Neurosci.* 18, 720–730. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-02-00720.1998>
- Ehlers, M.D., Zhang, S., Bernhardt, J.P., Haganir, R.L., 1996. Inactivation of NMDA Receptors by Direct Interaction of Calmodulin with the NR1 Subunit. *Cell* 84, 745–755. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81052-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81052-1)
- Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., Milh, M., Kortüm, F., Fritsch, A., Pientka, F.K., Hellenbroich, Y., Kalscheuer, V.M., Kohlhase, J., Moog, U., Rappold, G., Rauch, A., Ropers, H.-H., von Spiczak, S., Tönnies, H., Villeneuve, N., Villard, L., Zabel, B., Zenker, M., Laube, B., Reis, A., Wiczorek, D., Van Maldergem, L., Kutsche, K., 2010. Mutations in *GRIN2A* and *GRIN2B* encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat. Genet.* 42, 1021–1026. <https://doi.org/10.1038/ng.677>
- Firth, H.V., Richards, S.M., Bevan, A.P., Clayton, S., Corpas, M., Rajan, D., Vooren, S.V., Moreau, Y., Pettett, R.M., Carter, N.P., 2009. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 524–533. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010>
- Fisher, M.T., Fisher, J.L., 2014. Contributions of different kainate receptor subunits to the properties of recombinant homomeric and heteromeric receptors. *Neuroscience* 278, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.009>
- Fonnum, F., 1984. Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain. *J. Neurochem.* 42, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb09689.x>

- Fry, A.E., Fawcett, K.A., Zelnik, N., Yuan, H., Thompson, B.A.N., Shemer-Meir, L., Cushion, T.D., Muga-
laasi, H., Sims, D., Stoodley, N., Chung, S.-K., Rees, M.I., Patel, C.V., Brueton, L.A., Layet, V., Giuliano, F.,
Kerr, M.P., Banne, E., Meiner, V., Lerman-Sagie, T., Helbig, K.L., Kofman, L.H., Knight, K.M., Chen, W.,
Kannan, V., Hu, C., Kusumoto, H., Zhang, J., Swanger, S.A., Shaulsky, G.H., Mirzaa, G.M., Muir, A.M., Mef-
ford, H.C., Dobyms, W.B., Mackenzie, A.B., Mullins, J.G.L., Lemke, J.R., Bahi-Buisson, N., Traynelis, S.F.,
Iago, H.F., Pilz, D.T., 2018. De novo mutations in GRIN1 cause extensive bilateral polymicrogyria. *Brain* 141,
698–712. <https://doi.org/10.1093/brain/awx358>
- Furukawa, H., Gouaux, E., 2003. Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the
NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J.* 22, 2873–2885. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg303>
- Furukawa, H., Singh, S.K., Mancusso, R., Gouaux, E., 2005. Subunit arrangement and function in NMDA
receptors. *Nature* 438, 185–192. <https://doi.org/10.1038/nature04089>
- Grozeva, D., Carss, K., Spasic-Boskovic, O., Tejada, M.-I., Gecz, J., Shaw, M., Corbett, M., Haan, E., Thomp-
son, E., Friend, K., Hussain, Z., Hackett, A., Field, M., Renieri, A., Stevenson, R., Schwartz, C., Floyd, J.A.B.,
Bentham, J., Cosgrove, C., Keavney, B., Bhattacharya, S., Hurles, M., Raymond, F.L., 2015. Targeted Next -
Generation Sequencing Analysis of 1,000 Individuals with Intellectual Disability. *Hum. Mutat.* 36, 1197–1204.
<https://doi.org/10.1002/humu.22901>
- Hamdan, F.F., Gauthier, J., Araki, Y., Lin, D.-T., Yoshizawa, Y., Higashi, K., Park, A.-R., Spiegelman, D.,
Dobrzniecka, S., Piton, A., Tomitori, H., Daoud, H., Massicotte, C., Henrion, E., Diallo, O., Shekarabi, M.,
Marineau, C., Shevell, M., Maranda, B., Mitchell, G., Nadeau, A., D'Anjou, G., Vanasse, M., Srour, M.,
Lafrenière, R.G., Drapeau, P., Lacaille, J.C., Kim, E., Lee, J.-R., Igarashi, K., Haganir, R.L., Rouleau, G.A.,
Michaud, J.L., 2011. Excess of De Novo Deleterious Mutations in Genes Associated with Glutamatergic Sys-
tems in Nonsyndromic Intellectual Disability. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 306–316.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.001>
- Hansen, K.B., Furukawa, H., Traynelis, S.F., 2010. Control of Assembly and Function of Glutamate Receptors
by the Amino-Terminal Domain. *Mol. Pharmacol.* 78, 535–549. <https://doi.org/10.1124/mol.110.067157>
- Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Furukawa, H., Wollmuth, L.P., Gibb, A.J., Traynelis, S.F., 2018. Structure,
function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* 150, 1081–1105.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201812032>
- Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Menniti, F.S., Traynelis, S.F., 2017. NMDA Receptors in the Central Nerv-
ous System. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1677, 1–80. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7321-7_1
- Hansen, K.B., Yuan, H., Traynelis, S.F., 2007. Structural aspects of AMPA receptor activation, desensitization
and deactivation. *Curr. Opin. Neurobiol., Signalling mechanisms* 17, 281–288.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.03.014>
- Hardingham, G.E., Bading, H., 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications
for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 682–696. <https://doi.org/10.1038/nrn2911>
- Hayashi, T., 1954. Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.* 3, 183–192.
<https://doi.org/10.2302/kjm.3.183>
- Hayashi, T., Thomas, G.M., Haganir, R.L., 2009. Dual Palmitoylation of NR2 Subunits Regulates NMDA Re-
ceptor Trafficking. *Neuron* 64, 213–226. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.017>
- Hollmann, M., Boulter, J., Maron, C., Beasley, L., Sullivan, J., Pecht, G., Heinemann, S., 1993. Zinc potentiates
agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10, 943–954.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90209-A](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90209-A)
- Hollmann, M., Heinemann, S., 1994. Cloned Glutamate Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31–108.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.000335>

