

2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
ve spolupráci s Akademií věd ČR
Doktorské studijní programy v biomedicině



Mgr. Johana Trojanová

Imunohistochemická analýza vlastností inhibičních
glycinových a GABA_B receptorů v MNTB

Immunohistochemical analysis of the inhibitory
glycine and GABA_B receptors in the MNTB

Dizertační práce

Školitel: RNDr. Rostislav Tureček, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Oddělení
neurofyziologie sluchu, Laboratoř synaptické fyziologie, Praha

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci „*Imunohistochemická analýza vlastností inhibičních glycinových a GABA_B receptorů v MNTB*“ zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu *Theses.cz* za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 23. 3. 2014

.....

Mgr. Johana Trojanová

.....

RNDr. Rostislav Tureček, Ph.D.

Identifikační záznam:

TROJANOVÁ, Johana. Imunohistochemická analýza vlastností inhibičních glycinových a GABA_B receptorů v MNTB. [Immunohistochemical analysis of the inhibitory glycine and GABA_B receptors in the MNTB]. Praha 2014. 138 s., 5 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta ve spolupráci s Akademií věd ČR, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Oddělení neurofyziologie sluchu, Laboratoř synaptické fyziologie, Praha. Vedoucí práce Tureček, Rostislav.

Poděkování:

Tato práce by nemohla vzniknout bez pomoci a podpory mnoha učitelů a kolegů kolem mě.

V první řadě bych chtěla poděkovat mému školiteli, RNDr. Rostislavovi Turečkovi, Ph.D., který mně umožnil podílet se na tak zajímavých výzkumných projektech. Poskytl mi všestrannou pomoc při experimentech, jejich řešení, následném vyhodnocování experimentálních dat, jakož i psaní odborných prací. Dal mi spoustu rad a motivoval mě v mé práci.

Dále bych chtěla poděkovat kolegyním z Laboratoře synaptické fyziologie, Oddělení neurofyziologie sluchu ÚEM AV ČR, jmenovitě Mgr. Bohdaně Hruškové a Ing. Michaele Králíkové, Ph.D., za pomoc při provádění pokusů a za jejich cenné rady.

Poděkování bych také ráda vyjádřila dr. Ákosovi Kulikovi, Ph.D. z Ústavu anatomie a buněčné biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Německo, který mi umožnil získat obrovské zkušenosti v imunoelektronové mikroskopii.

Obsah

Obsah.....	5
Seznam zkratk	8
1. Úvod.....	13
1.1. Glycinové receptory (GlyR).....	15
1.1.1. Struktura GlyR a podjednotkové složení	15
1.1.2. Biofyzikální vlastnosti GlyR	17
1.1.2.1. Glycin jako inhibiční (excitační) neuropřenašeč.....	18
1.1.2.2. Agonisté/antagonisté GlyR a jejich farmakologické vlastnosti	19
1.1.3. Vývojové změny, exprese a lokalizace GlyR v nervové tkáni.....	19
1.1.4. Synaptická a extrasynaptická lokalizace homomerních a heteromerních GlyR	20
1.1.5. Distribuce funkčních GlyR.....	20
1.1.6. Fyziologický význam GlyR.....	21
1.2. GABA _B receptory (GABA _B R).....	21
1.2.1. Struktura GABA _B R a podjednotkové složení.....	22
1.2.2. Distribuce a funkce GABA _B receptorů v nervovém systému	24
1.2.3. Agonisté/antagonisté GABA _B receptorů a jejich farmakologické vlastnosti.....	26
1.2.4. Interakce GABA _B receptorů s G-proteiny.....	27
1.2.5. Tetramerizační doména draslíkových kanálů (KCTD).....	29
1.3. Mediální jádro trapézovitého tělesa (MNTB)	29
1.3.1. Glutamátergní synaptický přenos v MNTB	32
1.3.2. Struktura Heldova kalichu (presynaptická část).....	33
1.3.3. Hlavní neurony v MNTB (postsynaptická část).....	35
2. Cíle práce a hypotézy	36
3. Materiál a metodika	37
3.1. Přehled použitých metod v práci	37
3.2. Materiál	37
3.2.1. Roztoky, pufry	37
3.2.2. Primární protilátky (1°Ab)	39
3.2.3. Sekundární protilátky (1°Ab)	41
3.2.4. Zvířata	42

3.3.	Metodika.....	42
3.3.1.	Příprava řezů u mladého potkana.....	42
3.3.2.	Příprava řezů u dospělého potkana, myši.....	44
3.3.3.	Příprava řezů pro elektronovou mikroskopii.....	44
3.3.4.	Fluorescenční mikroskopie.....	44
3.3.5.	Pre-embedding imunoelektronová mikroskopie.....	45
3.3.6.	Retrogradní značení neuronálních buněk.....	47
3.3.7.	Imunoblot (Western Blot)	48
3.3.8.	Kvantitativní analýza trojrozměrně rekonstruovaných neuronálních výběžků...48	
3.3.9.	Kochleární ablace	49
3.3.10.	Statistické zpracování výsledků	50
4.	Výsledky.....	52
4.1.	Studium lokalizace a podjednotkového složení GlyR v Heldově synapsi v MNTB dospělého potkana.....	53
4.1.1.	Postsynaptické GlyR	53
4.1.2.	Presynaptické GlyR	58
4.2.	Určení vývojové změny inhibičního glycinergního systému a morfologických změn Heldova kalichu v MNTB.....	66
4.2.1.	Kvantitativní analýza GlyR u kochleotomizovaných v MNTB	67
4.2.2.	Kvantitativní analýza inhibičních zakončení u kochleotomizovaných v MNTB 70	
4.3.	Kvantitativní analýza povrchové distribuce GlyR na Heldově kalichu.....	72
4.3.1.	Morfologie dospělého Heldova kalichu v MNTB	73
4.3.2.	Různá hustota $G\alpha 1$ na Heldově kalichu	74
4.3.3.	Kvantitativní distribuce $G\alpha 1$ mezi morfologicky odlišnými segmenty Heldova kalichu	78
4.3.4.	Koncentrace presynaptických GlyR v částech přístupných pro okolní glycin....	81
4.4.	Buněčná distribuce $GABA_B$ receptorů v MNTB.....	88
4.5.	Lokalizace tetramerizační domény draslíkového kanálu 12 (KCTD 12) v oblasti MNTB	90
5.	Diskuze.....	92
5.1.	Podjednotkové složení GlyR v MNTB	92
5.2.	Vývojové změny inhibičního glycinergního systému v MNTB.....	94
5.3.	Distribuce $\alpha 1$ podjednotky GlyR ve vyzrálých Heldových kališích	96
5.3.1.	Mechanismus na aktivitě závislé redistribuce receptorů	96

5.3.2. Vztah mezi distribucí presynaptických GlyR a jejich funkcí.....	97
5.4. Buněčná distribuce GABA _B receptorů a jejich úloha v MNTB	99
6. Závěry	103
Abstrakt	105
Abstract.....	107
Seznam použité literatury	109
Přílohy	138

Seznam zkratek

1°	primární
2°	sekundární
5-HT ₃ R	serotoninový receptor 3. typu
A1R	adenosinový receptor typu 1
Ab	protilátka
AC	adenylátcykláza
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5methylisoxazol-4-propionová kyselina
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5methylisoxazol-4-propionový receptor
AP	akční potenciál
AVCN, aVCN	anteroventrální kochleární jádro (<i>angl.</i> Anteroventral Cochlear Nucleus)
Ax	axon
CA1 – CA3	<i>cornus Ammonis</i> ; oblast v hipokampu
CaBP	calbindin - vápník vážící protein (<i>angl.</i> calcium-binding proteins)
CB	calbindin
CaSR	receptor pro Ca ²⁺ (<i>angl.</i> calcium-sensing receptor)
Ca _v	Ca ²⁺ kanály aktivované vysokým napětím (<i>angl.</i> high-voltage activated calcium channels)
Ca _{v2.1} , Ca _{v2.2}	Ca ²⁺ kanály aktivované vysokým napětím typu 2.1 a 2.2
CB1	kanabinoidní receptor 1
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CH	Heldův kalich (<i>angl.</i> calyx of Held)
[Cl] _i	intracelulární koncentrace chloridových iontů
CNS	centrální nervová soustava
CR	calretinin - na vitamínu D závislý vápník vážící protein, který se podílí na vápníkové signalizaci

CTB	kyanotrifenyl borát
D1R	dopaminergní receptor typu 1
D2R	dopaminergní receptor typu 2
DG	<i>gyrus dentatus</i> ; oblast v hipokampu
eCB	endokanabinoid
EC	entorinální kůra
EC ₅₀	koncentrace účinné látky, při níž je dosaženo poloviny maximálního účinku
EM	elektronová mikroskopie
EPSP	excitační postsynaptický potenciál
ER	endoplazmatické retikulum
FM	fluorescenční mikroskopie
G _α	α-podjednotka heterotrimerního G-proteinu
GABA	γ-aminomáselná kyselina (<i>angl. gamma-Aminobutyric acid</i>)
GABA _A R	receptor pro γ-aminomáselnou kyselinu typu A
GABA _{A/C} R	receptor pro γ-aminomáselnou kyselinu typu A a C
GABA _B R	receptor pro γ-aminomáselnou kyselinu typu B
GABA _{B1/B2}	heteromerní receptor pro γ-aminomáselnou kyselinu typu B složený z podjednotek GB1 a GB2
GABA _{B1a/2}	heteromerní receptor pro γ-aminomáselnou kyselinu typu B složený z podjednotek GB1a a GB2
GABA _{B1b/2}	heteromerní receptor pro γ-aminomáselnou kyselinu typu B složený z podjednotek GB1b a GB2
Gα1	α1 podjednotka glycinového receptoru (GlyR)
GB1, GABA _B R1	B1 podjednotka GABA _B R
GB1a	B1a podjednotka GABA _B R
GB1b	B1b podjednotka GABA _B R
GB2, GABA _B R2	B2 podjednotka GABA _B R

GBC	globulární buňky (<i>angl.</i> globular bushy cells)
GDP	guanosindifosfát
GE	gephyrin
G _{i/o}	G-protein citlivý na toxin Bordetella pertussis Gi/o rodiny
G _{αi/o}	α-podjednotka heterotrimerního G-proteinu Gi/o rodiny
GIRK	G-proteinem spřažený dovnitř usměrňující K ⁺ kanál (<i>angl.</i> G-protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel)
GlyR	glycinový receptor
GlyT1	glycinový transportér 1 (<i>angl.</i> Glycine Transporter 1, Glial)
GlyT2	glycinový transportér 2 (<i>angl.</i> Glycine Transporter 2, Neuronal)
GpIII	metabotropní glutamátový receptor III
GpI	metabotropní glutamátový receptor I
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem (<i>angl.</i> G-protein Coupled Receptor)
GTP	guanosintrifosfát
i2	2. intracelulární smyčka
i3	3. intracelulární smyčka
IG	imunožlatá částice (<i>angl.</i> immunogold particle)
iGluR	ionotropní glutamátový receptor
i. p.	intraperitoneálně (do břišní dutiny)
inh.	inhibiční
IPSP	inhibiční postsynaptický potenciál
K _{Ca} 2.2	na vápníku závislé K ⁺ kanály s malou vodivostí typu 2 (SK2, KCNN2)
KCC2	K ⁺ /Cl ⁻ kotransporter
KCNN2	na vápníku závislé K ⁺ kanály s malou vodivostí typu 2 (SK2, K _{Ca} 2.2)
KCTD	tetramerizační doména draslíkového kanálu (<i>angl.</i> potassium

	channel tetramerization domain)
K _{ir}	dovnitř usměřňující K ⁺ kanál (<i>angl.</i> inward rectifying potassium ion channel)
K _{ir3}	dovnitř usměřňující K ⁺ kanál typu 3
K _v	napětově řízené K ⁺ kanály
LSO	jádra laterální olivy superior (<i>angl.</i> Lateral superior olive)
MF	mossy fiber
mGluR	metabotropní glutamátový receptor
MSO	jádra mediální olivy superior (<i>angl.</i> Medial superior olive)
MNTB	mediální jádro trapézovitého tělesa (<i>angl.</i> Medial Nucleus of Trapezoid Body)
m. j.	mezinárodní jednotka
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
NLL	jádra laterálního lemnisku (<i>angl.</i> nuclei of the lateral lemniscus)
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMDAR	N-methyl-D-aspartátový receptor
NO	oxid dusnatý
nNOS	neuronální NO-syntáza
P	postnatální den (<i>angl.</i> postnatal day)
PC	hlavní neuron MNTB (<i>angl.</i> Principal cell)
PB	fosfátový pufr
PBS	fosfátový pufr solný roztok
PLC	fosfolipáza C (<i>angl.</i> Phospholipase C)
PNS	periferní nervová soustava
PP	perforant dráha
pS	pikosiemens
PSD	postsynaptická denzita
PTX	pikrotoxin, toxin Bordetella pertussis

Rab3a	hlavní rab protein v mozku, přítomen ve velkém množství na synaptických váčcích
RGS	regulátor G-proteinové signalizace
SPN	jádro superiární paraolivny (<i>angl.</i> superior paraolivary nucleus)
Sb	subiculum
SC	Schafferovy kolaterály
SK2	na vápníku závislé K ⁺ kanály s malou vodivostí typu 2 (KCNN2, K _{Ca} 2.2)
st	stonek (<i>angl.</i> stalk)
sw	zduřenina (<i>angl.</i> swelling)
TB	<i>angl.</i> Tris Buffered
TBS	<i>angl.</i> Tris Buffered Saline
TM	transmembránová doména
vGluT1	vezikulární glutamátový transportér 1
vGAT	vezikulární GABA/glycinový transportér
VGCC	napětím řízený Ca ²⁺ kanál (<i>angl.</i> voltage-gated calcium channel)
WB	imunoblot (<i>angl.</i> Western blot)
w/v	hmotnostní koncentrace [<i>angl.</i> mass/volume - mass concentration (%)]
v/v	objemová koncentrace [<i>angl.</i> volume/volume - volume concentration (%)]

1. Úvod

K přenosu signálu mezi neurony dochází v oblastech vzájemného kontaktu, které se specializují na tento účel. Tyto kontakty neuronů byly označovány jako *synapse* Santiagem Ramón y Cajalem a Sirem Charlesem Scottem Sherringtonem (Sherrington, 1906). Termín *synapse* pochází z řeckého slova *synapto* spojovat: *syn-*; *hapto* dotknout se. Podle mechanismu přenosu signálu rozlišujeme 2 typy synapsí, synapsi chemickou a synapsi elektrickou. Většina synapsí v nervovém systému savců je typu chemické synapse.

Chemický přenos využívá specifické látky, tzv. neuropřenašeče, které se uvolňují z presynaptické buňky a váží se na specifické receptory exprimované na povrchu postsynaptické nebo presynaptické buňky. Aktivace receptorů vede ke vzniku signálu, který má buď ionotropní nebo metabotropní charakter. Iotropní receptory zprostředkovávají rychlý synaptický přenos. Mezi tyto receptory řadíme ligandem řízené iontové kanály, které se dále dělí na iontové kanály propustné pro kationty nebo anionty. Na druhé straně metabotropní receptory zprostředkovávají přenos pomalý. Mezi metabotropní receptory řadíme receptory spřažené s G-proteiny a receptory s vlastní enzymatickou aktivitou (guanylátcyklázovou anebo tyrozin kinázovou).

Hlavními inhibičními neuropřenašeči v savčím centrálním nervovém systému jsou aminokyseliny GABA a glycin. Jejich účinky jsou zprostředkovány ionotropními receptory, které spadají do rodiny Cys-loop receptorů a metabotropními receptory (pouze pro GABA). Studium funkcí inhibičních glycinových a GABA_B receptorů je středem pozornosti mnoha výzkumných i komerčních laboratoří. Pochopení principů fungování receptorů a jejich regulace za fyziologických a patofyziologických stavů je výchozím předpokladem pro vývoj nových terapeutických přístupů namířených např. proti Alzheimerově chorobě, Parkinsonově chorobě, schizofrenii, ischemii, epilepsii, k potlačování závislosti (kokain, heroin, nikotin, alkohol), k potlačování bolesti anebo ke vzniku nových anestetických přípravků.

V této práci jsme studovali vlastnosti glycinových a GABA_B receptorů, jejichž odpovědi vykazují v nervovém systému velkou variabilitu. Ta je do značné míry dána skladbou receptorů a jejich lokalizací. Studovali jsme proto podjednotkové složení

a distribuci pre- a postsynaptických glycinových a GABA_B receptorů. Naše pozornost byla upřena na dobře definovaný systém - mediální jádro trapézovitěho tělesa (MNTB) v mozgovém kmeni potkana a myši. Studovali jsme také změny vlastností receptorů během postnatálního vývoje potkana, včetně úlohy přirozené kochleární aktivity.

