

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Fyziologie živočichů



Autoreferát dizertační práce

Molekulární mechanismy regulace transportu a funkce různých
podtypů NMDA receptorů v hipokampálních neuronech

Mgr. Kristýna Skřenková

Praha, 2019

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova
a Akademie věd České republiky*

Program: Fyziologie živočichů

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště:



Fyziologický ústav AVČR
Oddělení buněčné neurofyzologie



Ústav experimentální medicíny AVČR
Oddělení neurochemie

Autor: Mgr. Kristýna Skřenková

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

*S dizertační prací je možno se seznámit v příslušných knihovnách
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.*

Obsah

1. Shrnutí	4
2. Úvod	5
3. Hypotézy a cíle	8
4. Materiály a metody	9
5. Výsledky	13
5.1. <i>N</i> -glykosylace reguluje transport a povrchovou mobilitu NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku	13
5.2. Strukturální změny v glycinových vazebných místech na GluN1 a GluN3A podjednotkách regulují povrchovou expresi NMDA receptorů	18
6. Diskuse	29
6.1. <i>N</i> -glykosylace reguluje transport a povrchovou mobilitu NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku	29
6.2. Strukturální změny v glycinových vazebných místech na GluN1 a GluN3A podjednotkách regulují povrchovou expresi NMDA receptorů	31
7. Závěr	35
8. Použitá literatura	36
9. Seznam publikací	42
10. Životopis	44

1. Shrnutí

N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory jsou ionotropní glutamátové receptory, které mají klíčovou úlohu v savčí centrální nervové soustavě. Za fyziologických podmínek jsou tyto receptory důležité pro excitační synaptický přenos a tvorbu paměťových stop. Za patologických podmínek může ovšem jejich abnormální regulace či aktivace vést k mnohým neurologickým a psychiatrickým onemocněním, jako je například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, epilepsie, nebo schizofrenie. Množství NMDA receptorů na povrchové membráně buněk je regulováno na několika úrovních, zahrnujících jejich syntézu, skládání, internalizaci či degradaci. Během transportu na buněčnou membránu dochází rovněž ke kontrole vazby agonistů a správné aktivaci NMDA receptorů. Současně dochází u NMDA receptorů k celé řadě posttranslačních modifikací, jako je palmitoylace, fosforylace nebo *N*-glykosylace.

V této dizertační práci jsme se zabývali studiem molekulárních mechanismů, které mohou ovlivnit transport a funkční vlastnosti NMDA receptorů v savčích buněčných liniích a potkaních neuronech. Konkrétně jsme se zabývali otázkou, jak mohou změny v extracelulární části NMDA receptoru ovlivnit jeho transport na buněčnou membránu a modulovat jeho funkční vlastnosti. Věnovali jsme se zejména roli *N*-glykosylace NMDA receptorů. U savců dochází k nejvíce orgánově specifické *N*-glykosylaci právě v mozku (Hanus et al., 2016). Její funkční význam v neuronech či na NMDA receptorech není dosud plně objasněn. Rovněž jsme studovali podjednotkově specifický účinek jednotlivých lektinů. Dalším tématem, kterému jsme se v této dizertační práci věnovali, byl vliv integrity glycinových vazebných míst na GluN1 a GluN3A podjednotkách na transport a funkci NMDA receptorů. Ke studiu těchto otázek jsme použili celou řadu metod, včetně imunohistochemie, živé mikroskopie, biochemie a elektrofyziologie. Použili jsme několik buněčných modelů – savčí linie HEK293 a COS-7 buněk, lidské fibroblasty odvozené z pacientů a potkaní hipokampální a mozečkové neurony.

2. Úvod

NMDA receptory jsou podtřídou glutamátových receptorů a hrají zásadní roli ve vývoji synapsí, excitačním přenosu a synaptické plasticitě v centrálním nervovém systému (CNS) savců (Perez-Otano et al., 2016; Traynelis et al., 2010). Bylo prokázáno, že dysregulace NMDA receptorů hraje klíčovou roli v etiologii mnoha neuropsychiatrických a neurologických poruch a stavů, včetně Huntingtonovy choroby (Mahfooz et al., 2016; Marco et al., 2013), schizofrenie (Mueller and Meador-Woodruff, 2004), závislosti na kokainu (Yuan et al., 2013) a závislosti na nikotinu (Chen et al., 2019). Rostoucí počet studií naznačuje, že mnoho neuropsychiatrických poruch je spojeno s mutacemi v genech, které kódují různé podjednotky NMDA receptorů, včetně GluN1 (Chen et al., 2017; Lemke et al., 2016) a GluN3A (Shen et al., 2009; Takata et al., 2013) podjednotek. Porozumění molekulárním mechanismům, které regulují NMDA receptory, je tedy nezbytným krokem k navrhování účinných terapií pro pacienty trpící těmito poruchami.

NMDA receptory jsou heterotetramery složené z GluN1 (s osmi sestřihovými variantami), GluN2 (GluN2A až GluN2D) a/nebo GluN3 (GluN3A a GluN3B) podjednotek. Všechny GluN podjednotky sdílejí stejnou topologii, včetně extracelulární amino-terminální domény (ATD), ligand vázající domény (LBD) tvořené segmenty S1 a S2, čtyř membránových domén (M1 až M4) a intracelulární C-terminální domény (CTD) (Paoletti et al., 2013; Traynelis et al., 2010). Konvenční podtyp NMDA receptorů GluN1/GluN2 je aktivován vazbou agonisty do glutamátového vazebného místa na LBD GluN2 podjednotky se současnou vazbou ko-agonisty do glycinového vazebného místa na LBD GluN1 podjednotky (Clements and Westbrook, 1991; Kleckner and Dingledine, 1988; Patneau and Mayer, 1990; Traynelis et al., 2010). Je zajímavé, že nekonvenční podtypy NMDA receptorů, jmenovitě GluN1/GluN3A a GluN1/GluN3B receptory, jsou aktivovány vazbou agonisty do glycinového vazebného místa na LBD GluN3 podjednotky, zatímco vazba agonisty do glycinového vazebného místa na LBD GluN1 podjednotky řídí desenzitizaci glycinem indukovaných proudů

GluN1/GluN3 receptorů (Awobuluyi et al., 2007; Kehoe et al., 2013; Kvist et al., 2013; Madry et al., 2007). To znamená, že glycinová vazebná místa na LBD různých GluN podjednotek mají odlišný vliv na funkci NMDA receptorů.

Počet i typ NMDA receptorů přítomných na neuronálním povrchu je regulován na více úrovních (Hansen et al., 2017; Horak et al., 2014; Sanz-Clemente et al., 2013), včetně jejich syntézy (Chazot and Stephenson, 1997; Huh and Wenthold, 1999), sestavení podjednotek (Atlason et al., 2007; Farina et al., 2011; Meddows et al., 2001; Schuler et al., 2008), zpracování v endoplasmickém retikulu (ER) (Hawkins et al., 2004; Horak and Wenthold, 2009; Matsuda et al., 2003; McIlhinney et al., 1998; Okabe et al., 1999; Perez-Otano et al., 2001; Qiu et al., 2009; Standley et al., 2000), transportu na buněčnou membránu (Jeyifous et al., 2009; Washbourne et al., 2002; Washbourne et al., 2004), laterální difúze (Dupuis and Groc, 2019; Groc et al., 2004), internalizace/recyklace (Lavezzari et al., 2004; Perez-Otano et al., 2006; Roche et al., 2001; Scott et al., 2004) a degradace (Kato et al., 2005; Scott et al., 2004). Přestože se mnoho prací zabývalo studiem molekulárních mechanismů, které regulují povrchovou expresi a povrchovou mobilitu NMDA receptorů, zaměřovaly se převážně na NMDA receptory obsahující GluN1/GluN2 podjednotky (Sanz-Clemente et al., 2013; Traynelis et al., 2010). Již dříve bylo prokázáno, že GluN1/GluN2 receptory jsou rozsáhle *N*-glykosylovány (Sanz-Clemente et al., 2013; Traynelis et al., 2010), a to jak v heterologních buňkách (Chazot et al., 1995; Everts et al., 1997), tak v nativním systému (Huh and Wenthold, 1999; Kaniakova et al., 2016). V ER nejprve vzniká *N*-glykanový prekurzor, který je poté přenesen na protein obsahující konzensus *N*-glykosylační sekvenci N-X-S/T. Z tohoto prekurzoru poté na proteinu vzniká vysoce-manóзовý typ *N*-glykanu, který může být dále remodelován v Golgiho aparátu (GA) na hybridní typ a následně dalšími modifikacemi na komplexní typ *N*-glykanu. Již dříve jsme ukázali, že na GluN1 podjednotce se nacházejí dvě *N*-glykosylační místa, která jsou vyžadována pro uvolnění GluN1/GluN2 receptorů z ER (Lichnerova et al., 2015). Ovšem úloha *N*-glykosylace v transportu a povrchové mobilitě NMDA receptorů obsahujících nekonvenční GluN3A podjednotku nebyla doposud studována.

Avšak nejen *N*-glykosylace NMDA receptorů je důležitá pro jejich správný transport a funkci. Modifikace v GluN podjednotkách, včetně LBD, jsou taktéž kritické pro regulaci povrchové exprese NMDA receptorů (Kenny et al., 2009; She et al., 2012). Konkrétně Kenny et al. ukázali, že narušení vazebného místa pro glycin v LBD na GluN1 podjednotce mutací D732A snižuje povrchovou expresi GluN1/GluN2A receptorů (Kenny et al., 2009). Podobně She et al. uvádí, že vazebné místo pro glutamát v LBD na GluN2B podjednotce reguluje povrchovou expresi GluN1/GluN2B receptorů (She et al., 2012). Toto pozorování bylo později potvrzeno nedávnou studií využívající lidské GluN1/GluN2B receptory s objevenými patogenními mutacemi (Swanger et al., 2016). Nicméně zda strukturální změny v glycinovém vazebném místě v GluN1 a/nebo GluN3A podjednotkách regulují povrchové počty funkčních NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku dosud nebylo objasněno.

3. Hypotézy a cíle

a) Dřívější studie se zaměřovaly zejména na časný transport GluN1/GluN2 receptorů (Sanz-Clemente et al., 2013; Traynelis et al., 2010); v současné době však chybí bližší informace o tom, jak strukturní a funkční determinanty ovlivňují NMDA receptory obsahující GluN3A podjednotku v savčích neuronech. Všechny ionotropní glutamátové receptory včetně NMDA receptorů obsahují několik *N*-glykosylačních míst ($N-X-S/T; X \neq P$) (Everts et al., 1997; Lichnerova et al., 2015; Traynelis et al., 2010). A přestože GluN3A podjednotka obsahuje 12 *N*-glykosylačních míst, role *N*-glykosylace v transportu a funkci NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku nebyla doposud objasněna.

Cíl: Identifikovat strukturální a funkční determinanty časného transportu NMDA receptorů, které obsahují GluN3A podjednotku se zaměřením na *N*-glykosylace, a prostudovat, jak remodelace *N*-glykanů reguluje časný transport NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku.

b) Většina studií naznačuje, že intracelulární CTD různých podjednotek NMDA receptorů hraje klíčovou roli při regulaci množství NMDA receptorů na buněčné membráně, a to včetně receptorů, které obsahují GluN2A a/nebo GluN2B podjednotky (Petrálie et al., 2009; Sanz-Clemente et al., 2013). Nicméně extracelulární doména savčích GluN podjednotek je poměrně rozsáhlá a obsahuje v LBD vazebná místa pro agonisty a antagonisty. Předpokládáme, že specifické mutace v glycinových vazebných místech na GluN1 a GluN3A podjednotce vyvolají strukturální změny, které budou regulovat počet NMDA receptorů na povrchu buňky.

Cíl: Charakterizovat způsob, jakým vazba glycinu na GluN1 a GluN3 podjednotky ovlivňuje množství povrchových receptorů a funkční vlastnosti NMDA receptorů v savčích buněčných liniích a v hipokampálních neuronech.

4. Materiály a metody

Příprava a transfekce primárních hipokampálních neuronů

Všechny pokusy na zvířatech byly prováděny v souladu s pokyny a předpisy pro zajištění dobrých životních podmínek zvířat. Primární kultury hipokampálních neuronů byly připraveny z 18-ti denních embryí potkanů Wistar (Lichnerova et al., 2015). Ve stručnosti: hipokampy byly vloženy do studeného Hankova vyváženého solného roztoku obsahujícího 10 mM HEPES (pH 7,4) a potom inkubovány po dobu 20 minut při 37 °C v disekčním médiu obsahujícím 0,1 mg/ml DNázy I a 0,05% trypsinu (Merck). Buňky pak byly promyty, disociovány pomocí skleněné pipety a resuspendovány v kultivačním médiu bez séra s B-27 doplňkem a L-glutaminem (Thermo Fisher Scientific). Buňky byly pěstovány v hustotě přibližně 2×10^4 buněk na cm^2 na miskách potažených poly-L-lysinem (Sigma). Neuronům bylo každé 2-3 dny měněno kultivační médium a byly transfekovány s použitím Lipofectaminu 2000.

Savčí buněčné kultury

COS-7 a HEK293 buňky byly kultivovány v Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) obsahujícím 5% fetální bovinní sérum (Thermo Fisher Scientific) (Kaniakova et al., 2012a; Lichnerova et al., 2015). Pro mikroskopii jsme používali COS-7 buňky a pro elektrofyziologii HEK293 buňky. HEK293 i COS-7 buňky byly transfekovány 2 μl Lipofectaminu 2000 (Thermo Fisher Scientific) a celkovým množstvím 900 μg cDNA, která kódovala příslušné GluN1 a GluN3A podjednotky. Pro elektrofyziologii byly transfekované buňky trypsinovány a pěstovány při nízké hustotě; buňky určené pro mikroskopické pokusy byly pěstovány bez trypsinizace. Pokusy byly prováděny 24 - 72 h po transfekci.

Imunofluorescenční mikroskopie

Povrchové NMDA receptory byly označeny tak, jak bylo popsáno dříve (Kaniakova et al., 2012a; Lichnerova et al., 2015). Ve stručnosti: buňky byly omyty ve fosfátem pufovaném solném roztoku (PBS), pak inkubovány v blokujícím

roztoku obsahujícím PBS a 10% normální kozí sérum. Buňky pak byly inkubovány po dobu 30 minut s primární protilátkou zředěnou v blokujícím roztoku. Po omytí byly buňky inkubovány po dobu 30 minut se sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenčním barvivem zředěnou blokujícím roztokem. Buňky byly omyty, fixovány ve 4% paraformaldehydu (PFA) v PBS po dobu 20 minut a poté byly vloženy do zalévacího média ProLong Antifade (Thermo Fisher Scientific). Pro značení intracelulárních GluN podjednotek byly buňky omyty v PBS, fixovány 4% PFA v PBS po dobu 20 minut, permeabilizovány po dobu 5 minut roztokem obsahujícím 0,25% Triton X-100 (TX-100) v PBS a poté blokovány 1 h blokovacím roztokem obsahujícím 0,1% TX-100. Buňky pak byly inkubovány s primární protilátkou po dobu 1 hodiny, omyty a inkubovány se sekundární protilátkou po dobu 30 minut. Snímky byly získány při pokojové teplotě za použití fluorescenčního mikroskopu (Olympus Scan) s objektivem pro olejovou imerzi 60x/1,35, nebo konfokálního skenovacího mikroskopu (Leica TCS SP8) vybaveného lasery v pevné fázi a apochromatickým objektivem pro olejovou imerzi 63x/1,30. Získané snímky byly analyzovány pomocí softwaru ImageJ (NIH). Intenzita povrchového (P) a celkového (C) fluorescenčního signálu v COS-7 buňkách a fibroblastech byla analyzována na celých buněčných oblastech (Kaniakova et al., 2012b). U hipokampálních neuronů byla analyzována intenzita povrchového a celkového fluorescenčního signálu v 10 μm dlouhých segmentech sekundárních a terciárních dendritů (Lichnerova et al., 2015). *Konkanavalin A* (conA) a *Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin* (PHA-L) značené rhodaminem (Vector Laboratories; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) byly rozpuštěny v blokovacím roztoku a inkubovány po dobu 5 minut s předem omytými živými buňkami. Buňky byly poté znovu omyty, fixovány 4% PFA v PBS po dobu 20 minut a vloženy do zalévacího média ProLong Antifade.

Kolokalizace GluN podjednotek s protilátkou značící GM130 byla analyzována z jedné vrstvy pomocí automatizovaného makra v ImageJ. Maska celé oblasti buněčného těla byla generována z nativního signálu zeleného fluorescenčního proteinu (GFP, z ang. Green fluorescent protein). Pro lokalizaci oblasti GA byla maska generována ze signálu GM130. GM130-negativní buněčná oblast byla vytvořena odečtením masky GM130 od signální masky GFP. GA kolokalizace byla

poté vypočtena jako poměr průměrné intenzity GFP signálu přes generovanou masku GM130 k průměrné intenzitě signálu GFP přes GM130-negativní buněčnou oblast.

Povrchová mobilita

Sledování kvantové tečky (QD) GluN3A podjednotek bylo provedeno tak, jak bylo popsáno dříve (Ferreira et al., 2017; Mikasova et al., 2017). Zkráceně, kultivované hipokampální neurony v 13. až 15. den *in vitro* (DIV13-15) exprimující GFP-GluN3A podjednotku byly omyty v předeřhřátém neurobazálním médiu (Thermo Fisher Scientific) obsahujícím 1% albuminu hovězího séra (BSA; Merck) a poté byly inkubovány po dobu 10 minut s králičí anti-GFP protilátkou (Merck, 1:2000), následovala 10 minutová inkubace s anti-králičím IgG konjugovaným k QD605 (Thermo Fisher Scientific; 1:10 000); primární i sekundární protilátky byly zředěny v neurobazálním médiu obsahujícím 1% BSA a byly inkubovány s neurony při 37 °C. Po značení QD byly neurony omyty předeřhřátým neurobazálním médiem a poté umístěny do extracelulárního roztoku obsahující 1 mM MgCl₂ a 1 mM CaCl₂; všechny záznamy byly získány při 37 °C do 30 minut od QD značení. QD-značené GluN3A podjednotky byly detekovány s použitím osvětlovacího modulu InsightSSI s objektivem pro imerzní olej (60x/1,42, PlanApo N) na širokoúhlém fluorescenčním mikroskopu (DeltaVision OMX™). Snímky (1200 po sobě jdoucích snímků) byly získány s časovým odstupem 50 ms. Jako negativní kontrola laterální mobility byly použity COS-7 buňky transfekované GluN1-4a/GFP-GluN3A receptory, které byly značeny králičí anti-GFP primární protilátkou a QD605-konjugovaným k anti-králičí IgG a poté fixovány v 4% PFA v PBS, jak je popsáno výše. Pohyby QD byly analyzovány v ImageJ pomocí programu Mosaic Particle Tracker 2D/3D. Pro každou QD trajektorii byl získán difúzní koeficient (D) s krátkým dosahem: $MSD(t) = 4 D t + b$ (Kusumi et al., 1993; Triller and Choquet, 2008). Kumulativní rozdělení pravděpodobnosti bylo vypočteno jako relativní kumulativní frekvence D ze všech trajektorií v uvedeném experimentu.

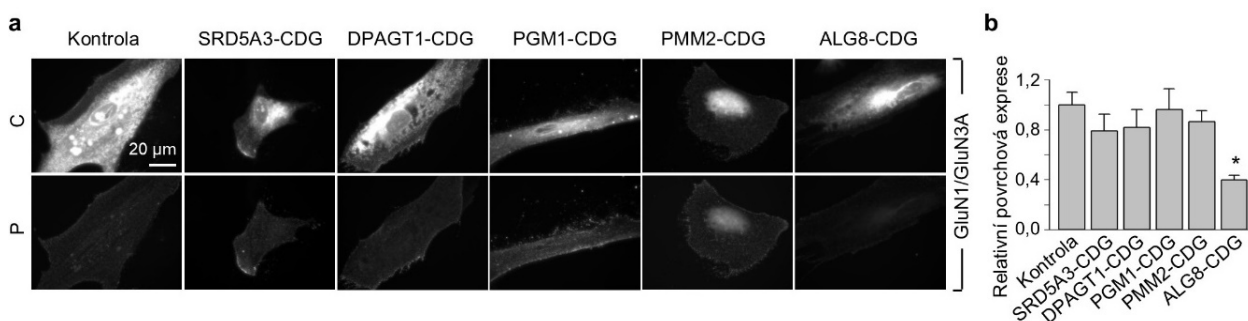
Elektrofyzologie

Záznamy z terčíkového zámku z celých buněk byly pořízeny na transfekovaných HEK293 buňkách exprimujících GluN1/GluN3A receptory pomocí zesilovače Axopatch 200B (Molecular Devices), jak bylo popsáno dříve (Kaniakova et al., 2018). Extracelulární roztok obsahoval (v mM): 160 NaCl, 2,5 KCl, 10 HEPES, 10 glukózy, 0,2 EDTA a 0,7 CaCl₂ (pH bylo upraveno na 7,3 pomocí NaOH). Intracelulární roztok obsahoval (v mM): 125 glukonovou kyselinu, 15 CsCl, 5 BAPTA, 10 HEPES, 3 MgCl₂, 0,5 CaCl₂ a 2 ATP-Mg soli (pH upravené na 7,2 pomocí CsOH). Skleněné pipety (odpor hrotu 3-6 MΩ) byly připraveny za použití mikropipetového tahače P-97 (Sutter Instrument Co.). Pro aplikaci extracelulárních roztoků byl použit mikroprocesorem řízený rychlý perfuzní systém (s časovou konstantou pro výměnu roztoku kolem buňky ~ 10 ms) (Lichnerova et al., 2014). Všechny elektrofyziologické experimenty byly prováděny při pokojové teplotě. K záznamu elektrofyziologických odpovědí byl použit pCLAMP 9 Software (Molecular Devices).

5. Výsledky

5.1. N-glykosylace reguluje transport a povrchovou mobilitu NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku

Zjišťovali jsme, zda remodelace N-glykanů ovlivňuje transport NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku na buněčný povrch. Nejdříve jsme exprimovali rekombinantní GluN1 podjednotky v lidských fibroblastech získaných od pacientů trpících různými kongenitálními poruchami glykosylace (CDG; viz **tabulka 1**) a v kontrolních buňkách a analyzovali jsme povrchovou expresi GluN1/GluN3A receptorů (**obr. 1a**). Tyto experimenty ukázaly, že kontrolní fibroblasty a čtyři z pěti CDG fibroblastových linií mají silnou povrchovou expresi GluN1/GluN3A receptorů (**obr. 1a, b; tabulka 1**). Naproti tomu linie ALG8-CDG, která redukuje tvorbu N-glykanů v ER, významně snížila povrchovou expresi GluN1/GluN3A receptorů. Tudíž nikoliv změny v remodelaci N-glykanů, ale snížení N-glykosylace v ER redukuje množství GluN1/GluN3A receptorů na buněčném povrchu.



Obrázek 1. Specifické lidské fibroblasty odvozené od pacientů s různými CDG mohou snížit povrchovou expresi GluN1/GluN3A receptorů. **(a)** Uvedené lidské fibroblasty byly transfekovány GluN1 a GluN3A podjednotkami. Podrobné informace týkající se zde použitých fibroblastů jsou uvedeny v **tabulce 1**. Znázorněny jsou reprezentativní snímky celkové (C) a povrchové (P) exprese značených podjednotek 24 hodin po transfekci. **(b)** Shrnutí normalizované povrchové exprese GluN1/GluN3A receptorů získané fluorescenční

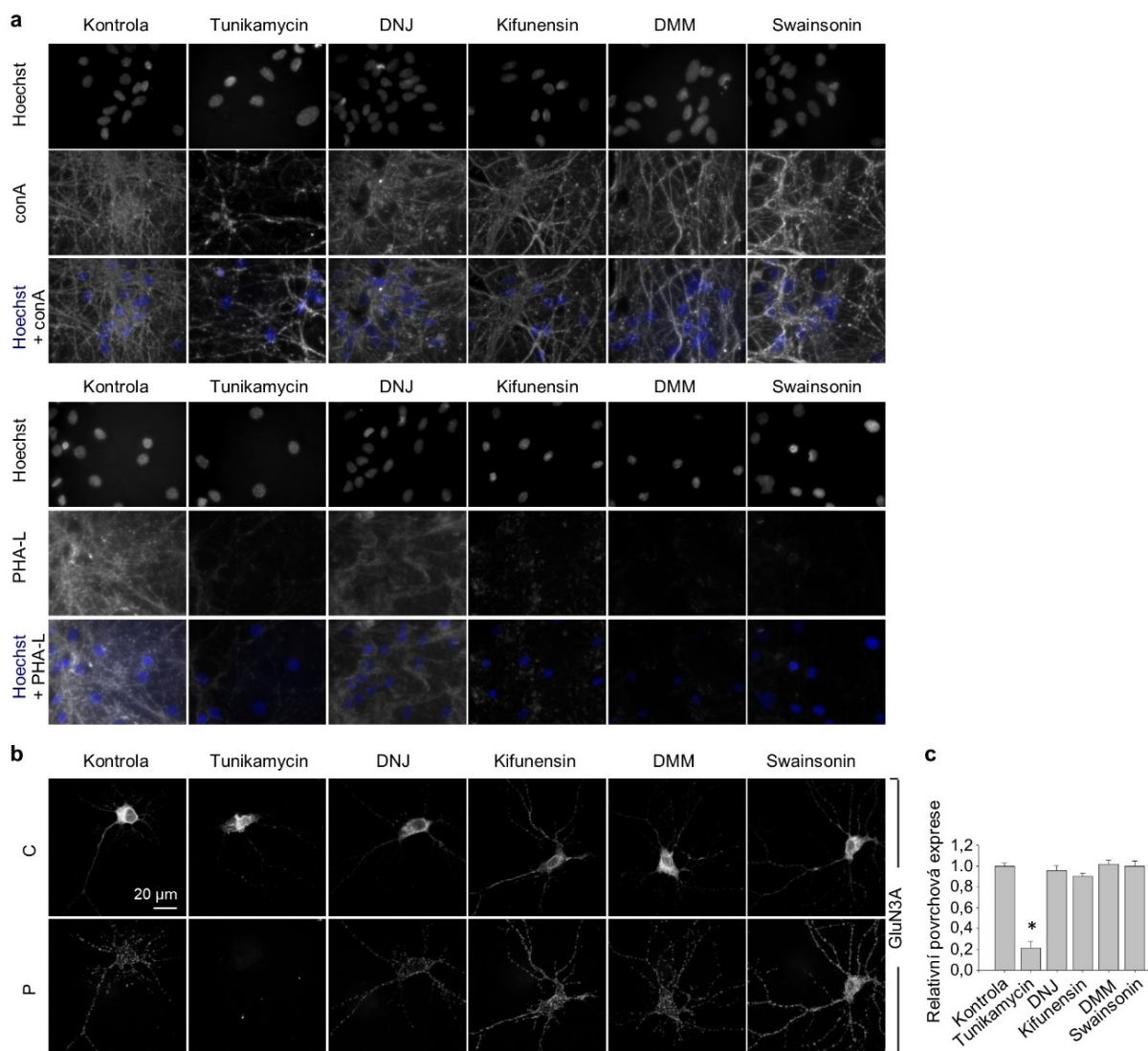
mikroskopií; $n \geq 20$ buněk ze dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ versus GluN1/GluN3A (ANOVA).

