

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Denisa Fraňková

Vliv zinečnatých kationtů na ionotropní glutamátové receptory

The influence of zinc ions on ionotropic glutamate receptors

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Praha, 2015

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli, RNDr. Janu Krůškovi CSc., který mě dovedl od prvního písmenka v mé bakalářské práci až po to poslední s trpělivostí, vstřícností a úsměvem na tváři. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi, doc. RNDr. Jiřímu Novotnému DSc., který po celou dobu mého psaní dohlížel na to, abych splnila veškeré parametry bakalářské práce, které Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy vyžaduje. Velký dík též patří mému blízkému okolí, které mě po celou dobu psaní podporovalo a také kolegům z FGÚ AV ČR, kteří mě vzali mezi sebe a začali mě připravovat na budoucí práci vědce.

Prohlášení

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

V Praze 13. 5. 2015

.....

Denisa Fraňková

Abstrakt

Zinek je jedním z hojnějších divalentních kovových iontů v centrální nervové soustavě, kde funguje jako regulátor mnoha proteinů (kanály, receptory, pumpy...), neurosekreční produkt či kofaktor. Zde se zinek nejvíce koncentruje v synaptických váčcích specifických neuronů, které se nazývají zinek-obsahující neurony a jsou podmnožinou glutamátergních neuronů. Kumulace zinku v synaptických váčcích je zajišťována zejména transporterem ZnT3. Odhaduje se, že zinek v synaptických váčcích dosahuje koncentrace až 1 mmol/l a možná i vyšší. Zinek-obsahující neurony se nacházejí především v předním mozku, kde u savců tvoří komplex a neuronální síť, která propojuje většinu mozkové kůry a limbický systém (Frederickson et al. 2000).

Jakmile dojde ke stimulaci, zinek je ze synapsí uvolňován (Vogt et al. 2000) a následně ovlivňuje mnoho receptorů, mezi které patří i postsynaptické NMDA receptory (Koh & Choi 1994) a Ca²⁺ propustné AMPA i kainátové receptory (Hong Z. Yin 1995), napětově závislé Ca²⁺ kanály (Atar et al. 1995) a GABA_A receptory (Ruiz et al. 2004).

Tato bakalářské práce shrnuje efekt zinečnatých kationtů na ionotropní glutamátové receptory. Je zaměřena především na NMDA receptory, které jsou Zn²⁺ ovlivněny nejvíce. První kapitola je věnována struktuře ionotropních glutamátových receptorů, na kterou pak navazují kapitoly další, které již přímo pojednávají o účinku zinečnatých kationtů na jednotlivé receptory a jejich podtypy.

Klíčová slova: glutamát, NMDA, AMPA, kainát, Zn²⁺

Abstract

Zinc is one of the most abundant divalent metal ion in the central nervous system, where it serves as regulator of many proteins (channels, receptors, pump...), product of neurosecretion or cofactor. The highest concentration of zinc in synaptic vesicles of the specific neurons, which are called zinc-containing neurons and it is subset of glutamatergic neurons. The cumulation of zinc in the synaptic neurons is arranged mostly by transporter ZnT3. A concentration of zinc in the synaptic's vesicles is about 1mmol/l and maybe higher. The zinc-containing neurons are mostly in forebrain, where create complex and neuronal network in mammalian's brain, which conect most of cerebral cortex and limbic system (Frederickson et al. 2000).

Zinc is released from synapses after a stimulation (Vogt et al. 2000) and then it affects a lot of receptors, for example postsynaptic NMDA receptors (Koh & Choi 1994) and Ca²⁺ permeable AMPA and kainate receptors (Hong Z. Yin 1995), voltage-gated Ca²⁺ channels (Atar et al. 1995) and GABA_A receptors (Ruiz et al. 2004).

This bachelor thesis summarizes the efekt Zn²⁺ on the ionotropic glutamate receptors. It is mostly adressed on the NMDA receptors, which are the most affected by zinc. The first chapter is about structure of ionotropic glutamate receptors, which is followed up other chapters, which are about zinc's effects on individual receptors and it's subtype.

Keywords: glutamate, NMDA, AMPA, kainate, Zn²⁺

Seznam zkratek

Å = angstrom; jednotka délky; $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$

AMPA = α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina

Asp = kyselina asparagová

ATD = amino-terminální doména

CTD = C-terminální doména

DEPC = diethyl pyrokarbonát

EC₅₀ = koncentrace agonisty, při které má odpověď amplitudu 50 % maximální amplitudy

GABA = γ -aminomáselná kyselina

Gln = glutamin

Glu = kyselina glutamová

His = histidin

IC₅₀ = koncentrace antagonisty, při které má odpověď amplitudu 50 % kontrolní amplitudy

iGluR = ionotropní glutamátový receptor

iGluRs = ionotropní glutamátové receptory

Ile = izoleucin

LBD = ligand-vázající doména

Leu = leucin

NMDA = *N*-methyl D-aspartát

NMDAR = NMDA receptor

NN = napětově nezávislá

NZ = napětově závislá

Phe = fenylalanin

Thr = threonin

TMD = transmembránová doména

Tyr = tyrosin

Obsah

1	Úvod	1
2	Struktura ionotropních glutamátových receptorů	3
3	Vliv Zn^{2+} na ionotropní glutamátové receptory.....	7
3.1	Obecně o zinečnatých kationtech	7
3.2	Zn^{2+} a NMDA receptory	7
3.2.1	GluN1 podjednotka	8
3.2.2	GluN1/GluN2 NMDA receptory	8
3.2.3	GluN1/GluN3 NMDA receptory	13
3.3	Zn^{2+} a AMPA + kainátové receptory	15
3.3.1	Kainátové receptory	15
3.3.2	AMPA receptory	19
4	Diskuze a závěr	23
5	Seznam literatury	25
5.1	Literární zdroje	25
5.2	Internetové zdroje.....	29

1 Úvod

Glutamátové receptory dělíme na *ionotropní* a *metabotropní* (Partin et al. 1993). Metabotropní glutamátové receptory jsou spojeny se signalizací s G-proteiny. Charakteristická je pro ně velká transmembránová část, která se skládá ze sedmi helixů protínajících membránu (Bockaert & Pin 1999) a rozlehlá N-terminální extracelulární doména vázající glutamát (O'Hara et al. 1993). Iontropní glutamátové receptory jsou naopak typické svou tetramerní organizací a jejich struktura je rozebrána v následující kapitole.

Ve své práci se zabývám ionotropními typy receptorů, mezi které patří *AMPA*, *NMDA*, *kainátové* (nazývané podle selektivních agonistů) a δ *receptory* (Partin et al. 1993). Jedná se o receptory, které přenášejí elektrický signál přes membránu (Kemp & McKernan 2002). Vliv zinku je nejlépe prozkoumán na NMDA receptorech, a proto se jimi ve své práci zabývám nejvíce. Ostatní ionotropní glutamátové receptory jsou označovány jako non-NMDA, přičemž toto označení ve většině článků znamená pouze AMPA a kainátové receptory, neboť o δ receptorech toho zatím není moc známo.

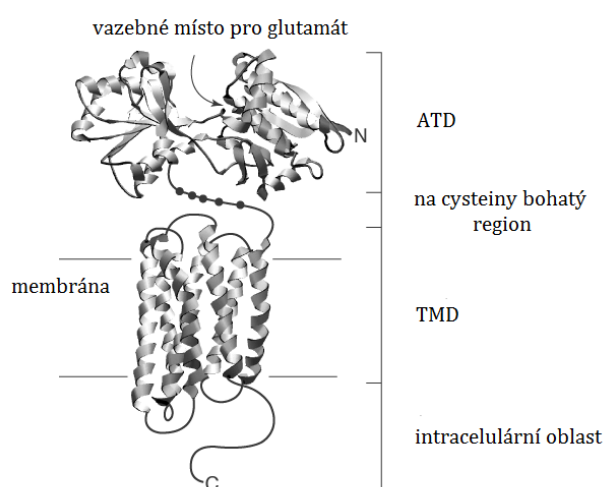
NMDA receptory se hojně vyskytují v mozcích savců a jsou stěžejní pro normální funkci centrální nervové soustavy. Vyznačují se velmi dobrou propustností pro vápník a silnou napěťovou závislostí prostřednictvím hořčkové blokády, která je odstraňována depolarizací. Ke své aktivaci potřebují glutamát i glycin, přičemž glutamát funguje jako neurotransmitter vylučovaný z presynaptických zakončení a glycin jako modulátor nacházející se v extracelulární tekutině (Kemp & McKernan 2002). Výjimkou jsou NMDA receptory zahrnující GluN1 ve spojení s GluN3 podjednotkami, k jejichž aktivaci postačuje glycin (Chatterton et al. 2002). Nově bylo zjištěno, že se GluN1/GluN3A receptory aktivují glycinem společně s Zn^{2+} (Madry et al. 2008).

NMDA receptory jsou též charakteristické tím, že se pomalu otevírají i deaktivují (Furukawa et al. 2005). V dnešní době jsou hodně zkoumány hned z několika důvodů. Jednak proto, že se podílejí na dlouhotrvající synaptické plasticitě, což je základní mechanismus pro učení a paměť. A také, protože při nadbytku glutamátu, např. během cerebrální ischemie či epilepsie, dochází k jejich přílišné aktivaci, a to podporuje neuronální smrt (Kemp & McKernan 2002). Dysfunkce NMDA receptoru je taktéž nebezpečná, neboť může vést například ke schizofrenii (Cull-Candy et al. 2001).