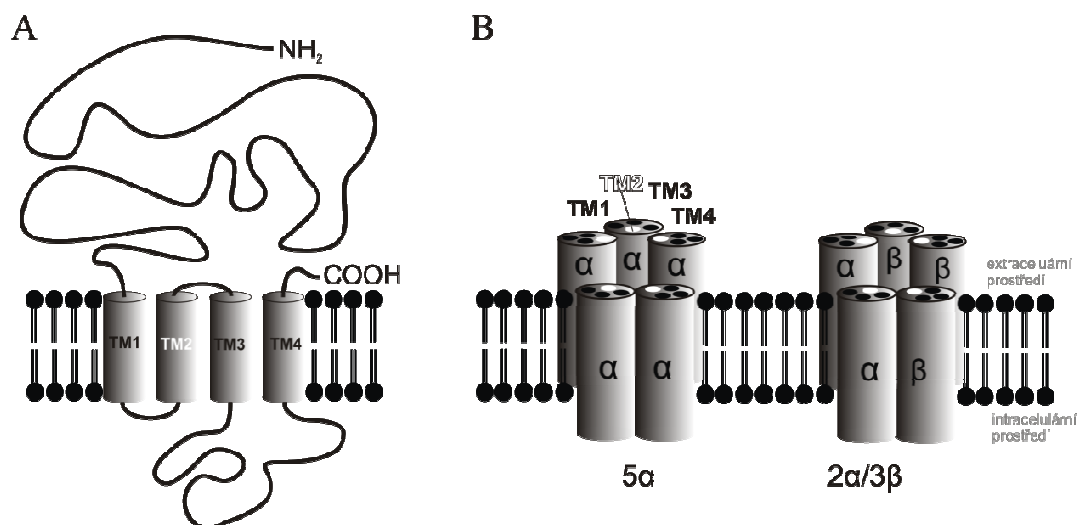
Věříme, že naše výsledky přispějí k pochopení fyziologické funkce GABA a glycinových receptorů při regulaci synaptického přenosu a umožní lépe pochopit komplexní funkce podkorových struktur sluchového systému savců.

1.1. Glycinové receptory (GlyR)

Glycinový receptor (GlyR) byl poprvé izolován ze savčího centrálního nervového systému (CNS) prof. Heinrichem Betzem a jeho skupinou (Pfeiffer and Betz, 1981; Pfeiffer et al., 1982; Laube et al., 2002; Lynch, 2004). GlyR jsou ligandem řízené iontové kanály propustné pro Cl^- ionty a pro HCO_3^- , které patří do rodiny Cys-loop iontových kanálů spolu s homologními receptory jako je receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou typu A a C ($\text{GABA}_{A/C}$), nikotinový acetylcholinový receptor (nAChR) a serotoninový receptor 3. typu ($5\text{-HT}_3\text{R}$) (Grenningloh et al., 1987). Tyto iontové kanály zprostředkovávají inhibiční postsynaptické proudy v míše, mozkovém kmeni a retině. Vyskytují se rovněž presynapticky, kde modulují uvolňování neuropřenašeče. Tyto ligandem řízené iontové kanály jsou známy pro své rychlé zprostředkování přenosu v nervovém systému a umožňují buňkám rychle odpovídat na změny v jejich vnějším prostředí.

1.1.1. Struktura GlyR a podjednotkové složení

GlyR jsou pentamerní transmembránové proteiny, které mají dvě podjednotky charakterizované jako α podjednotku (48 kDa) a β podjednotku (58 kDa). Každá podjednotka obsahuje dlouhý extracelulární N-konec, 4 transmembránové domény (TM1-TM4), dlouhou 2. intracelulární smyčku a krátký extracelulární C-konec. TM2 tvoří iontový kanál, který je propustný pro anionty (obr. 1a).



Obr. 1. *Struktura glycinového receptoru (GlyR). A, Každá podjednotka obsahuje dlouhý extracelulární N-konec, 4 transmembránové domény (TM1-TM4), dlouhou 2. intracelulární smyčku a krátký*

extracelulární C-konec. TM2 se podílí na uspořádání iontového kanálu, který je propustný pro anionty. B, GlyR jsou pentamery složené z podjednotek α a β . Složení se vývojově mění. Typickou embryonální formou jsou homomery složené z 5 α podjednotek, zatímco dospělou formu tvoří heteromer složený z podjednotek o stechiometrii 2 α :3 β .

Molekulární studie u potkanů odhalily existenci čtyř různých izoform pro α podjednotku ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) a jenom jednu izoformu β podjednotky. Rozmanitost GlyR se zvyšuje sestřihovými variantami $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ a β podjednotek (Kuhse et al., 1991; Malosio et al., 1991a; Nikolic et al., 1998). U $\alpha 1$ to jsou 2 varianty $\alpha 1$ a $\alpha 1^{\text{ins}}$, které se liší v exonu, který kóduje intracelulární smyčku mezi TM3 a TM4. Sestřihová varianta $\alpha 1^{\text{ins}}$ obsahuje navíc osm aminokyselin v blízkosti TM4 (Malosio et al., 1991b). U podjednotky $\alpha 2$ to jsou tři sestřihové varianty ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$ a $\alpha 2^*$), které se liší v oblasti exonu 3 a jednotlivými substitucemi aminokyselin (Kuhse et al., 1991). U $\alpha 3$ podjednotky rozeznáváme sestřihové varianty $\alpha 3L$ a $\alpha 3K$, které byly izolovány z lidského mozku a liší se v exonu 8A, patnácti aminokyselinami v intracelulární smyčce mezi TM3 a TM4 a delecí úseku 15 aminokyselin na C-konci u $\alpha 3K$ varianty (Nikolic et al., 1998; Legendre, 2001). Rovněž u β podjednotky se můžeme setkat se dvěma sestřihovými variantami (Oertel et al., 2007).

Funkční receptor mohou tvořit α podjednotky i v nepřítomnosti β . Heteromerní GlyR u dospělých potkanů jsou tvořeny podjednotkami α a β v poměru 2:3 (Grudzinska et al., 2005) (obr. 1b). Vazba agonisty se uskutečňuje převážně v místě α podjednotky (Lynch, 2004), zatímco β podjednotka je zodpovědná za ukotvení GlyR ke složkám postsynaptické denzity pomocí cytoplazmatického proteinu gephyrinu (93 kDa) (Prior et al., 1992; Kirsch and Betz, 1993; Meyer et al., 1995). Gephyrin tvoří jakési cytoskeletální lešení shlukující GlyR do klastrů a zároveň zprostředkuje jejich interakci s jinými proteiny jako např. RAFT-1, collybistin, profilin a složkami cytoskeletu jako mikrotubuly a aktinová vlákna (Kirsch and Betz, 1995; Meyer et al., 1995; Legendre, 2001). β podjednotka GlyR se váže ke gephyrinu svou hydrofobní sekvencí v intracelulární smyčce mezi doménami TM3 a TM4 (Meyer et al., 1995; Kneussel and Betz, 2000), tato interakce umožňuje klastrování těchto receptorů v postsynaptické denzitě.

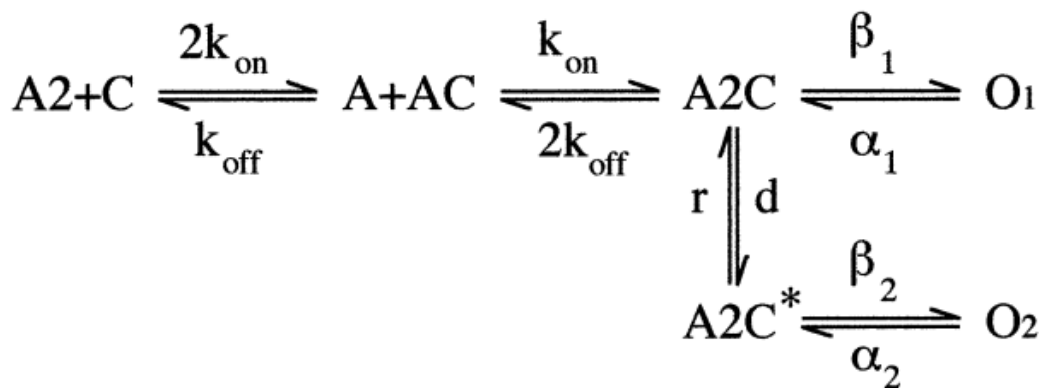
1.1.2. Biofyzikální vlastnosti GlyR

Podjednotkové složení GlyR ovlivňuje jejich iontovou vodivost a kinetické vlastnosti, afinitu pro agonisty nebo antagonisty, stejně tak jako různá alosterická modulační vazebná místa, která jsou regulována fosforylačními procesy.

GlyR se vyznačují několika jednotkovými vodivostními stavy (základními a vedlejšími). Obecně platí, že homomerní GlyR vykazují pět vodivostních stavů s nejvyšší pravděpodobností otevření do základního vodivostního stavu (~100 pS) (Rajendra et al., 1997; Legendre, 2001). Koexprese α podjednotek s β podjednotkami vede k receptorům s nejvyšší a nejčastěji se vyskytující vodivostí na 45 pS (Lynch, 2009). Kromě vodivosti ovlivňuje podjednotkové složení i kinetiku GlyR. Je známo, že rekombinantní homooligomerní $\alpha 2$ GlyR ukazují pomalejší kinetickou odpověď než $\alpha 1\beta$ heteromerní receptory (Takahashi, 2005; Betz and Laube, 2006).

Iontový kanál GlyR má průměr 5,2 Å a obsahuje minimálně dva pozitivně nabitě náboje, ke kterým se mohou vázat anionty (Witke et al., 1998). Propustnost pro jednotlivé anionty je v pořadí $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ (Bormann et al., 1987).

Kinetický model glycinem řízeného kanálu obsahuje dva otevřené stavy spojené s dvěma uzavřenými stavy. Heteromerní $\alpha 1\beta$ GlyR obsahuje 2 vazebná místa pro glycin. Po navázání 2 molekul glycinu na receptor dochází buď k otevření iontového kanálu nebo k přechodu do desenzitizovaného stavu, který přechází dále do dalšího otevřeného stavu, kineticky odlišného od stavu prvního viz obr. 2 (Legendre, 1998, 2001).

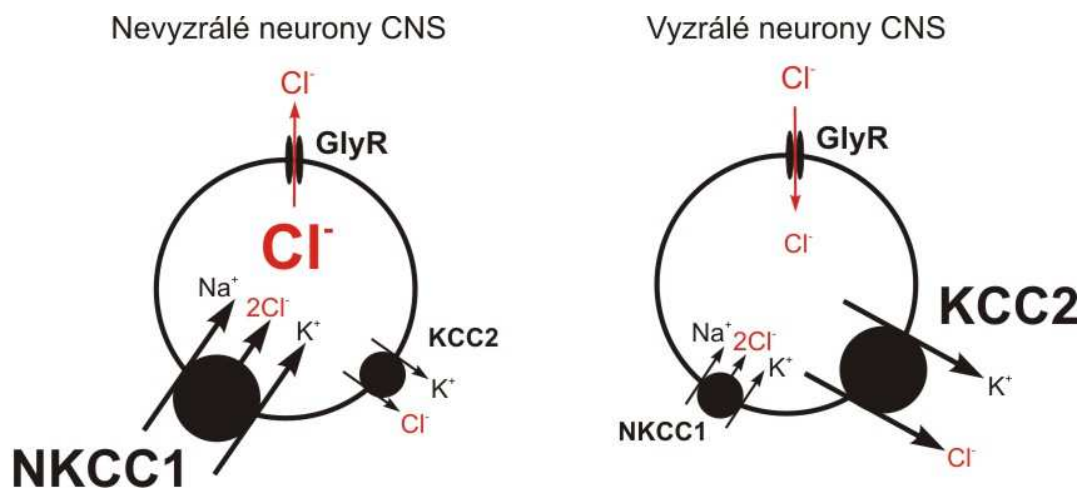


Obr. 2. *Kinetický model, který zahrnuje glycinem řízené kanály (Markovův model). Tento model má dva sekvenční a rovnocenné kroky vazby agonisty (A), ligandovaný zavřený stav (A₂C), který*

přechází do desenzitizovaného stavu ($A2C^*$) a dále dva otevřené stavy (O); stav otevřený/zavřený (O/C), rychlostní konstanta otevření (β_1 , β_2), rychlostní konstanta zavření (α_1 , α_2), disociační konstanta (k_{on}/k_{off}), rychlost (d , r).

1.1.2.1. Glycin jako inhibiční (excitační) neuropřenašeč

GlyR ovlivňují excitabilitu neuronálních buněk v závislosti na intracelulární koncentraci chloridů. U embryonálních a časně postnatálních neuronů je $[Cl^-]_i$ zvýšená tak, že reverzní potenciál glycinových odpovědí je pozitivnější než klidový potenciál. Aktivace GlyR proto vede k depolarizaci neuronů. Zvýšení $[Cl^-]_i$ je způsobeno zesílenou expresí $Na^+/K^+/2Cl^-$ přenašeče (NKCC1) u časných vývojových stadií (Kandler and Friauf, 1995; Ehrlich et al., 1999; Delpire, 2000; Ben-Ari, 2002; Owens and Kriegstein, 2002; Stein and Nicoll, 2003). Tato excitační funkce GlyR je důležitá při synaptogenezi (Kirsch and Betz, 1998). Přechod na vyzrálý fenotyp neuronu je zprostředkován expresí K^+/Cl^- přenašeče (KCC2) ve věku kolem P12-P16 (Balakrishnan et al., 2003). Ten snižuje $[Cl^-]_i$ a tím posouvá Cl^- rovnovážný potenciál k hodnotám negativnějším než je klidový potenciál. Aktivace GlyR tak vede k hyperpolarizaci neuronů a utlumení jejich excitability (Stein and Nicoll, 2003), viz obr. 3.



Obr. 3. **Vývojová regulace homeostázy chloridů v neuronech.** Nevyzrálé neurony exprimují hlavně přenašeč NKCC1 pro ionty $Na^+/K^+/2Cl^-$ a v menší míře přenašeč KCC2 pro ionty K^+/Cl^- , to má za následek zvýšenou $[Cl^-]_i$. Aktivace GlyR způsobuje výtok Cl^- a vede k depolarizaci.

U vyzrálých neuronů CNS klesá exprese NKCC1 a zároveň roste exprese KCC2. Výsledkem je nízká $[Cl^-]_i$. Aktivace GlyR způsobuje vtok Cl^- do buňky a následnou hyperpolarizaci, která vede k utlumení excitability neuronu. Upraveno podle (Stein and Nicoll, 2003).

1.1.2.2. Agonisté/antagonisté GlyR a jejich farmakologické vlastnosti

Hlavním endogenním agonistou GlyR je, jak již z názvu receptoru vyplývá, glycin. Glycin se váže do N-koncové části α podjednotky. Glycin je vysoce selektivní agonista GlyR. Jeho afinita k homomerním a heteromerním receptorům je pravděpodobně rozdílná. Nativní a rekombinantní GlyR jsou aktivovány několika dalšími aminokyselinovými agonisty v následujícím pořadí podle účinnosti: glycin > β -alanin > taurin > GABA. Mezi experimentálně používané exogenní antagonisty patří například strychnin a jeho sloučeniny, které spadají mezi vysokoafinitní kompetitivní antagonisy GlyR. Pikrotoxin (PTX) a jeho deriváty patří mezi nekompetitivní antagonisy $\alpha 1$ homomerních GlyR (Lynch et al., 1995). Konečně kyanotrifenyl borát (CTB) je nekompetitivní antagonista GlyR, které obsahují ve svém uspořádání $\alpha 1$ podjednotku (Rundstrom et al., 1994). Mezi další patří ICS 205.930 (tropisetron) zesilující odpovědi $\alpha\beta$ heteromerního GlyR zvýšením afinity GlyR ke glycinu (Chesnoy-Marchais, 1996, 1999). Dále pak jejich funkci ovlivňuje alkohol, jenž stimuluje aktivitu inhibičního GlyR, a tím tlumí činnost CNS. Anestetika jako je např. isofluran (Harrison et al., 1993) nebo těžké látky jako je toluen, 1,1,1-trichlorethan, trichloretylen, chloroform (Beckstead et al., 2000; Beckstead et al., 2001; Lynch, 2004) a mnoho dalších sloučenin.