Typ	Genová mutace	Proteinová mutace	Reference
SRD5A3-CDG	homozygot c. [436G > A]	p. E146K	Honzik et al, 2013
DPAGT1-CDG	c. [85A > T]; [652C > T]	p. [I29F]; [R218W]	Honzik et al, 2013
PGM1-CDG	c. [1010C > T]; [1508G > A]	p. [T337M]; [R503Q]	(Ondruskova et al., 2014)
PMM2-CDG	c. [422G > A]; [691G > A]	p. [R141H]; [V231M]	-
ALG8-CDG	c. [139A > C]; [1090C > T]	p. [T47P]; [R364X]	(Vesela et al., 2009)

Tabulka 1. Podrobnosti týkající se fibroblastů získaných od pacientů s uvedenými syndromy CDG. CDG, kongenitální poruchy glykosylace; SRD5A3, steroid 5- α -reduktáza 3; DPAGT1, dolicholfosfát α -N-acetylglukosaminyltransferáza; PGM1, fosfoglukomutáza 1; PMM2, fosfomanomutáza 2; ALG8, α -1,3-glukosyltransferáza.

Dále jsme se zjišťovali, zda inhibice N-glykosylačního aparátu ovlivňuje povrchovou expresi NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku v hipokampálních neuronech. Nejprve jsme inkubovali kultivované hipokampální neurony po dobu 2 dnů v přítomnosti nebo nepřítomnosti různých inhibitorů, včetně 0,5 μ g/ml tunikamycinu (inhibitor dolicholfosfát N-acetylglukosamin fosfotransferázy 1) (Yavin et al., 1984), 200 μ g/ml 1-deoxynojirimycinu (DNJ, inhibitor α -glukosidázy I-II) (Gross et al., 1986), 5 μ g/ml kifunensinu (inhibitor ER α -mannosidázy I) (Herreman et al., 2003), 200 μ g/ml 1-deoxymannoimycinu (DMM, inhibitor ER α -mannosidázy I-II) (Tokhtaeva et al., 2009) nebo 100 μ g/ml swainsoninu (inhibitor GA α -mannosidázy II) (Liu et al., 2000). S výjimkou DNJ ostatní čtyři inhibitory výrazně snížily povrchové barvení fluorescenčně značeným lektinem PHA-L, který rozpoznává komplexní typy N-glykanů (**obr. 2a**). Na rozdíl od toho, s výjimkou tunikamycinu, další čtyři inhibitory zvyšovaly povrchové barvení fluorescenčně značeným conA, který rozpoznává vysoce manózoové formy N-glykanů (**obr. 2a**). Tyto výsledky ukazují, že inkubace hipokampálních neuronů

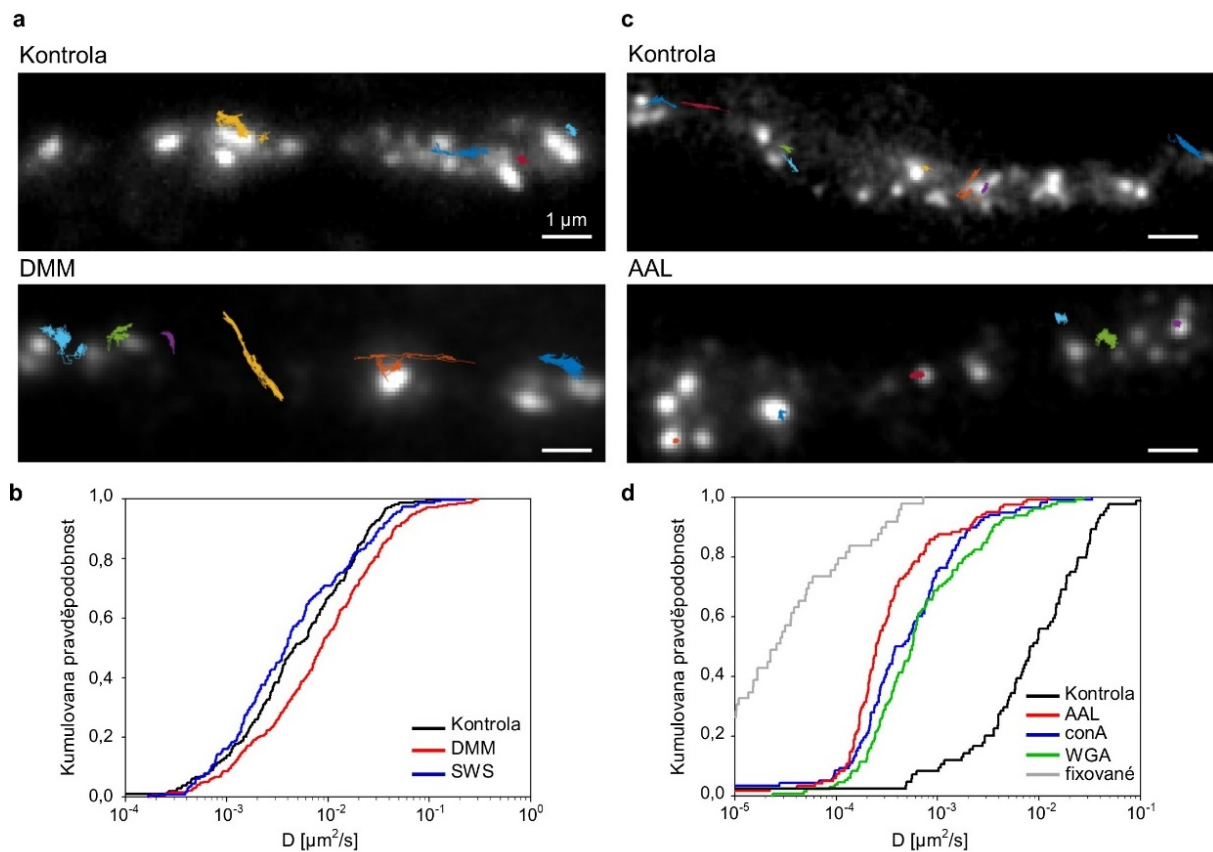
s tunikamycinem, kifunensinem, DMM a swainsoninem inhibuje *N*-glykosylační aparát. V transfekovaných hipokampálních neuronech jsme pozorovali snížení povrchové exprese receptorů obsahujících GluN3A podjednotku v neuronech inkubovaných s tunikamycinem; na rozdíl od toho DNJ, kifunensin, DMM a swainsonin neměly žádný účinek na povrchovou expresi NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku (**obr. 2b, c**). Tato data podporují naši hypotézu, že k povrchové expresi receptorů obsahujících GluN3A podjednotku je nutné počáteční připojení *N*-glykanů v ER, ale nikoli jejich následná remodelace. Celkově tato data naznačují, že remodelace *N*-glykanů nehraje zásadní roli v regulaci povrchové exprese NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku.



Obrázek 2. Tunikamycin, na rozdíl od inhibitorů pozdějších kroků *N*-glykosylační dráhy, snižuje povrchovou expresi GluN3A podjednotek v hipokampálních neuronech. **(a)** Hipokampální neurony byly inkubovány po dobu 2 dnů s 0,5 µg/ml tunikamycinu, 200 µg/ml DNJ, 5 µg/ml kifunensinu, 200 µg/ml DMM nebo 100 µg/ml swainsoninu. Neurony byly poté barveny fluorescenčně značeným conA nebo PHA-L; uvedeny jsou reprezentativní obrázky. **(b)** Hipokampální neurony byly transfekovány GFP-GluN3A podjednotkou (GluN3A) v DIV8 a inkubovány po dobu 2 dnů s uvedenými inhibitory, jak je popsáno výše. Neurony byly poté imunohistochemicky barveny pro povrchový (P) a celkový (C) GFP signál; zobrazeny jsou reprezentativní snímky celkové a povrchové imunoreaktivity. **(c)** Shrnutí relativní povrchové exprese GluN3A podjednotek v neuronech inkubovaných s uvedenými inhibitory; data byla získána z 10 µm dlouhých segmentů sekundárních a terciárních dendritů ($n \geq 30$ segmentů z > 6 neuronů) a jsou vyjádřena relativně ke kontrolním neuronům; * $p < 0,05$ versus kontrola (ANOVA).

Na závěr jsme zkoumali roli *N*-glykosylace v regulaci laterální mobility NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku na povrchu hipokampálních neuronů. Nejprve jsme inkubovali hipokampální neurony s inhibitory *N*-glykosylace DMM a swainsoninem a dva dny poté jsme sledovali QD značené GFP-GluN3A podjednotky na povrchové membráně živých neuronů (**obr. 3a**). Distribuce kumulativních difúzních koeficientů extrahovaných z jednotlivých trajektorií je znázorněna na **obr. 3b**. Naše analýza ukázala, že DMM, ale nikoli swainsonin, zvýšil difúzní koeficienty GluN3A podjednotek značených QD. Toto zjištění naznačuje, že přítomnost hybridních a/nebo komplexních *N*-glykanů na povrchu neuronů reguluje mobilitu NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku (**obr. 3b**). Rovněž jsme zjišťovali, zda je mobilita QD-začleněných GluN3A podjednotek na povrchu hipokampálních neuronů ovlivněna přítomností tří lektinů, o nichž jsme před tím zjistili, že se váží na endogenní GluN3A podjednotky. Konkrétně jsme použili conA, *Wheat germ agglutinin* (WGA)

a *Aleuria Aurantia* lektin (AAL). Je zajímavé, že všechny tyto tři lektiny výrazně snížily mobilitu QD-značených GluN3A podjednotek v hipokampálních neuronech (**obr. 3c, d**). Vzhledem k tomu, že v savčím CNS je exprimována široká škála lektinů, tato data naznačují, že *N*-glykosylace hraje roli při regulaci mobility NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku na povrchu neuronů savců.



Obrázek 3. *N*-glykosylace reguluje povrchovou mobilitu NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku na buněčném povrchu hipokampálních neuronů. (**a, c**) Reprezentativní trajektorie QD-značených GFP-GluN3A podjednotek (GluN3A) v hipokampálních neuronech inkubovaných s 200 µg/ml DMM (**a**) nebo lektinem AAL (20 µg/ml) (**c**). (**b, d**) Porovnání kumulativní distribuce difúzních koeficientů získaných pro QD-značené GluN3A podjednotky v hipokampálních neuronech inkubovaných po dobu dvou dnů s 200 µg/ml DMM, 100 µg/ml swainsoninu (**b**) nebo inkubovaných po QD značení s 20 µg/ml AAL, conA nebo WGA (n = 201-290 trajektorií

pro každou podmínku). Negativní kontroly pro fixované buňky byly získány z nezávislého experimentu (n = 86 trajektorií). * $p < 0,01$ a ** $p < 0,001$ versus kontrola (Kolmogorov-Smirnovův test a Mann-Whitney-Wilcoxonův test).

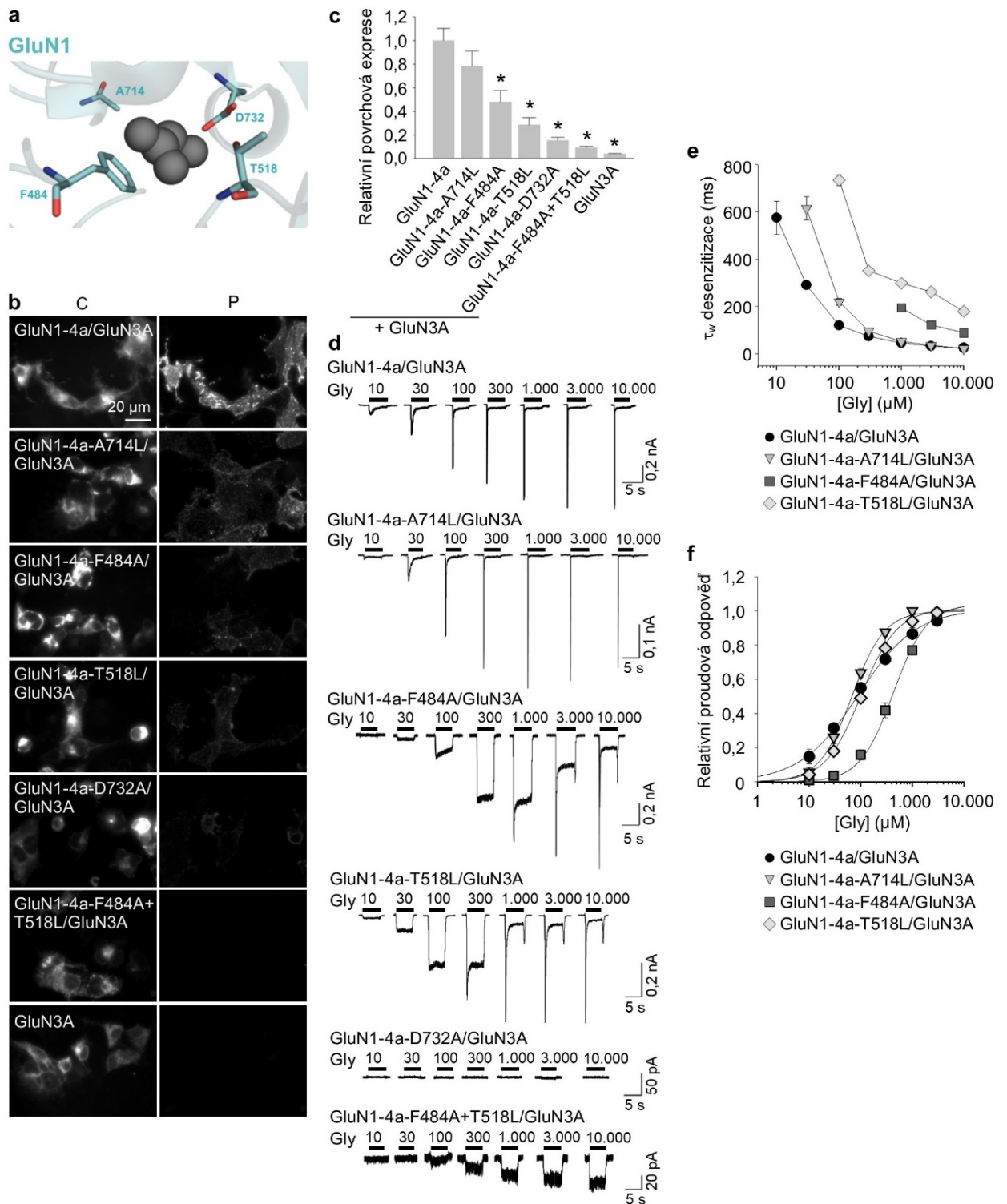
5.2. Strukturní změny v glycinových vazebných místech na GluN1 a GluN3A podjednotkách regulují povrchovou expresi NMDA receptorů

Předchozí studie ukázaly, že povrchová exprese GluN1/GluN2 receptorů je regulována vazbou glycinu na GluN1 podjednotku (Kenny et al., 2009) a vazbou glutamátu na GluN2 podjednotku (She et al., 2012). V této práci jsme zkoumali, zda glycinová vazebná místa na GluN1 nebo GluN3A podjednotce také regulují povrchovou expresi NMDA receptorů, které obsahují GluN3A podjednotku. Nejprve jsme použili mutace v GluN1 podjednotce, pro které bylo dříve ukázáno, že mění EC_{50} pro vazbu glycinu na GluN1/GluN2 receptorech (Kvist et al., 2013; Williams et al., 1996) (**obr. 4a**). Konkrétně jsme do GluN1-4a podjednotky zavedli mutaci A714L, která stabilizuje otevřenou konformaci LBD a mírně snižuje citlivost receptoru na glycin; ostatní mutace v GluN1-4a podjednotce zahrnovaly F484A, T518L (Kvist et al., 2013) a D732A (Kenny et al., 2009; Williams et al., 1996), z nichž všechny snižují afinitu ke glycinu o dva řády. Kromě toho jsme použili mutovanou podjednotku GluN1-4a-F484A+T518L, která byla dříve ukázána jako necitlivá ke glycinu až do 30 mM koncentrace, pokud byla exprimována společně s GluN2A podjednotkou (Kvist et al., 2013).

Nejprve jsme exprimovali jednotlivé mutované GluN1-4a podjednotky společně s GluN3A podjednotkou v COS7 buňkách a sledovali jsme jejich povrchovou expresi s použitím fluorescenční mikroskopie (**obr. 4b, c**). Zjistili jsme, že povrchová exprese byla nejvyšší pro GluN1-4a/GluN3A receptory, které byly následované (v sestupném pořadí podle míry povrchové exprese) GluN1-4a-A714L/GluN3A, GluN1-4a-F484A/GluN3A, GluN1-4a-T518L/GluN3A, GluN1-4a-D732A/GluN3A a GluN1-4a-F484A+T518L/GluN3A receptory. Je zajímavé, že toto pořadí odpovídá dříve určeným hodnotám EC_{50} pro glycin na GluN1/GluN2

receptorech obsahujících tyto mutované GluN1 podjednotky (Kvist et al., 2013; Williams et al., 1996).

Vzhledem k tomu, že dříve stanovené hodnoty EC_{50} pro glycin byly získané na GluN1/GluN2 receptorech exprimovaných na oocytech z *Xenopus laevis*, nemusí tyto hodnoty nutně reflektovat změnu v glycinové afinitě na GluN1/GluN3A receptorech exprimované v savčích buňkách. Proto jsme měřili proudy z celých buněk vyvolané zvyšující se koncentrací glycinu (v rozmezí od 10 μ M do 10 mM) v HEK293 buňkách exprimujících GluN1/GluN3A receptory (**obr. 4d**); použití systému umožňujícího rychlou výměnu roztoků nám pomohlo zjistit amplitudu proudu vyvolaného glycinem před desenzitizací receptoru. Ukázalo se, že časová konstanta desenzitizace (τ_w) se lišila mezi různými mutovanými podjednotkami testovaných receptorů a odpovídala stejnému pořadí, jaké jsme pozorovali v případě povrchové exprese (**obr. 4e**). Naše analýza relativní proudové odpovědi ukázala, že pouze mutace GluN1-4a-F484A způsobila posunutí křivky doprava (**obr. 4f**), což bylo dáno snížením účinnosti glycinu na této podjednotce o 5 % ve srovnání s nemutovanými GluN1-4a/GluN3A receptory. Toto zjištění je v souladu s předchozími studiemi, které ukázaly, že aktivace GluN1/GluN3A receptorů je regulována především vazbou glycinu na GluN3A podjednotku (Awobuluyi et al., 2007; Kvist et al., 2013; Madry et al., 2007). Buňky exprimující GluN1-4a-D732A/GluN3A receptory neměly žádné detekovatelné proudy ani při nejvyšší testované koncentraci glycinu; odpovědi GluN1-4a-F484A+T518L/GluN3A receptorů při žádných z testovaných koncentrací glycinu nedesenzitizovaly (**obr. 4d**). Z tohoto důvodu jsme nemohli provést detailní elektrofyziologickou analýzu těchto dvou mutovaných receptorů. Tato data podporují naši hypotézu, že strukturální změny ve vazebném místě pro glycin na GluN1 podjednotce jsou spojeny se změnami v povrchové expresi a v desenzitizaci GluN1/GluN3A receptorů.



Obrázek 4. Mutace ve vazebném místě pro glycin na GluN1 podjednotce mění povrchovou expresi a desenzitizační kinetiku GluN1/GluN3A receptorů. **(a)** Schéma reprezentující vazebné místo pro glycin na GluN1 podjednotce (PDB kód: 1PB7); námi studované aminokyselinové zbytky jsou znázorněny, stejně jako molekula glycinu. **(b)** Reprezentativní snímky COS-7 buněk, které byly

transfekovány vyznačenými podjednotkami mutovaných či nemutovaných GluN1-4a podjednotek společně s GFP-GluN3A podjednotkou (GluN3A) a barveny 24 h po transfekci. **(c)** Souhrn relativní povrchové exprese indikovaných GluN podjednotek měřený pomocí fluorescenční mikroskopie ($n \geq 24$ buněk na skupinu); * $p < 0,05$ vs. GluN1-4a/GluN3A (ANOVA). **(d)** Reprezentativní záznamy snímání z HEK293 buněk, které byly transfekovány indikovanými mutovanými či nemutovanými GluN1-4a/GluN3A receptory. Proudů z buněk byly vyvolané aplikováním glycinu v indikované koncentraci. **(e)** Souhrn τ_w desenzitizace pro uvedené GluN1-4a/GluN3A receptory ($n \geq 5$ buněk na skupinu). **(f)** Relativní proudová odpověď pro uvedené GluN1-4a/GluN3A receptory. Každý bod představuje průměr relativního proudu z ≥ 5 nezávislých buněk.

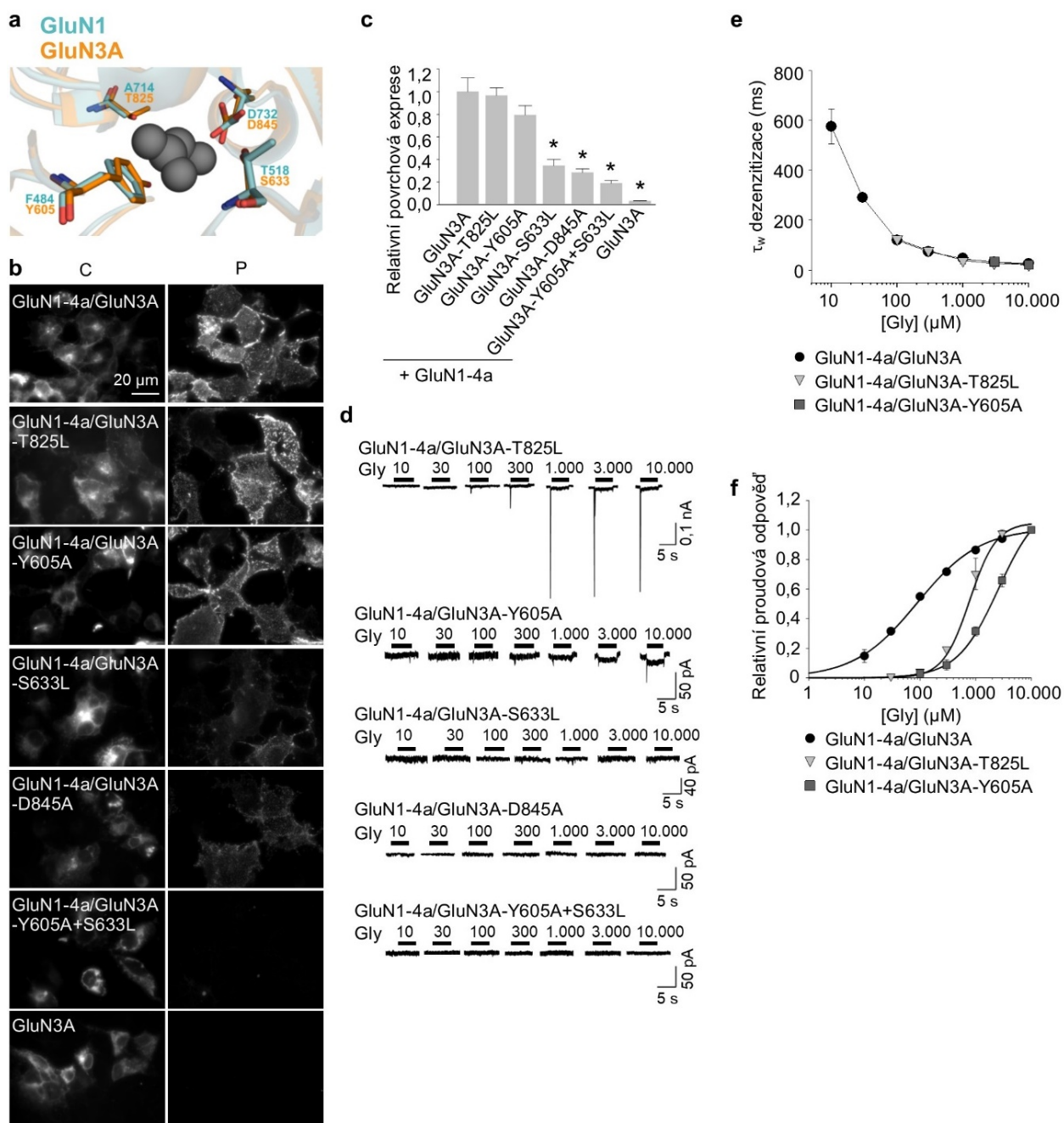
Vzhledem k tomu, že glycinová vazebná místa v LBD na GluN1 a GluN3A podjednotkách jsou vysoce konzervovaná, zajímalo nás, zda podobné strukturní změny ve vazebném místě na GluN3A podjednotce mohou také ovlivnit povrchovou expresi GluN1/GluN3A receptorů. V souladu s tím jsme zavedli bodové mutace v GluN3A podjednotce na pozicích analogických s těmi na GluN1 podjednotce, tudíž jsme vytvořili čtyři mutované GluN3 podjednotky (GluN3A-T825L, GluN3A-Y605A, GluN3A-S633L a GluN3A-D845A) a dvojitého mutantu GluN3A-Y605A+S633L (**Obr. 5a**). Každou tuto podjednotku jsme poté exprimovali společně s GluN1-4a podjednotkou v COS-7 buňkách a pomocí mikroskopie jsme zjišťovali povrchovou expresi daných receptorů (**obr. 5b, c**). Zajímavé bylo, že pořadí určené na základě povrchové exprese pro receptory obsahující mutované GluN3A podjednotky bylo stejné, jako to, které jsme pozorovali s analogickými mutanty v GluN1 podjednotce. Konkrétně receptory obsahující podjednotku GluN3A-T825L měly nejvyšší povrchovou expresi, následovány (v sestupném pořadí) receptory s podjednotkami GluN3A-Y605A, GluN3A-S633L, GluN3A-D845A a GluN3A-Y605A+S633L.