Hollmann, M., Maron, C., Heinemann, S., 1994. N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13, 1331–1343. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90419-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90419-7)

Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S.W., Heinemann, S., 1989. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342, 643. <https://doi.org/10.1038/342643a0>

Hu, C., Chen, W., Myers, S.J., Yuan, H., Traynelis, S.F., 2016. Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. *J. Pharmacol. Sci.* 132, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.10.002>

Isaac, J.T.R., Ashby, M.C., McBain, C.J., 2007. The Role of the GluR2 Subunit in AMPA Receptor Function and Synaptic Plasticity. *Neuron* 54, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.001>

Jeyifous, O., Lin, E.I., Chen, X., Antinone, S.E., Mastro, R., Drisdell, R., Reese, T.S., Green, W.N., 2016. Palmitoylation regulates glutamate receptor distributions in postsynaptic densities through control of PSD95 conformation and orientation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E8482–E8491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612963113>

Jin, R., Singh, S.K., Gu, S., Furukawa, H., Sobolevsky, A.I., Zhou, J., Jin, Y., Gouaux, E., 2009. Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain. *EMBO J.* 28, 1812–1823. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.140>

Johnson, J.W., Ascher, P., 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529. <https://doi.org/10.1038/325529a0>

Jonas, P., Burnashev, N., 1995. Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* 15, 987–990. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90087-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90087-X)

Karakas, E., Furukawa, H., 2014. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* 344, 992–997. <https://doi.org/10.1126/science.1251915>

Karakas, E., Simorowski, N., Furukawa, H., 2011. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475, 249–253. <https://doi.org/10.1038/nature10180>

Karakas, E., Simorowski, N., Furukawa, H., 2009. Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *EMBO J.* 28, 3910–3920. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.338>

Kashiwagi, K., Masuko, T., Nguyen, C.D., Kuno, T., Tanaka, I., Igarashi, K., Williams, K., 2002. Channel Blockers Acting at N-Methyl-D-Aspartate Receptors: Differential Effects of Mutations in the Vestibule and Ion Channel Pore. *Mol. Pharmacol.* 61, 533–545. <https://doi.org/10.1124/mol.61.3.533>

Keinanen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T.A., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1990. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249, 556–560. <https://doi.org/10.1126/science.2166337>

Kennedy, M.B., 1989. Regulation of synaptic transmission in the central nervous system: Long-term potentiation. *Cell* 59, 777–787. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90601-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90601-6)

Kessels, H.W., Malinow, R., 2009. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron* 61, 340–350. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.015>

Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., Seeburg, P.H., 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737–1740. <https://doi.org/10.1126/science.7569905>

Kristiansen, L.V., Beneyto, M., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J.H., 2006. Changes in NMDA receptor subunits and interacting PSD proteins in dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex indicate abnormal regional expression in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 11, 737–747. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001844>

Krupp, J.J., Vissel, B., Thomas, C.G., Heinemann, S.F., Westbrook, G.L., 1999. Interactions of Calmodulin and α -Actinin with the NR1 Subunit Modulate Ca²⁺-Dependent Inactivation of NMDA Receptors. *J. Neurosci.* 19, 1165–1178. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-04-01165.1999>

Kuner, T., Wollmuth, L.P., Karlin, A., Seeburg, P.H., Sakmann, B., 1996. Structure of the NMDA Receptor Channel M2 Segment Inferred from the Accessibility of Substituted Cysteines. *Neuron* 17, 343–352. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80165-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80165-8)