1.1.3. Vývojové změny, exprese a lokalizace GlyR v nervové tkáni

Exprese podjednotek GlyR je vývojově regulována a liší se v závislosti na studované oblasti mozku (Lynch, 2004). $\alpha 2$ homomerní receptory jsou považovány za převládající formu GlyR u zvířat v prenatálním a časně postnatálním období vývoje (Legendre, 2001). Podjednotka $\alpha 2$ je detekována u savců již na počátku nástupu synaptogeneze embryonálního CNS. Oblasti nejvyšší exprese $\alpha 2$ u dospělého zvířete jsou mozková kůra, *bulbus olfactorius*, talamus, retina a hipokampus (Malosio et al., 1991a; Sato et al., 1992).

Přestože v dospělém CNS převažují heteromerní $\alpha 1\beta$ GlyR, přítomnost $\alpha 2$ a $\alpha 3$ a $\alpha 4$ podjednotek v receptorovém heteromeru byla rovněž potvrzena. Exprese podjednotek β , $\alpha 1$ a $\alpha 3$ začíná kolem porodu. Hladiny podjednotek $\alpha 1$ a $\alpha 3$ se postupně zvyšují během postnatálního vývoje, zatímco exprese $\alpha 2$ podjednotky klesá a dosahuje bazální úrovně během několika týdnů. Exprese $\alpha 3$ podjednotky je výlučně omezena na přední kořeny míšni, mozeček, *bulbus olfactorius* a retinu (Malosio et al., 1991a). Podjednotka $\alpha 4$ je přítomna převážně ve vnitřní plexiformní vrstvě retiny (Heinze et al., 2007).

Předpokládá se proto, že nezralé GlyR jsou homomerní $\alpha 2$ receptory, které jsou postupně nahrazovány $\alpha 2\beta$ heteromerním GlyR a později $\alpha 1\beta$ nebo $\alpha 3\beta$. Tento vývojový model byl objeven v míše a několika jádrech mozku hlodavců (Malosio et al., 1991a; Singer et al., 1998; Piechotta et al., 2001). Vývojová změna z $\alpha 2$ na $\alpha 1\beta$ je kompletní u potkanů kolem 20. postnatálního dne.

1.1.4. Synaptická a extrasynaptická lokalizace homomerních a heteromerních GlyR

β podjednotka GlyR se váže přímo na protein gephyrin, který je vázaný na složky cytoskeletu v postsynaptické denzitě. Heteromerní $\alpha\beta$ GlyR se proto vyskytují především na subsynaptických místech. Naopak homomerní α GlyR, které neobsahují β podjednotku, se vyskytují v extrasynaptických částech postsynaptické membrány. Nízko afinitní interakce mezi $\alpha 2$ podjednotkou a gephyrinem ovšem naznačují, že homomerní $\alpha 2$ GlyR mohou vytvářet shluky na subsynaptických místech (Takagi et al., 1992).

1.1.5. Distribuce funkčních GlyR

Existuje velké množství důkazů o existenci funkčních glycinových receptorů v retině (Wassle and Boycott, 1991; Pourcho, 1996), v reflexním oblouku motorické dráhy míchy (Legendre, 2001) a v senzoryckých drahách bolesti míchy (Ahmadi et al., 2001). Glycineraní transmise byla také prokázána v různých jádrech mozku hlodavců. Receptory byly například velice dobře charakterizovány v kochleárních jádrech, které přijímají vstupy přímo ze sluchového nervu. GlyR se vyskytují rovněž

na hvězdicovitých buňkách (Ferragamo et al., 1998) a globulárních buňkách (Lim et al., 2000). Dále v trapézovitém tělese, hlavní přepínací stanici sluchové dráhy, kde jsou GlyR umístěny v Heldově synapsi převážně postsynapticky na MNTB hlavních neuronech. Jejich výskyt byl rovněž prokázán elektrofyziologickým měřením presynapticky, tj. na Heldově kalichu (Turecek and Trussell, 2001). Význačný výstup z těchto jader se vztahuje na komplex olivárních jader superior Varolova mostu, kde byl rovněž potvrzen výskyt glycinergní synapse (Kotak et al., 1998; Smith et al., 2000).

1.1.6. Fyziologický význam GlyR

GlyR jsou nejlépe známé jako zprostředkovatelé inhibičního přenosu v míše a mozковém kmeni, ačkoli nedávné výsledky dokazují jejich další fyziologické role, včetně excitačního přenosu, se kterým se můžeme setkat právě v MNTB. Tyto receptory zde pomáhají zesilovat uvolňování glutamátu z Heldova kalichu do synaptické štěrbině (Turecek and Trussell, 2001) na rozdíl od jejich odlišné funkce na postsynaptické membráně, kde jejich úkolem je zprostředkovat rychlou postsynaptickou inhibici (Banks and Smith, 1992; Turecek and Trussell, 2001; Awatramani et al., 2004, 2005a).

V posledních několika letech dochází ke zvýšenému zájmu o tyto receptory, a to díky velkému množství informací, které se týkají molekulární struktury a funkce GlyR. Většina informací byla získána o $\alpha 1$ a $\alpha 2$ podjednotce GlyR. Role ostatních podjednotek získala relativně malou pozornost. Vzhledem k tomu, že GlyR jsou zapojeny do místních reflexních oblouků (Legendre, 2001) a poskytují inhibiční synapse na neuronech citlivých na bolest (Ahmadi et al., 2001), mohou být tyto receptory význačnými prostředníky při vývoji dalších svalových relaxantů anebo periferních analgetických léků.

1.2. GABA_B receptory (GABA_BR)

GABA (γ -aminomáselná kyselina, *angl.* γ -aminobutyric acid) je hlavní inhibiční mediátor CNS. Svoji činnost zprostředkovává prostřednictvím ionotropních receptorů (GABA_A a GABA_C) a metabotropních receptorů (GABA_BR). Na rozdíl od ionotropních receptorů, jejichž součástí je iontový kanál pro anionty, metabotropní GABA_BR

umožňují přenos své informace aktivací G-proteinů (Bowery et al., 2002; Bettler et al., 2004).

GABA_B receptory patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR, *angl.* G-protein Coupled Receptors, 7TM, Serpentine Receptors, Heptahelical Receptors), které tvoří rozsáhlou skupinu membránových receptorů společně s metabotropními glutamátovými receptory (mGluR), receptorem pro Ca²⁺ (CaSR, *angl.* calcium-sensing receptor), chuťovými receptory, receptory pro sladké, feromonovými a dalšími.

Jsou široce rozšířeny po celém centrálním nervovém systému. Svým synaptickým přenosem prostřednictvím výlevu neuropřenašeče GABA nejenom kontrolují neuronální excitabilitu, ale také se podílejí na synaptické plasticitě. Na mnoha centrálních synapsích jsou GABA_BR přítomny na obou stranách synaptického spojení (Kulik et al., 2002; Kulik et al., 2003).

Elektrofyzilogické a farmakologické studie v hipokampu poskytly detailní charakterizaci presynaptické a postsynaptické inhibice působením těchto GABA_B receptorů (Dutar and Nicoll, 1988a; Mody et al., 1994; Misgeld et al., 1995; Bowery et al., 2002). V současné době je známo, že presynapticky umístěné GABA_BR modulují uvolňování neuropřenašečů potlačováním vtoku Ca²⁺ přes napětím aktivované Ca²⁺ kanály (Scholz and Miller, 1991; Pfrieger et al., 1994; Wu and Saggau, 1995). Vliv postsynaptických GABA_B receptorů je primárně zprostředkován GIRK kanály (Luscher et al., 1997; Kaupmann et al., 1998a), které vedou k pomalým IPSP (Dutar and Nicoll, 1988b; Olpe et al., 1993; Otis et al., 1993).

1.2.1. Struktura GABA_BR a podjednotkové složení

GABA_BR tvoří heterodimery z podjednotek GABA_BR1 (GB1) a GABA_BR2 (GB2) (Jones et al., 1998a; Kaupmann et al., 1998b; White et al., 1998b; Kuner et al., 1999; Ng et al., 1999), které mají rozdílné funkce. Koexprese obou podjednotek vede k tvorbě funkčního receptoru s vlastnostmi, které jsou pozorovány u nativních receptorů. Skupina prof. Jean-Philippe Pina ukázala, že heterodimerický GABA_BR může dále tvořit v mozku oligomery vyššího řádu (Maurel et al., 2008; Pin et al., 2009; Comps-Agrar et al., 2011). Je jisté, že dimerizace či oligomerizace receptorů silně

ovlivňuje jejich farmakologické vlastnosti, interakce s G-proteiny, desenzitizaci, internalizaci a buněčný transport.

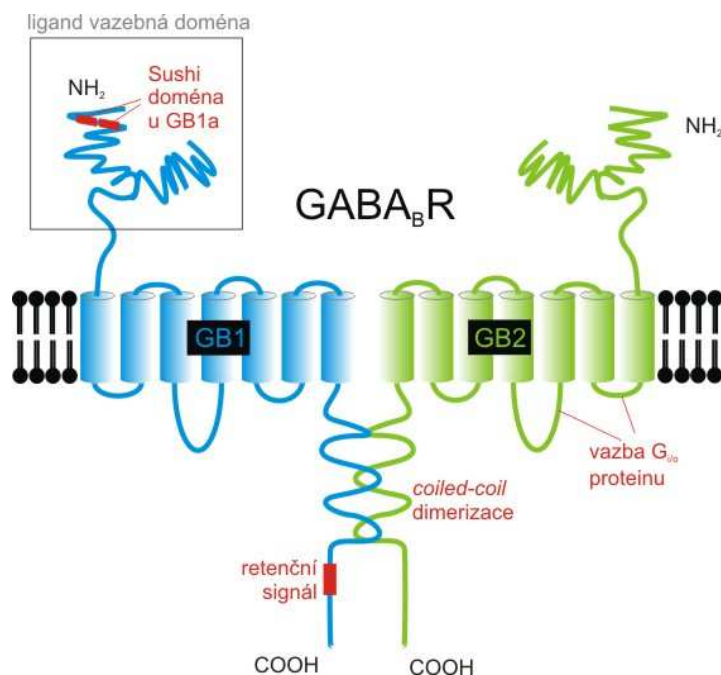
GABA_BR byly prvně identifikovány Normanem Bowery a jeho spolupracovníky (Bowery et al., 1980). cDNA GB1 podjednotky GABA_B receptoru byla poprvé izolována roku 1997 (Kaupmann et al., 1997). V roce 1998 byla nalezena druhá podjednotka tvořící GB2 (Jones et al., 1998a; Kaupmann et al., 1998b; White et al., 1998b), a tím celý funkční receptor. Existuje 8 sestříhových variant GB1 a GB2 podjednotky (Blackburn, 2010). Mezi převládající sestříhové varianty GB1 podjednotky patří GB1a a GB1b. Funkční specializace GB1 podjednotky je vazba agonisty, zatímco GB2 zajišťuje spřažení s G-proteinem.

Struktura GB1 podjednotky (obr. 4) je tvořena rozsáhlou extracelulární N-koncovou doménou, která je tvořena dvěma laloky a obsahuje vazebné místo pro ligandy. Sestříhová varianta GB1a obsahuje navíc v N-konci oproti GB1b pár interagujícího motivu, tzv. „*sushi*“ domény (Hawrot et al., 1998). Funkce této domény spočívá v zajišťování cílené exprese GABA_{B1a/2}R na glutamátergních zakončeních (Biermann et al., 2010). Konformační změny, vazba agonisty v extracelulární doméně a aktivace receptoru připomíná pohyb listu masožravé rostliny, podle kterého byl celý proces nazván „*fly-trap mechanism*“ (Galvez et al., 1999). N-koncová doména GABA_B podjednotky pokračuje sedmi transmembránovými hydrofobními α helixy, které jsou spojené třemi intracelulárními a třemi extracelulárními hydrolytickými smyčkami. Podjednotky GABA_BR jsou ukončeny intracelulárním C-koncem, který obsahuje „*coiled-coil*“ motiv (Pagano et al., 2001), za nímž následuje krátká aminokyselinová sekvence RSRR (arginin/serin/arginin/arginin) kódující retenční signál odpovědný za zadržování GB1 podjednotky v endoplazmatickém retikulu (ER) (Margeta-Mitrovic et al., 2000; Pagano et al., 2001). Při koexpresi GB1 s GB2 dochází k překrytí retenčního signálu GB2 podjednotkou, a tím i k transportu celého receptoru na buněčný povrch. GB2 je proto nezbytná k povrchové expresi funkčního heterodimeru. Vzájemné interakce C-konců obou dvou podjednotek neurčuje pouze transport receptoru, ale rovněž stabilizuje aktivní konformaci receptoru (Grunewald et al., 2002).

C-koncová doména GABA_BR je často asociována s mnoha intracelulárními proteiny. Pomocí kvantitativní hmotnostní spektrometrie (MS), afinitní purifikace a dvouhybridového systému v kvasinkách (Y2H, *angl.* Yeast Two Hybride system) byla

identifikována celá řada interagujících proteinů s GABA_BR, včetně KTCD domény, viz níže.

Díky mutagenезi bylo zjištěno, že intracelulární oblasti GB2 heptahelikální domény, zejména druhá (i2) a třetí (i3) intracelulární smyčka, jsou velmi důležité pro interakci s G-proteiny (Galvez et al., 2001; Margeta-Mitrovic et al., 2001; Robbins et al., 2001; Duthey et al., 2002; Havlickova et al., 2002), které patří do rodiny G_{i/o} proteinů.



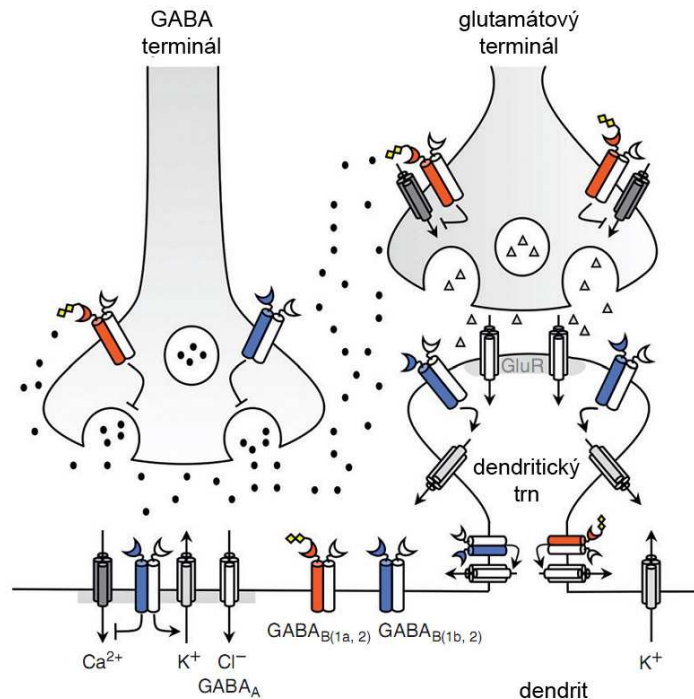
Obr. 4. *Struktura konstitutivního heterodimeru GABA_B receptoru (GABA_BR). Funkční GABA_B receptor je heterodimer tvořený podjednotkami GB1 a GB2. Každá z podjednotek je tvořena rozsáhlým extracelulárním N-koncem, sedmi transmembránovými doménami, které jsou spojené třemi intracelulárními a třemi extracelulárními smyčkami a intracelulárně uloženým C-koncem. Funkční receptory heterodimerizují pomocí C-koncové „coiled-coil“ domény. Existují dvě sestřihové varianty GB1 (1a a 1b), které se liší přítomností „sushi“ domény. Aktivace receptoru nastane po navázání ligandu do vazebné domény N-konce GB1 podjednotky. GB2 podjednotka se funkčně podílí na interakci GABA_B s G-proteiny.*

1.2.2. Distribuce a funkce GABA_B receptorů v nervovém systému

Obecně GABA_BR nacházíme na somatodendritických částech a nervových zakončeních inhibičních i excitačních neuronů (Hill and Bowery, 1981; Bowery et al.,

1987). V CNS se GABA_BR nalézají především v mozkové kůře, hipokampu, talamu, gangliích zadních kořenech míšních, v Purkyňových a granulárních buňkách mozečku a v mozkovém kmeni (Jones et al., 1998a; Kaupmann et al., 1998b). GABA_BR byly nalezeny také v periferním nervovém systému (PNS) a v různých dalších tkáních. Ultrastrukturální distribuce GABA_B závisí na jejich podjednotkovém složení. Bylo zjištěno, že heterodimerní GABA_{B1a/2} a GABA_{B1b/2} receptory se liší buněčnou lokalizací a nabývají rozdílných funkcí. GABA_{B1a/2} přednostně obsazují excitační nervová zakončení, zatímco GABA_{B1b/2} receptory se vyskytují především v postsynaptických místech (Lopez-Bendito et al., 2004). Receptory obsahující podjednotky GB1a regulují uvolňování glutamátu (Vigot et al., 2006). GB1b se vyskytuje nejvíce v dendritických trnech projekčních neuronů a reguluje postsynaptickou excitabilitu aktivací dovnitř usměrňujících K⁺ kanálů (GIRKs) a inhibicí Ca²⁺ napěťových hrotů v kůře (Blackburn, 2010), (obr. 5).