Dále jsme zjišťovali funkční vlastnosti GluN1-4a/GluN3A receptorů obsahujících nemutované nebo mutované GluN3A podjednotky exprimované

v HEK293 buňkách. Zjistili jsme, že oba receptory GluN1-4a/GluN3A-T825L a GluN1-4a/GluN3A-Y605A měly detekovatelné proudy, zatímco zbylé tři mutované receptory nedokázaly vytvořit receptory s měřitelnými proudy, a to dokonce ani po aplikaci 10 mM glycinu (**obr. 5d**). Navíc měly tyto dva mutované receptory podobné τ_w desenzitizace jako přirozené typy GluN1-4a/GluN3A receptorů (**obr. 5e**), což je v souladu s předpokladem, že desenzitizace GluN1/GluN3A receptorů je dána glycinovým vazebným místem na GluN1 podjednotce. Analýza relativních proudových odpovědí ukázala, že glycin je 9krát a 29krát méně účinný při aktivaci GluN1-4a/GluN3A-T825L a GluN1-4a/GluN3A-Y605A receptorů v porovnání s přirozenými GluN1-4a/GluN3A receptory (**Obr. 5f**), což koreluje s jejich povrchovou expresí. Tato data podporují hypotézu, že aktivace GluN1/GluN3A receptorů je zprostředkovávána vazbou glycinu na GluN3A podjednotku. Jak bylo uvedeno výše, nebyli jsme schopni detekovat žádné zjiřitelné proudy v buňkách exprimujících GluN1-4a/GluN3A-S633L, GluN1-4a/GluN3A-D845A nebo GluN1-4a/GluN3A-Y605A + S633L receptory (**obr. 5d**). To může být vysvětleno výrazně sníženým počtem receptorů na povrchu buňky, ztrátou schopnosti vázat glycin a/nebo změnou vlastností desenzitizace těchto mutovaných receptorů. Společně tato data ukazují, že jak GluN1, tak GluN3A podjednotka reguluje povrchovou expresi GluN1/GluN3A receptorů v savčích buněčných liniích.

K dalšímu potvrzení, že tato glycinová vazebná místa regulují transport NMDA receptorů na buněčnou membránu jsme COS-7 buňky exprimující mutované GluN1/GluN3A receptory, které vykazovaly sníženou povrchovou expresi, označili markrem pro GA „Golgi Matrix 130“ (GM130; **Obr. 6a, c**). Naše mikroskopická analýza ukázala výrazný pokles kolokalizace receptorů GluN1-4a-T518L/GluN3A, GluN1-4a-D732A/GluN3A a GluN1-4a-F484A+T518L/GluN3A a podjednotky GluN3A s GM130 ve srovnání s přirozenými GluN1-4a/GluN3A receptory (**obr. 6b**). Pokud jde o GluN1-4a-F484A/GluN3A receptory, nesledovali jsme výrazný pokles jejich snížené kolokalizace s GM130, což se podobá dříve studovanému receptoru GluN1/GluN2B-S664G (She et al., 2012). Naše mikroskopická analýza dále odhalila sníženou kolokalizaci GluN1-4a/GluN3A-S633L, GluN1-4a/GluN3A-D845A a GluN1-4a/GluN3A-Y605A+S633L receptorů

s GM130 ve srovnání s přirozenými GluN1-4a/GluN3A receptory (**Obr. 6d**). Tato data dohromady naznačují, že narušení vazby glycinu snižuje časný transport GluN1/GluN3A receptorů do GA.



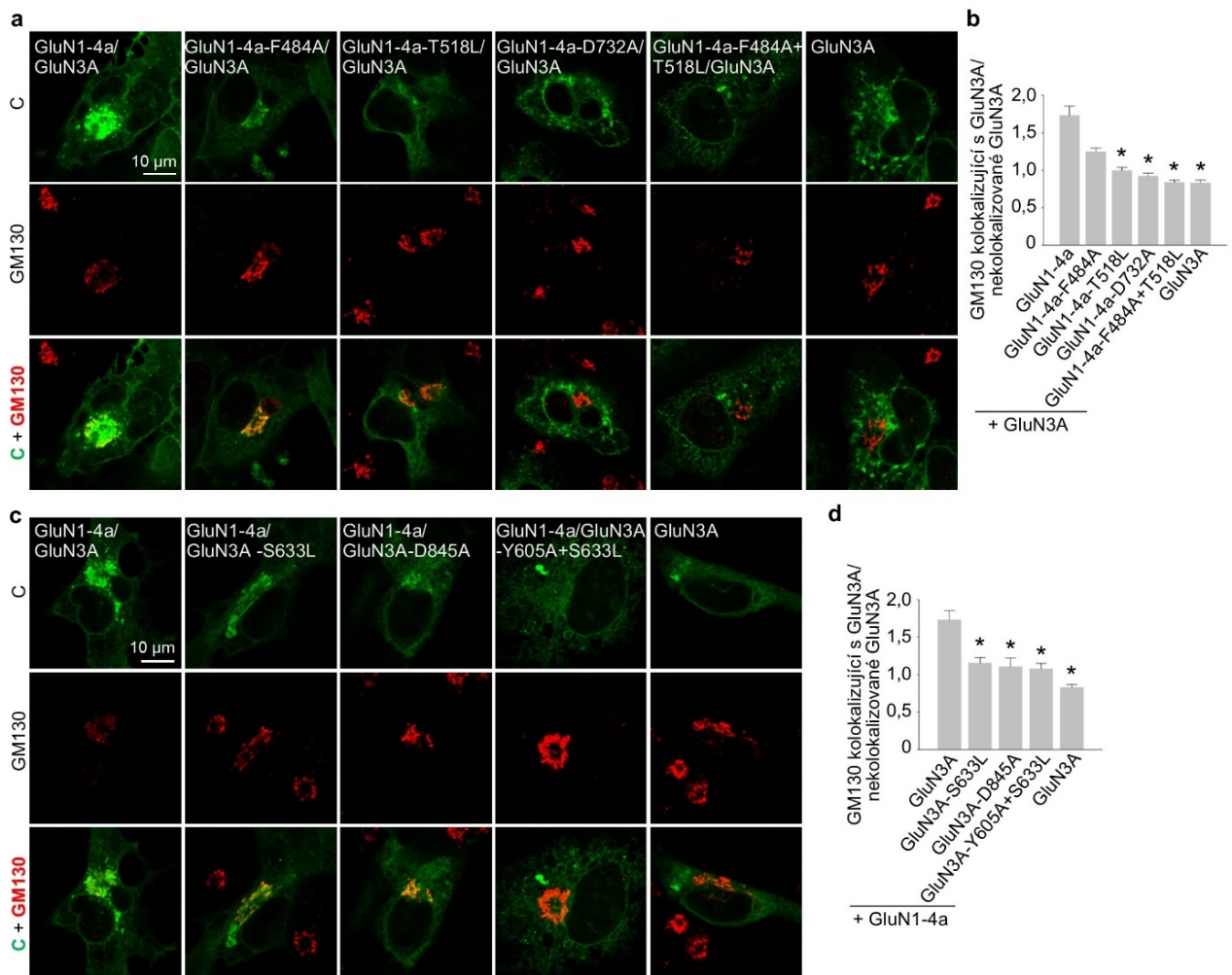
Obrázek 5. Mutace v glycinovém vazebném místě na GluN3A podjednotce regulují povrchovou expresi a afinitu glycinu ke GluN1/GluN3A receptorům. **(a)** Schéma reprezentující vazebné místo pro glycin na GluN3A podjednotce (PDB kód: 2RC7, znázorněna

oranžově); námi studované aminokyselinové zbytky jsou znázorněny, stejně jako molekula glycinu; pro porovnání je znázorněno i glycinové vazebné místo na GluN1 podjednotce (zobrazeno modře).

(b) Reprezentativní snímky COS-7 buněk, které byly transfekovány vyznačenými podjednotkami mutovaných či nemutovaných GluN3A podjednotek společně s GluN1-4a podjednotkou, barveny 24 h po transfekci. **(c)** Souhrn relativní povrchové exprese indikovaných GluN podjednotek měřené pomocí fluorescenční mikroskopie ($n \geq 20$ buněk na skupinu); * $p < 0,05$ vs. GluN1-4a/GluN3A (ANOVA).

(d) Reprezentativní záznamy snímání z HEK293 buněk, které byly transfekovány indikovanými GluN1-4a/GluN3A receptory. Proud z buněk byly vyvolané aplikováním glycinu v indikované koncentraci.

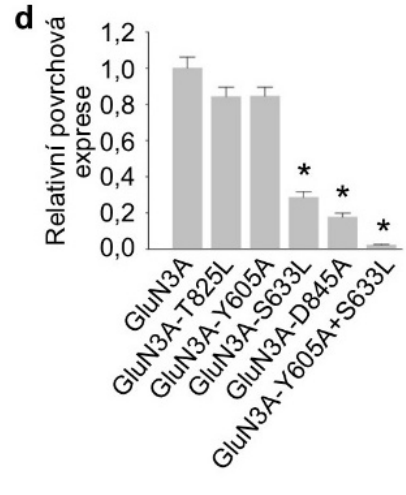
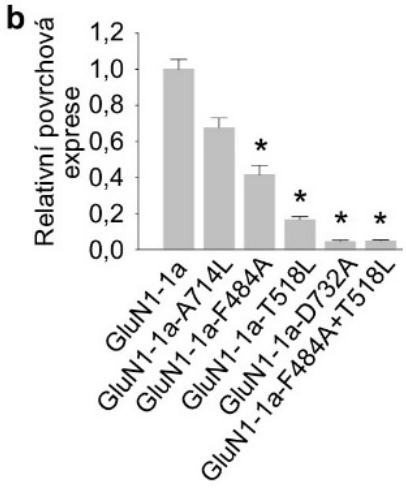
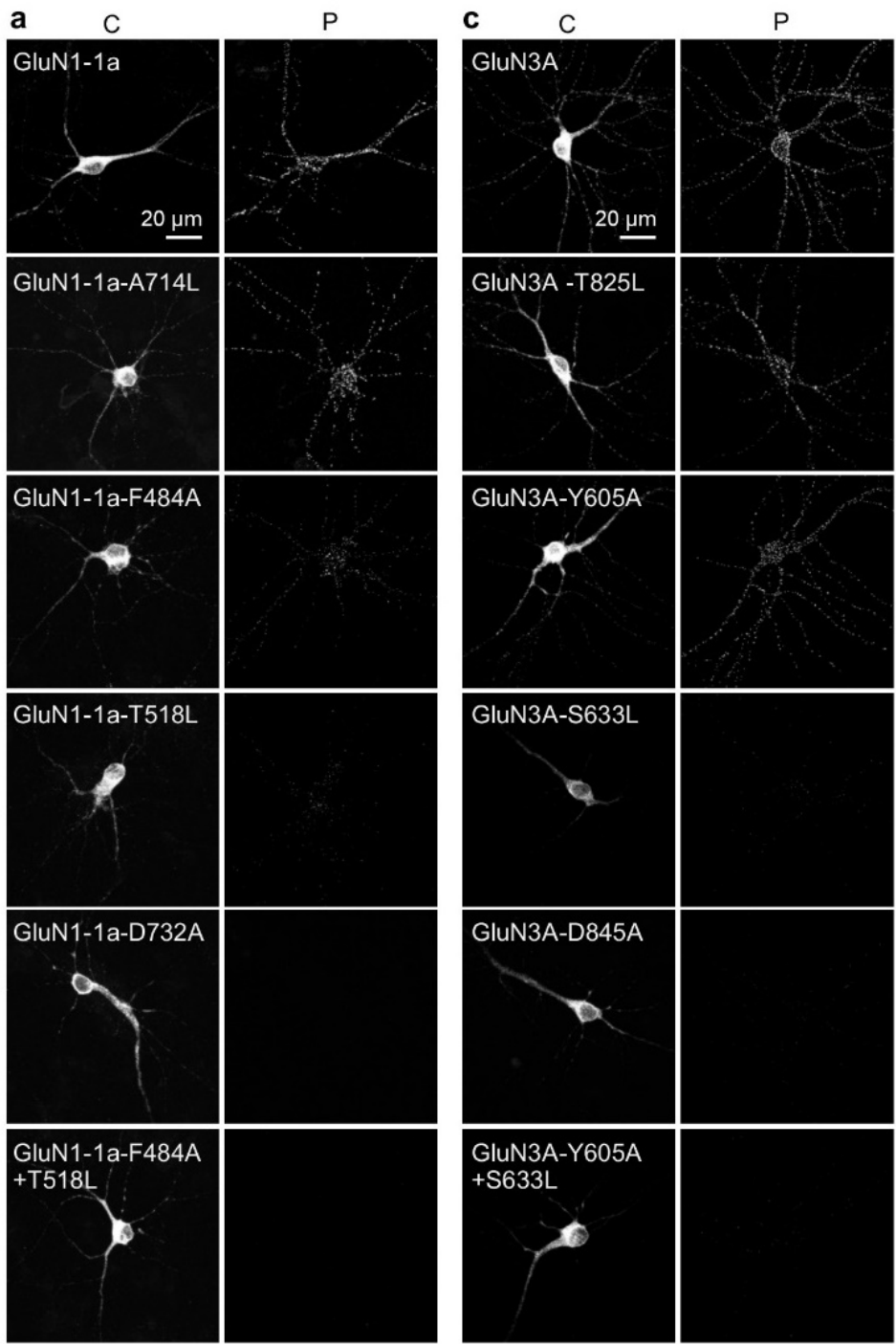
(e) Souhrn τ_w desenzitizace pro uvedené GluN1-4a/GluN3A receptory ($n \geq 5$ buněk na skupinu). **(f)** Relativní proudová odpověď pro uvedené GluN1-4a/GluN3A receptory. Každý bod představuje průměr relativního proudu z ≥ 5 nezávislých buněk.



Obrázek 6. Glycinová vazebná místa na GluN1 a GluN3A regulují časný transport GluN1/GluN3A receptorů. **(a, c)** Reprezentativní snímky z konfokální mikroskopie COS-7 buněk, které byly transfekované uvedenými podjednotkami GluN1-4a a GFP-GluN3A (GluN3A); pro značení GA byla použita protilátka anti-GM130. Znáznorněny jsou snímky celkové exprese (C), GM130 a spojené snímky z předchozích dvou. **(b, d)** Souhrn průměrné intenzity GFP-GluN3A (GluN3A) signálu kolokalizujícího s GM130 ($n \geq 10$ buněk); * $p < 0,05$ vs. GluN1-4a/GluN3A (ANOVA).

Dále nás zajímalo, zda zavedení mutací v glycinovém vazebném místě GluN podjednotek také ovlivní transport NMDA receptorů v neuronech. Z toho důvodu jsme transfekovali potkaní hipokampální neurony v DIV10 přirozenými nebo mutovanými GluN1-1a podjednotkami (tuto sestřihovou variantu jsme zvolili z toho důvodu, že není sama transportována na buněčný povrch, pokud není

složena s GluN2 a/nebo GluN3 podjednotkou) a přirozenými či mutovanými GluN3A podjednotkami. Čtyři dny po transfekci (tj. DIV14) jsme pak změřili povrchový a celkový signál rekombinantních GluN podjednotek s použitím anti-GFP protilátky a konfokální mikroskopie. Naše analýza ukázala následující pořadí povrchové exprese mutovaných GluN1-1a podjednotek (v sestupném pořadí): GluN1-1a-A714L, GluN1-1a-F484A, GluN1-1a-T518L, GluN1-1a-D732A a GluN1-1a-F484A+T518L (**obr. 7a, b**). Stejně tak pět mutovaných GluN3 podjednotek vykazovalo následující pořadí povrchové exprese (v sestupném pořadí): GluN3A-T825L, GluN3A-Y605A, GluN3A-S633L, GluN3A-D845A a GluN3A-Y605A + S633L (**obr. 7c, d**). Tyto výsledky jsou konzistentní s našimi daty získanými z analýzy povrchové exprese mutovaných NMDA receptorů v COS-7 buňkách, což podporuje hypotézu, že glycinová vazebná místa na GluN1 a GluN3A podjednotkách jsou kritická pro povrchovou expresi NMDA receptorů.



Obrázek 7. Glycinová vazebná místa na GluN1 a GluN3A podjednotkách regulují povrchovou expresi NMDA receptorů v hipokampálních neuronech. **(a, c)** Reprezentativní snímky z kultivovaných potkaních hipokampálních neuronů, které byly v DIV10 transfekovány uvedenými podjednotkami YFP-GluN1-1a (GluN1-1a) **(a)** nebo GFP-GluN3A (GluN3A) **(c)** a v DIV14 barveny pomocí protilátky proti GFP pro povrchovou (P) a celkovou (C) expresi. **(b, d)** Souhrn relativní povrchové exprese uvedených podjednotek měřených na 10 μm segmentech sekundárních nebo terciárních dendritů ($n \geq 30$ segmentů v ≥ 6 různých buňkách na skupinu); * $p < 0,05$ vs. GluN1-1a **(b)** nebo GluN3A **(d)** (ANOVA).

6. Diskuse

6.1. *N*-glykosylace reguluje transport a povrchovou mobilitu NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku

Zabývali jsme se studiem vlivu *N*-glykosylace GluN3A podjednotky na transport a povrchovou mobilitu NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku. Tato podjednotka působí jako „molekulární brzda“ a může tedy zpomalovat zrání excitačních synapsí (Pérez-Otaño et al., 2016). Abnormální funkce GluN3A podjednotky se rovněž předpokládá u řady neuropsychiatrických onemocnění (Kehoe et al., 2014; Mohamad et al., 2013; Yuan and Bellone, 2013) a je tedy možné, že narušená *N*-glykosylace GluN3A podjednotky může ovlivnit celou řadu procesů v CNS.

Ukázali jsme, že *N*-glykosylace GluN3A podjednotky je nezbytná pro povrchovou expresi GluN1/GluN3 receptorů jak v heterologních COS-7 buňkách, tak v potkaních hipokampálních neuronech. Ovšem není zcela zřejmé, jaký je kontrolní mechanismus pro správnou *N*-glykosylaci GluN3A podjednotky. Jednou z možností je, že přítomnost *N*-glykanů na GluN3A podjednotce ovlivňuje skládání a kvartérní strukturu NMDA receptoru, která je v ER kontrolována. Další možností je, že *N*-glykany na GluN3A podjednotce interagují v ER se specifickými vazebnými proteiny, jakými jsou galektiny či další endogenní lektiny, které následně zajišťují transport NMDA receptorů na buněčný povrch.

K našemu překvapení jsme zjistili, že remodelace *N*-glykanů, ke které dochází v GA, není nezbytná pro povrchovou expresi NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku. Tento výsledek je v souladu s nedávnou studií, v níž došli Hanus et al. k podobným závěrům v případě několika typů membránových proteinů, včetně AMPA receptorů (Hanus et al., 2016). Z tohoto důvodu jsme se dále zabývali otázkou, jakou roli hrají hybridní a komplexní *N*-glykany u NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotky. Zaměřili jsme se zejména na způsob, jakým ovlivňuje přítomnost hybridních a komplexních *N*-glykanů

mobilitu receptorů v buněčné membráně. V případě, kdy jsme zablokovali remodelaci *N*-glykanů v GA pomocí specifických inhibitorů a tím inhibovali syntézu hybridních a komplexních *N*-glykanů, pozorovali jsme na živých hipokampálních neuronech zvýšenou povrchovou mobilitu NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku. Dané výsledky jsou v souladu se zjištěním, že povrchová mobilita NMDA (Groc et al., 2007) i AMPA (Frischknecht et al., 2009) receptorů v neuronech může být ovlivněna změnami v extracelulární matrix. V případě, kdy jsme neurony transfekované značenou GluN3A podjednotkou inkubovali s vybranými lektiny, jsme pozorovali výrazné snížení povrchové mobility NMDA receptorů obsahujících GluN3A podjednotku. Tento výsledek lze vysvětlit jednak přímou vazbou lektinů na *N*-glykany přítomné na NMDA receptorech, či jejich případnou interakcí s ostatními glykoproteiny přítomnými v buněčné membráně. Podobné snížení mobility membránových proteinů po inkubaci s lektiny bylo pozorováno již dříve. Například Henis and Elson, 1981 pozorovali snížení povrchové mobility imunoglobulínů u myších lymfocytů po inkubaci s lektinem ConA. Je tedy možné, že naše pozorování může mít rovněž fyziologický význam, neboť v savčí CNS se exprimuje několik typů lektinů, jako jsou například lektiny rozpoznávající galaktózu (Stanley et al., 2015) nebo kyselinu sialovou (Macauley et al., 2014), které mohou zásadním způsobem ovlivňovat mobilitu NMDA receptorů *in vivo*.

Pro studium role *N*-glykosylace za patologických podmínek jsme využili pět linií lidských fibroblastů, které byly odvozeny z pacientů trpících řadou glykosylačních poruch s mutacemi v enzymech *N*-glykosylačního aparátu. Konkrétně jsme zkoumali linie fibroblastů PMM2-CDG a PGM1-CDG, u nichž se nacházely defekty biosyntézy *N*-glykanového prekurzoru v cytosolu, SRD5A3-CDG a DPAGT1-CDG linie s defekty v počátečních krocích syntézy *N*-glykanového prekurzoru navázaného na lipid na cytosolické straně ER a linii ALG8-CDG s defektem ve finálním kroku syntézy *N*-glykanového prekurzoru v ER. Je důležité zmínit, že všichni pacienti, od nichž jsme linie fibroblastů získali, vykazovali různý stupeň neurologického poškození (Ondruskova et al., 2014; Vesela et al., 2009). Změnu povrchové exprese GluN1/GluN3A receptorů jsme pozorovali pouze v případě ALG8-CDG linie. Pacienti s tímto typem CDG většinou

umírají během prvních měsíců života, a dané onemocnění je často doprovázeno těžkými multiorgánovými dysfunkcemi (Freeze, 2006; Schollen, 2004). V případě našeho pacienta obsahoval gen pro *ALG8* mutace c.139A>C (p.T47P) a c.1090C>T (p.R364X) které vedly k multiorgánovému selhání a úmrtí ve 2. měsíci u předčasně narozeného dítěte (Vesela et al., 2009).

Je tedy pravděpodobné, že změny v glykosylačním aparátu pozorované u pacientů trpících různými typy CDG mohou vést ke změnám v povrchové nebo synaptické lokalizaci NMDA receptorů vzhledem k tomu, že se u těchto pacientů často vyskytuje narušení řady nervových funkcí (Freeze, 2006; Moremen et al., 2012). Rovněž řada fyziologických či patologických procesů může vést ke změně *N*-glykanového složení, jak bylo například pozorováno u pacientů trpících schizofrenií (Tucholski et al., 2013a). Změny v *N*-glykanovém složení mohou ovlivňovat řadu vlastností NMDA receptorů, jako například jejich stabilitu v synapsi, nebo modulaci prostřednictvím endogenních lektinů. Z toho vyplývá, že poznatky o konkrétním složení *N*-glykanů na jednotlivých podjednotkách NMDA receptorů a jejich funkčním významu by mohly případně v budoucnu být využity pro terapii, neboť naše pokusy ukázaly, že funkční NMDA receptory obsahují desítky relativně komplexních *N*-glykanových struktur.