Laurie, D.J., Seeburg, P.H., 1994. Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J. Neurosci.* 14, 3180–3194. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-03180.1994>

Lee, C.-H., Lü, W., Michel, J.C., Goehring, A., Du, J., Song, X., Gouaux, E., 2014. NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature* 511, 191–197. <https://doi.org/10.1038/nature13548>

Legendre, P., Rosenmund, C., Westbrook, G.L., 1993. Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium. *J. Neurosci.* 13, 674–684. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-02-00674.1993>

Lemke, J.R., Geider, K., Helbig, K.L., Heyne, H.O., Schütz, H., Hentschel, J., Courage, C., Depienne, C., Nava, C., Heron, D., Møller, R.S., Hjalgrim, H., Lal, D., Neubauer, B.A., Nürnberg, P., Thiele, H., Kurlmann, G., Arnold, G.L., Bhambhani, V., Bartholdi, D., Pedurupillay, C.R.J., Misceo, D., Frengen, E., Strømme, P., Dlugos, D.J., Doherty, E.S., Bijlsma, E.K., Ruivenkamp, C.A., Hoffer, M.J.V., Goldstein, A., Rajan, D.S., Narayanan, V., Ramsey, K., Belnap, N., Schrauwen, I., Richholt, R., Koeleman, B.P.C., Sá, J., Mendonça, C., de Kovel, C.G.F., Weckhuysen, S., Hardies, K., De Jonghe, P., De Meirleir, L., Milh, M., Badens, C., Lebrun, M., Busa, T., Francannet, C., Piton, A., Riesch, E., Biskup, S., Vogt, H., Dorn, T., Helbig, I., Michaud, J.L., Laube, B., Syrbe, S., 2016. Delineating the GRIN1 phenotypic spectrum: A distinct genetic NMDA receptor encephalopathy. *Neurology* 86, 2171–2178. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002740>

Lemke, J.R., Hendrickx, R., Geider, K., Laube, B., Schwake, M., Harvey, R.J., James, V.M., Pepler, A., Steiner, I., Hörtnagel, K., Neidhardt, J., Ruf, S., Wolff, M., Bartholdi, D., Caraballo, R., Platzer, K., Suls, A., De Jonghe, P., Biskup, S., Weckhuysen, S., 2014. GRIN2B mutations in West syndrome and intellectual disability with focal epilepsies. *Ann. Neurol.* 75, 147–154. <https://doi.org/10.1002/ana.24073>

Lemke, J.R., Lal, D., Reinthaler, E.M., Steiner, I., Nothnagel, M., Alber, M., Geider, K., Laube, B., Schwake, M., Finsterwalder, K., Franke, A., Schilhabel, M., Jähn, J.A., Muhle, H., Boor, R., Van Paesschen, W., Caraballo, R., Fejerman, N., Weckhuysen, S., De Jonghe, P., Larsen, J., Møller, R.S., Hjalgrim, H., Addis, L., Tang, S., Hughes, E., Pal, D.K., Veri, K., Vaher, U., Talvik, T., Dimova, P., Guerrero López, R., Serratos, J.M., Linnankivi, T., Lehesjoki, A.-E., Ruf, S., Wolff, M., Buerki, S., Wohlrab, G., Kroell, J., Datta, A.N., Fiedler, B., Kurlmann, G., Kluger, G., Hahn, A., Haberlandt, D.E., Kutzer, C., Sperner, J., Becker, F., Weber, Y.G., Feucht, M., Steinböck, H., Neophythy, B., Ronen, G.M., Gruber-Sedlmayr, U., Geldner, J., Harvey, R.J., Hoffmann, P., Herms, S., Altmüller, J., Toliat, M.R., Thiele, H., Nürnberg, P., Wilhelm, C., Stephani, U., Helbig, I., Lerche, H., Zimprich, F., Neubauer, B.A., Biskup, S., von Spiczak, S., 2013. Mutations in *GRIN2A* cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nat. Genet.* 45, 1067–1072. <https://doi.org/10.1038/ng.2728>

Lesca, G., Rudolf, G., Bruneau, N., Lozovaya, N., Labalme, A., Boutry-Kryza, N., Salmi, M., Tsintsadze, T., Addis, L., Motte, J., Wright, S., Tsintsadze, V., Michel, A., Doummar, D., Lascelles, K., Strug, L., Waters, P., de Bellescize, J., Vrielynck, P., de Saint Martin, A., Ville, D., Ryvlin, P., Arzimanoglou, A., Hirsch, E., Vincent, A., Pal, D., Burnashev, N., Sanlaville, D., Szepietowski, P., 2013. *GRIN2A* mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. *Nat. Genet.* 45, 1061–1066. <https://doi.org/10.1038/ng.2726>