Na glutamátové receptory má vliv mnoho kationtů, ať už se jedná o jejich inaktivaci, disociaci agonisty či napětově závislou blokádu. Ve své práci se budu zabývat zinečnatými kationty, které se vyskytují především v excitačních zakončeních v mozku (Peters et al. 1987). O roli zinku v synaptickém přenosu v souvislosti s glutamátovými receptory se uvažuje z hlediska tří mechanismů. Zinek reaguje s receptory pro glutamát v *synaptické štěrbině*, dále by mohl reagovat s glutamátem *přímo v synaptickém měchýřku* a není možné vyloučit *pronikání zinku do postsynaptického neuronu* otevřenými iontovými kanály. Potom by zinek působil intracelulárně. Pro interakci zinku přímo v synaptickém měchýřku nejsou žádné přímé důkazy, stejně jako pro roli zinku pronikajícího do neuronů (Frederickson et al., 2000). Také se může stát, že při otevření pro zinečnaté kationty propustného kanálu projdou Zn^{2+} až do postsynaptické buňky, kde mohou ovlivňovat signální dráhu, případně se dostat až do jádra a regulovat tak transkripci (Vogt et al. 2000).

NMDA receptory jsou zinkem především inhibovány, dokonce ze všech ionotropních glutamátových receptorů jsou nativní (Peters et al. 1987) a rekombinantní GluN1/GluN2 NMDA receptory (Keith Williamms 1996) inhibovány nejsilněji. Kainátové receptory jsou zinkem také především inhibovány (Mott et al. 2008; Veran et al. 2012). Oproti tomu AMPA receptory jsou zinkem spíše potencovány a jen v menší míře inhibovány (Dreixler & Leonard 1994).

Obrázek č. 1: Struktura metabotropního glutamátového receptoru



Převzato a upraveno z

<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=40>

2 Struktura ionotropních glutamátových receptorů

Ionotropní glutamátové receptory se dělí podle selektivních agonistů na *NMDA receptory* a *non-NMDA receptory*, přičemž NMDA receptory se skládají do heterotetramerů, zatímco non-NMDA mohou fungovat i jako homotetramery. Non-NMDA receptory jsou aktivovány pouze L-glutamátem, oproti NMDA, které potřebují k aktivaci glutamát i glycin/D-serin (kromě již zmíněné výjimky o podjednotkovém složení GluN1 a GluN3) (Mayer et al. 1984).

AMPA receptory se skládají z podjednotek GluA1-GluA4, které mohou tvořit jak homomery tak heteromery (Partin et al. 1993).

Kainátové receptory jsou tvořené podjednotkami GluK1-GluK5. Podjednotky GluK1-GluK3 tvoří homomery i heteromery. Naproti tomu podjednotky GluK4 a GluK5 tvoří funkční receptory pouze v případě, kdy dochází ke společné expresi s GluK1-GluK3 (Partin et al. 1993).

δ *receptory* se skládají z podjednotek GluD1 a GluD2. U těchto podjednotek je zatím prokázána pouze tvorba homomerů (Traynelis et al. 2010).

NMDA receptory jsou složeny z podjednotek GluN1, GluN2A-GluN2D, GluN3A a GluN3B (Traynelis et al. 2010). Receptor se ale vždy musí skládat ze dvou GluN1 podjednotek, které jsou pak spojeny buď se dvěma GluN2, nebo s GluN2 a GluN3 podjednotkami. (Monyer et al. 1992).

GluN1 a GluN2A se vyskytují v celém mozku, kdežto podjednotky GluN2B pouze v předním mozku, GluN2C v mozečku a podjednotka GluN2D je nejvíce vzácná (Kemp & McKernan 2002).

Poslední model o skládání NMDA receptoru předpokládá, že se nejprve složí heterodimer GluN1-GluN2 a následně pak dochází k tetramerizaci (Schüler et al. 2008).

Všechny ionotropní glutamátové receptory jsou složeny z několika domén s mnoha různými funkcemi (Kuusinen et al. 1995). *Amino-terminální doména* (ATD) a *ligand-vázající doména* (LBD) tvoří společně extracelulární část všech ionotropních glutamátových receptorů a vykazují dvojčetnou symetrii (Sobolevsky et al. 2009). LBD tvoří vazebná místa pro agonisty a antagonisty (Karakas & Furukawa 2014) - v případě AMPA a kainátových receptorů se jedná pouze o jednoho agonistu, kterým je L-glutamát

(Mayer et al. 1984; Kemp & McKernan 2002). LBD se dále dělí na části S1 a S2 a její uspořádání a interakce jsou mezi NMDA, AMPA a kainátovými receptory konzervované, což znamená, že i mechanismus jejich otevírání a zavírání je pravděpodobně podobný (Furukawa et al. 2005). Nicméně interakce ATD s LBD jsou odlišné. NMDA receptory mají pevnější sbalení, a proto zde ATD funguje jako regulátor aktivity kanálu, zatímco u AMPA a kainátových receptorů tomu tak není (Yuan et al. 2009). Konkrétně oblast kontaktu ATD k LBD v NMDA receptoru je o ploše $3\,107\text{ \AA}^2$, kdežto u AMPA receptorů dosahuje pouhých $1\,470\text{ \AA}^2$ (Karakas & Furukawa 2014). Jiní se zase domnívají (Karakas et al. 2009), že je to díky hydrofobnímu místu v R2 části ATD domény GluN2B podjednotky.

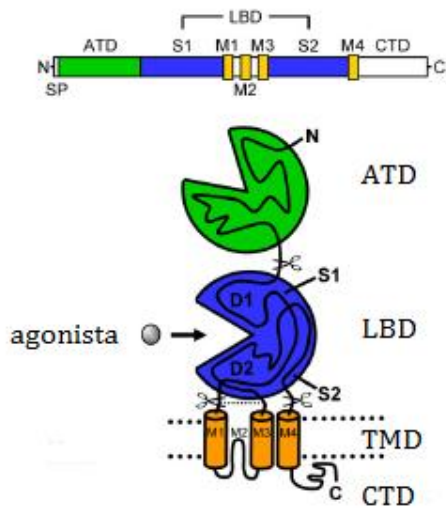
Na extracelulární část receptorů navazuje *transmembránová doména* (TMD), která zastává v receptoru funkci vlastního iontového kanálu (Karakas & Furukawa 2014). U všech iGluRs má čtyřčetnou symetrii (Sobolevsky et al. 2009). Tato doména je u každé podjednotky tvořena čtyřmi M helixy. Interakce těchto helixů v heterotetramerních NMDA receptorech (konkrétně GluN1a-GluN2B) jsou podobné jako u homomerních GluA2 AMPA receptorů. (Karakas & Furukawa 2014)

Na TMD navazuje *karboxylová terminální doména* (CTD), která zprostředkovává komunikaci s cytoskeletem a ukotvuje receptor na správném místě například v postsynaptické membráně (Karakas & Furukawa 2014).

Aktivace iGluR nastává po navázání agonisty do LBD, což způsobí zavření vazebného místa škeblovitého tvaru a změnu konformace TMD, a tím dochází k otevření iontového kanálu (Sobolevsky et al. 2009).

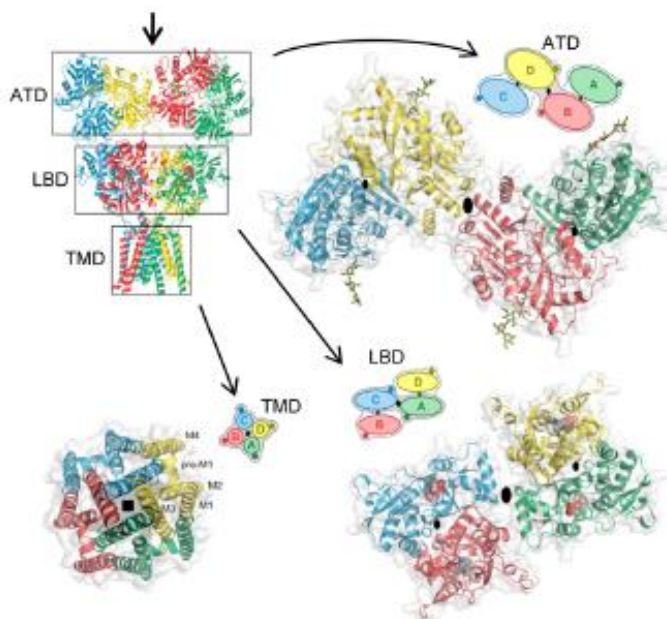
Obrázek č. 2: Domény glutamátových receptorů

SP = signální peptid



(Traynelis et al. 2010)

Obrázek č. 3: dvojčetná symetrie ATD a LBD a čtyřčetná symetrie TMD GluA2 AMPA receptoru



(Traynelis et al. 2010), který ho převzal a upravil od (Sobolevsky et al. 2009)

Obrázek č. 4: Porovnání struktur GluN1 α /GluN2B a GluA2; především rozdílnost vazby mezi ATD a LBD

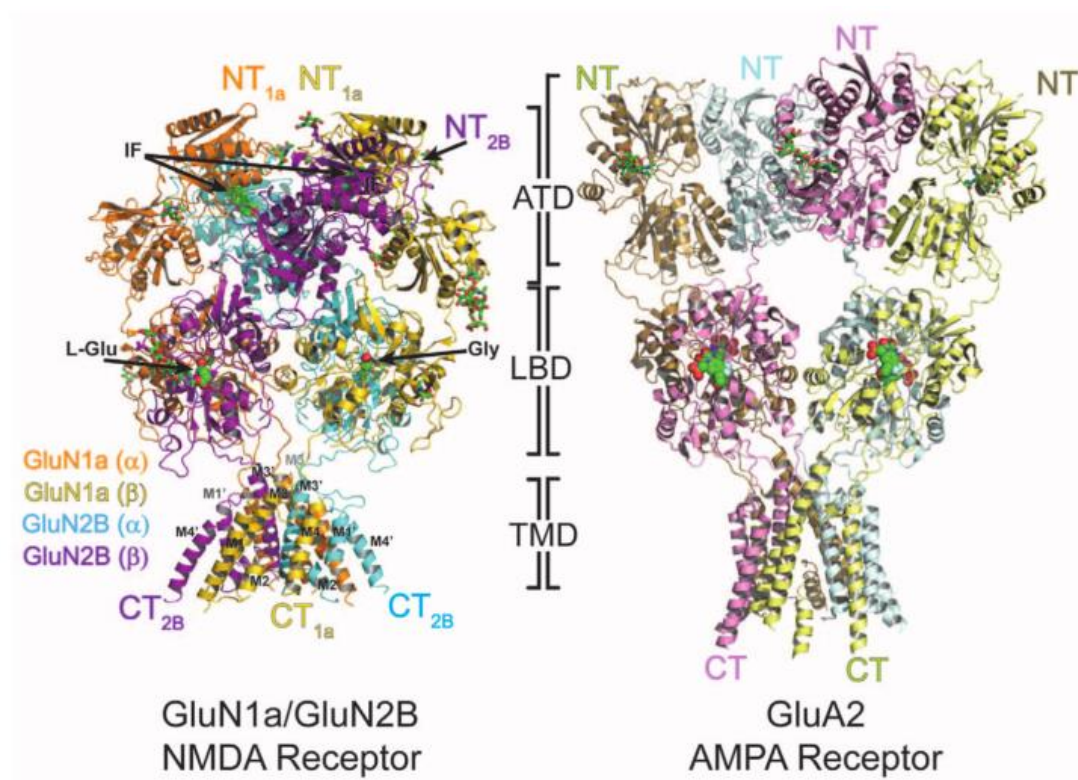
IF = ifenprodil

L-Glu = *L*-glutamát

Gly = glycin

NT = *N*-konec (amino-konec)