Bohužel, nedostatek vzorků z mozků pacientů trpících těmito vzácnými poruchami ztěžuje další výzkum daných onemocnění. Naštěstí lze nové metody a techniky, jako je například konverze lidských fibroblastů na neuronální buňky, využít pro další studium poruch *N*-glykosylace, což by mohlo pomoci při hledání vhodné léčby pro tyto pacienty.

6.2. Strukturní změny v glycinových vazebných místech na GluN1 a GluN3A podjednotkách regulují povrchovou expresi NMDA receptorů

V další práci jsme studovali vliv integrity glycinových vazebných míst na GluN1 a GluN3A podjednotkách na transport a funkci NMDA receptorů. GluN1/GluN3A receptory sice obsahují čtyři vazebná místa pro glycin, avšak jeho vazba na GluN1 či GluN3A podjednotku má odlišný dopad na funkci

receptoru. Vazba glycinu na GluN3A podjednotku aktivuje receptor, zatímco vazba na GluN1 podjednotku způsobuje rychlou desenzitizaci proudových odpovědí (Awobuluyi et al., 2007; Kehoe et al., 2013; Kvist et al., 2013; Madry et al., 2007). V naší studii jsme analyzovali proudy vyvolané glycinem, abychom zjistili, jaký dopad na funkční vlastnosti GluN1/GluN3A receptorů budou mít mutace v glycinovém vazebném místě na GluN1 nebo GluN3A podjednotce. U GluN1 podjednotky jsme se podrobněji zaměřili na mutace, které se nacházejí ve vazebném místě pro glycin a v předchozích studiích na GluN1/GluN2 receptorech u nich byl pozorován vliv na hodnoty EC_{50} pro glycin (Kvist et al., 2013; Williams et al., 1996). Konkrétně jsme zkoumali mutace F484A, T518L, F484A+T518L, A714L a D732A. U GluN3A podjednotky jsme zavedli mutace analogické k těm na GluN1 podjednotce, a to konkrétně mutace Y605A, S633L, Y605A+S633L, T825L a D845A. Zjistili jsme, že míra změn hodnot τ_w pro desenzitizaci u mutovaných GluN1/GluN3A receptorů je v souladu s dříve stanovenými změnami v hodnotách EC_{50} pro glycin u mutovaných GluN1/GluN2 receptorů (Kvist et al., 2013; Williams et al., 1996). Dále jsme pozorovali, že mutace F484A v GluN1 podjednotce snižuje desenzitizaci u GluN1/GluN3A receptorů, což je rovněž v souladu s předchozími studiemi (Kvist et al., 2013). Změny v desenzitizační kinetice GluN1/GluN3A receptorů způsobené zkoumanými mutacemi v glycinovém vazebném místě na GluN1 podjednotce přímo korelovaly se změnami v povrchové expresi těchto receptorů. Analýza maximálních proudových odpovědí nám umožnila stanovit hodnotu EC_{50} pro glycin na GluN1/GluN3A receptorech (89 μ M), což dříve nebylo možné vzhledem k tomu, že předchozí měření byla prováděna na receptorech exprimovaných v oocytech *Xenopus laevis*. Z našich výsledků dále vyplývá, že GluN1/GluN3A receptory s mutacemi v glycinovém vazebném místě na GluN3A podjednotce, které vykazovaly funkční odpovědi na aplikaci glycinu, měly podobnou desenzitizační kinetiku jako nemutované receptory a naopak vykazovaly sníženou afinitu ke glycinu. Dané výsledky jsou v souladu s hypotézou, že glycinové vazebné místo na GluN3A podjednotce je nezbytné pro aktivaci GluN1/GluN3A receptoru, avšak nepřispívá k jeho desenzitizaci. Toto pozorování je rovněž v souladu s nedávnou studií, v níž byla použita látka

CGP-78608, pomocí které byla odhalena přítomnost funkčních GluN1/GluN3A receptorů v hipokampu u potkaních mláďat (Grand et al., 2018). Naše data získaná z mikroskopických experimentů ukázala, že mutace v glycinovém vazebném místě analogické u GluN1 a GluN3A podjednotek snižují do stejné míry povrchovou expresi GluN1/GluN3A receptorů v COS-7 buňkách. Podobné výsledky jsme pozorovali rovněž v případě GluN3A podjednotek exprimovaných v hipokampálních neuronech.

Vzhledem k tomu, že v hipokampálních neuronech jsou endogenně exprimovány různé typy podjednotek, včetně GluN1, GluN2A, GluN2B a GluN3A (Grand et al., 2018; Rozeboom et al., 2015; Sanz-Clemente et al., 2013), naše data naznačují, že strukturní změny v glycinovém vazebném místě u exogenních GluN1 a GluN3A podjednotek ovlivňují rovněž transport NMDA receptorů obsahujících endogenní GluN podjednotky, včetně triheteromerních GluN1/GluN2/GluN3A receptorů. Přestože dosud není zcela zřejmé, jakým mechanismem mutace v glycinovém vazebném místě mění povrchovou expresi GluN1/GluN3A receptorů, je pravděpodobné, že kvalitativní kontrola v ER bude obdobná jako v případě GluN1/GluN2 receptorů (Kenny et al., 2009; She et al., 2012) či AMPA receptorů (Penn et al., 2008). Předchozí studie odhadují, že glutamát může být v ER přítomen až v milimolárních koncentracích (Berger et al., 1977; Meeker et al., 1989) a mohl by tedy hrát roli při ověřování funkčnosti správně složených GluN1/GluN2 receptorů či AMPA receptorů prostřednictvím specifického kontrolního mechanismu v ER (Penn et al., 2008). Podobnou úlohu by v ER mohl hrát i glycin či D-serin, přestože jejich přesná koncentrace v neuronálním ER není známa. Avšak vzhledem k tomu, že se tyto agonisté účastní řady metabolických procesů, je pravděpodobné, že se mohou v lumen ER nacházet v dostatečných koncentracích, aby se mohly vázat na nově složené NMDA receptory. Teoreticky by tedy neurony mohly regulovat počty NMDA receptorů na svém povrchu na základě množství agonistů, jako je glycin, D-serin a glutamát, či antagonistů, jako například kyselina kynurenová (Moroni et al., 1988), které se přirozeně nachází v savčí CNS. Podobně by mohly i různé farmakologické látky působící prostřednictvím glycinového vazebného místa na GluN1 a/nebo GluN3A podjednotce regulovat počty NMDA receptorů

na buněčném povrchu a tím poskytnout terapeutickou strategii za konkrétních patologických podmínek. Za tímto účelem jsme testovali, zda 48 h inkubace buněk s glycinem až v koncentraci 1 mM změni povrchovou expresi nemutovaných či mutovaných GluN1/GluN3A receptorů. K našemu překvapení jsme zjistili, že inkubace s glycinem nijak neovlivnila povrchovou expresi studovaných GluN1/GluN3A receptorů. Je tedy možné, že intracelulárně je již přítomna dostatečná koncentrace glycinu a extracelulárně přidaný glycin jí dále nezvyšuje, nebo že extracelulární koncentrace glycinu nepůsobí na jeho intracelulární koncentraci. Je rovněž možné, že vysoká intracelulární koncentrace glycinu nemá vliv na transport GluN1/GluN3A receptorů. Tato studie o významu glycinových vazebných míst na GluN1 a GluN3A podjednotkách tedy pomáhá k pochopení fyziologických procesů v savčí CNS.

7. Závěr

Výlev glutamátu z jednoho neuronu a jeho následná detekce glutamátovými receptory na přilehlém neuronu tvoří základ synaptického přenosu na více než 10^{14} synapsí v celém lidském mozku. Specifita této signalizace je navíc umožněna expresí různých podjednotek NMDA receptorů a jejich alternativním sestřihem, které se mohou lišit v místě i čase. Vzhledem k tomu, že daná signalizace je zásadní pro synaptickou plasticitu a neuronální vývoj, může abnormální transport, špatná lokalizace či neadekvátní aktivace NMDA receptorů vést k řadě patologií a dysfunkcí. Z toho důvodu je pochopení základních mechanismů regulace transportu a funkce NMDA receptorů nezbytné pro objasnění těchto dysfunkcí a vývoj budoucí terapie.

V této dizertační práci jsme ukázali, že narušená *N*-glykosylace NMDA receptorů mění jejich transport a funkční vlastnosti. Zjistili jsme, že jednotlivé podjednotky NMDA receptorů mají na svém povrchu navázané velké množství *N*-glykanů a že se mezi sebou tyto podjednotky liší v jejich složení. Zajímavé bylo pozorování, že u fibroblastů získaných od pacientů s diagnostikovanými poruchami glykosylace může docházet mimo jiné i ke změnám v povrchové expresi NMDA receptorů. Současně jsme pozorovali, že změny v remodelaci *N*-glykanů či vazba specifických lektinů mohou mít vliv na povrchovou mobilitu NMDA receptorů, což může vést ke změnám v lokalizaci a funkci NMDA receptorů. Dále jsme ukázali, že glycinová vazebná místa na GluN1 a GluN3A podjednotkách hrají odlišné funkční role u NMDA receptorů a že povrchová exprese těchto receptorů souvisí s afinitou ke glycinu u GluN1 podjednotky. Je tedy zřejmé, že jak specifický význam *N*-glykosylace pro neuronální funkci NMDA receptorů, tak rovněž změny v aktivaci NMDA receptorů si zaslouží další výzkum, neboť mohou hrát doposud neznámou úlohu ve fyziologii, či patofyziologii savčí centrální nervové soustavy.

8. Použitá literatura

- Atlason, P.T., Garside, M.L., Meddows, E., Whiting, P., and McIlhinney, R.A. (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.
- Awobuluyi, M., Yang, J., Ye, Y., Chatterton, J.E., Godzik, A., Lipton, S.A., and Zhang, D. (2007). Subunit-specific roles of glycine-binding domains in activation of NR1/NR3 N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 71, 112-122.
- Berger, S.J., Carter, J.C., and Lowry, O.H. (1977). The distribution of glycine, GABA, glutamate and aspartate in rabbit spinal cord, cerebellum and hippocampus. *J Neurochem* 28, 149-158.
- 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. *Mol Membr Biol* 12, 331-337.
- Chazot, P.L., and Stephenson, F.A. (1997). Biochemical evidence for the existence of a pool of unassembled C2 exon-containing NR1 subunits of the mammalian forebrain NMDA receptor. *J Neurochem* 68, 507-516.
- Chen, J., Liu, Q., Fan, R., Han, H., Yang, Z., Cui, W., Song, G., and Li, M.D. (2019). Demonstration of critical role of GRIN3A in nicotine dependence through both genetic association and molecular functional studies. *Addict Biol*.
- Chen, W., Shieh, C., Swanger, S.A., Tankovic, A., Au, M., McGuire, M., Tagliati, M., Graham, J.M., Madan-Khetarpal, S., Traynelis, S.F., *et al.* (2017). GRIN1 mutation associated with intellectual disability alters NMDA receptor trafficking and function. *J Hum Genet*.
- 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.
- Dupuis, J.P., and Groc, L. (2019). Surface trafficking of neurotransmitter receptors: From cultured neurons to intact brain preparations. *Neuropharmacology*.
- Everts, I., Villmann, C., and Hollmann, M. (1997). N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol* 52, 861-873.
- 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. *J Neurosci* 31, 3565-3579.
- Ferreira, J.S., Papouin, T., Ladepeche, L., Yao, A., Langlais, V.C., Bouchet, D., Dulong, J., Mothet, J.P., Sacchi, S., Pollegioni, L., *et al.* (2017). Co-agonists differentially tune GluN2B-NMDA receptor trafficking at hippocampal synapses. *Elife* 6.
- Freeze, H.H. (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet* 7, 537-551.
- Freeze, H.H., Eklund, E.A., Ng, B.G., and Patterson, M.C. (2012). Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol* 11, 453-466.
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C.I., Choquet, D., and Gundelfinger, E.D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 12, 897-904.

- Grand, T., Abi Gerges, S., David, M., Diana, M.A., and Paoletti, P. (2018). Unmasking GluN1/GluN3A excitatory glycine NMDA receptors. *Nat Commun* 9, 4769.
- Groc, L., Heine, M., Cognet, L., Brickley, K., Stephenson, F.A., Lounis, B., and Choquet, D. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7, 695-696.
- Groc, L., Choquet, D., Stephenson, F. A., Verrier, D., Manzoni, O. J., and Chavis, P. (2007). NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J Neurosci* 27, 10165-10175.
- Gross, V., Tran-Thi, T.A., Schwarz, R.T., Elbein, A.D., Decker, K., and Heinrich, P.C. (1986). Different effects of the glucosidase inhibitors 1-deoxynojirimycin, N-methyl-1-deoxynojirimycin and castanospermine on the glycosylation of rat alpha 1-proteinase inhibitor and alpha 1-acid glycoprotein. *Biochem J* 236, 853-860.
- Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Menniti, F.S., and Traynelis, S.F. (2017). NMDA Receptors in the Central Nervous System. *Methods Mol Biol* 1677, 1-80.
- Hanus, C., Geptin, H., Tushev, G., Garg, S., Alvarez-Castelao, B., Sambandan, S., Kochen, L., Hafner, A.S., Langer, J.D., and Schuman, E.M. (2016). Unconventional secretory processing diversifies neuronal ion channel properties. *Elife* 5.
- 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. *J Biol Chem* 279, 28903-28910.
- Henis, Y. I., and Elson, E. L. (1981). Inhibition of the mobility of mouse lymphocyte surface immunoglobulins by locally bound concanavalin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78, 1072-1076.
- Herreman, A., Van Gassen, G., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W., and De Strooper, B. (2003). gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J Cell Sci* 116, 1127-1136.
- Horak, M., Petralia, R.S., Kaniakova, M., and Sans, N. (2014). ER to synapse trafficking of NMDA receptors. *Front Cell Neurosci* 8, 394.
- Horak, M., and Wenthold, R.J. (2009). Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. *J Biol Chem* 284, 9683-9691.
- 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. *J Biol Chem* 274, 151-157.
- 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. *Nat Neurosci* 12, 1011-1019.
- Kaniakova, M., Kleteckova, L., Lichnerova, K., Holubova, K., Skrenkova, K., Korinek, M., Krusek, J., Smejkalova, T., Korabecny, J., Vales, K., et al. (2018). 7-Methoxyderivative of tacrine is a 'foot-in-the-door' open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo. *Neuropharmacology* 140, 217-232.
- Kaniakova, M., Krausova, B., Vyklicky, V., Korinek, M., Lichnerova, K., Vyklicky, L., and Horak, M. (2012a). Key amino acid residues within the third membrane domains of NR1 and NR2 subunits contribute to the regulation of the surface delivery of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 287, 26423-26434.
- Kaniakova, M., Lichnerova, K., Skrenkova, K., Vyklicky, L., and Horak, M. (2016). Biochemical and electrophysiological characterization of N-glycans on NMDA receptor subunits. *J Neurochem* 138, 546-556.

- Kaniakova, M., Lichnerova, K., Vyklicky, L., and Horak, M. (2012b). Single amino acid residue in the M4 domain of GluN1 subunit regulates the surface delivery of NMDA receptors. *J Neurochem* 123, 385-395.
- Kato, A., Rouach, N., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. (2005). Activity-dependent NMDA receptor degradation mediated by retrotranslocation and ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5600-5605.
- Kehoe, L.A., Bellone, C., De Roo, M., Zandueta, A., Dey, P.N., Perez-Otano, I., and Muller, D. (2014). GluN3A promotes dendritic spine pruning and destabilization during postnatal development. *J Neurosci* 34, 9213-9221.
- Kehoe, L.A., Bernardinelli, Y., and Muller, D. (2013). GluN3A: an NMDA receptor subunit with exquisite properties and functions. *Neural Plast* 2013, 145387.
- Kenny, A.V., Cousins, S.L., Pinho, L., and Stephenson, F.A. (2009). The integrity of the glycine co-agonist binding site of N-methyl-D-aspartate receptors is a functional quality control checkpoint for cell surface delivery. *J Biol Chem* 284, 324-333.
- Kleckner, N.W., and Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241, 835-837.
- Kusumi, A., Sako, Y., and Yamamoto, M. (1993). Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* 65, 2021-2040.
- Kvist, T., Greenwood, J.R., Hansen, K.B., Traynelis, S.F., and Brauner-Osborne, H. (2013). Structure-based discovery of antagonists for GluN3-containing N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuropharmacology* 75, 324-336.
- Lavezzari, G., McCallum, J., Dewey, C.M., and Roche, K.W. (2004). Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *J Neurosci* 24, 6383-6391.
- Lemke, J.R., Geider, K., Helbig, K.L., Heyne, H.O., Schutz, H., Hentschel, J., Courage, C., Depienne, C., Nava, C., Heron, D., *et al.* (2016). Delineating the GRIN1 phenotypic spectrum: A distinct genetic NMDA receptor encephalopathy. *Neurology* 86, 2171-2178.
- Lichnerova, K., Kaniakova, M., Park, S.P., Skrenkova, K., Wang, Y.X., Petralia, R.S., Suh, Y.H., and Horak, M. (2015). Two N-glycosylation Sites in the GluN1 Subunit Are Essential for Releasing N-methyl-d-aspartate (NMDA) Receptors from the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 290, 18379-18390.
- Lichnerova, K., Kaniakova, M., Skrenkova, K., Vyklicky, L., and Horak, M. (2014). Distinct regions within the GluN2C subunit regulate the surface delivery of NMDA receptors. *Front Cell Neurosci* 8, 375.
- Liu, C., Rozmyslowicz, T., Stwora-Wojczyk, M., Wojczyk, B., and Spitalnik, S.L. (2000). Posttranslational modifications of the amyloid precursor protein : glycosylation. *Methods Mol Med* 32, 169-190.
- Macauley, M.S., Crocker, P.R., and Paulson, J.C. (2014). Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol* 14, 653-666.
- Madry, C., Betz, H., Geiger, J.R., and Laube, B. (2008). Supralinear potentiation of NR1/NR3A excitatory glycine receptors by Zn²⁺ and NR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12563-12568.
- Madry, C., Mesic, I., Bartholomaeus, I., Nicke, A., Betz, H., and Laube, B. (2007). Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 102-108.
- Mahfooz, K., Marco, S., Martinez-Turrillas, R., Raja, M.K., Perez-Otano, I., and Wesseling, J.F. (2016). GluN3A promotes NMDA spiking by enhancing synaptic transmission in Huntington's disease models. *Neurobiol Dis* 93, 47-56.
- Marco, S., Giralt, A., Petrovic, M.M., Pouladi, M.A., Martinez-Turrillas, R., Martinez-Hernandez, J., Kaltenbach, L.S., Torres-Peraza, J., Graham, R.K., Watanabe, M., *et al.* (2013).

- Suppressing aberrant GluN3A expression rescues synaptic and behavioral impairments in Huntington's disease models. *Nat Med* 19, 1030-1038.
- 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. *J Neurosci* 23, 10064-10073.
- 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.
- 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. *J Biol Chem* 276, 18795-18803.
- Meeker, R.B., Swanson, D.J., and Hayward, J.N. (1989). Light and electron microscopic localization of glutamate immunoreactivity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroscience* 33, 157-167.
- Mikasova, L., Xiong, H., Kerkhofs, A., Bouchet, D., Krugers, H.J., and Groc, L. (2017). Stress hormone rapidly tunes synaptic NMDA receptor through membrane dynamics and mineralocorticoid signalling. *Sci Rep* 7, 8053.
- Mohamad, O., Song, M., Wei, L., and Yu, S. P. (2013). Regulatory roles of the NMDA receptor GluN3A subunit in locomotion, pain perception and cognitive functions in adult mice. *The Journal of physiology* 591, 149-68
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M., and Nairn, A.V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 448-462.
- Moroni, F., Russi, P., Lombardi, G., Beni, M., and Carla, V. (1988). Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. *J Neurochem* 51, 177-180.
- Mueller, H.T., and Meador-Woodruff, J.H. (2004). NR3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder. *Schizophr Res* 71, 361-370.
- 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. *J Neurosci* 19, 7781-7792.
- Ondruskova, N., Honzik, T., Vondrackova, A., Tesarova, M., Zeman, J., and Hansikova, H. (2014). Glycogen storage disease-like phenotype with central nervous system involvement in a PGM1-CDG patient. *Neuro Endocrinol Lett* 35, 137-141.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383-400.
- Patneau, D.K., and Mayer, M.L. (1990). Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci* 10, 2385-2399.
- Penn, A.C., Williams, S.R., and Greger, I.H. (2008). Gating motions underlie AMPA receptor secretion from the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 27, 3056-3068.
- Perez-Otano, I., Larsen, R.S., and Wesseling, J.F. (2016). Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 17, 623-635.
- Perez-Otano, I., Lujan, R., Tavalin, S.J., Plomann, M., Modregger, J., Liu, X.B., Jones, E.G., Heinemann, S.F., Lo, D.C., and Ehlers, M.D. (2006). Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nat Neurosci* 9, 611-621.
- 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. *J Neurosci* 21, 1228-1237.

- Petralia, R.S., Al-Hallaq, R.A., and Wenthold, R.J. (2009). Trafficking and Targeting of NMDA Receptors.
- Qiu, S., Zhang, X.M., Cao, J.Y., Yang, W., Yan, Y.G., Shan, L., Zheng, J., and Luo, J.H. (2009). An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-Methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 284, 20285-20298.
- Roche, K.W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M.D., and Wenthold, R.J. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* 4, 794-802.
- Rozeboom, A.M., Queenan, B.N., Partridge, J.G., Farnham, C., Wu, J.Y., Vicini, S., and Pak, D.T. (2015). Evidence for glycinergic GluN1/GluN3 NMDA receptors in hippocampal metaplasticity. *Neurobiol Learn Mem* 125, 265-273.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., and Roche, K.W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist* 19, 62-75.
- Schollen, E. (2004). Clinical and molecular features of three patients with congenital disorders of glycosylation type 1h (CDG-1h) (ALG8 deficiency). *Journal of Medical Genetics* 41, 550-556.
- Schuler, T., Mesic, I., Madry, C., Bartholomaeus, I., and 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.
- Scott, D.B., Michailidis, I., Mu, Y., Logothetis, D., and Ehlers, M.D. (2004). Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J Neurosci* 24, 7096-7109.
- 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. *J Biol Chem* 287, 27432-27445.
- Shen, Y.C., Liao, D.L., Chen, J.Y., Wang, Y.C., Lai, I.C., Liou, Y.J., Chen, Y.J., Luu, S.U., and Chen, C.H. (2009). Exomic sequencing of the ionotropic glutamate receptor N-methyl-D-aspartate 3A gene (GRIN3A) reveals no association with schizophrenia. *Schizophr Res* 114, 25-32.
- Skrenkova, K., Lee, S., Lichnerova, K., Kaniakova, M., Hansikova, H., Zapotocky, M., Suh, Y.H., and Horak, M. (2018). N-Glycosylation Regulates the Trafficking and Surface Mobility of GluN3A-Containing NMDA Receptors. *Front Mol Neurosci* 11, 188.
- Stanley, P., Taniguchi, N., and Aebi, M. (2015). "N-Glycans," in eds. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, et al. (Cold Spring Harbor (NY)), 99-111.
- 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.
- Swanger, S.A., Chen, W., Wells, G., Burger, P.B., Tankovic, A., Bhattacharya, S., Strong, K.L., Hu, C., Kusumoto, H., Zhang, J., et al. (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.
- Takata, A., Iwayama, Y., Fukuo, Y., Ikeda, M., Okochi, T., Maekawa, M., Toyota, T., Yamada, K., Hattori, E., Ohnishi, T., et al. (2013). A population-specific uncommon variant in GRIN3A associated with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 73, 532-539.
- Tokhtaeva, E., Sachs, G., and Vagin, O. (2009). Assembly with the Na,K-ATPase alpha(1) subunit is required for export of beta(1) and beta(2) subunits from the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 48, 11421-11431.
- 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 Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62, 405-496.

- Triller, A., and Choquet, D. (2008). New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron* 59, 359-374.
- Tucholski, J., Simmons, M.S., Pinner, A.L., Haroutunian, V., McCullumsmith, R.E., and Meador-Woodruff, J.H. (2013). Abnormal N-linked glycosylation of cortical AMPA receptor subunits in schizophrenia. *Schizophr Res* 146, 177-183.
- Vesela, K., Honzik, T., Hansikova, H., Haeuptle, M.A., Semberova, J., Stranak, Z., Hennet, T., and Zeman, J. (2009). A new case of ALG8 deficiency (CDG 1h). *J Inherit Metab Dis* 32 *Suppl 1*.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Sudhof, T.C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035-1041.
- Washbourne, P., Bennett, J.E., and McAllister, A.K. (2002). Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nat Neurosci* 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. *J Neurosci* 24, 8253-8264.
- Williams, K., Chao, J., Kashiwagi, K., Masuko, T., and Igarashi, K. (1996). Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by glycine: role of an aspartate residue in the M3-M4 loop of the NR1 subunit. *Mol Pharmacol* 50, 701-708.
- Yavin, E., Richter-Landsberg, C., Duksin, D., and Yavin, Z. (1984). Tunicamycin blocks neuritogenesis and glucosamine labeling of gangliosides in developing cerebral neuron cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5638-5642.
- Yuan, T., Mamei, M., O'Connor, E.C., Dey, P.N., Verpelli, C., Sala, C., Perez-Otano, I., Luscher, C., and Bellone, C. (2013). Expression of cocaine-evoked synaptic plasticity by GluN3A-containing NMDA receptors. *Neuron* 80, 1025-1038.