Lim, I.A., Hall, D.D., Hell, J.W., 2002. Selectivity and Promiscuity of the First and Second PDZ Domains of PSD-95 and Synapse-associated Protein 102. *J. Biol. Chem.* 277, 21697–21711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112339200>

Liu, S., Zhou, L., Yuan, H., Vieira, M., Sanz-Clemente, A., Badger, J.D., Lu, W., Traynelis, S.F., Roche, K.W., 2017. A Rare Variant Identified Within the GluN2B C-Terminus in a Patient with Autism Affects NMDA Receptor Surface Expression and Spine Density. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 4093–4102. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0827-16.2017>

Lynch, D.R., Guttman, R.P., 2002. Excitotoxicity: Perspectives Based on N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 717–723. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.3.717>

- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., 1987. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol.* 394, 501–527. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016883>
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie, P.B., 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261–263.
- McDonald, J.W., Johnston, M.V., 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15, 41–70. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(90\)90011-C](https://doi.org/10.1016/0165-0173(90)90011-C)
- Meddows, E., Bourdellès, B.L., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P., McIlhinney, R.A.J., 2001. Identification of Molecular Determinants That Are Important in the Assembly of N-Methyl-d-aspartate Receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 18795–18803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101382200>
- Meur, K.L., Galante, M., Angulo, M.C., Audinat, E., 2007. Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate of non-synaptic origin in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 580, 373–383. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.123570>
- Mony, L., Zhu, S., Carvalho, S., Paoletti, P., 2011. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J.* 30, 3134–3146. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.203>
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1992. Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. *Science* 256, 1217–1221. <https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1217>
- Myers, R.A., Casals, F., Gauthier, J., Hamdan, F.F., Keebler, J., Boyko, A.R., Bustamante, C.D., Piton, A.M., Spiegelman, D., Henrion, E., Zilversmit, M., Hussin, J., Quinlan, J., Yang, Y., Lafrenière, R.G., Griffing, A.R., Stone, E.A., Rouleau, G.A., Awadalla, P., 2011. A Population Genetic Approach to Mapping Neurological Disorder Genes Using Deep Resequencing. *PLOS Genet.* 7, e1001318. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001318>
- Okabe, S., Miwa, A., Okado, H., 1999. Alternative Splicing of the C-Terminal Domain Regulates Cell Surface Expression of the NMDA Receptor NR1 Subunit. *J. Neurosci.* 19, 7781–7792. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-07781.1999>
- Olney, J.W., Newcomer, J.W., Farber, N.B., 1999. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 33, 523–533. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(99\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(99)00029-1)
- O’Roak, B.J., Stessman, H.A., Boyle, E.A., Witherspoon, K.T., Martin, B., Lee, C., Vives, L., Baker, C., Hiatt, J.B., Nickerson, D.A., Bernier, R., Shendure, J., Eichler, E.E., 2014. Recurrent *de novo* mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat. Commun.* 5, 5595. <https://doi.org/10.1038/ncomms6595>
- Paganelli, M.A., Kussius, C.L., Popescu, G.K., 2013. Role of Cross-Cleft Contacts in NMDA Receptor Gating. *PLOS ONE* 8, e80953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080953>
- Pan, Y., Chen, J., Guo, H., Ou, J., Peng, Y., Liu, Q., Shen, Y., Shi, L., Liu, Y., Xiong, Z., Zhu, T., Luo, S., Hu, Z., Zhao, J., Xia, K., 2015. Association of genetic variants of GRIN2B with autism. *Sci. Rep.* 5, 8296. <https://doi.org/10.1038/srep08296>
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanani, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.-P., Oliet, S.H.R., 2012. Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell* 150, 633–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.029>
- Patriarchi, T., Buonarati, O.R., Hell, J.W., 2018. Postsynaptic localization and regulation of AMPA receptors and Cav1.2 by β 2 adrenergic receptor/PKA and Ca²⁺/CaMKII signaling. *EMBO J.* 37, e99771. <https://doi.org/10.15252/emboj.201899771>