GABA_BR byly prokázány na GABAergních nervových zakončeních jako autoreceptory, jejichž funkce spočívá v kontrole uvolňování nativního mediátoru GABA a také jako heteroreceptory, které inhibují uvolňování jiných neuropřenašečů (Davies et al., 1991; Mott and Lewis, 1991; Lambert and Wilson, 1993; Poncer et al., 2000; Nicoll, 2004). Ve většině případů svoje účinky GABA_BR projevují prostřednictvím Gβγ-závislé inhibice napěťově řízených Ca²⁺ kanálů N-typu (Ca_{v2.2}) nebo P/Q-typu (Ca_{v2.1}) (Chen and van den Pol, 1998; Bussieres and El Manira, 1999; Barral et al., 2000). Oba dva typy Ca²⁺ kanálů jsou exprimovány na presynaptickém zakončení a bylo u nich prokázáno, že spouštějí uvolnění neuropřenašeče (Wu and Saggau, 1997). Dalším mechanismem, kterým GABA_B receptory regulují presynaptické funkce, je Gα zprostředkovaná inhibice adenylátcyklázy a hladiny cAMP v nervovém zakončení (Sakaba and Neher, 2003). GABA_B receptory jsou rovněž spojeny s G-proteiny. Na postsynaptických neuronech GABA_BR zvyšují proud Cl⁻ iontů do buňky a K⁺ z buňky, aktivují dovnitř usměrňující K⁺ kanály, tlumí adenylátcyklázu (Kerr and Ong, 1995) a omezují prostupu Ca²⁺ membránou dovnitř do buňky. To vše má za následek hyperpolarizaci neuronů a s tím spojený inhibiční postsynaptický potenciál (IPSP) (Sodickson and Bean, 1998).



Obr. 5. *Distribuce jednotlivých izoforem GBApodjednotky (GB1a a GB1b) v neuronálních kompartmentech. Schéma axodendritické glutamatergní a GABAergní synapse. GABA_BR jsou lokalizovány presynapticky na glutamatergním i GABAergním zakončení a postsynapticky na dendritickém kmeni a dendritických trnech. Presynaptické GABA_BR kontrolují uvolňování neuropřenašečů inhibicí napětím řízených Ca²⁺ kanálů. Postsynaptické GABA_BR zprostředkovávají pomalé inhibiční postsynaptické potenciály (IPSPs) aktivací dovnitř usměrňujících K⁺ kanálů (K_{ir3} typu) a inhibují napětím řízené Ca²⁺ kanály. Předpokládá se, že heteroreceptory na glutamatergních zakončeních obsahují GB1a, zatímco autoreceptory na inhibičních boutonech přítomných na CA1 pyramidových neuronech obsahují jak GB1a, tak GB1b. Dendritické GABA_BR obsahují většinou GB1b podjednotku. Upraveno z knihy (Blackburn, 2010).*

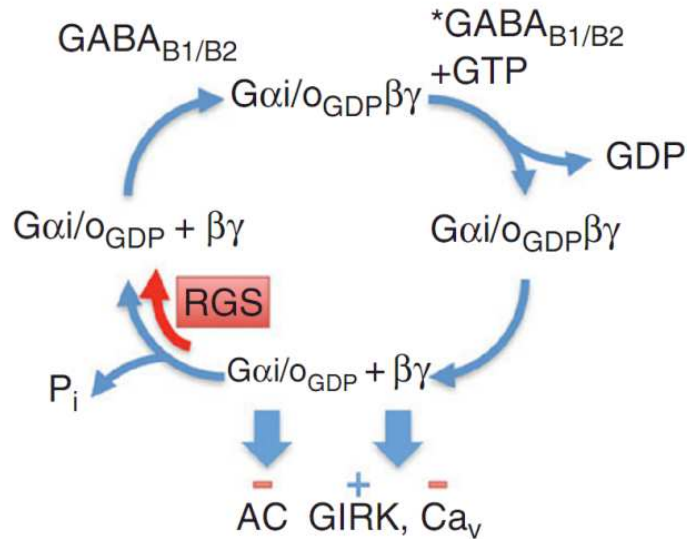
1.2.3. Agonisté/antagonisté GABA_B receptorů a jejich farmakologické vlastnosti

Endogenním agonistou GABA_BR je GABA. Nejznámějším exogenním agonistou je komerčně dostupný baclofen, který byl prvně syntetizován v září 1962 Heinrichem Keberlem ze společnosti Ciba - Basilej, Švýcarsko (Keberle et al., 1968). Baclofen je efektivním svalovým relaxantem působícím v CNS, periferním analgetikem a má rovněž pozitivní účinky při snižování závislosti na alkoholu, kokainu, nikotinu,

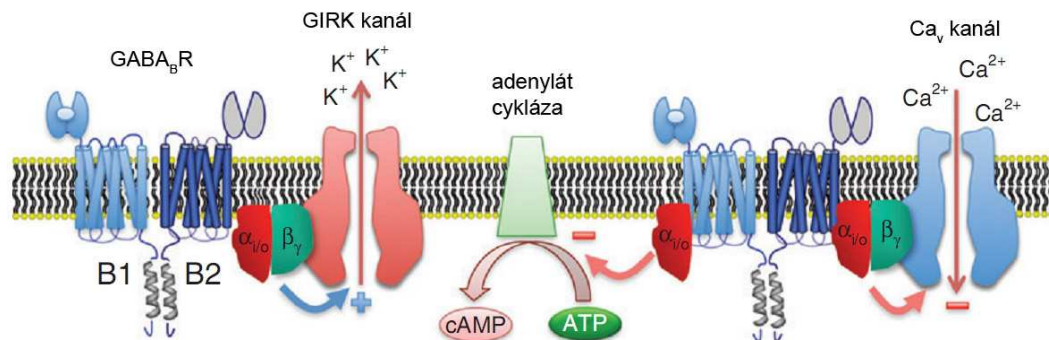
morfiu a heroinu (Becker et al., 2000; Orsnes et al., 2000). Může být použit při léčbě spasticity, migrén a muskuloskeletárních bolestí. Mezi částečné agonisty GABA_BR patří CGP47656 a γ -hydroxymáselná kyselina (GHB, *angl.* γ -Hydroxy-butyric acid). Mezi pozitivní alosterické modulátory GABA_BR patří CGP7930, GS39783, NVP-BHF177 a BHFF (Blackburn, 2010). Látky phaclofen, saclofen a 2-hydroxysaclofen (Kerr et al., 1987; Kerr et al., 1988) byly popsány jako první selektivní antagonisté, jejichž účinky např. potlačují abstinenční příznaky (Bowery et al., 1999; Charpier et al., 1999), zlepšují učení a tvorbu paměti (Brucato et al., 1996; Getova et al., 1997) anebo slouží jako efektivní antidepresiva (Nakagawa et al., 1999; Heese et al., 2000). Vysokoafinitivním kompetitivním antagonistou GABA_BR v experimentální práci je široce používaný CGP54626.

1.2.4. Interakce GABA_B receptorů s G-proteiny

GABA_BR selektivně aktivují heterotrimerní G-proteiny, které jsou citlivé na toxin *Bordetella pertussis* (PTX) a patří do Gi/o rodiny (Menon-Johansson et al., 1993). K interakci mezi GABA_BR dimerem a Gi/o-proteinem (obr. 6) dochází po navázání ligandu v extracelulární části receptoru. Receptorový protein tak podstoupí konformační změnu, která změní intracelulární část receptoru a umožní mu interagovat s G-proteinem umístěným na intracelulární straně plazmatické membrány. Navázáním k aktivovanému receptoru změní G α i/o podjednotka G-proteinu svoji konformaci, která vede k výměně GDP za GTP. Tato výměna způsobí rozpad heterotrimerního G-proteinu na aktivovanou podjednotku G α a na dimer G $\beta\gamma$. Aktivované podjednotky G-proteinu regulují aktivitu svých efektorů (adenylátcyklázy, GIRK a Ca_v; obr. 7). Aktivace G-proteinu je ukončena hydrolýzou GTP na G α , která následně vytvoří heterotrimer s G $\beta\gamma$ a cyklus se může opakovat tak dlouho, dokud je receptor aktivován agonistou.



Obr. 6. **G-protein zprostředkuje funkci GABA_BR.** Agonistou aktivovaný GABA_BR (*GABA_{B1/B2}) stimuluje výměnu GTP za GDP na Gαi/o. Aktivovaný heterotrimerní komplex (Gαi/o_{GTP}βγ) dále působí na signální kaskádu různých efektorů (např. adenylylacyklázu; GIRK; Ca_v). GTPázová aktivita Gαi/o hydrolyzuje GTP na GDP, tím umožní zpětnou formaci G-proteinu v neaktivní heterotrimer (Gαi/o_{GDP}βγ). Přítomnost regulátoru G-proteinové signalizace (RGS) urychluje GTPázovou aktivitu Gαi/o, to vede k desenzitizaci GIRK a disinhbici Ca_v proudů. Převzato z (Chuang et al., 1998; Blackburn, 2010).



Obr. 7. **Hlavní efekty GABA_B receptorů.** Aktivace GABA_BR stimuluje GTP-dependentní G-protein (Gi/o), který disociuje na Ga a Gβγ dimer. Podjednotka Gαi/o inhibuje adenylylacyklázu, zatímco Gβγ dimer je schopný modulovat napětím řízené Ca²⁺ kanály (Ca_v) nebo G-proteinem řízené dovnitř usměrňující K⁺ kanály (GIRK). Upraveno z knihy (Blackburn, 2010).

1.2.5. Tetramerizační doména draslíkových kanálu (KCTD)

Nedávno bylo objeveno, že proteiny z rodiny KCTD (*angl.* potassium channel tetramerization domain) se specificky a konstitutivně váží ke GABA_B receptoru a zásadně moduluje jeho funkční vlastnosti. Byly proto navrženy jako přídatné podjednotky GABA_BR (Schwenk et al., 2010; Gassmann and Bettler, 2012). KCTD jsou cytoplazmatické bílkoviny, které obsahují strukturální motiv určující konzervativní T1 doménu, která usnadňuje tetramerní kompletování napětím řízených K⁺ kanálů. Podrobnou analýzou bylo zjištěno, že samotné T1 domény KCTD se sjednocují do tetramerů, které se pevně váží s C-koncovou doménou GABA_{B2} podjednotky. Tato asociace GABA_BR s KCTD specificky mění vlastnosti GABA_B receptoru. Pomocí afinitní purifikace nativního GABA_BR komplexu následované analýzou na hmotnostním spektrometru, byly identifikovány 4 KCTD proteiny 8, 12, 12b a 16 (Schwenk et al., 2010). Bylo zjištěno, že heterologní exprese těchto izoform spolu s GABA_{B1/2} zvyšuje afinitu GABA_B aktivovaných GIRK k baclofenu. Isoforma KCTD 12 navíc dramaticky zvyšuje akutní desenzitizaci GABA_B odpovědí (Schwenk et al., 2010). Dále bylo ukázáno, že molekulární mechanismus desenzitizace zahrnuje interakci KCTD 12 s aktivovanými podjednotkami Gβγ heterotrimerních G-proteinů (Turecek et al., 2014). Tyto interakce vedou k odloučení Gβγ a GIRK a snížení pravděpodobnosti otevření GIRK. Na geneticky modifikovaných myších s odstraněnými KCTD proteiny je v současnosti zkoumána fyziologická úloha modulace GABA_BR.

1.3. Mediální jádro trapézovitého tělesa (MNTB)

Sluchová dráha vyšších obratlovců je vysoce strukturovaný systém zajišťující příjem a přesné zpracování akustických signálů z okolí organismu. Soubor sluchových jader mozkového kmene oliva superior, tvořený vzájemně propojenými shluky neuronálních buněk, do kterých spadá MNTB, představuje druhý stupeň sluchové dráhy a hraje klíčovou roli při určování prostorové polohy zdroje zvuku (Grothe, 2003).

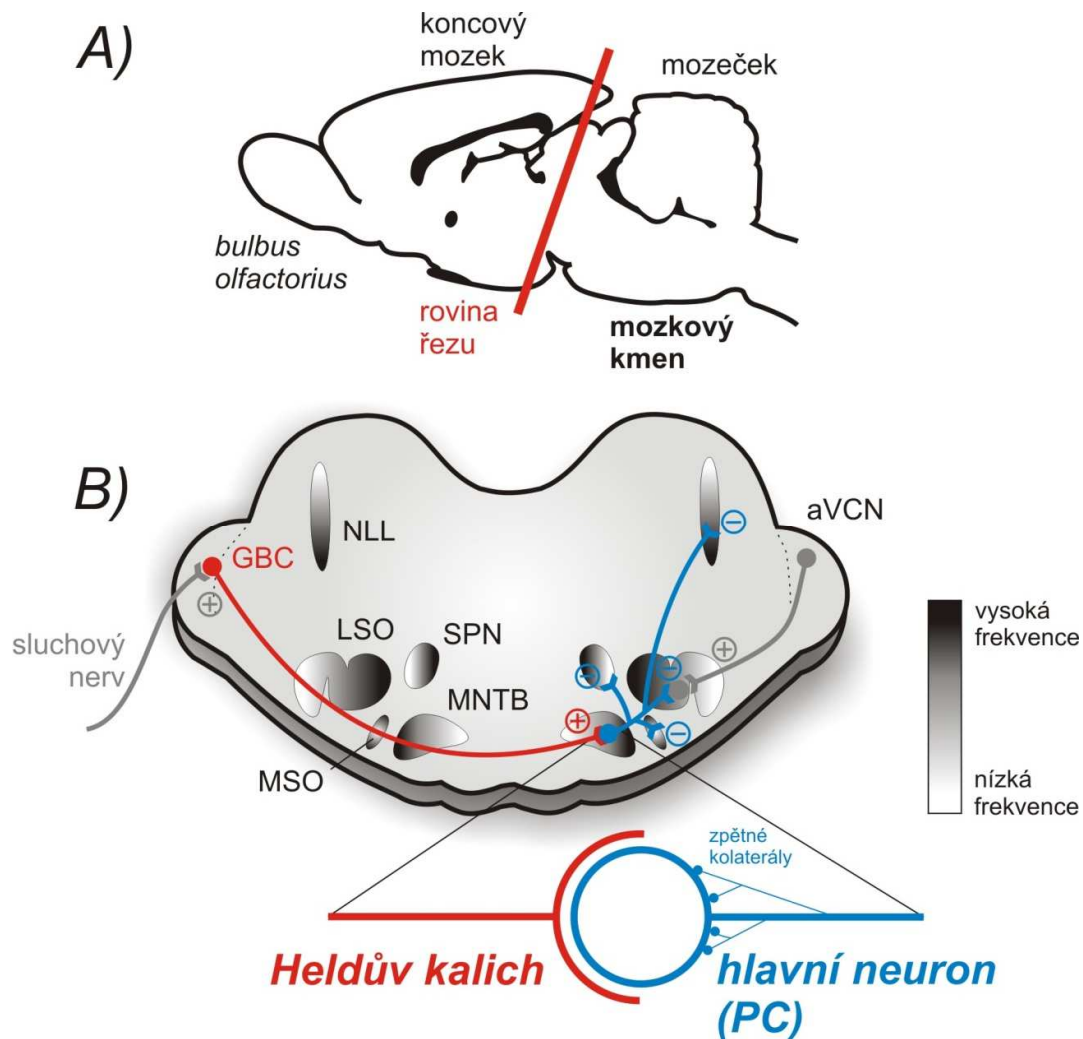
Mediální jádro trapézovitého tělesa (*angl.* medial nucleus of trapezoid body, MNTB) jedno ze sluchových jader oliva superior, se nachází na ventrální straně mozkového kmene (obr. 8c). MNTB obsahuje několik typů neuronů: dominantně zastoupené hlavní neurony (*angl.* principal cells, PC), hvězdčité buňky (*angl.* stellate

cell) a protáhlé buňky (*angl.* elongate cell) (Morest, 1968a; Kuwabara and Zook, 1991; Ehret and Romand, 1997). Hlavní neurony MNTB hrají klíčovou roli při zpracování akustické informace (Banks and Smith, 1992; Johnston et al., 2010). Účastní se mechanismů zodpovědných za přesnou lokalizaci zdroje zvuku. Tyto buňky přesně převádějí excitační signály na inhibiční signály, které směřují k dalším jádrům mozkového kmene (MSO, LSO; obr. 8c) (Johnston et al., 2010). Hlavní úloha MSO spočívá především v detekci rozdílů ve fázi a zpoždění výskytu zvuku v obou uších. LSO neurony zpracovávají informaci o rozdílu v intenzitě zvuku mezi oběma ušima.