9. Seznam publikací

Publikace *in extenso* související s touto dizertační prací

1. **Kristyna Skrenkova**, Katarina Hemelikova, Marharyta Kolcheva, Stepan Kortus, Martina Kaniakova, Barbora Krausova, Martin Horak (2019) Structural features in the glycine-binding sites of the GluN1 and GluN3A subunits regulate the surface delivery of NMDA receptors. *Scientific reports* 9:12303
IF = 4,5 (2018)
2. **Kristyna Skrenkova**, Sanghyeon Lee, Katarina Lichnerova, Martina Kaniakova, Hana Hansikova, Martin Zapotocky, Young Ho Suh, Martin Horak (2018). N-Glycosylation Regulates the Trafficking and Surface Mobility of GluN3A-Containing NMDA Receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11, 188.
IF = 3,7 (2018)
3. Martina Kaniakova, Katarina Lichnerova, **Kristyna Skrenkova**, Ladislav Vyklicky, Martin Horak (2016). Biochemical and electrophysiological characterization of N-glycans on NMDA receptor subunits. *Journal of Neurochemistry* 546–556.
IF = 4,1 (2016)
4. Lichnerova Katarina, Kaniakova Martina, Seung Pyo Park, **Kristyna Skrenkova**, Ya-Xiang Wang, Ronald S. Petralia, Young Ho Suh, Martin Horak (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.
IF = 4,3 (2015)

Publikace nesouvisející s touto dizertační prací

1. Katarina Hemelikova (Lichnerova), Marharyta Kolcheva, **Kristyna Skrenkova**, Martina Kanikova, Martin Horak (2019). Lectins modulate the functional properties of GluN1/GluN3A – containing receptors. *Neuropharmacology* 157, 107671.
IF = 4,4 (2018)
2. Martina Kaniakova, Eugenie Nepovimova, Lenka Kleteckova, **Kristyna Skrenkova**, Kristina Holubova, Zofia Chrienova, Vendula Hepnarova, Tomas Kucera, Tereza Koblrova, Karel Vales, Jan Korabecny, Ondrej Soukup, Martin Horak. (2019) Combination of Memantine and 6-Chlorotacrine as Novel Multi-Target Compound against Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 16:1.
IF= 3,2 (2018)
3. Martina Kaniakova, Lenka Kleteckova, Katarina Lichnerova, Kristina Holubova, **Kristyna Skrenkova**, Miloslav Korinek, Jan Krusek, Tereza Smejkalova, Jan Korabecny, Karel Vales, Ondrej Soukup, Martin Horak. (2018). 7-Methoxyderivative of tacrine is a 'foot-in-the-door' open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo. *Neuropharmacology* 15; 140:217-232.
IF= 4,3 (2018)
4. Vendula Sepsova, Jana Z. Karasova, Gunnar Tobin, Daniel Jun, Jan Korabecny, Pavla Cabelova, Katerina Janska, Jan Krusek, **Kristyna Skrenkova**, Kamil Kuca, Ondrej Soukup (2015). Cholinergic properties of new 7-methoxytacrine-donepezil derivatives. *General Physiology and Biophysics*, 34(2):189-200.
IF= 0,9 (2015)
5. Katarina Lichnerova, Martina Kaniakova, **Kristyna Skrenkova**, Ladislav Vyklicky, Martin Horak (2014). Distinct regions within the GluN2C subunit regulate the surface delivery of NMDA receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8, 375.
IF= 4,3 (2014)
6. Martina Kaniakova, **Kristyna Skrenkova**, Svatopluk Adamek, Frantisek Vyskocil, Jan Krusek (2014). Different effects of lobeline on neuronal and muscle nicotinic receptors. *European Journal of Pharmacology*, 738:352-9.
IF= 2,5 (2014)

10. Životopis

Kristýna Skřenková

Vzdělání

- 2014 - nyní **Doktorský studijní program Fyziologie živočichů**
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Dizertační práce: Molekulární mechanismy regulace transportu a funkce různých podtypů NMDA receptorů v hipokampálních neuronech
Vedoucí práce: Mgr. Martin Horák, Ph.D.
- 2012 - 2014 **Magisterský studijní obor Fyziologie živočichů, zaměření neurobiologie**
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Diplomová práce: Alosterické modulátory nikotinového acetylcholinového receptoru vhodné k léčbě neurodegenerativních onemocnění
Vedoucí práce: RNDr. Jan Krůšek, CSc.
- 2009 - 2012 **Bakalářský studijní obor Molekulární biologie a biochemie organismů**
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Bakalářská práce: Iontropní glutamátové receptory a excitotoxicita
Vedoucí práce: prof. Ladislav Vyklický, DrSc.

Pracovní zkušenosti

- 2018 - nyní **Ústav experimentální medicíny AVČR**
Oddělení neurochemie
- 2011 - nyní **Fyziologický ústav AVČR**
Oddělení buněčné neurofyziologie

Laboratorní dovednosti

- Kultivace a transfekce heterologních buněčných linií
- Příprava a kultivace primárních potkaních hipokampálních kultur
- Příprava potkaních hipokampálních řízků
- Transfekce a infekce hipokampálních neuronů
- Elektrofyziologie – technika terčíkového zámku (snímání z celé buňky)
- Molekulární biologie – cílená mutagenese, transformace bakterií, izolace plasmidové DNA, klonování DNA do vektoru
- Imunofluorescenční mikroskopie – povrchové a celkové značení, kolokalizace a internalizace.
- Živá mikroskopie - povrchová mobilita
- Biochemie- SDP-PAGE

Absolvované kurzy

- 2019 - Aplikované improvizace (*Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*)
- 2018 - Pokročilá praktická rétorika a prezentace (*Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*)
- 2018 - Zpracování a analýza mikroskopických obrazů pro biomedicínu (*Ústav molekulární genetiky, AVČR*)
- 2018 - Time management (*Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*)
- 2018 - Scientific Writing (*Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*)
- 2017 - Scientific Presentations (*Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*)
- 2017 - Praktická rétorika a prezentace (*Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*)
- 2015 - Kurz základů vědecké AVČR (*AVČR*)
- 2014 - Mikroskopické metody v biomedicině (*Ústav molekulární genetiky, AVČR*)

Charles University

Faculty of Science

Animal Physiology



Ph.D. thesis summary

Molecular mechanisms of regulation of trafficking and function
of different subtypes of NMDA receptors in hippocampal
neurons

Kristýna Skřenková

Prague, 2019

Doctoral Study programs in Biomedicine

*Charles University
and The Czech Academy of Sciences*

Study program: Animal Physiology

Chairman of the Sector Board: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Institute and Department:



Institute of Physiology CAS

Department of Cellular Neurophysiology



Institute of Experimental medicine CAS

Department of Neurochemistry

Author: Kristýna Skřenková

Supervisor: Martin Horák, Ph.D.

The Ph.D. Thesis is available in the library of the Faculty of Science, Charles University.

Contents

1. Summary	4
2. Introduction	5
3. Hypothesis and aims	8
4. Materials and methods	9
5. Results	13
5.1. N-glycosylation regulates the trafficking and surface mobility of GluN3A-containing NMDA receptors	13
5.2. Structural features in the glycine-binding sites of the GluN1 and GluN3A subunits regulate the surface delivery of NMDA receptors	18
6. Discussion	29
6.1. N-glycosylation regulates the trafficking and surface mobility of GluN3A-containing NMDA receptors	29
6.2. Structural features in the glycine-binding sites of the GluN1 and GluN3A subunits regulate the surface delivery of NMDA receptors	31
7. Conclusions	34
8. References	35
9. List of publications	41
10. Curriculum Vitae	43

1. Summary

N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are ionotropic glutamate receptors playing a key role in the mammalian central nervous system. Under physiological conditions, these receptors are important for excitatory synaptic transmission and memory formation. However, under pathological conditions, their abnormal regulation or activation can lead to many neurological and psychiatric disorders, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, epilepsy or schizophrenia. Previous work has shown that the number of NMDA receptors on the cell surface is regulated at multiple levels, including their synthesis, folding, internalization or degradation. During transport to the cell membrane, agonist binding and NMDA receptor activation are being control. The NMDA receptors also undergo many posttranslational modifications such as palmitoylation, phosphorylation or *N*-glycosylation.

In this thesis, we studied the molecular mechanisms that effect the trafficking and functional properties of NMDA receptors in mammalian cells lines and rat hippocampal neurons. Specifically, we focused on how specific changes in the extracellular domains of the NMDA receptor can affect trafficking to the cell membrane and how it modulate the functional properties of the NMDA receptor. In mammals, the most organ-specific *N*-glycosylation occurs in the brain. However, the effect of this modification on functional properties of NMDA receptors in neurons is not fully understood. Therefore, we focused on the role of *N*-glycosylation on NMDA receptors. We also studied the subunit-specific effect of individual lectins. Another topic we focused on was the effect of the integrity of glycine-binding sites of GluN1 and GluN3A subunits on the trafficking and function of NMDA receptors. We used a variety of methods, including immunohistochemistry, live microscopy, biochemistry and electrophysiology. We used several cell models - mammalian HEK293 and COS-7 cell lines, human fibroblast derived from patients suffering with various forms of CDG, and rat hippocampal and cerebellar neurons.

2. Introduction

NMDA receptors are a subclass of glutamate receptors that play an essential role in synapse development, excitatory neurotransmission as well as synaptic plasticity in the mammalian central nervous system (CNS) (Perez-Otano et al., 2016; Traynelis et al., 2010). It has been well established that dysregulation of NMDA receptors plays a critical role in the aetiology of many neuropsychiatric and neurological disorders and conditions, including Huntington's disease (Mahfooz et al., 2016; Marco et al., 2013), schizophrenia (Mueller and Meador-Woodruff, 2004), cocaine addiction (Yuan et al., 2013), and nicotine dependence (Chen et al., 2019). In addition, a growing number of studies suggest that many neuropsychiatric disorders are associated with mutations in genes that encode various NMDA receptor subunits, including the GluN1 (Chen et al., 2017; Lemke et al., 2016), and GluN3A (Shen et al., 2009; Takata et al., 2013) subunits. Thus, understanding the molecular mechanisms that regulate NMDA receptors is an essential step towards designing effective therapies for these patients.

Structurally, NMDA receptors are heterotetramers composed of GluN1 (with eight splice variants), GluN2 (GluN2A through GluN2D), and/or GluN3 (GluN3A and GluN3B) subunits (Paoletti et al., 2013; Traynelis et al., 2010). All GluN subunits have a common membrane topology, including an extracellular amino-terminal domain (ATD), extracellular ligand-binding domains (LBDs) formed by S1 and S2 segments, four membrane domains (M1 through M4), and an intracellular C-terminal domain (CTD) (Paoletti et al., 2013; Traynelis et al., 2010). The conventional NMDA receptors subtype - GluN1/GluN2 - is activated by the binding of agonists to the glutamate-binding site in the LBD of GluN2 together with the simultaneous binding of a co-agonist to the glycine-binding site in the LBD of GluN1 (Clements and Westbrook, 1991; Kleckner and Dingledine, 1988; Patneau and Mayer, 1990; Traynelis et al., 2010). Interestingly, unconventional NMDA receptor subtypes - namely GluN1/GluN3A and GluN1/GluN3B receptors - are activated by the binding of agonist to the glycine-binding site in the LBD of the GluN3 subunit, whereas binding of a co-agonist to

the glycine-binding site in the LBD of GluN1 drives the desensitization of glycine-induced currents in GluN1/GluN3 receptors (Awobuluyi et al., 2007; Kehoe et al., 2013; Kvist et al., 2013; Madry et al., 2007). Thus, the glycine-binding sites in the LBD of various GluN subunits play distinct functional roles in NMDA receptors.

Both the number and type of NMDA receptors present at the neuronal surface are regulated at multiple levels (Hansen et al., 2017; Horak et al., 2014; Sanz-Clemente et al., 2013), including their synthesis (Chazot and Stephenson, 1997; Huh and Wenthold, 1999), subunit assembly (Atlason et al., 2007; Farina et al., 2011; Meddows et al., 2001; Schuler et al., 2008), processing within the endoplasmic reticulum (ER) (Hawkins et al., 2004; Horak and Wenthold, 2009; Matsuda et al., 2003; McIlhinney et al., 1998; Okabe et al., 1999; Perez-Otano et al., 2001; Qiu et al., 2009; Standley et al., 2000), trafficking to the cell membrane (Jeyifous et al., 2009; Washbourne et al., 2002; Washbourne et al., 2004), lateral diffusion (Dupuis and Groc, 2019; Groc et al., 2004), internalisation/recycling (Lavezzari et al., 2004; Perez-Otano et al., 2006; Roche et al., 2001; Scott et al., 2004), and degradation (Kato et al., 2005; Scott et al., 2004). Although many studies have examined the molecular mechanisms that regulate the surface expression and surface mobility of NMDA receptors, these studies focused largely on NMDA receptors subtypes containing GluN1/GluN2 subunits (Sanz-Clemente et al., 2013; Traynelis et al., 2010). GluN1/GluN2 receptors have been found to be extensively *N*-glycosylated in both heterologous expression systems (Chazot et al., 1995; Everts et al., 1997) and native preparations (Huh and Wenthold, 1999; Kaniakova et al., 2016); moreover, we recently reported that two conventional *N*-glycosylation sites in the GluN1 subunit are required for the release of GluN1/GluN2 receptors from the endoplasmic reticulum (ER) (Lichnerova et al., 2015); however, the role of *N*-glycosylation in the trafficking and/or surface mobility of NMDA receptors containing the nonconventional GluN3A subunit has not been examined.

In addition, wide varieties of regions in GluN subunits – including the LBD – are critical for regulating the surface delivery of NMDA receptors (Kenny et al., 2009; She et al., 2012). Specifically, Kenny et al. previously reported that

disrupting the glycine-binding site in the LBD of GluN1 by introducing the D732A mutation reduces the surface delivery of GluN1/GluN2A receptors (Kenny et al., 2009). Similarly, She et al. reported that the glutamate-binding site in the LBD of GluN2B regulates the surface delivery of GluN1/GluN2B receptors (She et al., 2012); this finding was supported by a recent study using human GluN1/GluN2B receptors with known pathogenic mutations (Swanger et al., 2016). However, whether structural changes in the glycine-binding sites in the GluN1 and/or GluN3A subunits regulate the surface delivery of functional GluN3A-containing NMDA receptors is currently unknown.

3. Hypothesis and aims

a) Previous studies primarily examined early processing of GluN1/GluN2 receptors (Sanz-Clemente et al., 2013; Traynelis et al., 2010); however, there is currently a lack of understanding regarding the structural and functional determinants with respect to the early processing of GluN3A-containing NMDA receptors in mammalian neurons. In addition, all ionotropic glutamate receptors - including NMDA receptors - contain several conventional *N*-glycosylation consensus sites (N-X-S/T; X≠P) (Everts et al., 1997; Lichnerova et al., 2015; Traynelis et al., 2010), and we recently reported that GluN1/GluN2B receptors are occupied by diverse glycan structures (Kaniakova et al., 2016). Interestingly, although the GluN3A subunit contains 12 conventional *N*-glycosylation sites, the role of *N*-glycosylation in the trafficking and function of GluN3A-containing NMDA receptors remain unknown.

Aim: Identify the structural and functional determinants of early processing of GluN3A-containing NMDA receptors and study how *N*-glycan remodeling regulates early processing of GluN3A-containing NMDA receptors.

b) Most studies suggest that the intracellular CTD of GluN subunits plays a critical role in regulating the surface expression of NMDA receptors (Petralia et al., 2009; Sanz-Clemente et al., 2013); however, the extracellular domain of mammalian GluN subunits is extremely large and contains the LBDs for receptor agonists and competitive antagonists. We hypothesise that specific mutations in glycine-binding sites of GluN1 and GluN3A subunits induces structural changes that regulate the number of NMDA receptors at the cell surface.

Aim: Characterise how the glycine-binding site in GluN1 and GluN3 subunits regulate the surface delivery and functional properties of NMDA receptors in mammalian cells cultures and hippocampal neurons.

4. Materials and methods

Preparation and transfection of primary hippocampal neurons

All animal experiments were performed in accordance with institutional ethics guidelines and regulations for ensuring animal welfare. Primary cultures of hippocampal neurons were prepared from embryonic day 18 Wistar rats (Lichnerova et al., 2015). In brief, the hippocampi were collected in cold Hank's Balanced Salt Solution containing 10 mM HEPES (pH 7.4), and then incubated for 20 min at 37°C in dissection media containing 0.1 mg/ml DNase I and 0.05% trypsin (Merck). The cells were then washed, dissociated by trituration through a fire-polished glass pipette, and resuspended in plating medium consisting of serum-free Neurobasal media with B-27 supplement and L-glutamine (Thermo Fisher Scientific). The cells were grown at a density of approximately 2×10^4 cells per cm^2 on dishes coated with poly-L-lysine (Sigma). The neurons were fed every 2-3 days with plating media and transfected using Lipofectamine 2000.

Mammalian cell culture

COS-7 and HEK293 cells were obtained from ATCC and cultured in Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) containing 5% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific) (Kaniakova et al., 2012a; Lichnerova et al., 2015). We employed the COS-7 cells for microscopy and for electrophysiology, we used HEK293 cells because they are (i.) smaller than the COS-7 cells that enables us to better compensate patch-clamp recordings, (ii.) routinely used for electrophysiology of NMDA receptors in most laboratories. HEK293 cells and COS-7 cells were transfected with 2 μl Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) plus 900 ng of total cDNAs encoding the GluN1 and GluN3A subunits. For electrophysiology, transfected cells were trypsinised and grown at low density; cells intended for microscopy were grown without the trypsinisation step. The experiments were performed 24–72 h after transfection.

Immunofluorescence microscopy

Surface NMDA receptors were labeled as described previously (Kaniakova et al., 2012a; Lichnerova et al., 2015). In brief, the cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), then incubated in blocking solution containing PBS and 10% (v/v) normal goat serum. The cells were then incubated for 30 min with the primary antibody diluted in blocking solution. After washing, the cells were incubated for 30 min with a secondary antibody conjugated with a fluorescent dye and diluted in blocking solution. The cells were washed and then fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in PBS for 20 min, and then mounted using ProLong Antifade reagent (Thermo Fisher Scientific). For labeling intracellular GluN3A subunits, the cells were washed in PBS, fixed with 4% PFA in PBS for 20 min, permeabilized for 5 min with 0.25% (w/v) Triton X-100 (TX-100) in PBS, and then blocked for 1 h with blocking solution containing 0.1% TX-100. The cells were then incubated with the primary antibody for 1 h, washed, and incubated with the secondary antibody for 30 min. Images were acquired at room temperature using a fluorescence microscope (Olympus Scan) with a 60x/1.35 oil immersion objective or a confocal scanning microscope (Leica TCS SP8) fitted with solid-state lasers and a 63x/1.30 oil immersion apochromat objective. The images were analyzed using ImageJ software (NIH). The intensity of the surface and total GFP signals in the COS-7 cells and fibroblasts were analyzed on whole-cell areas (Kaniakova et al., 2012b). For hippocampal neurons, the intensity of the surface and total GFP signals was analyzed in 10- μ m long segments of secondary and tertiary dendrites (Lichnerova et al., 2015). Rhodamine-labeled *Concanavalin A* (conA) and *Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin* (PHA-L) (Vector Laboratories; 20 μ g/ml) were dissolved in blocking solution and incubated for 5 min with pre-washed live cells. The cells were then washed, fixed in 4% PFA in PBS for 20 min, and mounted using ProLong Antifade reagent.

Colocalisation of GluN subunit combinations with GM130 marker was analysed from single z-stack using an automated ImageJ macro to batch process the data. First, the background was subtracted using ImageJ function Subtract background with rolling factor set to 64. Mask of the entire cell area was generated from native GFP signal by thresholding. For Golgi apparatus (GA) area

localisation a mask was generated from GM130 signal by thresholding. The thresholds were determined from fluorescent intensity histograms using ImageJ function Threshold with Otsu algorithm and the obtained thresholds were used for batch processing across the all data. A GM130-negative cell area was generated by subtraction of the GM130 mask from the GFP signal mask. The GA colocalisation was then calculated as a ratio of the average intensity of GFP signal through the generated GM130 mask over the average intensity of GFP signal through the GM130-negative cell area.

Surface mobility

Quantum dot (QD) tracking of the GluN3A subunits was performed as described previously (Ferreira et al., 2017; Mikasova et al., 2017). In brief, cultured hippocampal neurons (DIV13-15) expressing the GFP-GluN3A subunit were washed in pre-warmed Neurobasal Medium (Thermo Fisher Scientific) containing 1% (w/v) bovine albumin serum (BSA; Merck) and then incubated for 10 min with rabbit anti-GFP antibody (Merck, 1:2000), followed by 10 min incubation with an anti-rabbit IgG conjugated to QD605 (Thermo Fisher Scientific; 1:10 000); both the primary and secondary antibodies were diluted in Neurobasal Medium containing 1% BSA and were incubated with the neurons at 37°C. After QD labeling, the neurons were washed extensively with pre-warmed Neurobasal Medium and then placed in extracellular recording solution containing 1 mM MgCl₂ and 1 mM CaCl₂; all recordings were performed at 37°C within 30 min of QD labeling. QD-labeled GluN3A subunits were detected using the InsightSSI illumination module, an oil immersion objective (60x 1.42, PlanApo N), and excitation/emission filters (excitation 571/19, emission 609/37) on a wide-field fluorescence microscope (DeltaVision OMX™). Images (up to 1200 consecutive frames) were obtained with an acquisition time of 50 ms. As a negative control for lateral mobility, COS-7 cells transfected with GluN1-4a/GFP-GluN3A receptors were labeled with a rabbit anti-GFP primary antibody and a QD605-conjugated anti-rabbit IgG and then fixed with PFA in PBS as described above. QD movements were analyzed in ImageJ using the Mosaic Particle Tracker 2D/3D plug-in. For each QD trajectory, the short-range diffusion

coefficient, D , was obtained from the linear fit of the first four points of the computed mean-squared displacement (MSD) versus time delay t as follows: $MSD(t) = 4 D t + b$ (Kusumi et al., 1993; Triller and Choquet, 2008). The cumulative probability distributions were computed as the relative cumulative frequency of D from all trajectories in the indicated experiment.

Electrophysiology

Whole-cell patch-clamp recordings were performed on transfected HEK293 cells expressing GluN1/GluN3A receptors using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices) as described previously (Kaniakova et al., 2018). The extracellular solution contained (in mM): 160 NaCl, 2.5 KCl, 10 HEPES, 10 glucose, 0.2 EDTA, and 0.7 CaCl₂ (pH adjusted to 7.3 with NaOH). The intracellular solution contained (in mM): 125 gluconic acid, 15 CsCl, 5 BAPTA, 10 HEPES, 3 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, and 2 ATP-Mg salt (pH adjusted to 7.2 with CsOH). Glass patch pipettes (3-6 M Ω tip resistance) were prepared using a model P-97 micropipette puller (Sutter Instrument Co.). A microprocessor-controlled multi-barrel rapid perfusion system (with a time constant for solution exchange around the cell of ~10 ms) was used to apply the extracellular solutions (Lichnerova et al., 2014). All electrophysiology experiments were performed at room temperature. pCLAMP 9 software (Molecular Devices) was used to record and analyse the glycine-induced currents at a membrane potential of -60 mV.

5. Results

5.1. *N*-glycosylation regulates the trafficking and surface mobility of GluN3A-containing NMDA receptors

First, we asked whether remodeling of *N*-glycans affects the trafficking of GluN3A-containing NMDA receptors to the cell surface. First, we expressed recombinant GluN subunits in human fibroblast cell lines derived from patients with various congenital disorders of glycosylation (CDG; see **Table 1**), as well as control cells, and measured the surface expression of GluN1/GluN3A receptors (**Fig. 1a**). These experiments revealed that control fibroblasts and four of the five CDG fibroblast lines have robust surface delivery of GluN1/GluN3A receptors (**Fig. 1a, b; Table 1**). In contrast, the ALG8-CDG line, which has reduced formation of *N*-glycans in the ER, had significantly reduced surface delivery of GluN1/GluN3A receptors. Thus, reduced *N*-glycosylation within the ER—but not altered *N*-glycan remodeling—reduces the delivery of GluN1/GluN3A receptors to the cell surface.

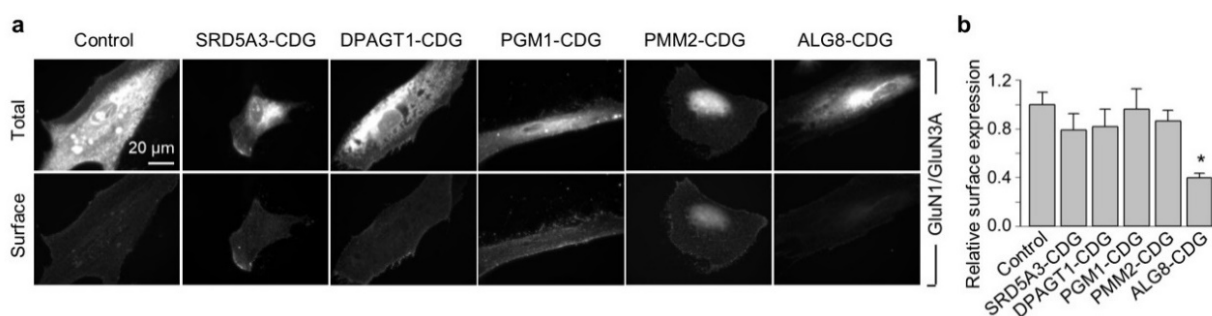


Figure 1. Specific human fibroblasts derived from patients with various CDG can reduce surface expression of GluN1/GluN3A receptors. **(a)** The indicated human fibroblasts were transfected with GluN1 and GluN3A. Detailed information regarding the fibroblasts used here is provided in **Table 1**. Representative images of total and surface pools of labeled subunits 24 h after transfection are shown. **(b)** Summary of the normalized surface expression of GluN1/GluN3A receptors measured using fluorescence microscopy; $n \geq 20$ cells from

two independent experiments. * $p < 0.05$ versus the GluN1/GluN3A receptors (ANOVA).