CT = *C*-konec (karboxy-konec)



(Karakas & Furukawa 2014), který ho převzal a upravil z Protein Data Bank

3 Vliv Zn^{2+} na ionotropní glutamátové receptory

3.1 Obecně o zinečnatých kationtech

Přítomnost zinku byla prokázána v hipokampu, striatu, amygdale, neokortexu a kortexu ve váčcích synaptických zakončení axonů (Pérez-Clausell & Danscher 1985). Tímto způsobem může být zinek při neuronální aktivitě ze synaptických váčků vypuštěn do synaptické štěrbině společně s glutamátem. Zinek se pak naváže do specifického vazebného místa na glutamátovém receptoru, které je tvořeno nejčastěji čtyřmi ligandy, z nichž tři jsou aminokyseliny zahrnující čteně histidin, cystein, aspartátové nebo glutamátové zbytky a čtvrtým ligandem je voda (Falchuk, H 1993).

Zinečnaté kationty silně ovlivňují neuronální synaptický přenos, neboť inhibují NMDA receptory na postsynaptických zakončeních a kainátové receptory jak na presynaptických (Fukushima et al. 2003), tak i na postsynaptických zakončeních (Mott et al. 2008).

3.2 Zn^{2+} a NMDA receptory

V dospělém mozku se nejčastěji vyskytují NMDA receptory složené z GluN2A či GluN2B podjednotek a jelikož zinek působí právě na tyto dvě podjednotky nejvíce, je považován za hlavního alosterického regulátora NMDA receptorů (Rachline & Perin-Dureau 2005).

Zinek působí na NMDA receptory především jako nekompetitivní antagonist. To znamená, že jeho působení zůstává stejné i v případě, že se mění koncentrace NMDA nebo glycinu (Mayer et al. 1989).

Zinečnaté kationty způsobují na NMDA receptorech hned dva typy inhibic. Jedná se o *napětově závislou (NZ)* a *napětově nezávislou (NN)* inhibici (Mayer et al. 1989). Napětová závislost inhibice se projevuje tím, že je míra inhibice na záporných hodnotách membránového potenciálu větší. I hodnota IC_{50} závisí na napětí a je nižší na záporných potenciálech. To znamená, že je při kladných potenciálech NN inhibice oslabena, zatímco NN inhibice funguje ve stejné míře jak na záporných tak na kladných potenciálech. NZ inhibice se zkoumá proto, aby se zjistilo, na jaké místo se zinek váže. Pokud totiž zinek NZ inhibici způsobuje, znamená to, že se váže přímo v póru, kde probíhá spád transmembránového elektrického pole. Díky tomu nemusí být NN inhibice ovlivněna mutacemi na jiných oblastech receptoru (Vogt et al. 2000; Mott et al. 2008).

Zinečnaté kationty inhibují závisle na napětí jen slabě a dělají to prostřednictvím blokády kanálu, čímž připomínají blokádu hořčíkem, která je ale intenzivnější. Nejspíš je to způsobené lepší propustností kanálu pro Zn^{2+} než Mg^{2+} . Při této inhibici je zinek vázán s nižší afinitou, než při NN inhibici. Díky tomu se předpokládá, že jsou NMDA receptory zinkem inhibovány především nezávisle na napětí, což se projevuje snížením frekvence otevírání kanálu (Paoletti et al. 1997; Mayer et al. 1989; Vogt et al. 2000).

3.2.1 GluN1 podjednotka

Zjistilo se, že k vysokoafinitní Zn^{2+} inhibici u GluN1/GluN2 receptorů jsou zapotřebí aminoterminální domény GluN2, ale i GluN1 podjednotek. ATD GluN1 podjednotek dokonce neovlivňují jen modulaci zinkem, ale například i ifenprodilem. Z toho vyplývá, že ATD u GluN1 i GluN2 podjednotek jsou nezbytné pro alosterickou modulaci. Nicméně na skládání receptoru a jeho funkčnost pravděpodobně nemají vliv (Madry et al. 2007).

GluN1 ovlivňuje citlivost k zinku při NN inhibici svým sestřihem. Pokud obsahuje exon 5, zvýší se IC_{50} pro extracelulární zinek, což znamená, že je daný GluN1-1/GluN2 k Zn^{2+} receptor méně citlivý (Paoletti et al. 1997). Tímto způsobem to funguje u receptorů s podjednotkami GluN2A a GluN2B. Pokud NMDA receptor obsahuje podjednotky GluN2C či GluN2D, je vliv exonu 5 velmi malý (Traynelis et al. 1998). Exon 5 se v GluN1 podjednotkách vyskytuje například v hipokampálních CA3 oblastech, kde snižuje citlivost neuronů na přetrvávající koncentraci zinku i na zinek uvolňovaný z váčků (Traynelis et al. 1998).

Podobný efekt jako na Zn^{2+} má exon 5 také na protonovou inhibici. Z toho lze usuzovat, že vysokoafinitní inhibice Zn^{2+} sdílí některé strukturní vlastnosti s protonovou inhibicí (Traynelis et al. 1998). Autoři také poukazují na fakt, že NMDA receptory, které jsou částečně inhibovány protony, jsou také citlivé k zinku a naopak a že při poklesu citlivosti k protonům, klesá i citlivost k Zn^{2+} .

3.2.2 GluN1/GluN2 NMDA receptory

NZ blokáda u rekombinantních GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů je podobná a odehrává se při koncentracích zinečnatých kationtů řádově desítky μM . NN inhibice se ale u těchto receptorů liší. GluN1/GluN2A receptory mají pro NN inhibici Zn^{2+} vyšší afinitu, takže se IC_{50} pro zinek v tomto případě pohybuje v nanomolárním rozsahu, zatímco IC_{50} receptoru GluN1/GluN2B se pohybuje v rozsahu mikromolárním. Pak tedy nastává situace, kdy při mikromolární koncentraci Zn^{2+} dochází u receptorů

GluN1/GluN2B jak k inhibici NN tak NZ. Jelikož je ale NZ nízkoafinitní, může být lehce maskována vysokoafinitní NN inhibicí. U GluN1/GluN2A receptorů dochází při určitých koncentracích k nasycení Zn^{2+} GluN2A podjednotkou a poté už ke zvyšování inhibice nedochází. Je tedy zřejmé, že zde k maskování nedochází, protože NZ začíná působit až při plató fázi NN inhibice, která je vidět na obrázku číslo 6 (Keith Williamms 1996; Choi & Lipton 1999). Pakliže NMDA receptor obsahuje jen jednu GluN2A podjednotku, kterou kombinuje s GluN2B, GluN2C, či GluN2D, pak takovému receptoru zůstává vysoká afinita k Zn^{2+} , která je typická pro GluN2A podjednotku, ale výsledná inhibice má menší účinnost (Hatton & Paoletti 2005).

Vyšší afinitu GluN1/GluN2A způsobují mimo jiné i dva histidinové zbytky (His42 a His44) nacházející se ve štěrbině ATD domény **GluN2A** podjednotky, které zde koordinují vysokoafinitní vazbu Zn^{2+} . Pokud provedeme jejich mutaci v extracelulární N-terminální doméně GluN2A, posune se IC_{50} pro vysokoafinitní inhibici zinečnatými kationty 200× bez ovlivnění EC_{50} koagonisty NMDA a glycinu, a tím se zruší inhibice způsobená stopovým množstvím Zn^{2+} přítomna u přirozeného typu GluN1-1a/GluN2A receptorů. NZ blokáda se při těchto mutacích nemění. V roce 1999 tedy bylo zřejmé, že histidinové zbytky H42 a His44 na GluN2A podjednotce jsou hlavním molekulárním znakem vysokoafinitní NN inhibice rekombinantních receptorů GluN1-1a/GluN2A. (Choi & Lipton 1999). V roce 2005 byla tato informace rozšířena o další poznatky, kdy (Rachline & Perin-Dureau 2005) popisují dva hlavní rozdíly v inhibici zinkem mezi receptory zahrnující GluN2A a GluN2B podjednotku. Jako první zmiňují *rozdílnou citlivost k zinku*, kterou přisuzují jeho odlišné geometrické koordinaci ve vazebných místech. Také zmiňují fakt, že se u těchto dvou podjednotek liší *rovnováha mezi otevřenou/zavřenou konformací štěrbin v ATD*. Jako druhý rozdíl uvádějí *závislost na pH*, kdy u GluN1/GluN2A byla prokázána silná interakce mezi protony a zinkem, která působí tak, že je v kyselém pH inhibice zinkem mnohem účinnější. Oproti tomu receptory GluN1/GluN2B prostřednictvím pH nejspíš ovlivněny nejsou, na což poukázal již (Traynelis et al. 1998). Vzhledem k rozporu je možné, že při vyšší koncentraci zinku (15 μM) dochází k NN inhibici díky vazebnému místu pro zinek v ATD na GluN2B, a tím je maskován podíl nízkoafinitní GluN2 ATD-nezávislé inhibice zinkem (Rachline & Perin-Dureau 2005).