Excitační vstup do MNTB je uskutečňován kontralaterální projekcí globulárních buněk (*angl.* globular bushy cells, GBC), které se vyskytují v anteroventrálním kochleárním jádře (*angl.* anteroventral cochlear nucleus, AVCN). Axony GBC tvoří obrovské axosomatické synapse na hlavních neuronech, tzv. Heldovy kalichy (Spirou et al., 1990), které obsahují synaptické váčky naplněné glutamátem.

Kromě excitačního vstupu jsou hlavní neurony inervovány také inhibičními vlákny, která tvoří malé GABAergní a glycinergní zakončení, dále malými excitačními vstupy, které nepatří kalichům a řídce se vyskytujícími zakončeními, která obsahují elektron-denzní (granulární, „dense-core“) váčky (Smith et al., 1991; Banks and Smith, 1992; Hamann et al., 2003). Hlavní neurony vystupují v silný myelinizovaný axon, který dále inervuje jádra LSO, MSO, NLL (jádra laterálního lemnisku), dorsomediální a ventromediální jádra paraoliv. Část inhibičních vláken, která opouštějí hlavní neurony, vytváří zpětné kolaterály, které inervují těla hlavních neuronů v podobě malých glycinergních zakončení (Kuwabara et al., 1991). Tato zakončení obsahují synaptické váčky, které mají pleomorfní tvar a jsou naplněny inhibičními neuropřenašeči (Smith et al., 1998). Tyto neuropřenašeče (GABA/glycin) se účastní inhibičního přenosu přes glycinové a GABA_A receptory.

GABA a glycinergní systémy v MNTB představují efektivní inhibiční systém, schopný rychlé modulace excitačního přenosu.

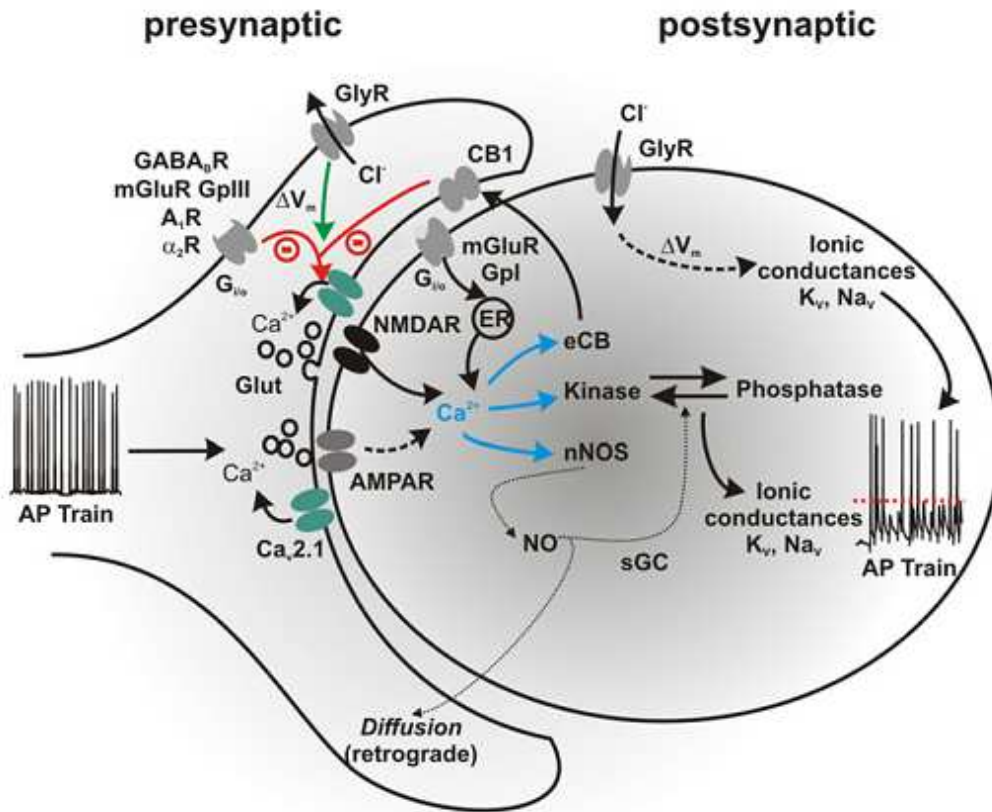


Obr. 8. **Přehled inhibice MNTB při zpracování sluchu mozkovým kmenem potkana.** *A*, Boční pohled na mozek dospělého potkana s vyznačenou rovinou řezu. *B*, Koronální řez mozkového kmene v rovině komplexu olivárních jader superior. Zvukem vyvolaná aktivita přichází do anteroventrálního kochleárního jádra (aVCN), které vysílá excitační projekce do kontralaterálního MNTB (červená linka, +). Hlavní neurony v MNTB vysílají inhibiční projekce (modré linky, -) do dalších jader mozkového kmene: mediální olivy superior (MSO), laterální olivy superior (LSO), jader superiární paraolivy (SPN) a jader laterálního lemnisku (NLL). Excitace do každého neuronu MNTB je zprostředkována přes synapsi Heldova kalichu (červená linka). Ve spodní části obrázku je schéma Heldovy synapse, která je tvořena Heldovým kalichem a hlavním neuronem (PC) se zpětnými kolaterálami, které inervují těla PC v podobě malých glycinergních zakončení opouštějící PC. Projekce jsou typicky tonotopické. Světle-tmavý gradient uvnitř jader vyznačuje nízkofrekvenční (světle) až vysokofrekvenční (tmavě) tonotopickou organizaci různých jader (Guinan et al., 1972).

1.3.1. Glutamátergní synaptický přenos v MNTB

Skupina prof. Forsythe (Kopp-Scheinflug et al., 2011) popisuje dráhy modulace uvolnění neuropřenašeče v Heldově synapsi následovně (obr. 9):

Příchozí presynaptické akční potenciály (AP) aktivují napětím řízené Ca^{2+} kanály (*angl.* voltage-gated calcium channel, VGCC), mezi něž patří Ca^{2+} kanály typu N-a typu P/Q- a R. Ty spouštějí uvolnění neuropřenašeče, které je zesíleno přítomností glycinových receptorů (GlyR) na Heldově kalichu. Adenosinový receptor 1 (A1R), noradrenalinový receptor 2, GABA_BR , mGluR (GpIII) nebo kanabinoidní receptory (CB1) inhibují presynaptické vápníkové kanály a potlačují uvolnění neuropřenašeče (prostřednictvím G-proteinové signalizace). Glutamát uvolněný synapsí aktivuje postsynaptické AMPA a NMDA receptory (AMPA, NMDAR) nebo mGluR, a to vede k vtoku Ca^{2+} do buňky. Tento krok dále moduluje různé kinázy a fosfatázy. Rovnováha jejich činností rozhoduje o řízení a aktivitě více iontových vodivostí, včetně K_v kanálů. Oxid dusnatý (NO), produkt neuronální NO-syntázy (nNOS), má různé fyziologické účinky, včetně modulace K_v kanálů, AMPAR a NMDAR. Všechny tyto modulační mechanismy nakonec rozhodují o generování AP, a tím přispívají k přenosu informace.



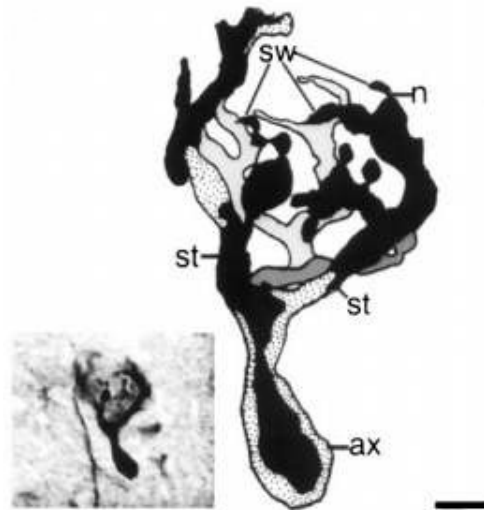
Obr. 9. Schéma dráhy modlace uvolnění neuropřenašeče v Heldově synapsi (Kopp-Scheinflug et al., 2011). Podrobný popis viz text výše.

1.3.2. Struktura Heldova kalichu (presynaptická část)

Heldův kalich impregnovaný Golgiho metodou byl poprvé popsán v roce 1893 německým anatomem Hansem Heldem v mozkovém kmeni kočky domácí (Held, 1893). Heldův kalich je pro jeho rozměrnost, velký počet aktivních zón, přístupnost k přímému zkoumání pomocí elektrofyziologických a mikroskopických metod, užitečným modelem pro studium presynaptických mechanismů synaptického přenosu v centrálním nervovém systému savců.

Struktura dospělého Heldova kalichu se skládá z několika různých segmentů (obr. 10). Je tvořena axonem o velkém průměru, který se větví opakovaně do výběžků připomínajících okvětní lístky (stonky, *angl.* stalks), které vedou do malých větví (stopek, *angl.* stems) někdy přes tenké krčky do jednotlivých zduření (*angl.* swellings) nebo sérií zduření různých velikostí, které obklopují postsynaptickou buňku (Rowland

et al., 2000). Kompletní a konečný tvar kalichu je dotvořen až kolem 28. postnatálního dne potkana (Wimmer et al., 2006).



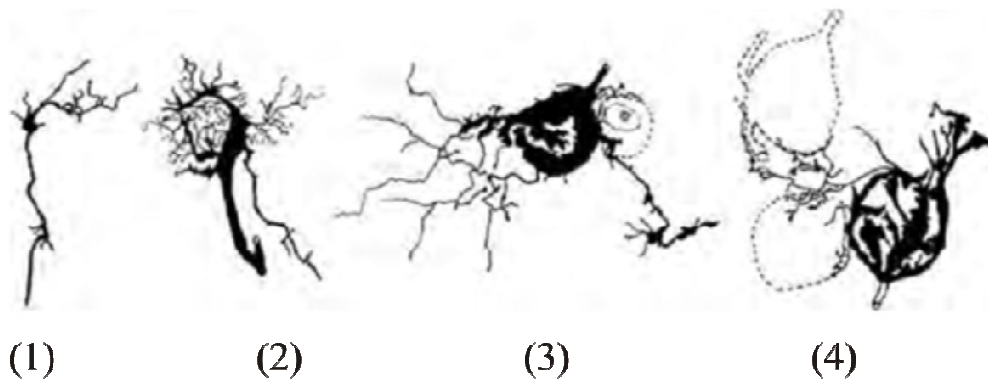
Obr. 10. **Kompartimentalizace Heldova kalichu.** Obrázek ze světelné mikroskopie ukazuje kalich, který byl znázorněn pomocí protilátek proti neuronálnímu calmodulin-vázajícímu proteinu (angl. neuronal calmodulin-binding protein, PEP-19). Presynaptický axon (ax) se větví do stonků (stalks, st). Stonky se dále větví do malých zduřenin (swellings, sw) oddělených od stonků úzkými krčky (n). Černé a tečkované oblasti představují vrchní roviny zaostření než světlé a tmavě šedé oblasti. Měřítko: 5 μ m; (Rowland et al., 2000; Perkins et al., 2010).

Všechny části kalichu, kromě krčků, obsahují aktivní zóny a jsou vyplněny kulatými synaptickými váčky naplněnými glutamátem (Ryugo and Spirou, 2009). Heldův kalich s vývojem rovněž ukazuje různé subcelulární specializace. Rowland a kol. (2000) referovali o netypické strukturální organizaci *puncta adhaerentia* a mitochondrií, které pojmenovali jako „mitochondria-associated adherens complex“ domnívají se, že tato struktura hraje nějakou roli mezi váčky a zásobováním energie, vápníkovou homeostazí a synaptickou stabilitou, jenž podporují vysokofrekvenční přenosy v této synapsi (Rowland et al., 2000).

Struktura Heldova kalichu prodělává výrazné změny během časných stádií postnatálního vývoje. Jednotlivé vývojové etapy (obr. 11) byly ukázány pomocí Golgiho impregnační techniky (Morest, 1968b). Vývoj začíná od růstového pahýlu (1), který se rozšiřuje do tzv. protokalichu (2). Ten prodělává další postupné změny, až se

kolem 5. dne postnatálního vývoje přetvoří na takzvaný nezralý kalich lžícovitého tvaru pokrývající přibližně 50 % povrchu MNTB hlavního neuronu (3). Fenestrací¹ nezralého kalichu získává struktura víceméně dospělý charakter (4) stonku s prstovitými výběžky (~P14) (Morest, 1968b; Kandler and Friauf, 1993; Hoffpauir et al., 2006; Ford et al., 2009; Ryugo and Spirou, 2009; Borst and Soria van Hove, 2012).

Vývojové změny jsou významně ovlivněny senzoricke aktivitou. Zabráníme-li přirozené kochleární aktivitě například bilaterální kochleární ablací, dochází k morfologickým a funkčním změnám přirozeného vývoje v inhibičním sluchovém systému.



Obr. 11. *Vývojová stádia Heldova kalichu byla prokázána pomocí Golgiho impregnace. (1) stádium růstového pahýlu (2) protokalich (3) nezralý kalich (4) zralý kalich. (Morest, 1968b)*

1.3.3. Hlavní neurony v MNTB (postsynaptická část)

Postsynaptické neurony MNTB se objevují mezi 12. až 14. dnem embryonálního vývoje potkana. Axony GBC, které vycházejí z kontralaterálního AVCN prorůstají středovou čáru mozku okolo 2. až 4. dne postnatálního vývoje a vytvářejí protokalich na PC (Hoffpauir et al., 2010). Tělo PC je kulovité nebo elipsoidní o průměru ~20 μm, s jedním velkým excentricky uloženým jádrem. PC mají většinou jeden až dva primární dendrity o velkém průměru, které se dále hojně větví v okolí buňky (Morest, 1968a; Kuwabara and Zook, 1991; Banks and Smith, 1992; Smith et al., 1998). Jednotlivé savčí druhy se podobají vzhledem a tvarem PC, ale liší se morfologií jejich dendritického pole a axonální projekce (Kuwabara and Zook, 1991).

¹ Fenestrace - proděravění, vznik či vytvoření okénka, otvoru. [lat. fenestra okno]; čerpáno z Velkého lékařského slovníku

2. Cíle práce a hypotézy

Cílem těchto několika projektů bylo identifikovat podjednotkové složení GlyR v Heldově synapsi, analyzovat rozmístění presynaptických GlyR a stanovit jejich souvislost ke glutamát-uvolňujícímu presynaptickému aparátu a endogenním zdrojům glycinu, dále zjistit i vývojové změny glycinergního inhibičního systému pod vlivem nepřírozené kochleární aktivity a nakonec určit přesnou distribuci GABA_BR v Heldově synapsi spolu s jejich pomocnou podjednotkou KCTD.

1. Studium lokalizace a podjednotkového složení GlyR v Heldově synapsi v MNTB dospělého potkana v presynaptické a postsynaptické části. Určit vývojové změny inhibičního glycinergního systému a morfologické změny Heldova kalichu v MNTB. Kvantitativně analyzovat GlyR a inhibiční zakončení v MNTB potkana s odstraněnými hlemýždi.