Type	Gene mutation(s)	Protein mutations	Reference
SRD5A3-CDG	homozygous c.[436G>A]	p.E146K	Honzik et al, 2013
DPAGT1-CDG	c.[85A>T];[652C>T]	p.[I29F];[R218W]	Honzik et al, 2013
PGM1-CDG	c.[1010C>T];[1508G>A]	p.[T337M];[R503Q]	(Ondruskova et al., 2014)
PMM2-CDG	c.[422G>A];[691G>A]	p.[R141H];[V231M]	-
ALG8-CDG	c.[139A>C];[1090C>T]	p.[T47P];[R364X]	(Vesela et al., 2009)

Table 1. Details regarding the fibroblasts obtained from patients with the indicated CDG syndromes. CDG, congenital disorders of glycosylation; SRD5A3, steroid 5-alpha-reductase 3; DPAGT1, dolichyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyltransferase; PGM1, phosphoglucomutase 1; PMM2, phosphomannomutase 2; ALG8, alpha-1,3-glucosyltransferase.

Next, we asked whether inhibiting the *N*-glycosylation machinery affects the surface delivery of GluN3A-containing NMDA receptors in hippocampal neurons. We first treated cultured hippocampal neurons for 2 days in the presence or absence of various inhibitors, including 0.5 $\mu\text{g/ml}$ tunicamycin (an inhibitor of dolichyl-phosphate *N*-acetylglucosamine phosphotransferase 1) (Yavin et al., 1984), 200 $\mu\text{g/ml}$ 1-deoxynojirimycin (DNJ, an inhibitor of α -glucosidase I-II) (Gross et al., 1986), 5 $\mu\text{g/ml}$ kifunensine (an inhibitor of the ER α -mannosidase I) (Herreman et al., 2003), 200 $\mu\text{g/ml}$ 1-deoxymannojirimycin (DMM, an inhibitor of the ER α -mannosidase I-II) (Tokhtaeva et al., 2009), or 100 $\mu\text{g/ml}$ swainsonine (an inhibitor of the GA α -mannosidase II) (Liu et al., 2000). With the exception of DNJ, the other four inhibitors drastically reduced surface labeling with fluorescently tagged PHA-L, which recognizes complex types of *N*-glycans (**Fig. 2a**). In contrast, with the exception of tunicamycin, the other four inhibitors increased surface labeling with fluorescently tagged conA, which recognizes the high-mannose forms of *N*-glycans (**Fig. 2a**). These results indicate

that treating hippocampal neurons with tunicamycin, kifunensine, DMM, and swainsonine inhibits the *N*-glycosylation machinery. Using these inhibitors in transfected hippocampal neurons, we found reduced surface delivery of GluN3A-containing receptors in neurons treated with tunicamycin; in contrast, DNJ, kifunensine, DMM, and swainsonine had no effect on the surface delivery of GluN3A-containing receptors (**Fig. 2b, c**). These data support our hypothesis that the initial attachment of *N*-glycans in the ER—but not the subsequent remodeling of *N*-glycan composition—is required for surface delivery of GluN3A-containing receptors. Taken together, these data indicate that remodeling of *N*-glycans does not play an essential role in the surface delivery of GluN3A-containing NMDA receptors.

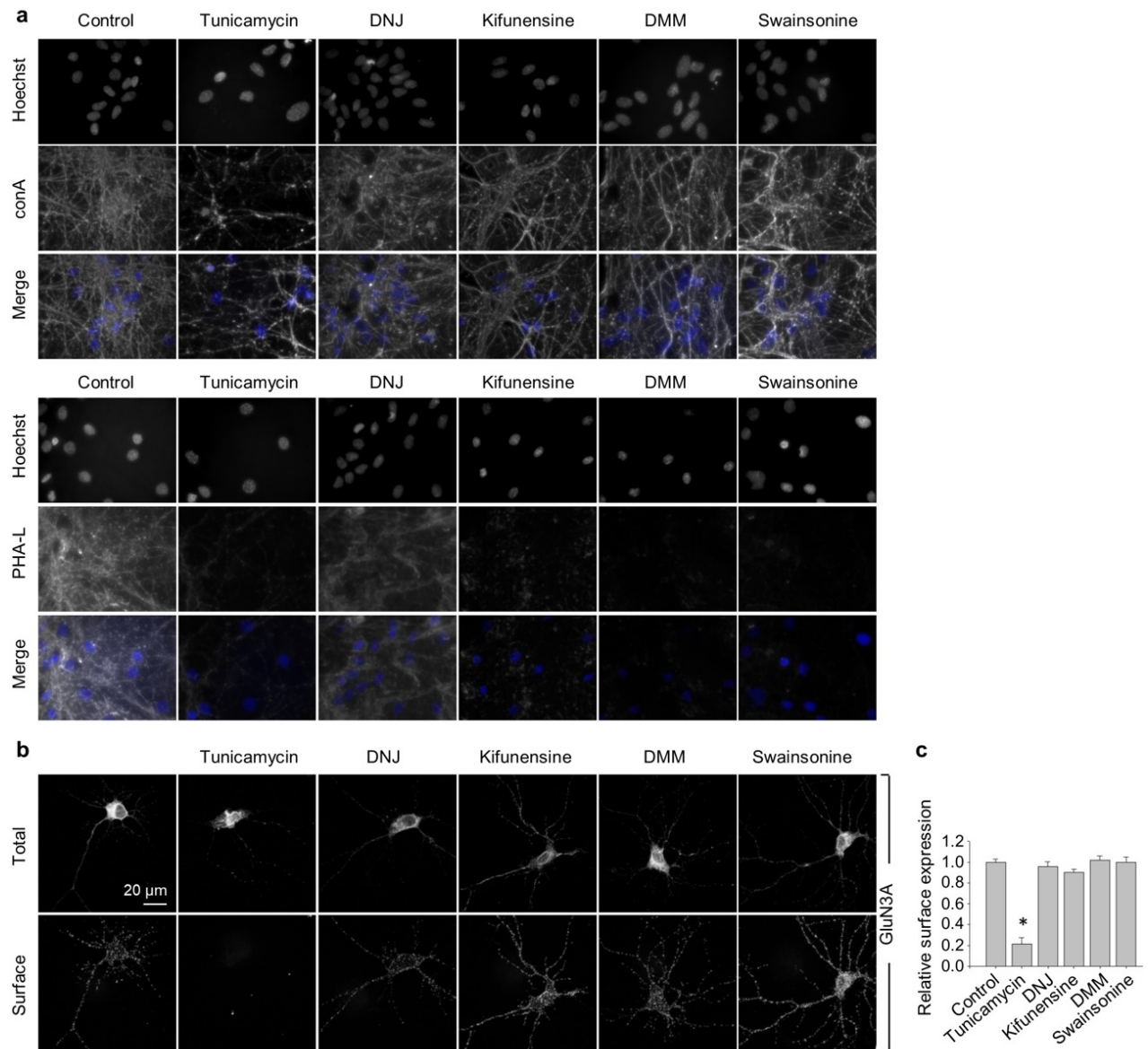


Figure 2. Tunicamycin, but not inhibitors of later step in the *N*-glycosylation pathway, reduces the surface delivery of GluN3A subunits in hippocampal neurons. **(a)** Hippocampal neurons were treated for 2 days with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ tunicamycin, 200 $\mu\text{g/ml}$ DNJ, 5 $\mu\text{g/ml}$ kifunensine, 200 $\mu\text{g/ml}$ DMM, or 100 $\mu\text{g/ml}$ swainsonine. The neurons were then labeled with fluorescently tagged conA or PHA-L; representative examples are shown. **(b)** Hippocampal neurons were transfected with GFP-GluN3A (GluN3A) at DIV8 and treated for 2 days with the indicated inhibitors as described above. The neurons were then immunostained for surface and total GFP under non-permeabilizing and permeabilizing conditions, respectively; representative images of total and surface immunoreactivity are shown. **(c)** Summary of the relative surface expression of GluN3A subunits in neurons treated with the indicated inhibitors; data were obtained from 10- μm long segments of secondary and tertiary dendrites ($n \geq 30$ segments from ≥ 6 neurons) and are expressed relative to control-treated neurons; * $p < 0.05$ versus control (ANOVA).

Lastly, we investigated the role of *N*-glycosylation in regulating the lateral mobility of GluN3A-containing NMDA receptors at the surface of hippocampal neurons. First, we treated hippocampal neurons with the *N*-glycosylation inhibitors DMM and swainsonine; we then performed QD tracking of labeled GFP-GluN3A subunits (**Fig. 3a**). The cumulative distribution of the diffusion coefficients extracted from the individual trajectories is shown in **Fig. 3b**. Our analysis revealed that DMM—but not swainsonine—increased the diffusion coefficient of QD-labeled GluN3A subunits. This finding indicates that the presence of hybrid and/or complex *N*-glycans at the neuron's surface regulates the mobility of GluN3A-containing NMDA receptors (**Fig. 3b**). We also asked whether the mobility of QD-labeled GluN3A subunits at the surface of hippocampal neurons is affected by the presence of the three lectins found to be associated with endogenous GluN3A subunits, namely conA, *Wheat germ agglutinin* (WGA), and *Aleuria aurantia* (AAL). Interestingly, all three lectins

strongly reduced the mobility of QD-labeled GluN3A subunits in hippocampal neurons (**Fig. 3c, d**). Given that a wide variety of lectins are expressed in the mammalian CNS these data indicate that *N*-glycosylation plays a role in regulating the mobility of GluN3A-containing NMDA receptors at the surface of mammalian neurons.

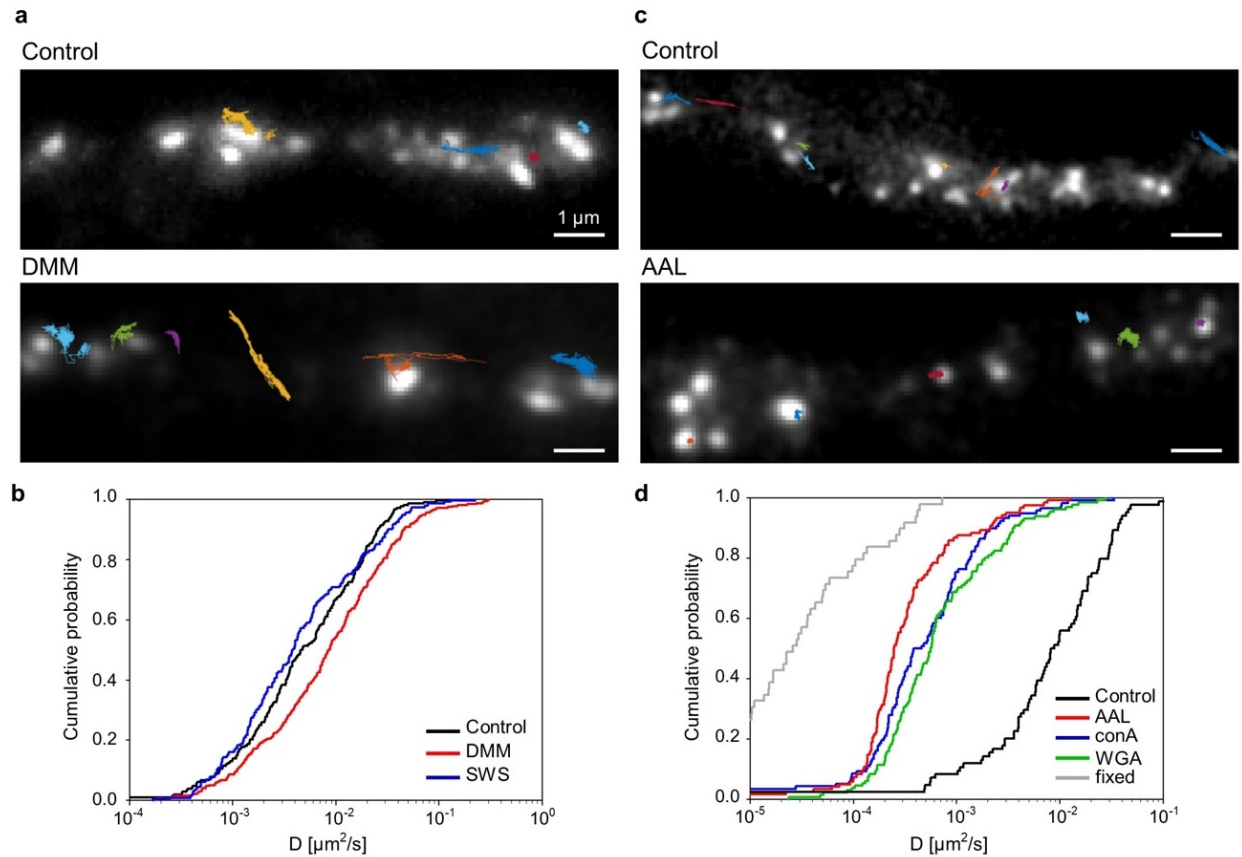


Figure 3. *N*-glycosylation regulates the mobility of GluN3A-containing NMDA receptors at the cell surface of hippocampal neurons. **(a,c)** Representative trajectories of QD-labeled GFP-GluN3A (GluN3A) subunits in hippocampal neurons treated with 200 µg/ml DMM **(a)** or with the lectin AAL (20 µg/ml) **(c)**. **(b,d)** Comparison of the cumulative distribution of the diffusion coefficients measured for QD-labeled GluN3A subunits in hippocampal neurons treated for two days with 200 µg/ml DMM, 100 µg/ml swainsonine **(b)**, or incubated after QD labeling with 20 µg/ml of AAL, conA, or WGA (n=201-290 trajectories per condition). The negative controls for the fixed cells shown in d were obtained from an independent experiment (n=86

trajectories). * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ versus control (Kolmogorov-Smirnov test and Mann-Whitney-Wilcoxon test).

5.2. Structural features in the glycine-binding sites of the GluN1 and GluN3A subunits regulate the surface delivery of NMDA receptors

Previous studies showed that the surface delivery of GluN1/GluN2 receptors is regulated by the glycine-binding site in the GluN1 subunit (Kenny et al., 2009) and the glutamate-binding site in the GluN2 subunit (She et al., 2012). Here, we examined whether the glycine-binding sites in the GluN1 or GluN3A subunits also regulate the surface delivery of GluN3A-containing NMDA receptors. We first used mutations in the GluN1 subunit that were shown previously to alter the EC_{50} for glycine binding to GluN1/GluN2 receptors (Kvist et al., 2013; Williams et al., 1996) (**Fig. 4a**). Specifically, we introduced the A714L mutation in GluN1-4a subunit, which stabilises the open conformation of the LBD and slightly reduces the receptor's sensitivity to glycine; other mutations in GluN1-4a subunit included F484A, T518L (Kvist et al., 2013), and D732A (Kenny et al., 2009; Williams et al., 1996), all of which reduce glycine affinity by two orders of magnitude. In addition, we used the double mutant GluN1-4a-F484A+T518L subunit, which was previously reported to be glycine-insensitive at concentrations up to 30 mM when co-expressed with the GluN2A subunit (Kvist et al., 2013).

First, we co-expressed each mutant GluN1-4a subunit together with GluN3A subunit in COS-7 cells and measured surface expression using fluorescence microscopy (**Fig. 4b, c**). We found that the surface expression was highest for GluN1-4a/GluN3A receptors, followed by (in decreasing order of surface expression) GluN1-4a-A714L/GluN3A, GluN1-4a-F484A/GluN3A, GluN1-4a-T518L/GluN3A, GluN1-4a-D732A/GluN3A, and GluN1-4a-F484A+T518L/GluN3A receptors; interestingly, this rank order corresponds to the previously determined order of glycine EC_{50} values for GluN1/GluN2 receptors containing these mutant GluN1 subunits (Kvist et al., 2013).

Because the previously assessed EC_{50} values for glycine were determined using GluN1/GluN2 receptors expressed in *Xenopus* oocytes, they might not necessarily reflect the change in glycine affinity of GluN1/GluN3A receptors expressed in mammalian cells. We therefore measured the whole-cell currents induced by increasing concentrations of glycine (ranging from 10 μ M to 10 mM) in HEK293 cells co-expressing GluN1/GluN3A subunits (**Fig. 4d**); importantly, using a rapid solution exchange system enabled us to detect the peak glycine-induced current prior to receptor desensitisation. We found that the time constant of desensitisation (τ_w) differed among the various mutant receptors tested and corresponded with the same rank order that we observed for surface delivery (**Fig. 4e**). Our analysis of the peak concentration-response relationship revealed that only the GluN1-4a-F484A mutation caused a rightward shift of the curve (**Fig. 4f**), resulting in an ~5-fold decrease in glycine potency compared to wild-type GluN1-4a/GluN3A receptors. This finding is consistent with previous reports that activation of GluN1/GluN3A receptors is regulated primarily by the glycine-binding site in GluN3A subunit (Awobuluyi et al., 2007; Kvist et al., 2013; Madry et al., 2007). Cells expressing GluN1-4a-D732A/GluN3A receptors had no detectable currents, even at the highest glycine concentration tested; moreover, at all glycine concentrations tested, currents measured through GluN1-4a-F484A+T518L/GluN3A receptors did not desensitise (**Fig. 4d**). Thus, we were unable to perform detailed functional analyses of these two mutant receptors. Taken together, these data support the hypothesis that structural changes in the glycine-binding site in the GluN1 subunit are associated with changes in the surface delivery and the desensitisation properties of GluN1/GluN3A receptors.

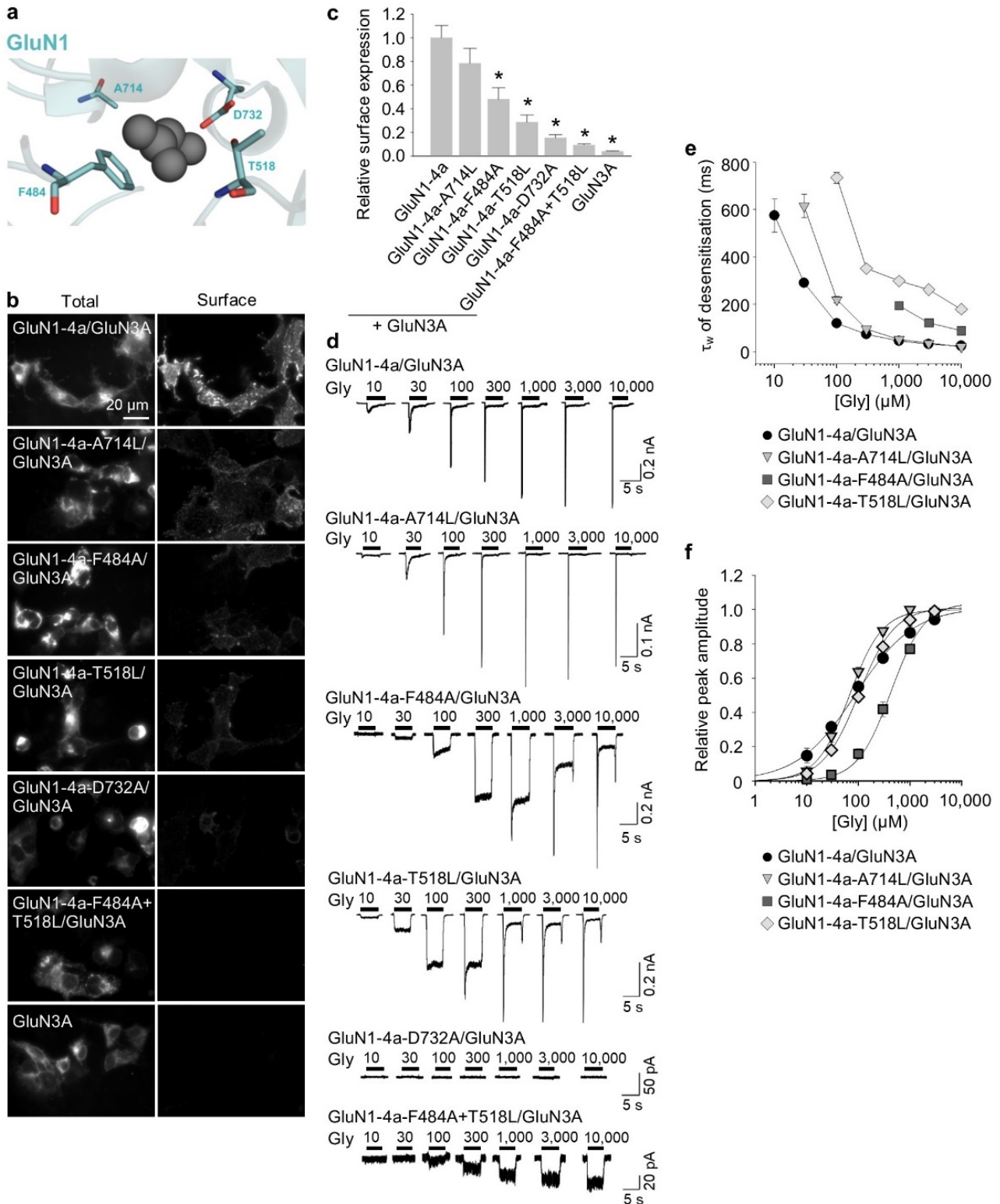


Figure 4. Mutations in the glycine-binding site in the GluN1 subunit alter the surface expression and desensitisation kinetics of GluN1/GluN3A receptors. **(a)** Schematic representation of the glycine-binding site in the GluN1 subunit (PDB code: 1PB7); the amino acid residues studied here, and a glycine molecule,

are shown. **(b)** Representative images of COS-7 cells transfected with the indicated wild-type or mutant GluN1-4a subunits together with GFP-GluN3A (GluN3A) subunit and labelled 24 h after transfection. **(c)** Summary of the relative surface expression of the indicated GluN subunits measured using fluorescence microscopy ($n \geq 24$ cells per group); $*p < 0.05$ vs. GluN1-4a/GluN3A (ANOVA). **(d)** Representative whole-cell patch-clamp recordings from HEK293 cells transfected with the indicated wild-type or mutant GluN1-4a/GluN3A receptors. Currents were elicited by applying glycine at the indicated concentrations. **(e)** Summary of the τ_w of desensitisation for the indicated GluN1-4a/GluN3A receptors ($n \geq 5$ cells per group). **(f)** Peak concentration-response curves for the indicated GluN1-4a/GluN3A receptors. Each data point represents the mean relative current from ≥ 5 independent cells.

Given that the glycine-binding sites in the LBD of GluN1 and GluN3A subunits are highly conserved, we next asked whether similar structural changes in the glycine-binding site in the GluN3A subunit can also affect the surface delivery of GluN1/GluN3A receptors. Accordingly, we introduced point mutations in GluN3A subunit at the positions analogous to GluN1 subunit, yielding four mutant GluN3 subunits (GluN3A-T825L, GluN3A-Y605A, GluN3A-S633L, and GluN3A-D845A) and the double mutant GluN3A-Y605A+S633L subunit (**Fig. 5a**); each subunit was then co-expressed together with GluN1-4a subunit in COS-7 cells and surface expression was examined using microscopy (**Fig. 5b, c**). Interestingly, the rank order of surface expression for the receptors containing mutant GluN3A subunits was similar to the order that we observed with the analogous mutant GluN1 subunits. Specifically, receptors containing the GluN3A-T825L subunit had the highest surface expression, followed by (in decreasing order) GluN3A-Y605A, GluN3A-S633L, GluN3A-D845A, and GluN3A-Y605A+S633L subunits.

Next, we measured the functional properties of GluN1-4a/GluN3A receptors containing wild-type or mutant GluN3A subunits expressed in HEK293 cells

in order to examine the effect of these mutations on glycine affinity. We found that both GluN1-4a/GluN3A-T825L and GluN1-4a/GluN3A-Y605A receptors produced detectable currents whereas the other three mutant receptors failed to produce measurable currents, even with 10 mM glycine (**Fig. 5d**). Moreover, these two mutant receptors had a τ_w of desensitisation similar to wild-type GluN1-4a/GluN3A receptors (**Fig. 5e**), which is consistent with the notion that the desensitisation of GluN1/GluN3A receptors is regulated by the glycine-binding site in the GluN1 subunit. An analysis of the peak concentration-response relationship revealed that glycine is 9-fold and 29-fold less potent at activating GluN1-4a/GluN3A-T825L and GluN1-4a/GluN3A-Y605A receptors, respectively, compared to wild-type GluN1-4a/GluN3A receptors (**Fig. 5f**), which clearly correlates with their surface expression levels. These data support the hypothesis that activation of GluN1/GluN3A receptors is mediated by glycine binding to the GluN3A subunit. As noted above, we measured no detectable currents in cells expressing GluN1-4a/GluN3A-S633L, GluN1-4a/GluN3A-D845A, or GluN1-4a/GluN3A-Y605A+S633L receptors (**Fig. 5d**). This finding may be explained by the greatly reduced number of receptors at the cell surface, a loss of glycine binding, and/or a change in the desensitisation properties of these mutant receptors. Together, our data suggest that the glycine-binding sites in both the GluN1 and GluN3A subunits regulate the surface delivery of GluN1/GluN3A receptors in the mammalian cell lines.