Blíže se inhibicí zinečnatými kationty v souvislosti s protonovou inhibicí zabývali Erreger s Traynelisem. Při měření jednotlivých kanálů zjistili, že ve chvíli, kdy je GluN1/GluN2A receptor inhibován zinkem, se zvyšuje citlivost k protonům. Je tedy pravděpodobné, že inhibice GluN1/GluN2A receptoru submikromolární koncentrací extracelulárního Zn^{2+} je podobná inhibici prostřednictvím protonů. Prokázali, že obě tyto inhibice snižují průměrné doby otevření kanálu, a zároveň pravděpodobnost jeho otevření. Nicméně neovlivňují vodivost jednotlivých kanálů (Erreger & Traynelis 2008). Protony jsou tedy také alosterickými modulátory NMDA. Porovnáním těchto dvou inhibic se dále zabývá článek (Gielen et al. 2009).

Novější poznatky o vazbě zinku při vysokoafinitní inhibici byly objeveny prostřednictvím analýzy modelu založené na krystalografických datech. Více je tato problematika rozebrána na straně 11 této práce.

Vysokoafinitní NN inhibici GluN-1a/GluN2A receptorů zinečnatými kationty blokuje diethyl pyrokarbonát (DEPC), pomocí modifikace histidinů, na které se zinečnaté kationty vážou. Je pravděpodobné, že DEPC soupeří s Zn^{2+} o stejná histidinová místa (Choi & Lipton 1999).

Vazebné místo pro zinečnaté kationty na **GluN2B** podjednotce se nachází také ve škeblovitém útvaru amino-terminální domény. ATD GluN2B podjednotky se skládá klasicky z částí R1 a R2, které spolu vytvářejí typickou škeblovitou strukturu. Ve štěrbině této škeblovitě struktury se nacházejí tři regiony. *Hydrofilní region* zahrnuje polární zbytky jako např. His127 a Glu284, které jsou součástí vazebného místa pro zinek. *Hydrofobní region* zahrnuje hydrofobní zbytky jako např. Ile133, Ile150, Phe176, Tyr231 a Leu261, které zajišťují citlivost k ifenprodilu. Mezi hydrofilním a hydrofobním regionem se nachází *vazebná strana pro ionty*, která zahrnuje zbytky jako např. Ser131, Phe146 a Gln153 a zajišťuje místo pro Na a Cl ionty. Zbytky v této části struktury škeblovitěho tvaru kontrolují její otvírání a zavírání a samotnou aktivitu kanálu (Karakas et al. 2009).

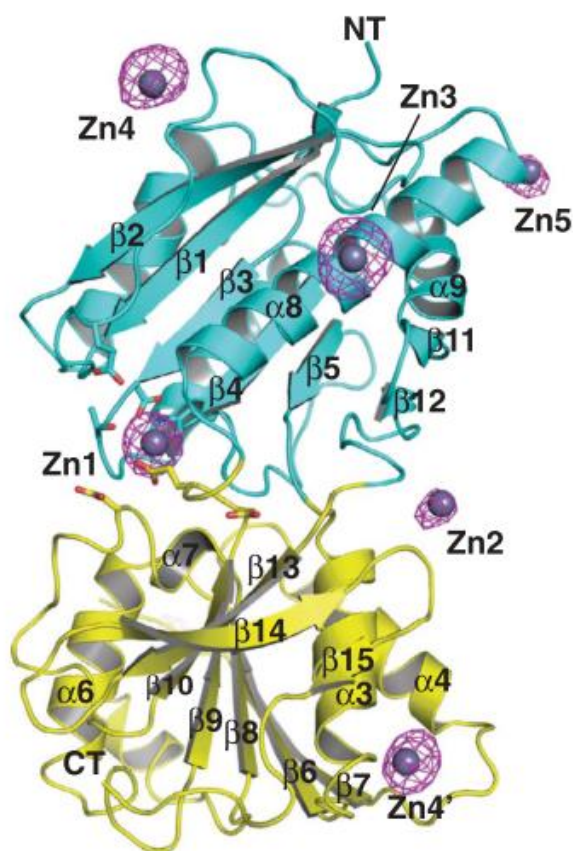
Na ATD doméně GluN2B podjednotky bylo na základě analýzy krystalu identifikováno 5 potenciálních vazebných míst pro zinek ($Zn1 - 5$). $Zn1$ se nachází v hydrofilním regionu štěrbině struktury o škeblovitě tvaru, kde jsou zbytky související s citlivostí pro zinek. Dále je v těsném kontaktu s polárními zbytky His127 (R1 část) a Glu284 (R2),

které stabilizují strukturu škeblovitého tvaru v zavřeném stavu. Velmi důležité jsou též zbytky Asp101 a Thr103, které zajišťují stavbu Zn1 a vůbec celé ATD GluN2B podjednotky (Karakas et al. 2009) a ovlivňují citlivost k zinku i ifenprodilu (Rachline & Perin-Dureau 2005). Zn2, Zn3 a Zn5 jsou lokalizovány na proteinovém rozhraní a pravděpodobně nehrají stěžejní roli při inhibici receptoru zinkem, protože při mutacích v těchto vazebných místech nedochází k žádným velkým změnám co do citlivosti k zinku. Vazebné místo Zn4 bylo identifikováno krystalograficky, nicméně se předpokládá, že za fyziologických podmínek se na inhibici zinkem také neúčastní (Karakas et al. 2009).

Obrázek č. 5: Krystalová struktura ATD GluN2B podjednotky s vyznačenými vazebnými místy pro zinek

NT = N-konec (amino-konec)

CT = C-konec (karboxy-konec)

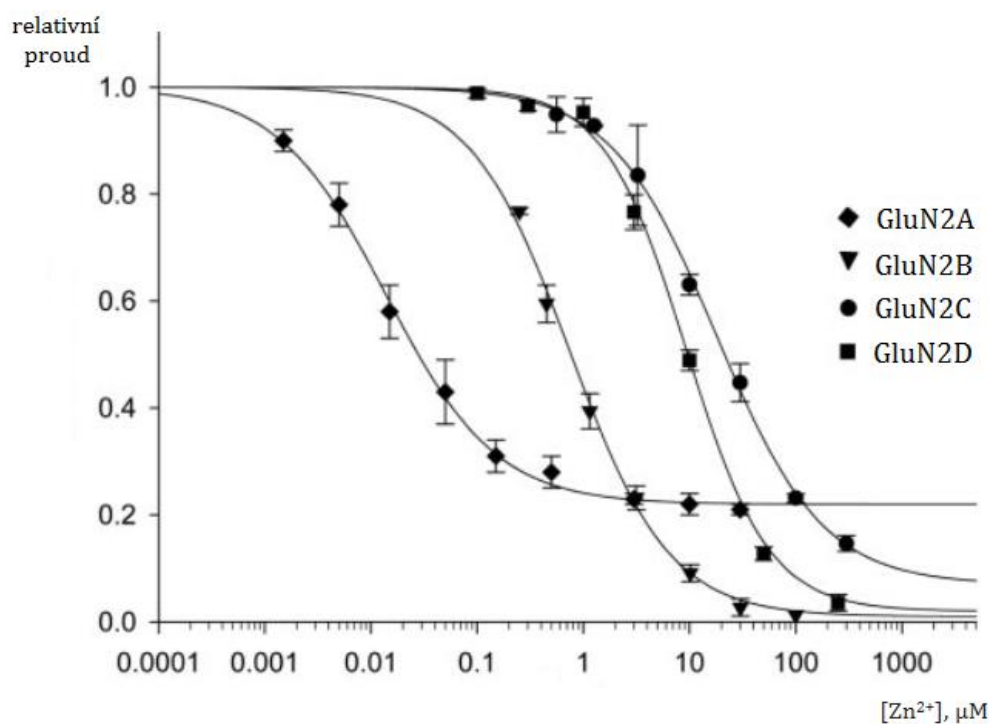


(Karakas et al. 2009)

Podle (Karakas et al. 2009) je Zn1 vazebné místo zodpovědné za NN inhibici zinkem a dále předpokládá, že je toto vazebné místo a jeho okolí na GluN2B podobné jako na GluN2A, neboť jsou jejich ATD z 56 % identické. Jejich IC_{50} k Zn^{2+} při NN inhibici se ale velmi liší. Hledali tedy odlišnosti v ATD mezi podjednotkami. Největší rozdíl je ve smyčce $\beta 1$ vlákna, která v případě GluN2B mimo jiné obsahuje Glu47, kdežto v GluN2A podjednotce se na stejném místě nachází mimo jiné His42 a His44, na které poukazyval již (Choi & Lipton 1999). Tyto histidinové zbytky výrazně ovlivňují citlivost k zinku (Fayyazuddin et al. 2000) a napomáhají stabilizaci struktury škeblovitého tvaru společně s His 128 (His127 v GluN2B) a Asp283 (Glu284 v GluN2B). Karakas a kolektiv tedy upřesnili myšlenku (Choi & Lipton 1999) a domnívají se, že již zmíněná velká odlišnost v NN inhibici mezi GluN2A a GluN2B je způsobena množstvím přímých koordinátorů, kde v GluN2A jsou hned čtyři, na rozdíl od GluN2B, která má pouze dva přímé koordinátory.