2. Kvantitativní analýzou stanovit povrchovou distribuci GlyR na Heldově kalichu. Charakterizovat morfologii dospělého Heldova kalichu v MNTB. Definovat hustotu Gα1 na Heldově kalichu. Stanovit kvantitativní distribuci Gα1 mezi morfologicky odlišnými segmenty Heldova kalichu. Definovat zvýšenou koncentraci presynaptických GlyR v částech přístupných pro okolní glycin

3. Charakterizovat buněčnou distribuci GABA_B receptorů v MNTB a lokalizovat jejich pomocnou podjednotku KCTD 12 v MNTB

3. Materiál a metodika

3.1. Přehled použitých metod v práci

- Příprava řezů u mladého potkana
- Příprava řezů u dospělého potkana, myši
- Příprava řezů pro elektronovou mikroskopii
- Transkardiální perfúze
- Imunohistochemie
- Fluorescenční mikroskopie
- Pre-embedding imunoelektronové mikroskopie
- Retrogradní značení neuronálních buněk
- Imunoblot (Western blot)
- Kvantitativní analýza trojrozměrně rekonstruovaných neuronálních výběžků
- Kochleární ablace
- Statistické zpracování výsledků

3.2. Materiál

3.2.1. Roztoky, pufry

U některých pufřů je jejich složení popsáno v průběhu textu.

- 0,2 M PB (fosfátový pufr; v gramech): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (43,42), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5,24) → dále ředěno na 0,1 M PB
- 25 mM PBS (fosfátový pufr s chloridem sodným) ředěno z 0,1 M PB s přídatkem 9 g NaCl na 1 l pufřu
- 50 mM TBS (*angl.* Tris-buffered saline; v gramech): Trizma-base (6,05), NaCl (9); (úprava pH pomocí 1 N HCl)
- extracelulární roztok (aCSF; *angl.* artificial cerebrospinal fluid) s nízkou koncentrací Ca^{2+} , který obsahoval v mM: NaCl (125), KCl (2,5), MgCl_2 (2,5), CaCl_2 (0,1), glukózu (25), NaH_2PO_4 (1.25), NaHCO_2 (25), kys. askorbovou (0,5), *myo-*

inositol (3) a pyruvát sodný (3); pH 7,4 s osmolalitou ~310 mOsm, jestliže byl tento roztok probubláván plynou směsí karbogenu (5% CO₂ a 95% O₂).

- standardní extracelulární roztok, který obsahoval v mM: NaCl (125), KCl (2,5), MgCl₂ (1), CaCl₂ (2), glukózu (25), NaH₂PO₄ (1.25), NaHCO₂ (25), kys. askorbovou (0,5), *myo*-inositol (3) a pyruvát sodný (3).
- fyziologický roztok (0,9 g/l NaCl) – komerčně získán z lékárny IKEM
- fixační roztok I: 4% paraformaldehyd (PF) *w/v* v 0,1 M PB, konečné pH 7,4. *Příprava*: paraformaldehyd byl rozpuštěn v deionizované vodě za konstantního míchání a úpravy pH použitím koncentrovaného roztoku NaOH při teplotě, která nepřesáhla 60°C. 0,2 M PB byl přidán do roztoku k dosažení konečné koncentrace, tj. 0,1 M PB. Po rozpuštění bylo pH upraveno koncentrovanou HCl na pH 7,4. Roztok PF byl přefiltrován, ochlazen na 4°C a připraven k okamžitému použití. Roztok byl připravován před fixací vždy čerstvý!
- fixační roztok II: 4% PF *w/v*, 15% kyselina pikrová *v/v* (saturovaný vodní roztok; 1,3% ve vodě) a 0,05%² glutaraldehyd (GA) *w/v* v 0,1 M PB; roztok byl připravován podobně jako fixační roztok I, lišil se pouze přidávkem kys. pikrové a závěrečným přidáním vždy nově otevřeného 25% GA z ampulky (TAAB, UK). Roztok byl opět připravován těsně před použitím. Jeho množství záleželo na počtu zvířat.
- CHTA (*zkr.* Chemiblocker, Triton X-100 a NaN₃) – ředící směs primárních a sekundárních protilátek sloužila k zabránění nespecifické vazby protilátek díky 5% Chemiblockeru (Chemicon, Millipor, USA), k permeabilizaci membrán byl použit 1% Triton X-100, proti růstu bakterií a plísní 0,1% azid sodný v 0,1 M PB.
- epoxidová pryskyřice (Durcupan ACM, Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) – příprava dle návodu od výrobce. Zbylé množství bylo zamraženo při -20°C a ponecháno pro další experimenty.

² Koncentrace glutaraldehydu byla natolik snížena, aby byla minimalizována ztráta antigenicity. Přesto epitopy rozpoznávané hl. protilátkou namířenu proti *a1* podjednotce glycinového receptoru (*mAb2*) byly touto technikou z velké části zničeny.

- lyační pufr – 20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 v/v, 0,1% dodecyl sulfát sodný (SDS), 1 mM EDTA, kompletní proteázová inhibitorová směs (Roche Diagnostics, Švýcarsko)
- SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate; *Sufficient substrate for 1,000 cm²* of blotting membrane (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific, USA)
- NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (20X) (Invitrogen, USA)
- NuPAGE® Transfer Buffer (20X) (Invitrogen)
- NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen)
- HiMark™ Pre-stained Protein Standard (Invitrogen)
- NuPAGE® Novex 3-8% Tris-Acetate Gel 1.0 mm (Invitrogen)
- XCell SureLock™ Mini-Cell; vana na gely (Invitrogen)
- EI 9001-X Cell IITM Mini Cell (Novel Experimental Technology, USA); Novex company; blotovací vana
- CL-XPosure Film 8 x 10 in (20 x 25 cm) (Pierce Biotechnology)
- Hypercassette 18x 24 cm, RPN 13642 (Amersham Biosciences)

Není-li uvedeno jinak, chemikálie byly pořízeny u firmy Sigma-Aldrich (USA).

3.2.2. Primární protilátky (1°Ab)

Použité primární protilátky pro fluorescenční mikroskopii (FM), elektronovou mikroskopii (EM) anebo imunoblot (WB) jsou shrnuty v Tabulce 1. 1°Ab byly ředěny s použitím ředící směsi CHTA. Specifická primárních protilátek byla ověřena (1) v případě jednoho, dvojího či trojího značení opomenutím jedné z 1°Ab. Jestliže jedna 1°Ab byla opomenuta anebo nebyla aplikována žádná 1°Ab, ale byly aplikovány zbylé 2°Ab, potom nebylo pozorováno žádné imunoznačení pro jednotlivé molekuly. (2) pomocí imunoblotu a za (3) kontrolní značení bylo provedeno na deficientních myších (KO, -/-), které postrádaly daný protein.

Tabulka 1. Primární protilátky použité v této práci

Antigen	klonalita	Ředění			Zdroj
		FM*	EM*	WB*	
Gephyrin (N-term)	monoklonální myší (mAb7a)	1:200	1:200		Synaptic Systems
GlyR α 1 (aa 1-10)	monoklonální myší (mAb2b)	1:1000	1:500	1:500	Synaptic Systems
GlyR α 1 (aa 362-422)	polyklonální králičí	1:600	1:800	1:2000	Synaptic Systems
GlyR α 1/ α 2 (N-term)	polyklonální králičí	1:1000			Abcam
GlyR α 2 podjednotka	polyklonální králičí	1:150			Santa Cruz
GlyR α 3 podjednotka	polyklonální kozí	1:150			Santa Cruz
vGAT (aa 75-87)	polyklonální králičí	1:500			Synaptic Systems
vGAT	monoklonální myší	1:500			Synaptic Systems
vGAT	polyklonální morčecí	1:500			Calbiochem/Merck Millipore
vGLUT 1 (aa 456-560)	polyklonální morčecí	1:1000	1:800		Synaptic Systems
Rab3a (aa 191-220)	monoklonální myší (42.2)	1:250			Synaptic Systems
Calretinin	polyklonální králičí	1:200			Zymed/Invitrogen
Calretinin	monoklonální myší	1:200			Zymed/Invitrogen
Parvalbumin	monoklonální myší	1:100			Swant
Parvalbumin	polyklonální králičí	1:1000			Swant
Calbindin D-28K (CaBP)	polyklonální králičí	1:250			Swant
GFAP	monoklonální myší	1:400			Sigma-Aldrich
GlyT1	polyklonální kozí	1:500			Chemicon
GlyT2	polyklonální morčecí	1:500			Chemicon/Millipore
MAP2	monoklonální myší	1:500			Sigma-Aldrich
MAP2	polyklonální králičí	1:150			Chemicon/Millipore
GABA _{B1} R (BR1a, BR1b; B17)	polyklonální králičí sérum		1:100		dr. Ákos Kulik
GABA _{B2} R (BR2; B2T1)	polyklonální králičí sérum		1:200		dr. Ákos Kulik
KCTD 12 syntetický	polyklonální králičí		1:100		prof. Bernhard

peptid, 145-167 aa myši KCTD 12	sérum				Bettler
------------------------------------	-------	--	--	--	---------

*vysvětlivky: FM, fluorescenční mikroskopie; EM, elektronová mikroskopie; WB, imunoblot (*angl.* Western Blot)

3.2.3. Sekundární protilátky (1°Ab)

Použité sekundární protilátky jsou shrnuty v Tabulce 2.

Tabulka 2. Sekundární protilátky použité v této práci

typ	klonalita	Ředění			Zdroj
		FM*	EM*	WB*	
Alexa Fluor 488	kozí proti myši	1:500			Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 488	oslí proti koze	1:500			Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 488	oslí proti králíčkovi	1:500			Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 488	oslí proti myši	1:500			Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 532	kozí proti myši	1:500			Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 647	kozí proti morčeti	1:500			Molecular Probes/Invitrogen
CY3	oslí proti králíčkovi	1:500			Jackson Immuno Research
CY3	oslí proti myši	1:500			Jackson Immuno Research
CY3	oslí proti morčeti	1:500			Jackson Immuno Research
CY3	kozí proti morčeti	1:500			Jackson Immuno Research
CY5	oslí proti koze	1:500			Jackson Immuno Research
Nanogold 1.4 nm – Fab' fragment	kozí proti myši		1:100		Nanoprobes/Biotrend
Nanogold 1.4 nm – Fab' fragment	kozí proti morčeti		1:100		Nanoprobes/Biotrend
Nanogold 1.4 nm – Fab' fragment	kozí proti králíčkovi		1:100		Nanoprobes/Biotrend
Fab Anti-RABBIT IgG (H&L) (GOAT) Antibody Peroxidase Conjugated	kozí proti králíčkovi		1:50		Rockland Inc./Biotrend

Fab Anti-GUINEA PIG IgG (H&L) (GOAT) Antibody Peroxidase Conjugated	kozí proti morčeti		1:50		Rockland Inc./Biotrend
SA-HRP conjugates	kozí proti králíkoví			1:6500	Pierce Biotechnology
SA-HRP conjugates	kozí proti myši			1:6500	Pierce Biotechnology

3.2.4. Zvířata

Používali jsme potkany imbredního kmene Wistar ve věku P12-P18 bez rozlišení pohlaví a ve věku kolem 2 měsíců o hmotnosti ~250 g (pouze samci). Dále byly použity dospělé myši kmene BALB/c a deficientní myši s postrádajícím GABA_{B2} receptorem (GABA_{B2}^{-/-}).

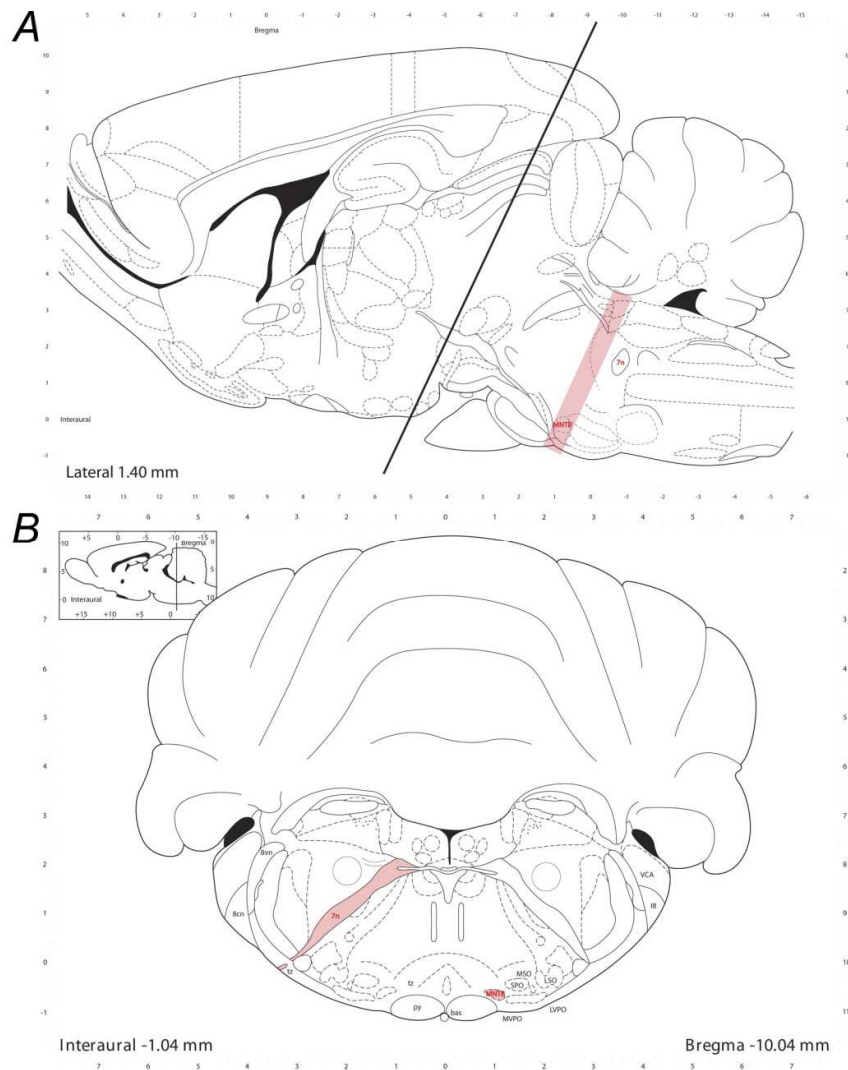
Se zvířaty bylo manipulováno v souladu se Zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, České republiky (v souladu se směrnicemi Rady Evropského společenství 86/609/EEC).

3.3. Metodika

3.3.1. Příprava řezů u mladého potkana

Zvířata byla uvedena do celkové anestézie v isofluranových parách (Forane inh sol 100 ml, Abbott Laboratories Ltd., UK) a utracena dekapitací. Mozek byl okamžitě vyjmut z lebky a přenesen do chladného (~4°C) extracelulárního roztoku s nízkou koncentrací vápníku o složení viz seznam výše (pH 7,3 při sycení plynem složeným z 5% CO₂ a 95% O₂). 300 µm silné koronální nebo parasagitální řezy z mozku kmene, které obsahovaly MNTB nebo AVCN (obr. 12) byly krájeny na vibračním mikrotomu VT1000 S (Leica, Německo) v extracelulárním roztoku s nízkou koncentrací Ca²⁺. Řezy byly po nakrájení fixovány podle typu protilátek ve vychlazeném a čerstvě připraveném 4% paraformaldehydu (PF). Následně byly několikrát promyty v 0,1 M PB a prosyceny pomocí vzestupné řady roztoků sacharózy (10%/1 hod., 20%/3 hod. a 30% w/v přes noc při pokojové teplotě). Poté byla tkáň prosycena po dobu 30 minut při 4°C v kryoprotektivu (Jung Tissue Freezing Medium, Leica, Německo) a nakrájena na finální řezy o tloušťce 25 µm (Leica CM3050 S). Takto připravené řezy byly

montovány na podložní skla s povrchovou úpravou (Menzel-Gläser SuperFrost®Plus, Gerhard Menzel GmbH, Německo) a skladovány při -20°C do doby aplikace primárních a sekundárních protilátek.



Obr. 12. **Laterální a koronální pohled na dospělé mozek potkana.** **A,** Oblast zájmu, která obsahovala MNTB, byla zvýrazněna růžově. Diagonální čára označuje provedení řezu, který oddělil mozek od mozkového kmene. Nervus facialis (7 n.) sloužil jako orientační bod začátku oblasti zájmu. **B,** Koronální řez dospělým mozkem potkana. Oblast MNTB a 7 n. je růžově zvýrazněna. Upraveno dle atlasu *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, George Paxinos & Charles Watson, 4. vydání (1998).