- Petrovski, S., Wang, Q., Heinzen, E.L., Allen, A.S., Goldstein, D.B., 2013. Genic Intolerance to Functional Variation and the Interpretation of Personal Genomes. *PLOS Genet.* 9, e1003709. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003709>
- Pickard, L., Noël, J., Duckworth, J.K., Fitzjohn, S.M., Henley, J.M., Collingridge, G.L., Molnar, E., 2001. Transient synaptic activation of NMDA receptors leads to the insertion of native AMPA receptors at hippocampal neuronal plasma membranes. *Neuropharmacology* 41, 700–713. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00127-7)
- Pin, J.-P., Duvoisin, R., 1995. The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology* 34, 1–26. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(94\)00129-G](https://doi.org/10.1016/0028-3908(94)00129-G)
- Platzer, K., Yuan, H., Schütz, H., Winschel, A., Chen, W., Hu, C., Kusumoto, H., Heyne, H.O., Helbig, K.L., Tang, S., Willing, M.C., Tinkle, B.T., Adams, D.J., Depienne, C., Keren, B., Mignot, C., Frengen, E., Strømme, P., Biskup, S., Döcker, D., Strom, T.M., Mefford, H.C., Myers, C.T., Muir, A.M., LaCroix, A., Sadleir, L., Scheffer, I.E., Brilstra, E., Haelst, M.M. van, Smagt, J.J. van der, Bok, L.A., Møller, R.S., Jensen, U.B., Millichap, J.J., Berg, A.T., Goldberg, E.M., Bie, I.D., Fox, S., Major, P., Jones, J.R., Zackai, E.H., Jamba, R.A., Rolf, A., Leventer, R.J., Lawson, J.A., Roscioli, T., Jansen, F.E., Ranza, E., Korff, C.M., Lehesjoki, A.-E., Courage, C., Linnankivi, T., Smith, D.R., Stanley, C., Mintz, M., McKnight, D., Decker, A., Tan, W.-H., Tarnopolsky, M.A., Brady, L.L., Wolff, M., Dondit, L., Pedro, H.F., Parisotto, S.E., Jones, K.L., Patel, A.D., Franz, D.N., Vanzo, R., Marco, E., Ranells, J.D., Donato, N.D., Dobyns, W.B., Laube, B., Traynelis, S.F., Lemke, J.R., 2017. GRIN2B encephalopathy: novel findings on phenotype, variant clustering, functional consequences and treatment aspects. *J. Med. Genet.* 54, 460–470. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104509>
- Rauch, A., Wiczorek, D., Graf, E., Wieland, T., Ende, S., Schwarzmayr, T., Albrecht, B., Bartholdi, D., Beygo, J., Di Donato, N., Dufke, A., Cremer, K., Hempel, M., Horn, D., Hoyer, J., Joset, P., Röpke, A., Moog, U., Riess, A., Thiel, C.T., Tzschach, A., Wiesener, A., Wohlleber, E., Zweier, C., Ekici, A.B., Zink, A.M., Rump, A., Meisinger, C., Grallert, H., Sticht, H., Schenck, A., Engels, H., Rappold, G., Schröck, E., Wieacker, P., Riess, O., Meitinger, T., Reis, A., Strom, T.M., 2012. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *The Lancet* 380, 1674–1682. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61480-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61480-9)
- Retterer, K., Juusola, J., Cho, M.T., Vitazka, P., Millan, F., Gibellini, F., Vertino-Bell, A., Smaoui, N., Neidich, J., Monaghan, K.G., McKnight, D., Bai, R., Suchy, S., Friedman, B., Tahiliani, J., Pineda-Alvarez, D., Richard, G., Brandt, T., Haverfield, E., Chung, W.K., Bale, S., 2016. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet. Med.* 18, 696–704. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.148>
- Rosenmund, C., Westbrook, G.L., 1993. Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. *Neuron* 10, 805–814. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90197-Y](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90197-Y)
- Schiffer, H.H., Swanson, G.T., Heinemann, S.F., 1997. Rat GluR7 and a Carboxy-Terminal Splice Variant, GluR7b, Are Functional Kainate Receptor Subunits with a Low Sensitivity to Glutamate. *Neuron* 19, 1141–1146. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80404-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80404-3)
- Schüler, T., Mesic, I., Madry, C., Bartholomäus, I., Laube, B., 2008. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 Heterodimers Constitutes the Initial Step in N-Methyl-D-aspartate Receptor Assembly. *J. Biol. Chem.* 283, 37–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703539200>
- Seeburg, P.H., Burnashev, N., Köhr, G., Kuner, T., Sprengel, R., Monyer, H., 1995. The NMDA Receptor Channel: Molecular Design of a Coincidence Detector, in: Bardin, C.W. (Ed.), *Proceedings of the 1993 Laurentian Hormone Conference, Recent Progress in Hormone Research*. Academic Press, Boston, pp. 19–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571150-0.50006-8>
- Sheng, M., Kim, E., 2011. The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005678. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005678>
- Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P., Gouaux, E., 2009. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462, 745.