Co se týče ATD u podjednotek GluN2C a GluN2D, tak v porovnání s GluN2B je u nich konzervován Asp101 (jako Asp110 u GluN2C a Asp116 u GluN2D) a v případě GluN2D podjednotky i His127 (jako His142). Nicméně z pokusů na ATD, které byly následně provedeny na různých GluN2 podjednotkách, je patrné, že v případě GluN2D podjednotky nemá delece ATD na citlivost k zinku skoro žádný vliv. Naopak při delecí ATD na GluN2A podjednotce vzrostlo IC_{50} pro zinek 750 \times . Poté následovaly další pokusy, které jednoznačně prokázaly, že amino-terminální domény u GluN2C a GluN2D nevytváří vazebné místo pro zinek při vysokoafinitní inhibici. Oproti tomu se vazebná místa pro nízkoafinitní inhibici zinkem, NN a GluN2 ATD-nezávislou inhibici nachází na všech typech NMDA receptorů zahrnujících GluN2 podjednotku (Rachline & Perin-Dureau 2005).

Obrázek č. 6: Citlivost k zinku u NMDA receptorů vzhledem k GluN2 podjednotce



Převzato a upraveno z (Rachline & Perin-Dureau 2005)

3.2.3 GluN1/GluN3 NMDA receptory

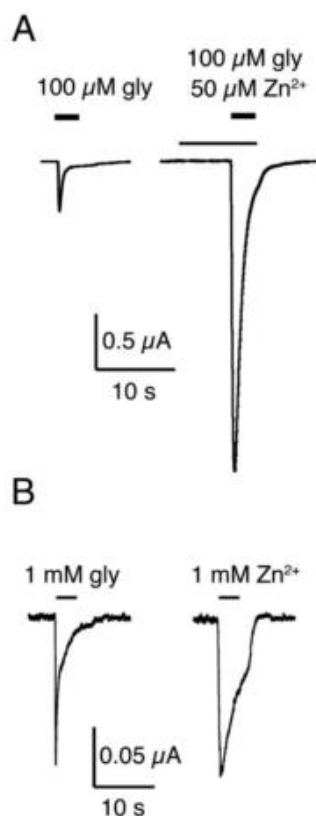
Již v roce 2002 bylo zřejmé, že se GluN1/GluN3 receptory aktivují glycinem (Chatterton et al. 2002). Nicméně novější studie (Madry et al. 2008) poukazuje na fakt, že i Zn^{2+} mají při aktivaci těchto receptorů velký význam. Nejprve zjistili, že pokud se některý z antagonistů naváže do vazebného místa na GluN1 podjednotce, způsobí to zvýšení odpovědi GluN1/GluN3 receptorů (Madry et al. 2007). Pravděpodobně se tak stane díky tomu, že daný antagonist brání silné desensitizaci, která by nastala, kdyby se na GluN1 podjednotku navázal glycin. Poté se zaměřili na vazebná místa pro glycin a Zn^{2+} a došli k závěru, že se glycin a Zn^{2+} vážou každý do svého vazebného místa. Pro Zn^{2+} je vazebné místo v LBD na GluN1 podjednotce a pro glycin v LBD na GluN3A podjednotce (Madry et al. 2008).

Z dalších pokusů vzešlo, že je glycin sám o sobě schopen GluN1/GluN3A receptor aktivovat a že Zn^{2+} mají na tyto receptory hned dvojitý efekt. Pokud je koncentrace zinku nízká (μM), funguje pouze jako potencující regulátor glycinem indukovaných GluN1/GluN3A proudů. Pokud je ale jejich koncentrace vyšší, je naprosto dostačující pro aktivaci rekombinantního GluN1/GluN3A a stává se tak agonistou.

Obrázek č. 7: Duální efekt Zn^{2+} na GluN1/GluN3A receptorech

A – zinek jako modulátor; ke 100 μM glycinu přidali 50 μM Zn^{2+} , což způsobilo potenciaci glycinem indukovaných GluN1/GluN3A proudů

B – zinek jako agonista; jak glycin tak Zn^{2+} v milimolárním rozsahu sami o sobě aktivovaly GluN1/GluN3A receptor



(Madry et al. 2008)

Mechanismem duálního efektu Zn^{2+} na GluN1/GluN3A ještě není znám. Nicméně se nabízejí hned dvě varianty, které by mohly vysvětlit tento jev. Je možné, že pokud se v rámci tetrameru naváže zinek jen na jednu LBD, způsobí potenciaci, ale pokud se naváže na obě LBD GluN1 homodimeru, způsobí aktivaci. Druhou možností by bylo, kdyby na každé z obou LBD byla 2 vazebná místa pro zinek (Madry et al. 2008).

Ačkoliv glycin i Zn^{2+} mohou sami o sobě aktivovat GluN1/GluN3A receptor, pro efektivní funkčnost kanálu je zapotřebí obojí (Madry et al. 2008).

3.3 Zn²⁺ a AMPA + kainátové receptory

Zinek je také součástí synaptických zakončení v retině (Wu et al. 1993), kde reguluje AMPA a kainátové receptory a ovlivňuje tak excitační synaptický přenos (Kreitzer et al. 2009). V závislosti na jeho koncentraci ovlivňuje AMPA a kainátové receptory kladně či záporně (Rassendren et al. 1990), přičemž závisí i na podjednotkovém složení receptoru (Kreitzer et al. 2009).

3.3.1 Kainátové receptory

Ještě v roce 2008 se sledoval vliv zinku pouze na rekombinantních kainátových receptorech, nikoliv na nativních (Mott et al. 2008). Na druhou stranu o rekombinantních receptorech ve vztahu k zinku píše již Hoo a jeho kolegové v roce 1994, kdy zjistili, že zinek inhibuje rekombinantní GluK2 (Hoo et al. 1994) a GluK2/GluK5 kainátové receptory. I zde způsobují Zn²⁺ nekompetitivní inhibici. Ta může být odstraněna pomocí Ca²⁺, které se ale váží do jiného místa na GluK2/GluK5 receptorů než Zn²⁺ (Fukushima et al. 2003).

Kainátové receptory se vyskytují například v kortikolimbickém systému zahrnujícího hipokampální oblast CA3, kde přispívají k synaptické plasticitě (Mott et al. 2008). Nejvíce jsou prozkoumány právě v hipokampu na synapsích mezi mechovými vlákny a CA3 pyramidovými buňkami (Castillo et al. 1997), které mají k zinku různou citlivost, což je zřejmě způsobeno různým podjednotkovým složením kainátových receptorů v těchto oblastech (Mott et al. 2008). Na synapsích CA3 pyramidálních buněk na mechových vláknech se kainátové receptory vyskytují na presynaptické i postsynaptické straně (Contractor et al. 2003). Na té presynaptické jsou kainátové receptory složeny z GluK2 a GluK3 podjednotek, zatímco na postsynaptické z podjednotek GluK2, GluK4 a GluK5 (Veran et al. 2012). Postsynaptické kainátové receptory na synapsích mechových vláken jsou inhibovány endogenním zinkem, který se během stimulace hromadí v synaptické štěrbině, kde snižuje frekvenci facilitace kainátem. Nicméně nemá žádný vliv na zde vyskytující se AMPA receptory. Tato inhibice je také závislá na podjednotkovém složení kainátových receptorů (Mott et al. 2008).

Heteromerní kainátové receptory zahrnující podjednotku GluK4 a GluK5 vykazují vyšší afinitu pro inhibici zinkem oproti homomerickým kainátovým receptorům GluK1 a GluK2. Tato vysoká afinita u heteromerních kainátových receptorů připomíná inhibici zinkem u GluN1a/GluN2B NMDA receptorů. Ještě menší citlivost k zinku než GluK1

a GluK2 mají NMDA receptory zahrnující GluN2C podjednotku a AMPA receptory zahrnující GluA2 podjednotku (Mott et al. 2008).

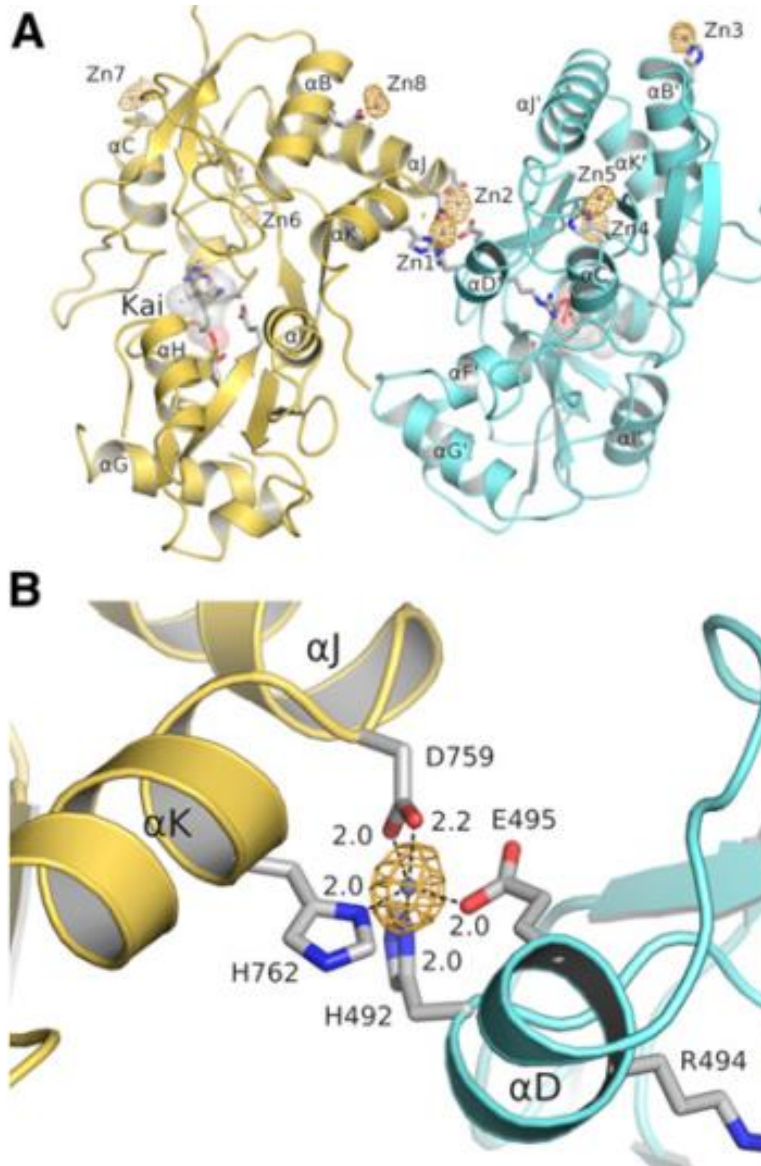
Pakliže kainátové receptory zahrnují podjednotku GluK4 či GluK5, jsou citlivější nejen k zinku, ale i k dalším endogenním modulátorům. Reakce na modulátory se ale mohou lišit. Například receptory obsahující GluK4 podjednotku jsou jedinými kainátovými receptory, u kterých protony způsobují potenciaci (Mott et al. 2003).