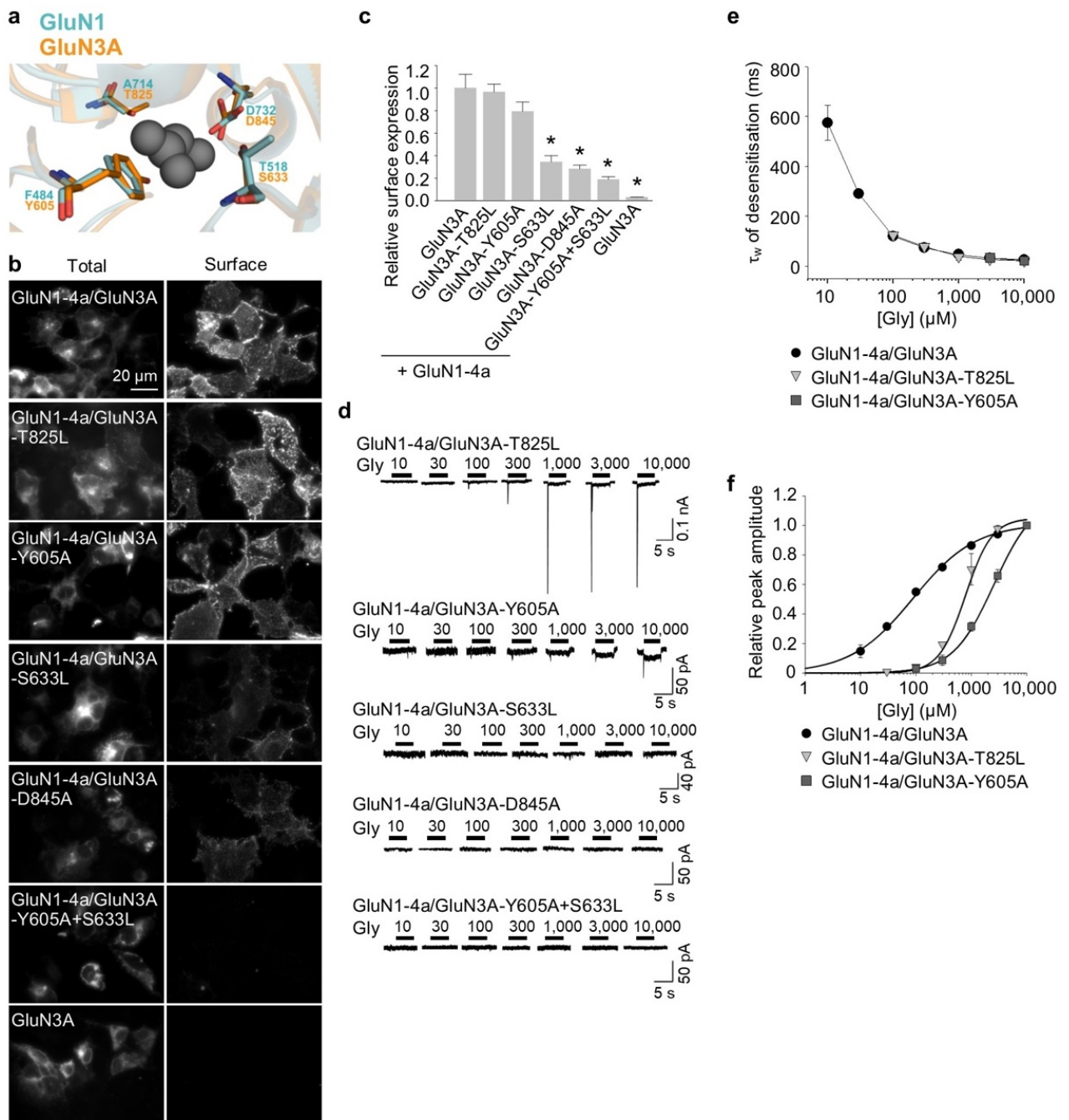


Figure 5. Mutations in the glycine-binding site in the GluN3A subunit regulate the surface expression and glycine affinity of GluN1/GluN3A receptors. **(a)** Schematic representation of the glycine-binding site in the GluN3A subunit (PDB code: 2RC7; in orange), with a glycine molecule shown; for comparison, the binding site in the GluN1 subunit is shown in blue. **(b)** Representative images of COS-7 cells transfected with the indicated wild-type or mutant GFP-GluN3A subunit together with GluN1-4a subunit and labelled 24 h after transfection.

(c) Summary of the relative surface expression of the indicated GluN subunits measured using fluorescence microscopy ($n \geq 20$ cells per group); $*p < 0.05$ vs. GluN1-4a/GluN3A (ANOVA). **(d)** Representative whole-cell patch-clamp recordings from HEK293 cells transfected with the indicated wild-type or mutant GluN1-4a/GluN3A receptors. Currents were elicited by applying the indicated concentrations of glycine. **(e)** Summary of the τ_w of desensitisation for the indicated GluN1-4a/GluN3A ($n \geq 5$ cells per group). **(f)** Peak concentration-response curves for the indicated wild-type and mutant GluN1-4a/GluN3A receptors. Each data point represents the mean relative current from ≥ 5 cells.

To further corroborate that indicating glycine-binding sites regulates forward trafficking of NMDA receptors, we next labelled the COS-7 cells expressing the mutated GluN1/GluN3A receptors which exhibited reduced surface delivery in the experiments described above, with a GA marker Golgi matrix protein 130 (GM130; **Fig. 6a, c**). Our microscopical analysis revealed significantly decreased colocalisation of the GluN1-4a-T518L/GluN3A, GluN1-4a-D732A/GluN3A and GluN1-4a-F484A+T518L/GluN3A and GluN3A subunit combinations with the GM130 when compared with the wild-type GluN1-4a/GluN3A receptors (**Fig. 6b**). Concerning the GluN1-4a-F484A/GluN3A receptors, we did not observe significant tendency for their reduced colocalisation with the GM130, which resembles previously reported finding with the GluN1/GluN2B-S664G receptors (She et al., 2012). Our microscopical analysis further revealed decreased colocalisation of the GluN1-4a/GluN3A-S633L, GluN1-4a/GluN3A-D845A and GluN1-4a/GluN3A-Y605A+S633L receptors with the GM130 when compared with the wild-type GluN1-4a/GluN3A receptors (**Fig. 6d**). Together, these data indicate that impaired glycine binding reduces forward trafficking of GluN1/GluN3A receptors to the cell surface.

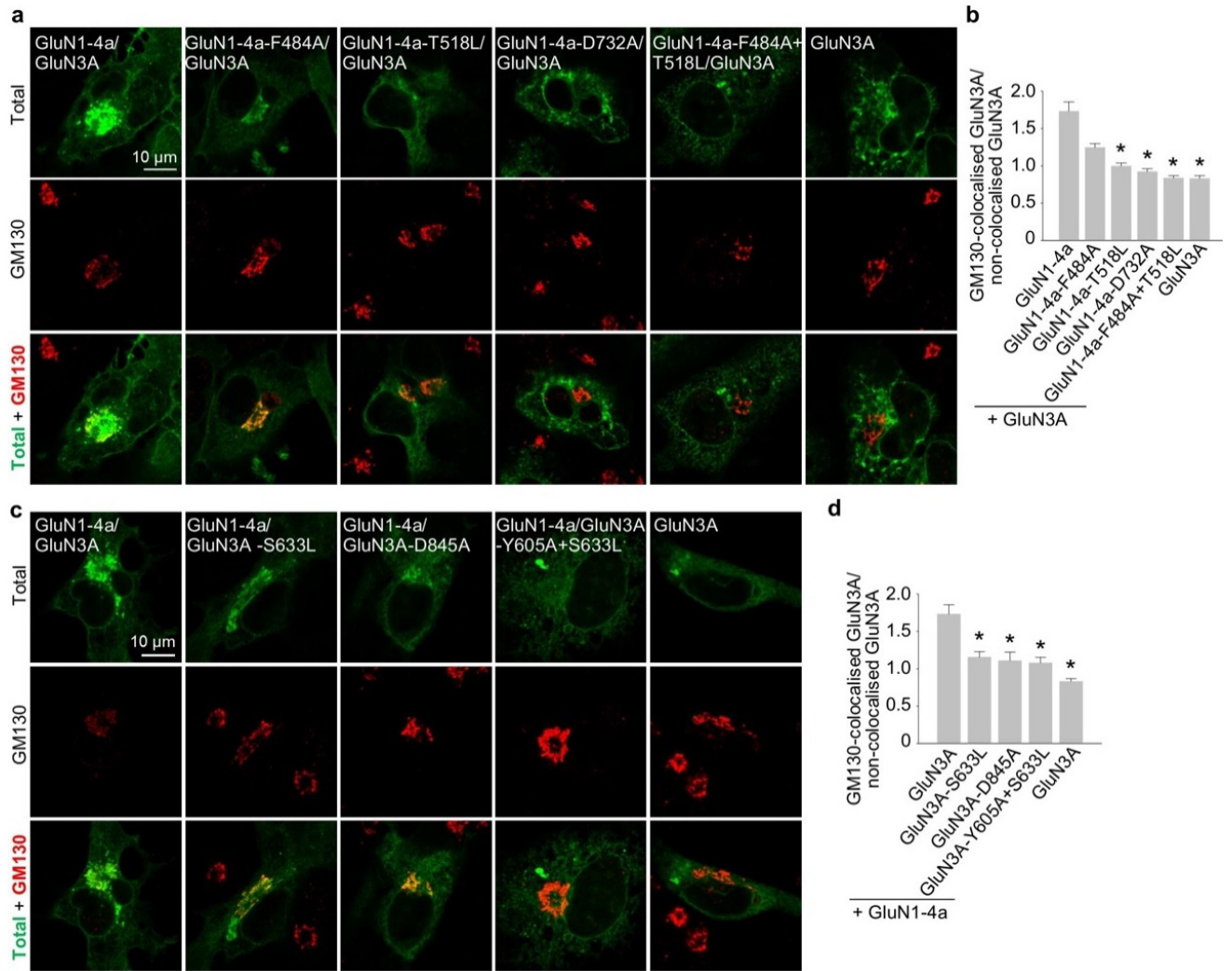


Figure 6. The glycine-binding sites in the GluN1 and GluN3A subunits regulate forward trafficking of GluN1/GluN3A receptors. **(a,c)** Representative confocal microscopy images of the COS-7 cells transfected with the indicated GluN1-4a and GFP-GluN3A (GluN3A) subunits; the anti-GM130 antibody was used to label the GA. **(b,d)** Summary of the average intensity of GFP-GluN3A (GluN3A) subunit signal colocalised with GM130 over the average intensity of GFP-GluN3A (GluN3A) subunit signal outside GM130 signal, calculated for the indicated GluN subunit combinations ($n \geq 10$ cells); * $p < 0.05$ vs. GluN1-4a/GluN3A (ANOVA).

Next, we asked whether the introducing of mutations in the glycine-binding sites of GluN subunits also affects the trafficking of NMDA receptors in neurones. We therefore transfected cultured rat hippocampal neurones at DIV10 with YFP-tagged wild-type or mutant GluN1-1a subunits (we chose this splice variant because it is not delivered to the cell surface unless associated with the GluN2 and/or GluN3 subunit) or GFP-tagged wild-type or mutant GluN3A subunits. Four days after transfection (i.e. at DIV14), we then measured the surface and total pools of recombinant GluN subunits using labelling with an anti-GFP antibody and confocal microscopy. Our analysis revealed the following rank order for the surface delivery of mutant GluN1-1a subunits (in decreasing order): GluN1-1a-A714L, GluN1-1a-F484A, GluN1-1a-T518L, GluN1-1a-D732A, and GluN1-1a-F484A+T518L (**Fig. 7a, b**). Similarly, all five mutant GluN3 subunits exhibited the following rank order of surface delivery (in decreasing order): GluN3A-T825L, GluN3A-Y605A, GluN3A-S633L, GluN3A-D845A, and GluN3A-Y605A+S633L (**Fig. 7c, d**). These results are consistent with our cell surface expression data in cell lines and support the notion that the glycine-binding sites in both the GluN1 and GluN3A subunits are critical for surface delivery of NMDA receptors.

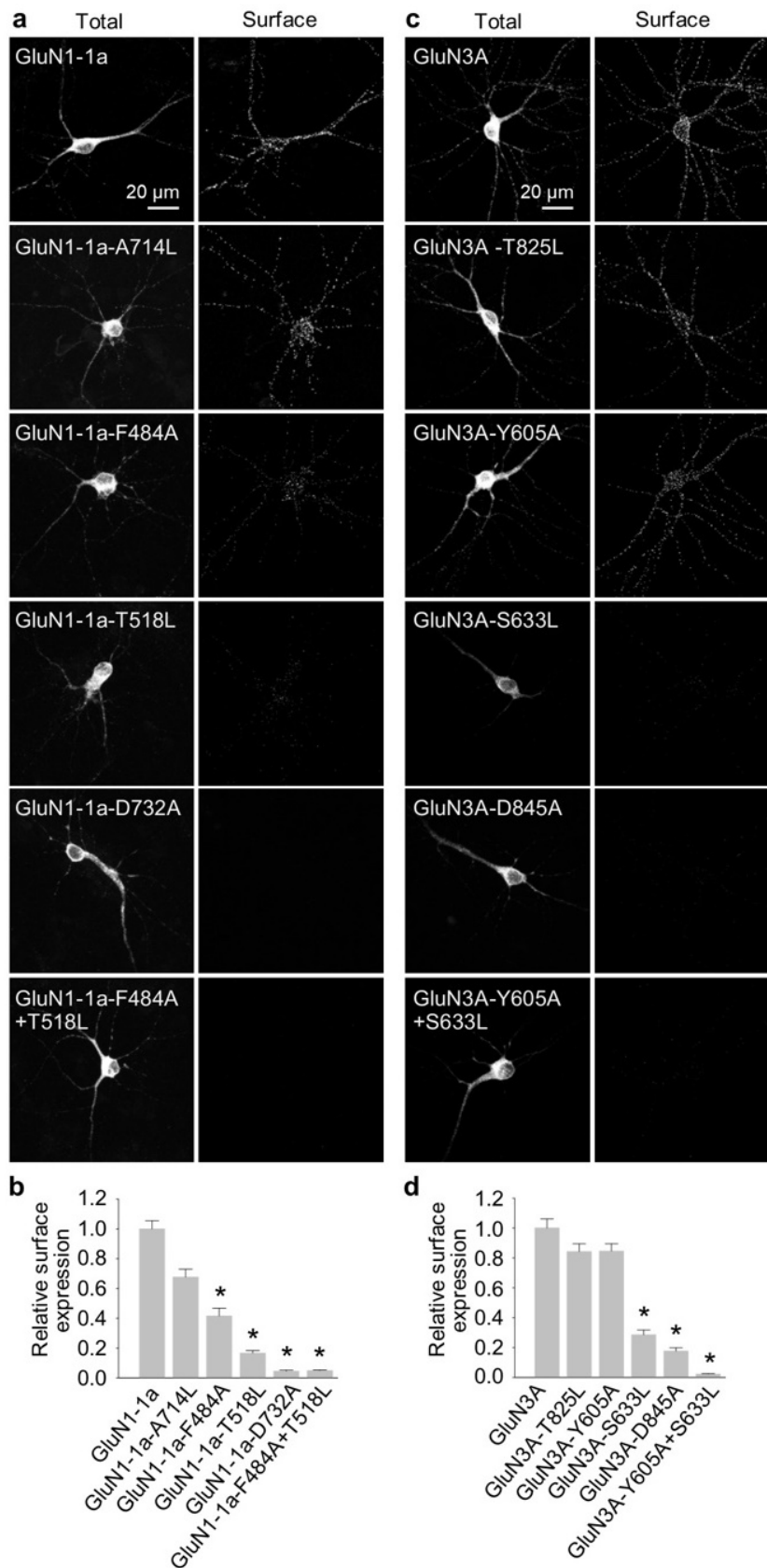


Figure 7. The glycine-binding sites in the GluN1 and GluN3A subunits regulate the surface expression of NMDA receptors in hippocampal neurones. **(a,c)** Representative images of cultured rat hippocampal

neurons transfected at DIV10 with the indicated YFP-GluN1-1a **(a)** or GFP-GluN3A **(c)** subunits; at DIV14, surface and total subunits were stained using an anti-GFP antibody. **(b,d)** Summary of the relative surface expression of the indicated subunits measured in 10- μ m segments of secondary or tertiary dendrites (n \geq 30 segments in \geq 6 different cells per group); *p<0.05 vs. GluN1-1a **(b)** or GluN3A **(d)** (ANOVA).

6. Discussion

6.1. *N*-glycosylation regulates the trafficking and surface mobility of GluN3A-containing NMDA receptors

We present compelling evidence that *N*-glycosylation of the GluN3A NMDA receptor subunit is required for the receptor's delivery to the cell surface. The precise mechanism by which this process is mediated is currently unknown. One possibility is that the presence of specific *N*-glycans confers a critical structure to GluN3A-containing NMDA receptors, thereby permitting their release from the ER (Vagin et al., 2009). Another possibility is that the GluN subunits interact with specific glycan-binding proteins such as galactose-binding lectins (Copits et al., 2014), which then facilitates the trafficking of GluN3A-containing NMDA receptors to the cell surface. Other ionotropic glutamatergic receptors, including α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors and kainate receptors, also contain a variety of *N*-glycan forms (Coleman et al., 2006; Greger et al., 2003; Hanus et al., 2016; Mah et al., 2005; Standley et al., 1998); thus, it is likely that the *N*-glycan composition of all ionotropic glutamate receptors regulates their trafficking and function *in vivo*.

We studied human fibroblasts obtained from patients with deficits in *N*-glycosylation machinery and found reduced surface delivery of GluN1/GluN3A receptors only in cells in which the initial step in the *N*-glycosylation pathway is impaired (i.e., ALG8-CDG). Taken together, our data suggest that the trafficking machinery in heterologous expression systems and cultured hippocampal neurons uses a common quality-control mechanism to regulate the trafficking of GluN3A-containing receptors.

Our finding that *N*-glycan remodeling is not required for the surface delivery of GluN3A-containing NMDA receptors is consistent with a recent study by Hanus et al., who reached a similar conclusion with respect to various neuronal membrane proteins (Hanus et al., 2016). In addition, we found that

the mobility of QD-labeled GluN3A subunits at the surface of hippocampal neurons increases when hybrid and complex forms of N-glycans are removed. These findings are consistent with the report that the mobility of AMPA receptors can be regulated by enzymatic removal of the extracellular matrix (Frischknecht et al., 2009). In contrast, the diffusion coefficient of GluN3A subunits was reduced in the presence of lectins compared to control cells, corresponding to an approximately 4-fold increase in the time required to diffuse across a given short distance. Indeed, one possible interpretation of our data is that the lectins used in our study may indirectly affect the mobility of GluN3A-containing NMDA receptors by interacting with other glycoproteins at the neuronal cell surface. Because a wide variety of lectins are expressed in the mammalian CNS, including sialic acid-binding Ig-like lectins (Macauley et al., 2014) and galactose-binding lectins (Cummings et al., 2017), these lectins could affect the mobility of NMDA receptors *in vivo*. Other groups reported similar findings; for example, the binding of conA restricts the mobility of surface receptors for this lectin in mouse fibroblasts (Zagyansky and Edidin, 1976), and the protein galectin-3 alters the lateral mobility and clustering of β 1-integrin receptors in HeLa cells (Yang et al., 2017).

The GluN3A subunit acts as a molecular brake, limiting the maturation of excitatory synapses; this subunit has also been implicated in a number of neuropsychiatric disorders (Fiuza et al., 2013; Kehoe et al., 2014; Kehoe et al., 2013). Thus, N-glycosylation may play as-yet unrecognized roles in the mammalian brain during health and/or disease. For example, N-glycosylation of the GluN3A subunit may be essential for its synaptic/perisynaptic localization and/or degradation (Chowdhury et al., 2013; Pachernegg et al., 2012). With respect to the clinical relevance of our findings, it is interesting to note that the glycosylation pattern on AMPA receptors is altered in the cerebral cortex of schizophrenia patients (Tucholski et al., 2013); therefore, it is reasonable to speculate that the N-glycosylation pattern of the GluN3A subunit may be altered in certain neurological and/or psychiatric conditions. Indeed, the altered function of the glycosylation machinery observed in patients with a CDG syndrome could result in altered surface and/or synaptic delivery

of NMDA receptors, as many of these patients have impaired brain function (Freeze, 2006; Freeze et al., 2012; Moremen et al., 2012). Unfortunately, the availability of suitable human brain samples from patients with these relatively rare diseases is limited; however, the availability of new techniques for converting human fibroblasts into neuronal cells (Vierbuchen et al., 2010) may provide new opportunities for studying the consequences of impaired glycosylation machinery on the function of NMDA receptors, possibly leading to the identification of new therapeutic targets for these patients.

6.2. Structural features in the glycine-binding sites of the GluN1 and GluN3A subunits regulate the surface delivery of NMDA receptors

The relatively long N- and C-termini of GluN subunits is believed to allow the receptor to interact with a variety of proteins during its journey to the cell surface, at the cell surface, and during internalisation. In GluN1/GluN3A receptors, the glycine-binding site in GluN3A subunit activates the receptor, whereas the glycine-binding site in GluN1 subunit mediates the rapid desensitisation kinetics of glycine-induced currents (Awobuluyi et al., 2007; Kehoe et al., 2013; Kvist et al., 2013; Madry et al., 2007). Here, we analysed glycine-induced currents in order to measure the functional properties of various GluN1/GluN3A receptors containing mutations in the glycine-binding sites of both GluN1 and GluN3A subunits. We found that the changes in τ_w values for desensitisation of mutant GluN1/GluN3A receptors is consistent with previously measured changes of EC_{50} values for glycine binding to mutant GluN1/GluN2 receptors (Kvist et al., 2013; Williams et al., 1996). This finding is also consistent with previous studies that used mutant GluN1 subunits (e.g. GluN1-F484A subunit) to reduce the desensitisation kinetics of GluN1/GluN3A receptors (Cummings and Popescu, 2016; Grand et al., 2018; Kaniakova et al., 2018; Kvist et al., 2013; Madry et al., 2008; Smothers and Woodward, 2009). The observed order of changes in EC_{50} values for the mutant GluN1-4a-F484A/GluN3A receptors based on peak current amplitude is similar to previous reports of steady-state currents (Awobuluyi et al., 2007; Kvist et al., 2013).

Moreover, an analysis of peak currents enabled us to estimate the EC₅₀ value for wild-type GluN1-4a/GluN3A receptors as well, which was previously not possible due to the virtually negligible steady-state currents when these receptors were expressed in *Xenopus* oocytes (Awobuluyi et al., 2007; Chatterton et al., 2002; Kvist et al., 2013). However, we observed an apparent rightward shift in the concentration-response curve for GluN1-4a/GluN3A receptors compared to previously reported estimates of glycine EC₅₀ values for steady-state currents based on bell-shaped curves (Kvist et al., 2013) as well as to previously reported K_d values from binding studies using soluble LBDs (Yao and Mayer, 2006); this shift could be due to a variety of factors, including: i) decreased glycine affinity of the peak current compared to the steady-state current, ii) the fast desensitisation kinetics of GluN1/GluN3A receptors, and/or iii) the use of different expression systems. Furthermore, we found that both the GluN1/GluN3A-T825L and GluN1/GluN3A-Y605A receptors have similar desensitisation kinetics but markedly decreased glycine affinity compared to wild-type receptors. These findings support the conclusion that the glycine-binding site in GluN3A subunit is required for activating the GluN1/GluN3A receptors but does not contribute to the desensitisation of GluN1/GluN3A receptors.

Our microscopy data showed that analogous mutations in the glycine-binding sites of GluN1 and GluN3A subunits reduce the surface delivery of their respective NMDA receptors when expressed in both mammalian cell lines and hippocampal neurones. Given that endogenous GluN1, GluN2A-B, and GluN3 subunits are likely expressed in hippocampal neurones (Grand et al., 2018; Hansen et al., 2017; Paoletti et al., 2013; Rozeboom et al., 2015; Sanz-Clemente et al., 2013), our data support the view that the structural changes in the glycine-binding sites in exogenous GluN1 and GluN3A subunits dominate the trafficking of NMDA receptors that include endogenous GluN subunits (for example, in the case of tri-heteromeric GluN1/GluN2/GluN3A receptors). Although the underlying mechanism by which mutations in the glycine-binding sites alters surface delivery is currently unknown, it is likely that the quality control machinery in the ER plays a role, as was shown previously for GluN1/GluN2

receptors as well as AMPA receptors (Kenny et al., 2009; Penn et al., 2008; She et al., 2012). Glutamate may be present in the ER in the millimolar range (Berger et al., 1977; Meeker et al., 1989) and may be important for detecting properly assembled functional GluN1/GluN2 receptors and AMPA receptors via an ER-specific quality control mechanism. The precise concentration of glycine in the ER is unknown; however, given the role that glycine plays in various metabolic pathways (Wang et al., 2013), it is likely present in sufficient amounts to interact with newly assembled receptors. In theory, a neurone could regulate the number of NMDA receptors at the cell surface by controlling the production of agonists such as glycine and D-serine or competitive antagonists such as kynurenic acid, which are found naturally in the mammalian CNS (Moroni et al., 1988; Traynelis et al., 2010). In addition, certain pharmacological compounds that act on the glycine-binding sites of GluN1 and/or GluN3A subunits may alter the surface expression of NMDA receptors, thereby providing a possible therapeutic strategy for certain pathological conditions. In this respect, it is important to note that treating cells with up to 1 mM glycine for 48 hours did not affect the surface expression of either wild-type or mutant GluN1/GluN3A receptors. This suggests that: *i*) intracellular glycine is already present at saturating concentrations in cultured cells, *ii*) high levels of extracellular glycine do not sufficiently alter the concentration of glycine within the ER, and/or *iii*) high levels of glycine do not regulate the intracellular processing of GluN1/GluN3A receptors.