- Soler, J., Fañanás, L., Parellada, M., Krebs, M.-O., Rouleau, G.A., Fatjó-Vilas, M., 2018. Genetic variability in scaffolding proteins and risk for schizophrenia and autism-spectrum disorders: a systematic review. *J. Psychiatry Neurosci.* JPN 43, 223–244. <https://doi.org/10.1503/jpn.170066>
- Sommer, B., Burnashev, N., Verdoorn, T. a., Keinänen, K., Sakmann, B., Seeburg, P. h., 1992. A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J.* 11, 1651–1656. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05211.x>
- Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R., Seeburg, P.H., 1991. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11–19. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90568-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90568-J)
- Soto, D., Altafaj, X., Sindreu, C., Bayés, À., 2014. Glutamate receptor mutations in psychiatric and neurodevelopmental disorders. *Commun. Integr. Biol.* 7, e27887. <https://doi.org/10.4161/cib.27887>
- Standley, S., Roche, K.W., McCallum, J., Sans, N., Wenthold, R.J., 2000. PDZ Domain Suppression of an ER Retention Signal in NMDA Receptor NR1 Splice Variants. *Neuron* 28, 887–898. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00161-6)
- Stessman, H.A.F., Xiong, B., Coe, B.P., Wang, T., Hoekzema, K., Fencikova, M., Kvarnung, M., Gerdts, J., Trinh, S., Cosemans, N., Vives, L., Lin, J., Turner, T.N., Santen, G., Ruivenkamp, C., Kriek, M., Haeringen, A. van, Aten, E., Friend, K., Liebelt, J., Barnett, C., Haan, E., Shaw, M., Gecz, J., Anderlid, B.-M., Nordgren, A., Lindstrand, A., Schwartz, C., Kooy, R.F., Vandeweyer, G., Helsmoortel, C., Romano, C., Alberti, A., Vinci, M., Avola, E., Giusto, S., Courchesne, E., Pramparo, T., Pierce, K., Nalabolu, S., Amaral, D.G., Scheffer, I.E., Delatycki, M.B., Lockhart, P.J., Hormozdiari, F., Harich, B., Castells-Nobau, A., Xia, K., Peeters, H., Nordenskjöld, M., Schenck, A., Bernier, R.A., Eichler, E.E., 2017. Targeted sequencing identifies 91 neurodevelopmental-disorder risk genes with autism and developmental-disability biases. *Nat. Genet.* 49, 515. <https://doi.org/10.1038/ng.3792>
- Swanger, S.A., Chen, W., Wells, G., Burger, P.B., Tankovic, A., Bhattacharya, S., Strong, K.L., Hu, C., Kusumoto, H., Zhang, J., Adams, D.R., Millichap, J.J., Petrovski, S., Traynelis, S.F., Yuan, H., 2016. Mechanistic Insight into NMDA Receptor Dysregulation by Rare Variants in the GluN2A and GluN2B Agonist Binding Domains. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 1261–1280. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.10.002>
- Takasaki, Y., Koide, T., Wang, C., Kimura, H., Xing, J., Kushima, I., Ishizuka, K., Mori, D., Sekiguchi, M., Ikeda, M., Aizawa, M., Tsurumaru, N., Iwayama, Y., Yoshimi, A., Arioka, Y., Yoshida, M., Noma, H., Oya-Itō, T., Nakamura, Y., Kunimoto, S., Aleksic, B., Uno, Y., Okada, T., Ujike, H., Egawa, J., Kuwabara, H., Someya, T., Yoshikawa, T., Iwata, N., Ozaki, N., 2016. Mutation screening of *GRIN2B* in schizophrenia and autism spectrum disorder in a Japanese population. *Sci. Rep.* 6, 33311. <https://doi.org/10.1038/srep33311>
- Tarabeux, J., Kebir, O., Gauthier, J., Hamdan, F.F., Xiong, L., Piton, A., Spiegelman, D., Henrion, É., Millet, B., S2D team, Fathalli, F., Joobor, R., Rapoport, J.L., DeLisi, L.E., Fombonne, É., Mottron, L., Forget-Dubois, N., Boivin, M., Michaud, J.L., Drapeau, P., Lafrenière, R.G., Rouleau, G.A., Krebs, M.-O., 2011. Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Transl. Psychiatry* 1, e55. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.52>
- Tovar, K.R., McGinley, M.J., Westbrook, G.L., 2013. Triheteromeric NMDA Receptors at Hippocampal Synapses. *J. Neurosci.* 33, 9150–9160. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0829-13.2013>
- 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., Dingledine, R., 2010. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Vance, K.M., Hansen, K.B., Traynelis, S.F., 2012. GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *J. Physiol.* 590, 3857–3875. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.234062>
- Vanderver, A., Simons, C., Helman, G., Crawford, J., Wolf, N.I., Bernard, G., Pizzino, A., Schmidt, J.L., Takanohashi, A., Miller, D., Khouzam, A., Rajan, V., Ramos, E., Chowdhury, S., Hambuch, T., Ru, K., Baillie, G.J., Grimmond, S.M., Caldovic, L., Devaney, J., Bloom, M., Evans, S.H., Murphy, J.L.P., McNeill, N., Fogel, B.L., Schiffmann, R., Knaap, M.S. van der, Taft, R.J., 2016. Whole exome sequencing in patients with white matter abnormalities. *Ann. Neurol.* 79, 1031–1037. <https://doi.org/10.1002/ana.24650>