Mnoho nových poznatků přišlo až v roce 2012 s článkem (Veran et al. 2012), který popisuje vliv Zn^{2+} i na nativních kainátových receptorech. Autoři zjistili, že pokud kainátový receptor, ať už homomerní či heteromerní, zahrnuje podjednotku GluK3, má na něj zinek potenciační účinek a to v koncentračním rozmezí Zn^{2+} 10 až 100 μM . To znamená, že je zde zinek pozitivním alosterickým modulátorem. Všechny ostatní kainátové receptory jsou zinkem inhibovány (GluK1, GluK2, GluK2/GluK4 a GluK2/GluK5) přesně ve zmíněném koncentračním rozsahu. Ovšem pokud přesáhne koncentrace Zn^{2+} hodnotu 100 μM , začne zinek GluK3 receptor postupně inhibovat. Tato inhibice je podobná inhibici GluK2. Na GluK2/GluK3 receptorech ale inhibice prokázána nebyla. Nejspíš tedy bude pro inhibici zinkem jiné vazebné místo, které je v případě heteromerního receptoru nějakým způsobem zneprístupněno, nebo zcela chybí (Mott et al. 2008; Veran et al. 2012). Dále přišli na to, že se zinek váže na rozdíl od jiných kainátových receptorů do S2 části LBD v oblasti na rozhraní s LBD sousední GluK3 podjednotky. Zinek tak funguje jako intramolekulární most mezi ligand vázajícími doménami v daném dimeru. V S2 části LBD GluK3 podjednotky identifikovali hned osm možných vazebných míst pro Zn^{2+} , které se skládají z glutamových kyselin, histidinů a asparagových kyselin. Za hlavní vazebné místo považují Zn1 a ostatní zmiňují jen jako alternativní varianty. Nejvýznamnějšími aminokyselinovými zbytky v Zn1 vazebném místě jsou Asp759 a His762 společně se zbytky His492 a Glu495 na sousední LBD. Asp759 je v tomto místě charakteristický pouze pro GluK3. V případě GluK1 a GluK2 je na tomto místě glycin (stejně jako u všech AMPA a NMDA receptorů kromě GluN2D podjednotky) a u GluK4 a GluK5 je asparagin. Právě Asp759 má na svědomí pro GluK3 charakteristickou rychlou desensitizaci. Důležitý je též Asp730, který kompletuje koordinaci „skořápky“ pro zinek (Veran et al. 2012).

Obrázek č. 8: Krystalová struktura zobrazující vazebná místa pro zinek na dvou protomerech v LBD GluK3

A – všechna nalezená vazebná místa pro zinek

B – detail Zn1 vazebného místa; αJ a αK jsou helixy na jednom protomeru; αD je helix na druhém protomeru; čísla vyjadřují vzdálenost vazby v Å



(Veran et al. 2012)

Mechanismus potenciace GluK3 zinkem je pravděpodobně následující. Zn^{2+} se naváže do svého vazebného místa, a stabilizuje tak rozhraní mezi dimery. Následně dojde ke zpomalení desensitizace, zvýšení afinity pro glutamát a potenciaci GluK3 na

glutamátergních synapsích, což způsobí prodloužení doby otevření kanálu. Nakonec pak zinek urychlí návrat z desensitizace. Pokud se tedy zinek nenaváže, bude rozhraní mezi dimery destabilizované, což je způsobené aminokyselinovými zbytky Asp759 a Asp730, které se svým nábojem odpuzují. To znamená, že zde zinek funguje jako neutralizační činidlo, které ruší odpudivou interakci těchto dvou zbytků (Veran et al. 2012).

Co se týče heteromerních receptorů GluK2/GluK3, jsou zinkem také potencovány. To je způsobeno heterodimerním uspořádáním podjednotek. Potom každý z dimerů obsahuje právě jedno vazebné místo pro zinek ze zbytků Gln756, Asp759 a His762 na GluK3 a zbytků Asp729 na GluK2. Také to může být tím, že je zbytek Asp730 konzervován jak v GluK3 tak v GluK2 (Veran et al. 2012).

Jelikož je zbytek Asp729 konzervovaný ve všech podjednotkových typech kainátových receptorů, předpokládá se, že všechny receptory zahrnující podjednotku GluK3 mají vazebné místo pro potenciační efekt zinku (Veran et al. 2012).

Inhibici zinečnatými kationty ovlivňuje kromě podjednotkového složení také pH roztoku. Čím je hodnota pH nižší, tím je nižší i účinek zinečnatých kationtů. Protony tedy zvyšují IC_{50} pro inhibici zinkem. Tento efekt je závislý na koncentraci zinku a podjednotkovém složení kainátových receptorů (Mott et al. 2008). Skutečnost, že protony v případě kainátových receptorů snižují afinitu vazebného místa pro zinek, je odlišná od GluN1/GluN2A NMDA receptorů, kde zinek zvyšuje protonovou inhibici (Choi & Lipton 1999; Mott et al. 2008). pH silně ovlivňuje také homomerní receptory GluK3. Při pH 6,8 jsou totiž odpovědi GluK3 vyšší a převládá zde inhibiční efekt zinku. Oproti tomu při pH 8,3 je odpověď sama o sobě menší a v takovém případě zinek funguje jako potenciační modulátor (Veran et al. 2012).

Stejně jako u NMDA receptorů typu GluN1a/GluN2A, GluN1a/GluN2B a GluN1b/GluN2C způsobuje zinek u kainátových receptorů především NN inhibici a jen v malé míře NZ. Oproti tomu byla NN inhibice zinkem u GluA2/GluA3 AMPA receptorů velmi malá (Mott et al. 2008).

Inhibice zinkem by se v případě kainátových receptorů dala využít například k zabránění jejich patologické aktivace na mechových vláknech (Mott et al. 2008).

3.3.2 AMPA receptory

Zinečnaté kationty mají na AMPA receptory jiný vliv než na GluN1/GluN2 NMDAR. Efekt zinku se liší hlavně ve dvou aspektech. Prvním je, že má zinek pro AMPA receptory především *potenciační účinek*. Sice se zde inhibice taktéž projevuje, ale pouze při vyšších koncentracích Zn^{2+} . Druhým faktem je, že jsou AMPA receptory *méně citlivé k Zn^{2+}* , neboť doposud nebylo zjištěno, že by reagovaly na submikromolární koncentrace zinku (Rassendren et al. 1990; Paoletti et al. 2009). Pokud je tedy koncentrace Zn^{2+} v mikromolárním rozsahu, pak potencuje jak nativní (Lin et al. 2001) tak rekombinantní AMPAR (Dreixler & Leonard 1994) pomocí redukce rychlosti desensitizace. Zn^{2+} ale pouze zpomalují přechod do desensitizovaného stavu. Na návrat z desensitizace má zinek jen malý vliv (Lin et al. 2001). Oproti tomu milimolární koncentrace Zn^{2+} má na AMPAR inhibiční efekt, který do určité míry překrývá efekt potenciace. Navíc ještě zpomaluje desensitizaci (Bresink et al. 1996).

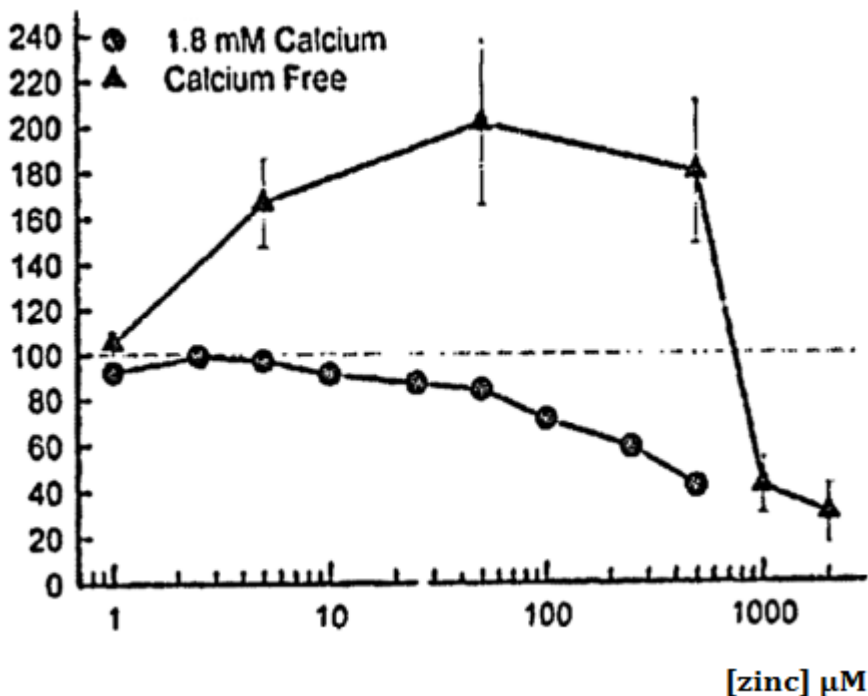
Z krystalografických analýz vyplývá, že i na AMPA receptorech má zinek více vazebných míst, a proto je možné, že stejně jako u dříve popsanych receptorů, i zde nejsou všechna vazebná místa využívána pro zde popsany efekt Zn^{2+} . Na rozdíl od GluN1/GluN2 NMDAR a většiny kainátových receptorů se na AMPAR vazebná místa pro Zn^{2+} vyskytují v LBD, a proto se uvažuje o tom, že by mohl být zinek také modulátorem vazby agonisty. V těchto vazebných místech se nacházejí především histidinové zbytky, z nichž nejvýznamnějšími jsou His412 a His435. Zjistilo se, že His412 je konzervovaný v GluA2-4, zatímco GluA1 má na této pozici alanin. His435 je oproti tomu konzervován u všech typů AMPA receptorů (Armstrong & Gouaux 2000). Je tedy zřejmé, že je citlivost k zinku závislá jak na koncentraci Zn^{2+} tak na podjednotkovém složení AMPAR. Například homomerní AMPAR skládající se z GluA3 podjednotek jsou citlivé k zinku, zatímco homomerní GluA1 a heteromerní AMPAR obsahující GluA2 jsou k zinku téměř necitlivé (Dreixler & Leonard 1994; Dreixler & Leonard 1997). Konkrétně u rekombinantních GluA3 receptorů byla potenciace zinkem zjištěna v koncentračním rozmezí Zn^{2+} od 4 do 7,5 μM (Dreixler & Leonard 1997). V koncentracích vyšších než 100 μM již působil zinek jako inhibitor (Dreixler & Leonard 1994). Heteromerní GluA1 není v normálním fyziologickém roztoku zinkem potencován, pokud je jeho koncentrace menší než 100 μM . Jeho nízká citlivost k zinku může být způsobena tím, že zde Ca^{2+} účinněji kompetuje s vazebným místem pro Zn^{2+} potenciaci. K inhibici GluA1 dochází, pokud koncentrace Zn^{2+} přesáhne 250 μM (Dreixler & Leonard 1997).