3.3.2. Příprava řezů u dospělého potkana, myši

Dospělí samci potkana kmene Wistar (P57-87; o hmotnosti ~250 g) anebo dospělé myši kmene BALB/c (obě pohlaví) byli uvedeni do celkové anestezie podáním ketaminu a xylazinu (100 mg/kg a 16 mg/kg váhy zvířete, i. p.; Inj. Calypsol, Richter Gedeon, Hungary; Inj. Xylapan, Vétouqiol, UK). Tkáně pokusných zvířat byly nejprve promyty fyziologickým roztokem s Heparinem (5 000 m.j. na 150 ml fyziologického roztoku) pomocí transkardiální perfúze. Poté byly tkáně promyty vychlazeným a čerstvě připraveným fixačním roztokem o složení: 4% PF v 0,1 M PB. Po vyjmutí mozku z lebky byly připraveny na vibračním mikrotomu Leica VT1000 300 μ m silné koronální anebo parasagitální řezy, které obsahovaly MNTB nebo AVCN. Řezy byly dále zpracovány stejným způsobem jako řezy u mladého potkana, viz text výše.

3.3.3. Příprava řezů pro elektronovou mikroskopii

Dospělí samci potkana kmene Wistar anebo dospělé myši kmene BALB/c byli v celkové anestezii promyti fyziologickým roztokem (s Heparinem) a následně vychlazeným a čerstvě připraveným fixačním roztokem II o složení 4% PF, 15% kys. pikrová a 0,05% GA v 0,1 M PB. Mozek byl vyjmut, postfixován ve stejném fixačním roztoku II (30 min.) a několikrát promyt v 0,1 M PB. Z mozkového kmene byly dále připraveny koronální řezy o tloušťce 50 μ m.

3.3.4. Fluorescenční mikroskopie

Podložní skla se zmrazenými řezy byla promyta 0,1 M PB a přes noc inkubována v ředící směsi CHTA spolu s primárními protilátkami při pokojové teplotě (21-23°C). Poté byly řezy několikrát promyty v 0,1 M PB a inkubovány 2 hodiny v ředící směsi CHTA současně se sekundárními protilátkami. Seznam použitých sekundárních protilátek je uveden v Tabulce 2. Po inkubaci byly řezy promyty v 0,1 M PB a zamontovány do média na vodní bázi Aqua-Poly/Mount (Polysciences, USA).

Snímky byly pořízeny prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu Leica DMRE s konfokálním nástavcem Leica TSC-SP1 anebo pomocí Olympus FluoView FV300 s tělem mikroskopu Olympus BX61, které byly vybaveny laserovou diodou

405nm, argonovým (Ar) iontovým a helium-neonovým (HeNe) laserem (v případě systému Leica TSC-SP1). Excitace byla použita o vlnové délce 488/543/633 nm. Jednotlivé snímky byly zachyceny ve třech kanálech: (i) zelený kanál s detekcí v rozsahu pásmového filtru 500 nm až 535 nm, (ii) červený kanál s detekcí v rozsahu vlnových délek od 565 nm do 615 nm a (iii) modrý kanál v rozsahu 670 nm až 770 nm. U systému Olympus FluoView FV300 s využitím argonového (Ar), zeleného HeNe a červeného HeNe laseru. Excitace byla při stejných vlnových délkách, tj. 488/543/633. Signál byl detekován bariérovými filtry v rozmezí vlnových délek 510-530 nm, 560-600 nm a 660 nm. Snímky jednotlivých barev byly pořizeny postupně, aby se zabránilo nespecifickému prolínání signálu. Navíc zde byl použit kanál, který nám umožnil zachytit obraz v procházejícím světle (DIC, diferenciální interferenční kontrast). Programy Leica confocal software 2.5 (Německo) anebo Olympus FluoView 5.0 (Japonsko), byly použity k získání a zpracování jednotlivých snímků. Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu byly jednotlivé roviny snímků anebo série snímků (krok v ose z 1 μ m) jednoho, dvojího anebo trojího značení snímány na mikroskopu Leica a Olympus olejovými imerzními objektivy PlanApochromat (PIAPO) 63x/NA 1,32-0,6, 40x/NA 1,25-0,75, HC PL FLUOTAR 20x/NA 0,50 a HCX APO 10x/NA 0,30 W U-V-I (Leica) a dále u mikroskopu Olympus objektivy PlanApo 60x/NA 1,42, UPlanFLN 40x/NA 1,30 a UPlanFLN 10x/0,30 při rozlišení 1024x1024 pixlů. Jas a kontrast snímků byl optimalizován v programu Adobe Photoshop CS4 Extended version 11.0.2 (Adobe Systems Inc., USA). Ke zvýšení jasu i kontrastu u prezentovaných snímků byly použity lineární metody, které byly aplikovány na všechny snímky se stejnými parametry, pokud není uvedeno jinak.

3.3.5. Pre-embedding imunoelektronová mikroskopie

Řezy byly inkubovány po dobu 1 hod. v kryoprotektivním roztoku složeném z 25% sacharózy w/v a 10% glycerolu v/v v 50 mM PB. Poté byly řezy akutně zmrazeny v isopentanu (5-6 s) a následně v tekutém dusíku (2-3 s). Po rozmražení byly řezy vloženy zpět do kryoprotektivní směsi a promyty v pufrech: 0,1 M PB, 50 mM TBS. Inkubovány v roztoku Chemiblockeru (20% v/v v 50 mM TBS, pH 7,4) po dobu 1 hod. při pokojové teplotě. Značení primárními protilátkami ředěných ve směsi (5% Chemiblocker v TBS) probíhalo přes noc při 4°C. Poté byly řezy promyty 50 mM TBS

a inkubovány se směsí 2°Ab naředěných ve stejné ředící směsi jako 1°Ab přes noc při 4°C. Použité 2°Ab byly buď biotinylovány (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) nebo konjugovány s 1,4 nm zlatými částicemi (Nanoprobes, USA). Po několika po sobě jdoucích promytích v 50 mM TBS a 25 mM PBS byly řezy postfixovány v 1% GA *v/v* ředěném v 25 mM PBS 10 min. Řezy byly opět promyty, nejprve 25 mM PBS a následně v deionizované vodě. 2°Ab s navázanými zlatými částicemi byly zintenzivněny stříbrem prostřednictvím sady HQ Silver Enhancement (Nanoprobes, USA). Dále byly inkubovány s avidin-biotinovým komplexem (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, USA) pro zesílení signálu. Tento komplex značený křenovou peroxidázou (HRP) byl vizualizován přispěním katalyticko-histochemické metody s diaminobenzidinem (DAB) za změny komplexu na hnědou sraženinu. Po několika promytích v 50 mM TB a 0,1 M PB byla tkáň zafixována a kontrastována 1% oxidem osmičelým *v/v* (OsO₄ v 0,1 M PB; TAAB, UK). Ke konečnému kontrastování struktur byl použit 1% uranyl acetát *w/v* (Polyscience, USA) v 70% etanolu ve tmě při pokojové teplotě po dobu 35 minut. Řezy byly následně odvodněny ve vzestupné alkoholové řadě (50%, 70%, 90%, 96%, 100%, 100%/10 min.), dosušeny propylen oxidem (Polyscience, USA) a prosyceny epoxidovou pryskyřicí (Durcupan ACM, Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) při pokojové teplotě. Další den byla zalitá tkáň přenesena na podložní skla potažená tenkou nepřilnavou vrstvou (Hobby Time Formen Trennmittel, Glorex, Švýcarsko) a při teplotě 55°C vytvrzena mezi podložním a krycím sklem přes noc. Po polymerizaci byla z řezu vyříznuta menší oblast zájmu (MNTB), zalitá stejnou pryskyřicí do kapsle a opětovně vytvrzena při 55°C. Z takto připravené tkáně byly nakrájeny 70-80 nm silné řezy diamantovým nožem Ultra Diamond Knife 35°, 3 mm (DiATOME, USA) na ultramikrotomu Reichert Ultracut S (Leica, Německo). Tyto tzv. ultratenké řezy byly přeneseny na měděné mřížky potažené formwarovou membránou (0,35% Formwar v ethylendichloridu *w/v*; Plano GmbH, Německo).

Jednotlivé řezy nebo série řezů s jedním anebo dvojím značením byly snímány na transmisním elektronovém mikroskopu LEO 906E (Carl Zeiss, Německo) s urychlujícím napětím 120 kV, digitální kamerou Mega View II a programovým vybavením BioVision/VarioVision 3.2 (Soft Imaging System, Olympus). Získané snímky byly zpracovány a analyzovány pomocí programů ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) anebo ReconstructTM software (Fiala, 2005). Ke zvýšení jasu

a kontrastu byl použit program Adobe Photoshop CS4 Extended podobně jako u fluorescenční mikroskopie.

3D rekonstrukce byly vyhotoveny v programu IRIS Explorer (NAG, Oxford, UK) anebo ReconstructTM, veškeré statistické vyhodnocení pak v programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA).

3.3.6. Retrográdní značení neuronálních buněk

K pokusům byli použiti potkani kmene Wistar ve věku P12-P18 obou pohlaví. Mozek anestetizovaných a následně dekapitovaných zvířat byl rychle vyjmut a ponořen do ledově studeného extracelulárního roztoku s nízkou koncentrací Ca^{2+} . Biotinylovaný dextran amin *w/v* (10% BDA, 10 kDa; Molecular Probes, USA) byl injikován na ventrální straně mozkového kmene do svazku axonů laterálně od mediální roviny mozkového kmene, kde dochází ke křížení vláken (značení globulárních buněk v AVCN), nebo do ipsilaterálního LSO (značení hlavních neuronů v MNTB). Aplikace byla prováděna borosilikátovou mikropipetou o průměru 15-20 μm (obr. 23) pod nízkým tlakem za vizuální kontroly ve stereomikroskopu Leica S6E.

Izolovaný mozkový kmen byl poté inkubován v okysličeném extracelulárním roztoku po dobu 6 hodin při pokojové teplotě. Po inkubaci byly připraveny 100 μm silné koronální nebo parasagitální řezy, které byly fixovány prostřednictvím čerstvě připraveného 4% PF přes noc při 4°C. Další den byly řezy promyty v 0,1 M PB a 2 hodiny inkubovány se streptavidinem konjugovaným s Alexa Fluor488 při pokojové teplotě. Řezy byly opět promyty 0,1 M PB a zamontovány do média Aqua Poly/mount.

Při zkoumání axonálního značení byla tato metoda retrográdního barvení pomocí BDA spojena s imunohistochemickým barvením. Získané řezy mozkového kmene pak byly fixovány po dobu 10 min, několikrát promyty v 0,1 M PB a inkubovány v roztoku, který obsahoval primární protilátky (Ga1, GE nebo CR) přes noc při pokojové teplotě. Druhý den byly řezy několikrát promyty v 0,1 M PB a inkubovány 2 hodiny v roztoku, který obsahoval sekundární protilátky konjugované s CY3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a streptavidin konjugovaný s Alexa Fluor488 (Molecular Probes). Nakonec byly řezy několikrát promyty v 0,1 M PB a zamontovány do média Aqua Poly/mount. Snímky byly pořízeny olejovým imerzním objektivem PLAPO 40x/NA

1,25-0,75 nebo HC PL FLUOTAR 20x/NA 0,50 (Leica) a dále stejným způsobem jako v odstavci Fluorescenční mikroskopie, viz text výše.

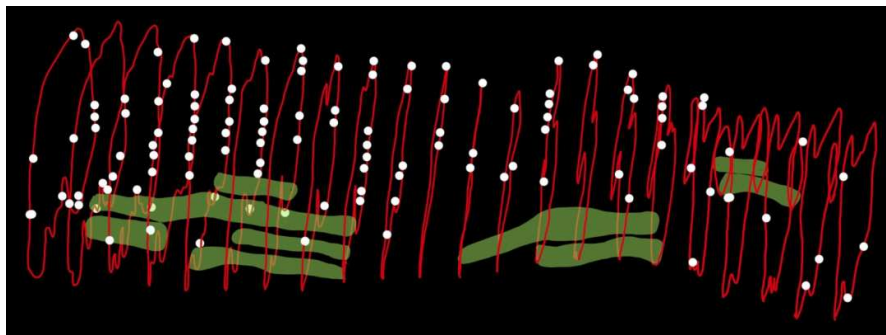
3.3.7. Imunoblot (Western Blot)

Vzorky tkáně MNTB získané z dospělého potkana byly krátce homogenizovány ve 200 μ l ledově studeném lyzačním pufru, který obsahoval 20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 v/v, 0,1% dodecyl sulfátu sodného (SDS) w/v, 1 mM EDTA, včetně kompletní proteázové inhibitorové směsi (Roche Diagnostics, Švýcarsko) při 4°C. Homogenát byl odstředěn při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut při teplotě 4°C (rotor Fa 45-30-11, Eppendorf, Německo). Supernatant byl proporčně smíchan s NuPAGE®Buffer Sample LDS (Invitrogen, USA), nanesen na NuPAGE®Novex 3-8% Tris-Acetátový Gel (Invitrogen) a později přenesen na nitrocelulóзовou membránu (Bio-Rad Laboratories, USA). Aby se zabránilo nespecifické vazbě protilátek, membrána byla blokována v 5% odtučněném mléku w/v rozpuštěném v TBS doplněném 0,1% Tween 20 (TBST) v/v spolu s primárními protilátkami přes noc při 4°C. Nitrocelulóзовá membrána byla následně inkubována se sekundárními protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou (HRP) v blokovacím pufru 1 hod. při pokojové teplotě. Membrána byla po každé inkubaci s protilátkou několikrát promyta v TBST. Nakonec byla membrána vyvolána s použitím substrátu SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific, USA) podle návodu výrobce.

3.3.8. Kvantitativní analýza trojrozměrně rekonstruovaných neuronálních výběžků

Jednotlivé snímky anebo trojrozměrné rekonstrukce byly zhotoveny, analyzovány a jednotlivé parametry měřeny ze sérií snímků či samotných snímků pořízených na transmisním elektronovém mikroskopu LEO 906E (Zeiss) v programech ImageJ (<http://rsweb.nih.gov/ij>), ReconstructTM (Fiala, 2005) a IRIS Explore (NAG, Oxford, UK). Do analýz byly zahrnuty pouze ty zlaté částice, které byly vertikálně vzdáleny od linie plazmatické membrány < 25 nm (Nyiri et al., 2005). Plocha povrchu

segmentu byla odhadnuta pomocí Cavalierova principu (Specht et al., 2013) vynásobením součtu délek obvodu řezů tloušťkou řezu.

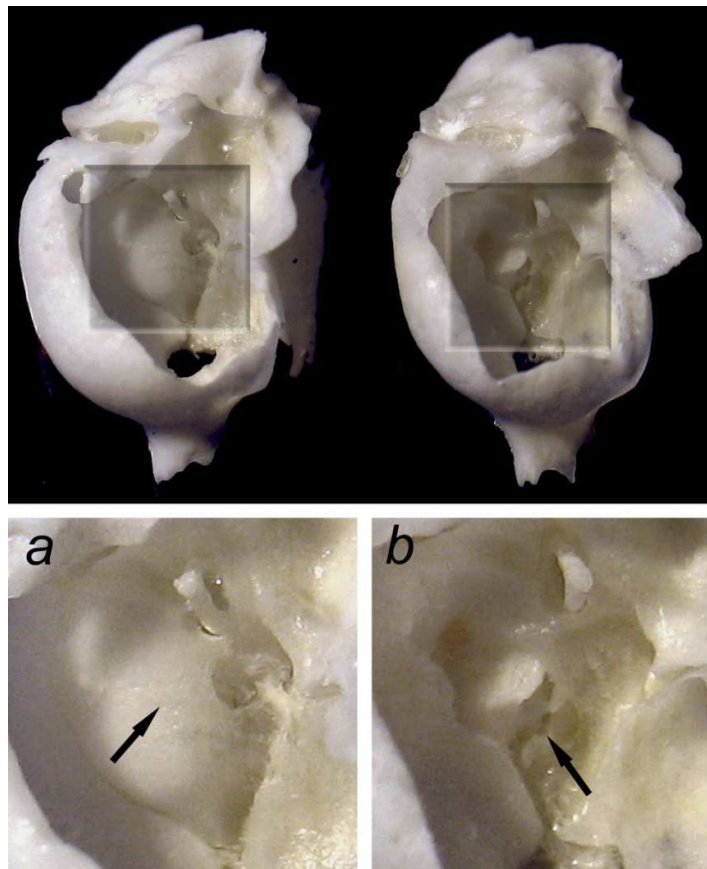


Obr. 13. **Trojrozměrná rekonstrukce části Heldova kalichu.** Příklad rekonstrukce části Heldova kalichu, která byla sestavena z 22 po sobě jdoucích ultratenkých příčných řezů výběžkem Heldova kalichu (tloušťka jednoho řezu ~70 nm). Červená čára znázorňuje presynaptickou membránu na řezu, zeleně je označena subsynaptická membrána glutamatergických aktivních zón. Bílé body ukazují umístění membránových IG částic.