- von Stülpnagel, C., Ensslen, M., Møller, R.S., Pal, D.K., Masnada, S., Veggiotti, P., Piazza, E., Dreesmann, M., Hartlieb, T., Herberhold, T., Hughes, E., Koch, M., Kutzer, C., Hoertnagel, K., Nitanda, J., Pohl, M., Ros-tásy, K., Haack, T.B., Stöhr, K., Kluger, G., Borggraefe, I., 2017. Epilepsy in patients with GRIN2A alterations: Genetics, neurodevelopment, epileptic phenotype and response to anticonvulsive drugs. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 21, 530–541. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.01.001>
- Waxman, E.A., Lynch, D.R., 2005. N-methyl-D-aspartate Receptor Subtypes: Multiple Roles in Excitotoxicity and Neurological Disease. *The Neuroscientist* 11, 37–49. <https://doi.org/10.1177/1073858404269012>
- Wenthold, R.J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N., Petralia, R.S., 2003. Trafficking of NMDA Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 335–358. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135803>
- Werner, P., Voigt, M., Keinänen, K., Wisden, W., Seeburg, P.H., 1991. Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* 351, 742. <https://doi.org/10.1038/351742a0>
- Williams, H.J., Georgieva, L., Dwyer, S., Kirov, G., Owen, M.J., O'Donovan, M.C., 2012. Absence of de novo point mutations in exons of GRIN2B in a large schizophrenia trio sample. *Schizophr. Res.* 2–3, 274–276. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.08.024>
- Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., Beggs, A.H., Craig, A.M., Sheng, M., 1997. Competitive binding of α -actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385, 439. <https://doi.org/10.1038/385439a0>
- XiangWei, W., Jiang, Y., Yuan, H., 2018. De novo mutations and rare variants occurring in NMDA receptors. *Curr. Opin. Physiol., Ion Channels* 2, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2017.12.013>
- Yuan, H., Low, C.-M., Moody, O.A., Jenkins, A., Traynelis, S.F., 2015. Ionotropic GABA and Glutamate Receptor Mutations and Human Neurologic Diseases. *Mol. Pharmacol.* 88, 203–217. <https://doi.org/10.1124/mol.115.097998>
- Zhang, S., Ehlers, M.D., Bernhardt, J.P., Su, C.-T., Huganir, R.L., 1998. Calmodulin Mediates Calcium-Dependent Inactivation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *Neuron* 21, 443–453. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80553-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80553-X)
- Zhou, X., Chen, Z., Yun, W., Ren, J., Li, C., Wang, H., 2015. Extrasynaptic NMDA Receptor in Excitotoxicity: Function Revisited. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 21, 337–344. <https://doi.org/10.1177/1073858414548724>
- Zhou, X., Hollem, D., Liao, J., Andrechek, E., Wang, H., 2013. NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell Death Dis.* 4, e560. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.82>
- Zukin, R.S., Bennett, M.V.L., 1995. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* 18, 306–313. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)93920-S](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93920-S)

PŘÍLOHY

Tabulka 1. – Přehled mutací a vzácných variant nalezených v CTD NMDA receptoru.

Převzato z (Hu et al., 2016) a (XiangWei et al., 2018).

Gen	Genotyp	Protein	Typ	Fenotyp	Reference
<i>GRIN1</i>	c.2530C>T	p.R844C	missense	EPI, ID	1,2
<i>GRIN2A</i>	c.2572G>A	p.G858R	missense	ASD, ID	3
<i>GRIN2A</i>	c.2710A>T	p.I904F	missense	EPI, ID, BCECTS	4,5
<i>GRIN2A</i>	c.2736_2738delCTC	p.S913del	frame-shift	EPI, ID	5
<i>GRIN2A</i>	c.2797G>A	p.D933N	missense	EPI, LKS	6,7
<i>GRIN2A</i>	c.2829C>G	p.Y943*	nonsense	EPI, ID	4
<i>GRIN2A</i>	c.2848C>T	p.Q950*	nonsense	Abnormality nervového systému	8
<i>GRIN2A</i>	c.2902G>A	p.A968T	missense	SCZ	9
<i>GRIN2A</i>	c.3073T>A	p.S1025T	missense	EPI, ID	5
<i>GRIN2A</i>	c.3751G>A	p.D1251N	missense	EPI	6
<i>GRIN2A</i>	c.3842C>T	p.R1281Q	missense	ID	9
<i>GRIN2A</i>	c.4126C>A	p.R1376S	missense	EPI, ID	5
<i>GRIN2A</i>	c.4161C>A	p.Y1387*	nonsense	EPI, ID	6
<i>GRIN2A</i>	c.4189_4193delAATGA		frame-shift	EPI, ID, ASD	10
<i>GRIN2B</i>	c.3041A>G	p.Q1014R	missense	SCZ	13, 14