Již v roce 1997 bylo zjištěno, že pokud z extracelulárního roztoku odstraníme Ca^{2+} , potom jsou jak homomerní GluA1 tak GluA3 receptory potenciovány zinkem a to ve velkém koncentračním rozmezí od 5 až do 500 μM . K největší potenciaci však dochází při koncentraci 50 μM . Malý rozdíl v chování mezi GluA1 a GluA3 v roztoku bez Ca^{2+} je v inhibici. Zatímco je GluA1 inhibován při koncentraci Zn^{2+} 1mM, GluA3 potřebuje koncentraci až 2 mM. Ca^{2+} tedy regulují schopnost Zn^{2+} potencovat homomerní GluA1 a GluA3 AMPAR. Tyto dva kationty spolu nejspíš reagují přímo v oblasti póru, kudy Ca^{2+} prochází při aktivaci GluA1 a GluA3 za fyziologických podmínek. S rostoucí koncentrací zinku může nad jeho funkcí potenciační převážit funkce inhibiční, což vede k blokádě toku iontů (Dreixler & Leonard 1997)

Obrázek č. 9: Potenciace Zn^{2+} u homomerního GluA1 AMPAR při ne/přítomnosti extracelulárních Ca^{2+} (při společné aplikaci se 100 μM kainátu)

- osa y udává velikosti proudových odpovědí na kainát v přítomnosti zinku vyjádřené relativně ke kontrolní odpovědi bez zinku

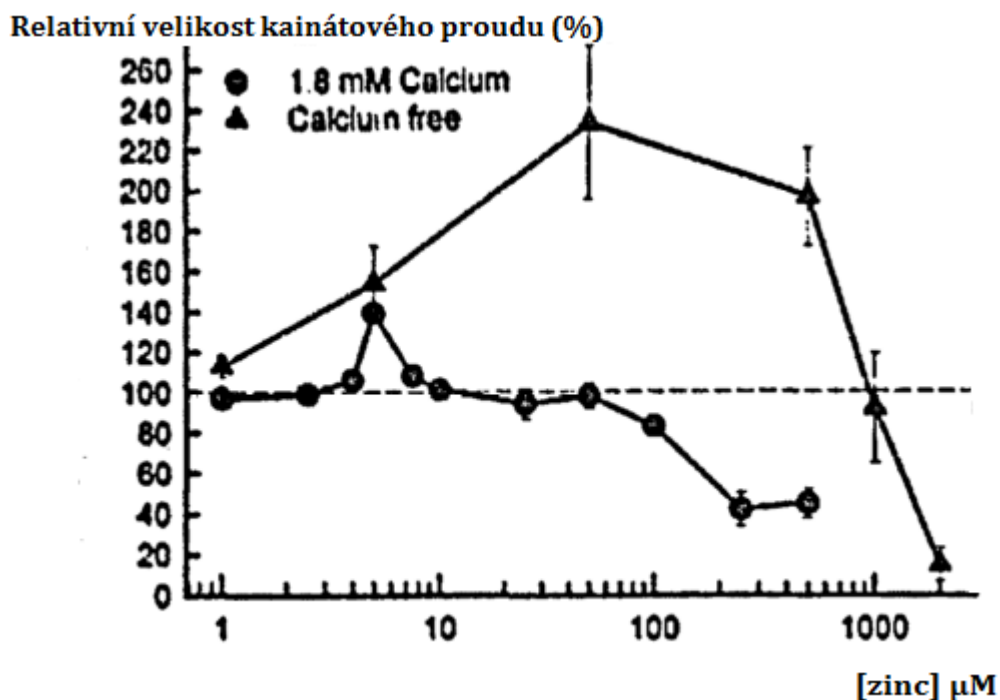
Relativní velikost kainátového proudu (%)



(Dreixler & Leonard 1997)

Obrázek č. 10: Potenciace Zn^{2+} u homomerního GluA3 AMPAR při ne/přítomnosti extracelulárních Ca^{2+} (při společné aplikaci se $100 \mu M$ kainátu)

- osa y udává velikosti proudových odpovědí na kainát v přítomnosti zinku vyjádřené relativně ke kontrolní odpovědi bez zinku



(Dreixler & Leonard 1997)

V případě heteromerních AMPAR s GluA2 podjednotkou nemá odstranění extracelulárních Ca^{2+} žádný vliv. Heteromerní kanály se tedy chovají podobně jak v přítomnosti, tak nepřítomnosti Ca^{2+} . Netečnost GluA2 podjednotek vůči zinku může být způsobena funkčními změnami zasahujícími do argininového aminokyselinového zbytku, který je důležitý pro funkci receptoru (Dreixler & Leonard 1997).

Senzitivita AMPAR k Zn^{2+} také závisí na sestřihové variantě receptoru, kdy je *flip* varianta více citlivá k zinku než *flop* varianta (Shen & Yang 1999). Flip varianta se nachází například v CA3 buňkách v hipokampu, kde se varianta flop vůbec nevyskytuje (Lomeli et al. 1994). Zatímco horizontální buňky retiny kapra obsahují převážně variantu flop. Odpověď AMPA receptorů s flop variantou sestřihu byla zinkem změněna pouze tehdy, pohybovala-li se koncentrace v rozmezí $30 \mu M - 3 mM$ (Shen & Yang 1999).

Na tyto dřívější poznatky navázali (Lin et al. 2001), kteří ucelili představu o faktorech ovlivňujících senzitivitu AMPAR k Zn^{2+} . Zjistili, že nejvíce citlivé k zinku jsou *synaptické* AMPAR složené z podjednotek GluA2-4, a/nebo flip sestřihové varianty. Oproti tomu *extrasynaptické* AMPAR jsou nejčastěji z GluA1 podjednotek, a/nebo s větším podílem sestřihové varianty flop, což způsobuje necitlivost k zinku až u 50 % extrasynaptických AMPAR.

4 Diskuze a závěr

Tato práce shrnuje poznatky o efektu zinečnatých kationtů na ionotropní glutamátové receptory. Je zřejmé, že jsou Zn^{2+} alesterickým modulátorem většiny iGluRs. V některých případech má ale zinek inhibiční efekt a v jiných zase potenciační. Záleží především na podjednotkovém složení jednotlivých receptorů a na koncentraci Zn^{2+} . Také vazebná místa pro zinek jsou různá. Většinou se však váže do aminoterminálních domén. Efekt zinku na jednotlivé receptory shrnuji v následující tabulce.

Tabulka č. 1: Shrnutí efektu Zn^{2+} na všech podtypech iGluRs, které byly doposud zkoumány vzhledem k zinku za experimentálních podmínek.

receptor	podtyp	efekt	koncentrace Zn^{2+}	vazebná doména
NMDA	GluN1/GluN2A	inhibice	nM, μ M	ATD
	GluN1/GluN2B	inhibice	μ M	ATD
	GluN1/GluN2C	inhibice	μ M	ATD
	GluN1/GluN2D	inhibice	μ M	ATD
	GluN1/GluN3A	potenciace/aktivace	μ M/mM	LBD
kainátové	GluK1	inhibice	μ M	ATD
	GluK2	inhibice	μ M	ATD
	GluK3	potenciace/inhibice	10-100 μ M/>100 μ M	LBD
	GluK4	inhibice	μ M	ATD
	GluK5	inhibice	μ M	ATD
AMPA	všechny	inhibice	mM	LBD
	GluA3	potenciace/inhibice	μ M/>100 μ M	LBD

Převzato a upraveno z (Paoletti et al. 2009)

Tabulka obsahuje i údaje, které jsou zatím jen předpokladem. Především vliv Zn^{2+} na AMPA receptory je zatím velmi diskutabilní. U všech podjednotkových typů nejspíš dochází k inhibici, ale většinou až v milimolárním koncentračním rozsahu zinku. Potenciace zinečnatými kationty byla zatím blíže popsána jen u GluA3 receptorů.

Za značný nedostatek studií, které zde cituji, považuji různé způsoby značení jednotlivých podtypů. Z tohoto důvodu přikládám tabulku, která by měla usnadnit orientaci v daných člancích.