Taken together, our findings regarding the role of glycine-binding sites in GluN1 and GluN3A subunits in the surface delivery of NMDA receptors provide new previously overlooked insight into the physiological and pathophysiological regulation of these receptors in the mammalian CNS.

7. Conclusions

The glutamate release from one neuron and its detection by glutamate receptors on the adjacent neuron form the synaptic transmission on more than 10^{14} synapses in the human brain. The specificity of this signalization is also thanks to the neuron-specific expression of various NMDA receptor subunits and their alternative splicing, which may vary in time and location. Since this signaling is essential for synaptic plasticity and neuronal development, abnormal transport, inappropriate localization or inadequate activation of these receptors can lead to a number of pathologies and dysfunctions. Therefore, understanding the basic mechanisms of regulation of trafficking and function of NMDA receptors is essential to elucidate these dysfunctions and to develop future therapies.

In this thesis, we have shown that insufficient *N*-glycosylation of NMDA receptors alters the trafficking and functional properties of NMDA receptors. We found that the subunits of NMDA receptors have a large variety of attached *N*-glycans and that the subunits differ in their composition. It was interesting to note that fibroblasts derived from patients with CDG may also alter in the surface expression of NMDA receptors. At the same time, we observed that changes in *N*-glycan remodeling or lectin binding may affect the lateral mobility of NMDA receptors, which may lead to changes in the localization and function of NMDA receptors. We further showed that glycine-binding sites on the GluN1 and GluN3A subunits have different functional roles at NMDA receptors and that their surface expression correlates with affinity for glycine on the GluN1 subunit. Thus, it is clear that as the specific role of *N*-glycosylation on the neuronal function of NMDA receptors as the changes in NMDA receptor activation deserve further attention as they may play a previously unknown role in the physiology or pathophysiology of the mammalian central nervous system.

8. References

- Atlason, P.T., Garside, M.L., Meddows, E., Whiting, P., and McIlhinney, R.A. (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.
- Awobuluyi, M., Yang, J., Ye, Y., Chatterton, J.E., Godzik, A., Lipton, S.A., and Zhang, D. (2007). Subunit-specific roles of glycine-binding domains in activation of NR1/NR3 N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 71, 112-122.
- Berger, S.J., Carter, J.C., and Lowry, O.H. (1977). The distribution of glycine, GABA, glutamate and aspartate in rabbit spinal cord, cerebellum and hippocampus. *J Neurochem* 28, 149-158.
- 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., 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. *Mol Membr Biol* 12, 331-337.
- Chazot, P.L., and Stephenson, F.A. (1997). Biochemical evidence for the existence of a pool of unassembled C2 exon-containing NR1 subunits of the mammalian forebrain NMDA receptor. *J Neurochem* 68, 507-516.
- Chen, J., Liu, Q., Fan, R., Han, H., Yang, Z., Cui, W., Song, G., and Li, M.D. (2019). Demonstration of critical role of GRIN3A in nicotine dependence through both genetic association and molecular functional studies. *Addict Biol*.
- Chen, W., Shieh, C., Swanger, S.A., Tankovic, A., Au, M., McGuire, M., Tagliati, M., Graham, J.M., Madan-Khetarpal, S., Traynelis, S.F., *et al.* (2017). GRIN1 mutation associated with intellectual disability alters NMDA receptor trafficking and function. *J Hum Genet*.
- Chowdhury, D., Marco, S., Brooks, I.M., Zandueta, A., Rao, Y., Haucke, V., Wesseling, J.F., Tavalin, S.J., and Perez-Otano, I. (2013). Tyrosine phosphorylation regulates the endocytosis and surface expression of GluN3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 33, 4151-4164.
- 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.
- Coleman, S.K., Moykkynen, T., Cai, C.L., von Ossowski, L., Kuismanen, E., Korpi, E.R., and Keinänen, K. (2006). Isoform-specific early trafficking of AMPA receptor flip and flop variants. *Journal of Neuroscience* 26, 11220-11229.
- Cummings, K.A., and Popescu, G.K. (2016). Protons Potentiate GluN1/GluN3A Currents by Attenuating Their Desensitisation. *Sci Rep* 6, 23344.
- Dupuis, J.P., and Groc, L. (2019). Surface trafficking of neurotransmitter receptors: From cultured neurons to intact brain preparations. *Neuropharmacology*.
- Everts, I., Villmann, C., and Hollmann, M. (1997). N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol* 52, 861-873.
- 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. *J Neurosci* 31, 3565-3579.

- Ferreira, J.S., Papouin, T., Ladepeche, L., Yao, A., Langlais, V.C., Bouchet, D., Dulong, J., Mothet, J.P., Sacchi, S., Pollegioni, L., *et al.* (2017). Co-agonists differentially tune GluN2B-NMDA receptor trafficking at hippocampal synapses. *Elife* 6.
- Fiuza, M., Gonzalez-Gonzalez, I., and Perez-Otano, I. (2013). GluN3A expression restricts spine maturation via inhibition of GIT1/Rac1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20807-20812.
- Freeze, H.H. (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet* 7, 537-551.
- Freeze, H.H., Eklund, E.A., Ng, B.G., and Patterson, M.C. (2012). Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol* 11, 453-466.
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C.I., Choquet, D., and Gundelfinger, E.D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 12, 897-904.
- Grand, T., Abi Gerges, S., David, M., Diana, M.A., and Paoletti, P. (2018). Unmasking GluN1/GluN3A excitatory glycine NMDA receptors. *Nat Commun* 9, 4769.
- 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.
- Groc, L., Heine, M., Cognet, L., Brickley, K., Stephenson, F.A., Lounis, B., and Choquet, D. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7, 695-696.
- Gross, V., Tran-Thi, T.A., Schwarz, R.T., Elbein, A.D., Decker, K., and Heinrich, P.C. (1986). Different effects of the glucosidase inhibitors 1-deoxynojirimycin, N-methyl-1-deoxynojirimycin and castanospermine on the glycosylation of rat alpha 1-proteinase inhibitor and alpha 1-acid glycoprotein. *Biochem J* 236, 853-860.
- Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Menniti, F.S., and Traynelis, S.F. (2017). NMDA Receptors in the Central Nervous System. *Methods Mol Biol* 1677, 1-80.
- Hanus, C., Geptin, H., Tushev, G., Garg, S., Alvarez-Castelao, B., Sambandan, S., Kochen, L., Hafner, A.S., Langer, J.D., and Schuman, E.M. (2016). Unconventional secretory processing diversifies neuronal ion channel properties. *Elife* 5.
- 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. *J Biol Chem* 279, 28903-28910.
- Herreman, A., Van Gassen, G., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W., and De Strooper, B. (2003). gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J Cell Sci* 116, 1127-1136.
- Horak, M., Petralia, R.S., Kaniakova, M., and Sans, N. (2014). ER to synapse trafficking of NMDA receptors. *Front Cell Neurosci* 8, 394.
- Horak, M., and Wenthold, R.J. (2009). Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. *J Biol Chem* 284, 9683-9691.
- 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. *J Biol Chem* 274, 151-157.
- 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. *Nat Neurosci* 12, 1011-1019.
- Kaniakova, M., Kleteckova, L., Lichnerova, K., Holubova, K., Skrenkova, K., Korinek, M., Krusek, J., Smejkalova, T., Korabecny, J., Vales, K., *et al.* (2018). 7-Methoxyderivative of tacrine is a 'foot-in-the-door' open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo. *Neuropharmacology* 140, 217-232.

- Kaniakova, M., Krausova, B., Vyklicky, V., Korinek, M., Lichnerova, K., Vyklicky, L., and Horak, M. (2012a). Key amino acid residues within the third membrane domains of NR1 and NR2 subunits contribute to the regulation of the surface delivery of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 287, 26423-26434.
- Kaniakova, M., Lichnerova, K., Skrenkova, K., Vyklicky, L., and Horak, M. (2016). Biochemical and electrophysiological characterization of N-glycans on NMDA receptor subunits. *J Neurochem* 138, 546-556.
- Kaniakova, M., Lichnerova, K., Vyklicky, L., and Horak, M. (2012b). Single amino acid residue in the M4 domain of GluN1 subunit regulates the surface delivery of NMDA receptors. *J Neurochem* 123, 385-395.
- Kato, A., Rouach, N., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. (2005). Activity-dependent NMDA receptor degradation mediated by retrotranslocation and ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5600-5605.
- Kehoe, L.A., Bellone, C., De Roo, M., Zanduetta, A., Dey, P.N., Perez-Otano, I., and Muller, D. (2014). GluN3A promotes dendritic spine pruning and destabilization during postnatal development. *J Neurosci* 34, 9213-9221.
- Kehoe, L.A., Bernardinelli, Y., and Muller, D. (2013). GluN3A: an NMDA receptor subunit with exquisite properties and functions. *Neural Plast* 2013, 145387.
- Kenny, A.V., Cousins, S.L., Pinho, L., and Stephenson, F.A. (2009). The integrity of the glycine co-agonist binding site of N-methyl-D-aspartate receptors is a functional quality control checkpoint for cell surface delivery. *J Biol Chem* 284, 324-333.
- Kleckner, N.W., and Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241, 835-837.
- Kusumi, A., Sako, Y., and Yamamoto, M. (1993). Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* 65, 2021-2040.
- Kvist, T., Greenwood, J.R., Hansen, K.B., Traynelis, S.F., and Brauner-Osborne, H. (2013). Structure-based discovery of antagonists for GluN3-containing N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuropharmacology* 75, 324-336.
- Lavezzari, G., McCallum, J., Dewey, C.M., and Roche, K.W. (2004). Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *J Neurosci* 24, 6383-6391.
- Lemke, J.R., Geider, K., Helbig, K.L., Heyne, H.O., Schutz, H., Hentschel, J., Courage, C., Depienne, C., Nava, C., Heron, D., *et al.* (2016). Delineating the GRIN1 phenotypic spectrum: A distinct genetic NMDA receptor encephalopathy. *Neurology* 86, 2171-2178.
- Lichnerova, K., Kaniakova, M., Park, S.P., Skrenkova, K., Wang, Y.X., Petralia, R.S., Suh, Y.H., and Horak, M. (2015). Two N-glycosylation Sites in the GluN1 Subunit Are Essential for Releasing N-methyl-d-aspartate (NMDA) Receptors from the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 290, 18379-18390.
- Lichnerova, K., Kaniakova, M., Skrenkova, K., Vyklicky, L., and Horak, M. (2014). Distinct regions within the GluN2C subunit regulate the surface delivery of NMDA receptors. *Front Cell Neurosci* 8, 375.
- Liu, C., Rozmyslowicz, T., Stwora-Wojczyk, M., Wojczyk, B., and Spitalnik, S.L. (2000). Posttranslational modifications of the amyloid precursor protein : glycosylation. *Methods Mol Med* 32, 169-190.
- Macauley, M.S., Crocker, P.R., and Paulson, J.C. (2014). Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol* 14, 653-666.
- Madry, C., Betz, H., Geiger, J.R., and Laube, B. (2008). Supralinear potentiation of NR1/NR3A excitatory glycine receptors by Zn²⁺ and NR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12563-12568.

- Madry, C., Mesic, I., Bartholomaeus, I., Nicke, A., Betz, H., and Laube, B. (2007). Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 102-108.
- 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. *J Neurosci* 25, 2215-2225.
- Mahfooz, K., Marco, S., Martinez-Turrillas, R., Raja, M.K., Perez-Otano, I., and Wesseling, J.F. (2016). GluN3A promotes NMDA spiking by enhancing synaptic transmission in Huntington's disease models. *Neurobiol Dis* 93, 47-56.
- Marco, S., Giralt, A., Petrovic, M.M., Pouladi, M.A., Martinez-Turrillas, R., Martinez-Hernandez, J., Kaltenbach, L.S., Torres-Peraza, J., Graham, R.K., Watanabe, M., *et al.* (2013). Suppressing aberrant GluN3A expression rescues synaptic and behavioral impairments in Huntington's disease models. *Nat Med* 19, 1030-1038.
- 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. *J Neurosci* 23, 10064-10073.
- 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.
- 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. *J Biol Chem* 276, 18795-18803.
- Meeker, R.B., Swanson, D.J., and Hayward, J.N. (1989). Light and electron microscopic localization of glutamate immunoreactivity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroscience* 33, 157-167.
- Mikasova, L., Xiong, H., Kerkhofs, A., Bouchet, D., Krugers, H.J., and Groc, L. (2017). Stress hormone rapidly tunes synaptic NMDA receptor through membrane dynamics and mineralocorticoid signalling. *Sci Rep* 7, 8053.
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M., and Nairn, A.V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 448-462.
- Moroni, F., Russi, P., Lombardi, G., Beni, M., and Carla, V. (1988). Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. *J Neurochem* 51, 177-180.
- Mueller, H.T., and Meador-Woodruff, J.H. (2004). NR3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder. *Schizophr Res* 71, 361-370.
- 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. *J Neurosci* 19, 7781-7792.
- Ondruskova, N., Honzik, T., Vondrackova, A., Tesarova, M., Zeman, J., and Hansikova, H. (2014). Glycogen storage disease-like phenotype with central nervous system involvement in a PGM1-CDG patient. *Neuro Endocrinol Lett* 35, 137-141.
- Pachernegg, S., Strutz-Seeböhm, N., and Hollmann, M. (2012). GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends Neurosci* 35, 240-249.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383-400.
- Patneau, D.K., and Mayer, M.L. (1990). Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci* 10, 2385-2399.
- Penn, A.C., Williams, S.R., and Greger, I.H. (2008). Gating motions underlie AMPA receptor secretion from the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 27, 3056-3068.

- Perez-Otano, I., Larsen, R.S., and Wesseling, J.F. (2016). Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 17, 623-635.
- Perez-Otano, I., Lujan, R., Tavalin, S.J., Plomann, M., Modregger, J., Liu, X.B., Jones, E.G., Heinemann, S.F., Lo, D.C., and Ehlers, M.D. (2006). Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nat Neurosci* 9, 611-621.
- 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. *J Neurosci* 21, 1228-1237.
- Petralia, R.S., Al-Hallaq, R.A., and Wenthold, R.J. (2009). Trafficking and Targeting of NMDA Receptors.
- Qiu, S., Zhang, X.M., Cao, J.Y., Yang, W., Yan, Y.G., Shan, L., Zheng, J., and Luo, J.H. (2009). An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-Methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 284, 20285-20298.
- Roche, K.W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M.D., and Wenthold, R.J. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* 4, 794-802.
- Rozeboom, A.M., Queenan, B.N., Partridge, J.G., Farnham, C., Wu, J.Y., Vicini, S., and Pak, D.T. (2015). Evidence for glycinergic GluN1/GluN3 NMDA receptors in hippocampal metaplasticity. *Neurobiol Learn Mem* 125, 265-273.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., and Roche, K.W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist* 19, 62-75.
- Schuler, T., Mesic, I., Madry, C., Bartholomaeus, I., and 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.
- Scott, D.B., Michailidis, I., Mu, Y., Logothetis, D., and Ehlers, M.D. (2004). Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J Neurosci* 24, 7096-7109.
- 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. *J Biol Chem* 287, 27432-27445.
- Shen, Y.C., Liao, D.L., Chen, J.Y., Wang, Y.C., Lai, I.C., Liou, Y.J., Chen, Y.J., Luu, S.U., and Chen, C.H. (2009). Exomic sequencing of the ionotropic glutamate receptor N-methyl-D-aspartate 3A gene (GRIN3A) reveals no association with schizophrenia. *Schizophr Res* 114, 25-32.
- Skrenkova, K., Lee, S., Lichnerova, K., Kaniakova, M., Hansikova, H., Zapotocky, M., Suh, Y.H., and Horak, M. (2018). N-Glycosylation Regulates the Trafficking and Surface Mobility of GluN3A-Containing NMDA Receptors. *Front Mol Neurosci* 11, 188.
- Smothers, C.T., and Woodward, J.J. (2009). Expression of glycine-activated diheteromeric NR1/NR3 receptors in human embryonic kidney 293 cells Is NR1 splice variant-dependent. *J Pharmacol Exp Ther* 331, 975-984.
- 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., 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. *J Neurochem* 70, 2434-2445.
- Swanger, S.A., Chen, W., Wells, G., Burger, P.B., Tankovic, A., Bhattacharya, S., Strong, K.L., Hu, C., Kusumoto, H., Zhang, J., *et al.* (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.

- Takata, A., Iwayama, Y., Fukuo, Y., Ikeda, M., Okochi, T., Maekawa, M., Toyota, T., Yamada, K., Hattori, E., Ohnishi, T., *et al.* (2013). A population-specific uncommon variant in GRIN3A associated with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 73, 532-539.
- Tokhtaeva, E., Sachs, G., and Vagin, O. (2009). Assembly with the Na,K-ATPase alpha(1) subunit is required for export of beta(1) and beta(2) subunits from the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 48, 11421-11431.
- 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 Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62, 405-496.
- Triller, A., and Choquet, D. (2008). New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron* 59, 359-374.
- Tucholski, J., Simmons, M.S., Pinner, A.L., Haroutunian, V., McCullumsmith, R.E., and Meador-Woodruff, J.H. (2013). Abnormal N-linked glycosylation of cortical AMPA receptor subunits in schizophrenia. *Schizophr Res* 146, 177-183.
- Vagin, O., Kraut, J.A., and Sachs, G. (2009). Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F459-469.
- Vesela, K., Honzik, T., Hansikova, H., Haeuptle, M.A., Semberova, J., Stranak, Z., Hennet, T., and Zeman, J. (2009). A new case of ALG8 deficiency (CDG 1h). *J Inherit Metab Dis* 32 Suppl 1.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Sudhof, T.C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035-1041.
- Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., and Wu, G. (2013). Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino Acids* 45, 463-477.
- Washbourne, P., Bennett, J.E., and McAllister, A.K. (2002). Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nat Neurosci* 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. *J Neurosci* 24, 8253-8264.
- Williams, K., Chao, J., Kashiwagi, K., Masuko, T., and Igarashi, K. (1996). Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by glycine: role of an aspartate residue in the M3-M4 loop of the NR1 subunit. *Mol Pharmacol* 50, 701-708.
- Yang, E.H., Rode, J., Howlader, M.A., Eckermann, M., Santos, J.T., Hernandez Armada, D., Zheng, R., Zou, C., and Cairo, C.W. (2017). Galectin-3 alters the lateral mobility and clustering of beta1-integrin receptors. *PLoS One* 12, e0184378.
- Yao, Y., and Mayer, M.L. (2006). Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *J Neurosci* 26, 4559-4566.
- Yavin, E., Richter-Landsberg, C., Duksin, D., and Yavin, Z. (1984). Tunicamycin blocks neuritogenesis and glucosamine labeling of gangliosides in developing cerebral neuron cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5638-5642.
- Yuan, T., Mamei, M., O'Connor, E.C., Dey, P.N., Verpelli, C., Sala, C., Perez-Otano, I., Luscher, C., and Bellone, C. (2013). Expression of cocaine-evoked synaptic plasticity by GluN3A-containing NMDA receptors. *Neuron* 80, 1025-1038.
- Zagyansky, Y., and Edidin, M. (1976). Lateral diffusion of concanavalin A receptors in the plasma membrane of mouse fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 433, 209-214.

9. List of publications

Publications in extenso, related to this thesis

5. **Kristyna Skrenkova**, Katarina Hemelikova, Marharyta Kolcheva, Stepan Kortus, Martina Kaniakova, Barbora Krausova , Martin Horak (2019) Structural features in the glycine-binding sites of the GluN1 and GluN3A subunits regulate the surface delivery of NMDA receptors. *Scientific reports* 9:12303.
IF = 4.5 (2018)
6. **Kristyna Skrenkova**, Sanghyeon Lee, Katarina Lichnerova, Martina Kaniakova, Hana Hansikova, Martin Zapotocky, Young Ho Suh, Martin Horak (2018). N-Glycosylation Regulates the Trafficking and Surface Mobility of GluN3A-Containing NMDA Receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11, 188.
IF = 3.7 (2018)
7. Martina Kaniakova, Katarina Lichnerova, **Kristyna Skrenkova**, Ladislav Vyklicky, Martin Horak (2016). Biochemical and electrophysiological characterization of N-glycans on NMDA receptor subunits. *Journal of Neurochemistry* 546–556.
IF = 4.1 (2016)
8. Lichnerova Katarina, Kaniakova Martina, Seung pyo Park, **Kristyna Skrenkova**, Ya-Xiang Wang, Ronald S. Petralia, Young Ho Suh, Martin Horak (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.
IF = 4.3 (2015)

Publications *in extenso*, unrelated to this thesis

1. Katarina Hemelikova (Lichnerova), Marharyta Kolcheva, **Kristyna Skrenkova**, Martina Kanikova, Martin Horak (2019). Lectins modulate the functional properties of GluN1/GluN3A – containing receptors. *Neuropharmacology* 157, 107671.
IF = 4.4 (2018)
2. Martina Kaniakova, Eugenie Nepovimova, Lenka Kleteckova, **Kristyna Skrenkova**, Kristina Holubova, Zofia Chrienova, Vendula Hepnarova, Tomas Kucera, Tereza Kobrlova, Karel Vales, Jan Korabecny, Ondrej Soukup, Martin Horak. (2019) Combination of Memantine and 6-Chlorotacrine as Novel Multi-Target Compound against Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 16:1.
IF= 3.2 (2018)
3. Martina Kaniakova, Lenka Kleteckova, Katarina Lichnerova, Kristina Holubova, **Kristyna Skrenkova**, Miloslav Korinek, Jan Krusek, Tereza Smejkalova, Jan Korabecny, Karel Vales, Ondrej Soukup, Martin Horak. (2018). 7-Methoxyderivative of tacrine is a 'foot-in-the-door' open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo. *Neuropharmacology* 15; 140:217-232.
IF= 4.3 (2018)
4. Vendula Sepsova, Jana Z. Karasova, Gunnar Tobin, Daniel Jun, Jan Korabecny, Pavla Cabelova, Katerina Janska, Jan Krusek, **Kristyna Skrenkova**, Kamil Kuca, Ondrej Soukup (2015). Cholinergic properties of new 7-methoxytacrine-donepezil derivatives. *General Physiology and Biophysics*, 34(2):189-200.
IF= 0.9 (2015)
5. Katarina Lichnerova, Martina Kaniakova, **Kristyna Skrenkova**, Ladislav Vyklicky, Martin Horak (2014). Distinct regions within the GluN2C subunit regulate the surface delivery of NMDA receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8, 375.
IF= 4.3 (2014)
6. Martina Kaniakova, **Kristyna Skrenkova**, Svatopluk Adamek, Frantisek Vyskocil, Jan Krusek (2014). Different effects of lobeline on neuronal and muscle nicotinic receptors. *European Journal of Pharmacology*, 738:352-9.
IF= 2.5 (2014)

10. Curriculum Vitae

Kristýna Skřenková

Education

- 2014 - present **Ph.D. program in Neuroscience - Animal Physiology,**
Charles University in Prague, Faculty of Science
Thesis: Molecular mechanisms of regulation of transport and function of different subtypes of NMDA receptors in hippocampal neurons
Supervisor: Martin Horák, Ph.D.
- 2012 - 2014 **Master of Science in Animal Physiology**
Charles University in Prague, Faculty of Science
Thesis: Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by tacrine and its derivatives
Supervisor RNDr. Jan Krůšek, CSc.
- 2009 - 2012 **Bachelor of Molecular biology and biochemistry of organisms**
Charles University in Prague, Faculty of Science
Thesis: Ionotropic glutamate receptors and excitotoxicity
Supervisor: prof. Ladislav Vyklický, DrSc.

Research training

- 2018 - present **Institute of Experimental medicine CAS**
Department of Neurochemistry
- 2011 - present **Institute of Physiology CAS**
Department of Cellular Neurophysiology

Laboratory skills - a hands-on technique

- Cultivation and transfection of heterologous cell lines
- Preparation and cultivation of primary hippocampal cultures
- Preparation of hippocampal slices
- Transfection and infection of hippocampal neurons
- Electrophysiology - patch clamp techniques (whole-cell on heterologous cell lines)
- Molecular biology - site direction mutagenesis, transformation of bacterial cells, isolation of plasmid DNA, cloning of DNA into a vector
- Immunofluorescence microscopy - surface and total labelling, colocalization and internalization essays.
- Live microscopy - surface mobility
- Biochemistry - SDP-PAGE

Completed courses

2019 - Applied improvisation (*Charles University, Faculty of Science*)

2018 - Advanced practical rhetoric and presentation (*Charles University, Faculty of Science*)

2018 - Processing and analysis of microscopic images in biomedicine (*Institute of Molecular Genetics, CAS*)

2018 - Time management (*Charles University, Faculty of Science*)

2018 - Scientific Writing (*Charles University, Faculty of Science*)

2017 - Scientific Presentations (*Charles University, Faculty of Science*)

2017 - Practical rhetoric and presentation (*Charles University, Faculty of Science*)

2015 - Course in the Fundamentals of Research Work Administered by CAS (*CAS*)

2014 - Microscopy methods in biomedicine (*Institute of Molecular Genetics, CAS*)