<i>GRIN2B</i>	c.3076G>A	p.G1026S	missense	ASD, SCZ	13, 22
<i>GRIN2B</i>	c.3295delC	p.R1099AfsX51	frame-shift	ID, ASD	16, 19
<i>GRIN2B</i>	c.3683C>T	p.T1228M	missense	ASD	20
<i>GRIN2B</i>	c.3799G>T	p.A1267S	missense	ID, SCZ	21, 22
<i>GRIN2B</i>	c.3818C>A	p.T1273K	missense	ASD	20
<i>GRIN2B</i>	c.3878A>G	p.K1293R	missense	AD	23
<i>GRIN2B</i>	c.3993G>A	p.M1331I	missense	ID	21
<i>GRIN2B</i>	c.4015A>G	p.M1339V	missense	ASD	20
<i>GRIN2B</i>	c.4056_4058delCAA	p.N1352del	frame-shift	SCZ	13
<i>GRIN2B</i>	c.4244C>T	p.S1415L	missense	ASD	13
<i>GRIN2B</i>	c.4270C>T	p.L1424F	missense	SCZ	13
<i>GRIN2B</i>	c.4355C>T	p.S1452F	missense	SCZ	13
<i>GRIN2B</i>	c.2539C>T	p.R847*	nonsense	ASD, ID	11, 12
<i>GRIN2B</i>	c.2589delC	p.I864Sfs*20	frame-shift	Abnormality nervo- vého systému	8
<i>GRIN2B</i>	c.2926_2928delAAG	p.K976del	frame-shift	ID	11
<i>GRIN2B</i>	c.3012C>G	p.Y1004*	nonsense	ID, ASD	11
<i>GRIN2B</i>	c.3033G>T	p.F1011L	missense	ID	9
<i>GRIN2B</i>	c.3041A>G	p.Q1014R	missense	SCZ	13, 14
<i>GRIN2B</i>	c.3296G>A	p.R1099H	missense	ASD	15

<i>GRIN2B</i>	c.3295delC	p.R1099A fsX51	frame-shift	ASD	16
<i>GRIN2B</i>	c.3332G>A	p.R1111H	missense	ID	11
<i>GRIN2B</i>	c.3457_3460delGACAT-CTAinsGACATCTAA-CATCTA	p.Y1155*	frame-shift	ASD, ID	3
<i>GRIN2B</i>	c.3722G>A	p.R1241Q	missense	ASD, ID	3
<i>GRIN2B</i>	c.3875A>G	p.K1292R	missense	SCZ	15
<i>GRIN2B</i>	c.4307G>C	p.G1436A	missense	ID, poruchy řeči	17
<i>GRIN2B</i>	c.4337A>G	p.I1446T	missense	ID	9
<i>GRIN2C</i>	c.2588T>C	p.I863T	missense	ASD	13
<i>GRIN2C</i>	c.2976C>T	p.S992F	missense	ID	18
<i>GRIN2C</i>	c.2984C>T	p.S995L	missense	ASD, SCZ	13
<i>GRIN2C</i>	c.3560_3580delA-CAGGGGCA GGACT-CTGGGGC	p.H1187_G1193del	frame-shift	ID	18
<i>GRIN2C</i>	c.3145_3146insCCCCGGAGC	p.E1048_u1049insF	frame-shift	ID	18
<i>GRIN2C</i>	c.3560_3580del	p.H1187_G1194del	frame-shift	SCZ	13
<i>GRIN2D</i>	c.2701G>A+c.2702C>T	p.A901I	missense	SCZ	13
<i>GRIN2D</i>	c.2776G>A	p.A926T	missense	ASD	13
<i>GRIN2D</i>	c.2944G>C	p.A982P	missense	SCZ	13

AD - Alzheimerova choroba, ASD - porucha autistického spektra, BCECTS - benigní dětská epilepsie s centrotemporálními hroty, EPI - epilepsie, ID - mentální postižení, LKS - Landau Kleffnerův syndrom, SCZ - schizofrenie

Reference:

1. (Lemke et al., 2016)
2. (Vanderver et al., 2016)
3. (Stessman et al., 2017)
4. (Lemke et al., 2013)
5. (von Stülpnagel et al., 2017)
6. (Lesca et al., 2013)
7. (Addis et al., 2017)
8. (Retterer et al., 2016)
9. (Grozeva et al., 2015)
10. (Bramswig et al., 2015)
11. (Platzer et al., 2017)
12. (Firth et al., 2009)
13. (Tarabeux et al., 2011)
14. (Myers et al., 2011)
15. (Takasaki et al., 2016)
16. (O’Roak et al., 2014)
17. (Chen et al., 2017)
18. (Hamdan et al., 2011)
19. (Rauch et al., 2012)
20. (Pan et al., 2015)
21. (Endele et al., 2010)
22. (Williams et al., 2012)
23. (Andreoli et al., 2014)