Tabulka č. 2: Shrnutí starého a nového podjednotkového značení

receptor	starší název podtypu	novější název podtypu
NMDA	NR1	GluN1
	NR2	GluN2
	NR3	GluN3
kainátové	GluR5	GluK1
	GluR6	GluK2
	GluR7	GluK3
	KA1	GluK4
	KA2	GluK5
AMPA	GluR1	GluA1
	GluR2	GluA2
	GluR3	GluA3
	GluR4	GluA4

Ohledně efektu Zn^{2+} na iGluRs ještě mnoho věcí zůstává neobjasněných. Nejvíce je toho známo o NMDA receptorech, nicméně se v literatuře zatím nenachází žádné údaje, co se týče podtypu GluN1/GluN3B. O kainátových a AMPA receptorech ve vztahu k zinku je napsáno podstatně méně studií. Je tedy velmi pravděpodobné, že další experimenty odhalí poznatky o podtypech, které ještě nebyly řádně zkoumány, či doplní fakta k již prozkoumaným a částečně objasněným podtypům.

5 Seznam literatury

5.1 Literární zdroje

- Armstrong N, Gouaux E** (2000), Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*, 28: 165–181.
- Atar D, Backx HP, Appel MM, Gao DW, Marban E** (1995), Excitation-transcription coupling mediated by zinc influx through voltage-dependent calcium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 2473–2477.
- Bockaert J, Pin PJ** (1999), Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal*, 18: 1723–1729.
- Bresink I, Ebert B, Parsons GC, Mutschler E** (1996), Zinc changes AMPA receptor properties: Results of binding studies and patch clamp recordings. *Neuropharmacology*, 35: 503–509.
- Castillo PE, Malenka R, Nicoll R** (1997), Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature*, 388: 182–186.
- Contractor A, Sailer WA, Darstein M, Maron C, Xu J, Swanson TG, Heinemann FS** (2003), Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation of mossy-fiber synapses in KA2^{-/-} mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23: 422–429.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M** (2001), NMDA receptor subunits: Diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11: 327–335.
- Dreixler CJ, Leonard PJ** (1997), Effects of external calcium on zinc modulation of AMPA receptors. *Brain Research*, 752: 170–174.
- Dreixler CJ, Leonard PJ** (1994), Subunit-specific enhancement of glutamate receptor responses by zinc. *Molecular Brain Research*, 22: 144–150.
- Erreger K, Traynelis FS** (2008), Zinc inhibition of rat NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of physiology*, 586: 763–778.
- Falchuk HK, Vallee LB** (1993), The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, Vol. 73.
- Fayyazuddin A, Villarroel A, Goff LA, Lerma J, Neyton J** (2000), Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn²⁺ binding to NMDA receptors. *Neuron*, 25: 683–694.

- Frederickson JC, Suh WS, Silva D, Frederickson JC, Thompson BR** (2000), Zinc and Health: Current Status and Future Directions Importance of Zinc in the Central Nervous System: The Zinc-Containing Neuron. *The Journal of Nutrition*, 130: 1471–1483.
- Fukushima T, Shingai R, Ogurusu T, Ichinose M** (2003), Inhibition of willardiine-induced currents through rat GluR6/KA-2 kainate receptor channels by Zinc and other divalent cations. *Neuroscience Letters*, 349: 107–110.
- Furukawa H, Singh KS, Mancusso R, Gouaux E** (2005), Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438: 185–92.
- Gielen M, Retchless SB, Mony L, Johnson WJ, Paoletti P** (2009), Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature*, 459: 703–707.
- Hatton JC, Paoletti P** (2005), Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron*, 46: 261–274.
- Yin ZH, Weiss HJ** (1995), Zn²⁺ permeates Ca²⁺ permeable AMPA kainate channels and triggers selective neural injury. *NeuroReport*, 6: 2553-2556.
- Hoo HK, Nutt LS, Fletcher JE, Elliott EC, Korczak B, Deverill MR, Rampersad V, Fantaske PR, Kamboj KR** (1994), Functional expression and pharmacological characterization of the human EAA4 (GluR6) glutamate receptor: a kainate selective channel subunit. *Receptors & channels*, 2: 327–337.
- Chatterton EJ, Awobuluyi M, Premkumar SL, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino AK, Nakanishi N, Tong G, Lipton AS, Zhang D** (2002), Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415: 793–798.
- Choi Y, Lipton AS** (1999), Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn²⁺ inhibition of the NMDA receptor. *Neuron*, 23: 171–180.
- Karakas E, Furukawa H** (2014), Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science (New York, N.Y.)*, 344: 992–7.
- Karakas E, Simorowski N, Furukawa H** (2009), Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *The EMBO journal*, 28: 3910–3920.
- Williamms K** (1996), Separating dual effects of zinc at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience Letters*, 215: 9–12.
- Kemp AJ, McKernan MR** (2002), NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature neuroscience*, 5: 1039–1042.

- Koh YJ, Choi WD** (1994), Zinc toxicity on cultured cortical neurons: involvement of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*, 60: 1049–1057.
- Kreitzer AM, Birnbaum DA, Qian H, Malchow PR** (2009), Pharmacological characterization, localization, and regulation of ionotropic glutamate receptors in skate horizontal cells. *Visual neuroscience*, 26: 375–87.
- Kuusinen A, Arvola M, Keinänen K** (1995), Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. *The EMBO journal*, 14: 6327–6332.
- Lin DD, Cohen SA, Coulter AD** (2001), Zinc-induced augmentation of excitatory synaptic currents and glutamate receptor responses in hippocampal CA3 neurons. *Journal of neurophysiology*, 85: 1185–1196.
- Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T, Höger T, Geiger PRJ, Kuner T, Monyer H, Higuchi M, Bach A, Seeburg HP** (1994), Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science (New York, N.Y.)*, 266: 1709–1713.
- Madry C, Mesic I, Bartholomäus I, Nicke A, Betz H, Laube B** (2007), Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354: 102–108.
- Madry C, Betz H, Geiger PRJ, Laube B** (2008), Supralinear potentiation of NR1/NR3A excitatory glycine receptors by Zn²⁺ and NR1 antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 12563–12568.
- Madry C, Mesic I, Betz H, Laube B** (2007), The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn²⁺ inhibition and glycine affinity of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular pharmacology*, 72(6), pp.1535–1544.
- Mayer LM, Vyklicky L, Westbrook LG** (1989), Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurones. *The Journal of physiology*, 415: 329–350.
- Mayer LM, Westbrook LG, Guthrie BP** (1984), Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309: 261–263.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg HP** (1992), Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256: 1217–1221.
- Mott DD, Washburn SM, Zhang S, Dingledine JR** (2003), Subunit-dependent modulation of kainate receptors by extracellular protons and polyamines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23: 1179–1188.
- Mott DD, Benveniste M, Dingledine JR** (2008), pH-dependent inhibition of kainate receptors by zinc. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28: 1659–71.

- O'Hara JP, Sheppard OP, Thogersen H, Venezia D, Haldeman AB, McGrane V, Houamed MK, Thomsen C, Gilbert LT, Mulvihill RE** (1993), The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron*, 11: 41–52.
- Paoletti P, Vergnano MA, Barbour B, Casado M** (2009), Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, 158: 126–136.
- Paoletti P, Ascher P, Neyton J** (1997), High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17: 5711–5725.
- Partin MK, Patneau KD, Winters AC, Mayer LM, Buonanno A** (1993), Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron*, 11: 1069–1082.
- Pérez-Clausell J, Danscher G** (1985), Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Research*, 337: 91–98.
- Peters S, Koh J, Choi WD** (1987), Zinc selectively blocks the action of *N*-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science*, 236: 589–593.
- Rachline J, Perin-Dureau F, Goff LA, Neyton J, Paoletti P** (2005), The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *The Journal of Neuroscience*, 25: 308–317.
- Rassendren FA, Lory P, Pin PJ, Nargeot J** (1990), Zinc has opposite effects on NMDA and Non-NMDA receptors expressed in xenopus oocytes. *Neuron*, 4: 733–740.
- Ruiz A, Walker CM, Fabian-Fine R, Kullmann MD** (2004), Endogenous zinc inhibits GABA(A) receptors in a hippocampal pathway. *Journal of neurophysiology*, 91: 1091–1096.
- Shen Y, Yang XL** (1999), Zinc modulation of AMPA receptors may be relevant to splice variants in carp retina. *Neuroscience Letters*, 259: 177–180.
- Schüler T, Mesic I, Madry C, Bartholomäus I, Laube B** (2008), Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in *N*-methyl-D-aspartate receptor assembly. *The Journal of biological chemistry*, 283: 37–46.
- Sobolevsky IA, Rosconi PM, Gouaux E** (2009), X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*, 462: 745–56.
- Traynelis FS, Burgess FM, Zheng F, Lyuboslavsky P, Powers LJ** (1998), Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *Neuron*, 18: 6163–6175.

Traynelis FS, Wollmuth PL, McBain JC, Menniti SF, Vance MK, Ogden KK, Hansen BK, Yuan H, Myers JS, Dingledine R (2010), Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 62: 405–96.

Veran J, Kumar J, Pinheiro SP, Athané A, Mayer LM, Perrais D, Mulle C (2012), Zinc potentiates GluK3 glutamate receptor function by stabilizing the ligand binding domain dimer interface. *Neuron*, 76: 565–578.

Vogt K, Mellor J, Tong G, Nicoll R (2000), The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, 26: 187–196.

Wu MS, Qiao X, Noebels LJ, Yang LX (1993), Localization and modulatory actions of zinc in vertebrate retina. *Vision Research*, 33: 2611–2616.

Yuan H, Hansen BK, Vance MK, Ogden KK, Traynelis FS (2009), Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29: 12045–12058.

5.2 Internetové zdroje

Jean-Philippe Pin, Francine Acher, P. Jeffrey Conn, Robert Duvoisin, Francesco Ferraguti, Peter J. Flor, David Hampson, Michael P. Johnson, Yoshihiro Kubo, James Monn, Shigetada Nakanishi, Ferdinando Nicoletti, Darryle D. Schoepp, Ryuichi Shigemoto, Michihiro Tateyama.

Metabotropic glutamate receptors, introduction. Last modified on 22/01/2015.

Accessed on 18/04/2015. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY

<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=40>

[online, 18. 4. 2015]