3.3.9. Kochleární ablace

Bilaterální kochleární ablace (kochleotomie) byly provedeny u potkaních mláďat obou pohlaví ve věku P5-P6 ($n = 6$), přibližně týden před nástupem slyšení (~P11). Mláďata byla uvedena do celkové anestezie parami isofluranu a umístěna na vyhřívanou podložku za neustálé kontroly jejich fyziologických funkcí. Kůže za ušním boltcem (postaurikulární přístup) byla rozstřížena a byla zpřístupněna tympanická bula. Do kostěné stěny tympanické buly byl vyvrtán otvor, který umožnil mechanické rozrušení a odstranění hlemýždě. Vzniklá dutina byla vyplněna sterilní gelovou pěnou (SUGI, REF 31603, Kettenbach, Německo), která obsahovala ototoxickou látku kanamycin (kanamycin sulfát, Sigma-Aldrich, USA). Poté byla rána zašita a mláďata byla po skončení účinku anestézie vrácena zpět k matce. Procedury vedoucí k bilaterální kochleární ablaci provedla Mgr. Bohdana Hrušková z naší laboratoře Synaptické fyziologie, ÚEM AV ČR. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin. První skupina potkanů ($n = 3$) byla použita k imunohistochemickým pokusům po 6-10 dnech a druhá skupina potkanů ($n = 3$) po dvou měsících. Kontrolní zvířata byla podrobena podobným procedurám bez kochleotomie.

Účinnost ablací u pokusných zvířat byla posouzena pomocí fyziologických a histologických metod. Úplná sluchová ztráta potkanů po kochleární ablacii byla potvrzena měřením tzv. evokovaných potenciálů z mozkového kmene (ABR, *angl.* Auditory brainstem response). Měření ABR na zvířatech bylo provedeno bezprostředně před imunohistochemickým pokusy RNDr. Jiřím Popelářem, Ph.D. na Oddělení neurofyziologie sluchu, ÚEM AV ČR. Druhý způsob spočíval v anatomickém srovnání oblastí vnitřního ucha u kochleotomizovaných a kontrolních zvířat, viz obr. 14.



Obr. 14. *Kontrola úspěšnosti experimentálního odstranění kochleárního aparátu. Snímky ukazují kontrolní zvíře (vlevo) a zvíře po kochleotomii (vpravo). Oblast vnitřního ucha je zobrazena ve výřezech s větším zvětšením. Šipky poukazují na neporušenou (a) a porušenou (b) kochleu.*

3.3.10. Statistické zpracování výsledků

Pokud nebude uvedeno jinak, výsledky charakterizující vlastnosti zkoumaných souborů v této práci byly uvedeny ve formě aritmetického průměru se střední chybou

průměru (průměr \pm s.e.m.). Statistická významnost rozdílů mezi aritmetickými průměry dvou statistických souborů byla hodnocena párovým nebo nepárovým t-testem a Mann-Whitney testem. Pokud byly aritmetické průměry porovnávány u několika testovaných statistických souborů, byl použit Dunnettův nebo Bonferroni mnohonásobný srovnávací test. Nepárový Kolmogorov-Smirnovův test byl použit pro srovnání kumulativních histogramů.

Veškerá statistická analýza byla vypracována pomocí programu GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Hladina statistické významnosti P rovná nebo nižší 0,05 byla považována za statisticky významnou.

4. Výsledky

Výsledky dizertační práce jsou založeny na těchto publikacích:

Hruskova B, **Trojanova J**, Turecek R (2007) Modulation of Excitatory synaptic transmission by K_{Ca} and GABAB receptors on central type synapses. *Physiol Res* 56:13P.

Schwenk J, Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, Bildl W, Tarusawa E, Kulik A, Unger A, Ivankova K, Seddik R, Tiao JY, Rajalu M, **Trojanova J**, Rohde V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B (2010) Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* 465:231-235.

Hruskova B*, **Trojanova J***, Kulik A, Kralikova M, Pysanenko K, Bures Z, Syka J, Trussell LO, Turecek R (2012) Differential distribution of glycine receptor subtypes at the rat calyx of held synapse. *J Neurosci* 32:17012-17024.

**B.H. a J.T. se podílely na práci stejnou měrou*

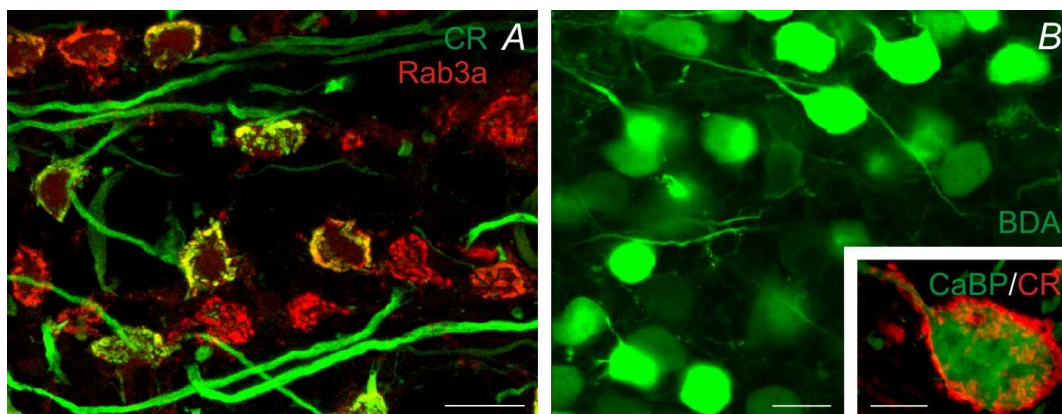
Trojanova J, Kulik A, Janacek J, Kralikova M, Syka J, Turecek R (*Frontiers in Neural Circuits, Inhibitory Function in Auditory Processing (Bude zasláno v průběhu dubna 2014)*) Surface distribution of glycine receptors in the mature calyx of Held nerve terminal.

4.1. Studium lokalizace a podjednotkového složení GlyR v Heldově synapsi v MNTB dospělého potkana

4.1.1. Postsynaptické GlyR

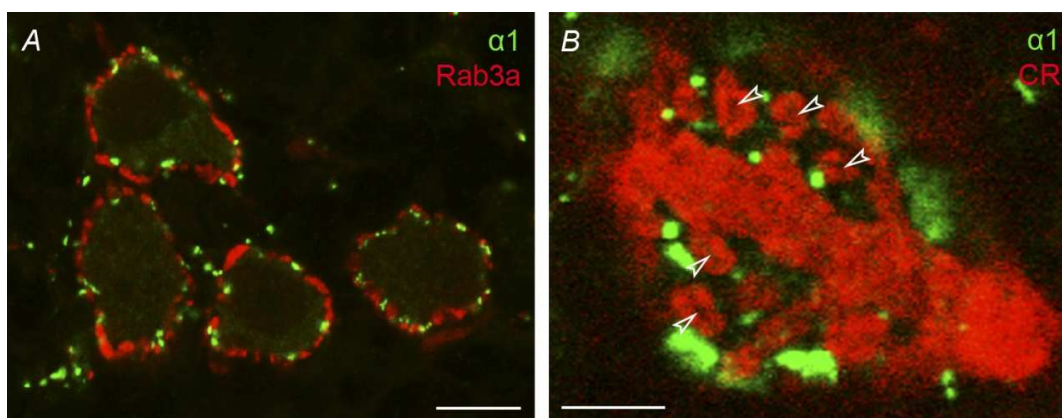
Lokalizace a podjednotkové složení GlyR v MNTB dospělého potkana byly v této práci studovány imunohistochemickými metodami. Abychom mohli rozlišit presynaptickou a postsynaptickou část Heldovy synapse, označili jsme Heldovy kalichy (presynaptické zakončení) protilátkami rozeznávajícími Ca^{2+} vážící protein calretinin (CR), nebo protein Rab3a (obr. 15A), který je součástí membrány synaptického váčku (Lohmann and Friauf, 1996; Felmy and Schneggenburger, 2004). Těla a výběžky hlavních neuronů byly označeny protilátkami rozeznávajícími buď Ca^{2+} vážící protein calbindin (CaBP, obr. 15B, výřez) (Felmy and Schneggenburger, 2004), nebo retrogradně biotinylovaným dextran aminem (BDA; obr. 15B) (Veenman et al., 1992).

GlyR byly označeny monoklonálními protilátkami mAb2b, které rozpoznávají extracelulární část receptoru (prvních 10 aminokyselin) na N-konci $\alpha 1$ podjednotky (Pfeiffer et al., 1984). Znárodnění mAb2b pomocí sekundárních protilátek konjugovaných s fluorescenčními barvivou ukázalo jejich sdružování do shluků. Tyto shluky nevykazovaly překryvy s Rab3a ani CR pozitivními fluorescenčními signály. Z toho vyplývalo, že tyto $\alpha 1$ shluky byly lokalizovány postsynapticky (obr. 16).



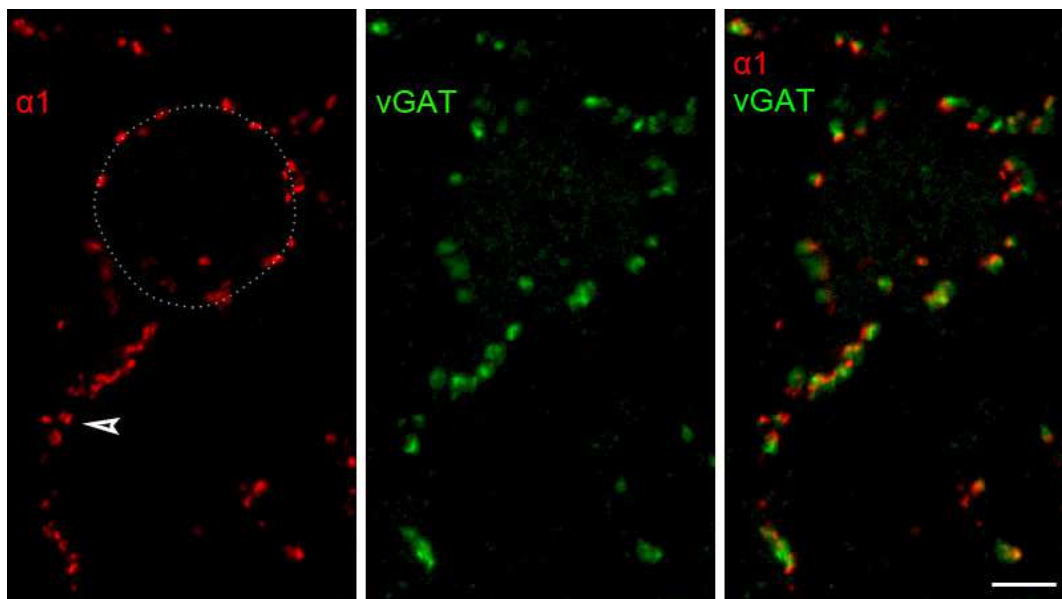
Obr. 15. *Identifikace pre- a postsynaptické části Heldovy synapse v MNTB. A, Konfokální snímek ($9 \mu\text{m}$ v ose z) presynaptických neuronů (Heldovy kalichy), které byly identifikovány dvojím značením s primárními protilátkami namířenými proti calretininu (CR, zeleně) a Rab3a (červeně).*

Postsynaptické hlavní neurony byly CR a Rab3a negativní. **B**, Hlavní neurony retrográdně značené biotin dextran aminem (BDA, zeleně) injektovaným do ipsilaterální olivy superior (LSO). **Výřez**, Projekce 11 rovin v ose z (tloušťka 11 μm) hlavním neuronem, který byl značený dvojím barvením pomocí protilátek proti specifickému postsynaptickému markeru, calbindinu (CaBP, zeleně) a presynaptickému calretininu (červeně). Měřítko: 20 μm (A, B), 10 μm (výřez).



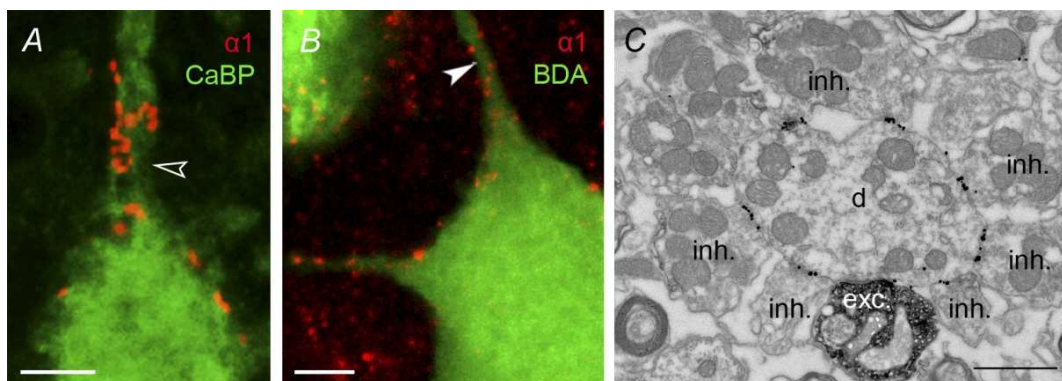
Obr. 16. **Somatická lokalizace $\alpha 1$ podjednotky GlyR v dospělém MNTB potkana.** **A, B** Snímky pořizené na konfokálním mikroskopu ukazují Rab3a nebo CR imunoreaktivní kalichy (červeně) a shluky $\alpha 1$ podjednotek GlyR (zeleně). Z obrázků je patrné, že se fluorescenční signály nepřekrývají. Tento výsledek naznačuje postsynaptickou lokalizaci GlyR. Šipky označují prstencovité řezy presynaptickými výběžky, které jsou typické pro dospělý Heldův kalich. Měřítko: 20 μm (A), 4 μm (B)

Téměř všechny $\alpha 1$ pozitivní shluky vykazovaly kolokalizaci s vGAT (vezikulární GABA/glycinový transportér) pozitivním nervovým zakončením (obr. 17). Tím bylo ukázáno, že fluorescenční shluky označovaly synapticky lokalizované GlyR. Mnoho těchto shluků bylo uspořádáno do útvarů připomínajících růžice (obr. 18A, 22). Kvantifikovali jsme počet růžic na somatech 192 postsynaptických neuronů v koronálních řezech centrální oblasti MNTB. 161 buněk obsahovalo alespoň jednu růžici, přičemž průměrný počet byl $3,07 \pm 0,42$ růžic/buňku.



Obr. 17. *Synaptická lokalizace Ga1 na tělech PC.* Snímek z konfokálního mikroskopu (2 roviny po 1 μm) ukazuje tělo PC (tečkovaně znázorněno) se shluky $\alpha 1$ podjednotek GlyR (červeně) a vGAT-pozitivními inhibičními zakončeními (vGAT, zeleně). Snímek ukazuje překryv obou fluorescenčních signálů dokládající synaptickou lokalizaci GlyR. Měřítko: 4 μm

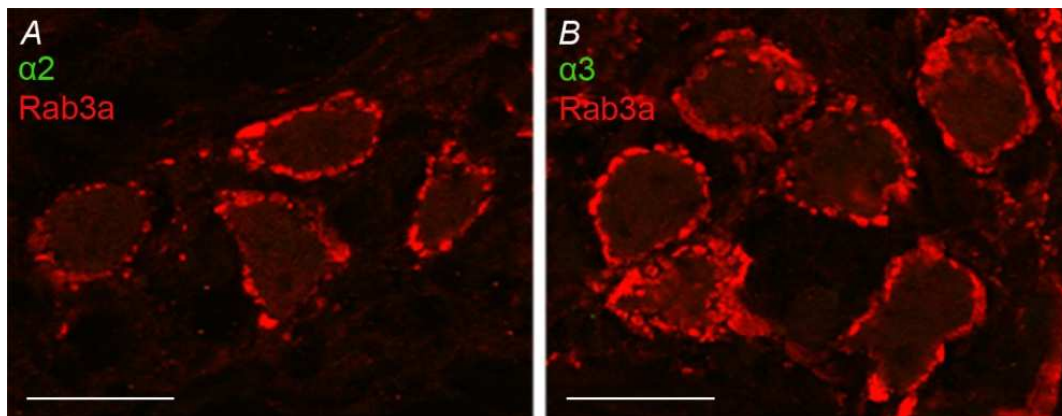
Shluky, které obsahovaly $\alpha 1$ podjednotku GlyR, byly rovněž nalezeny na dendritech MNTB hlavních neuronů (obr. 18A, 18C) a v proximálních částech (vzdálených < 20 μm od těla) jejich axonů odpovídající tzv. iniciálnímu segmentu (obr. 18B).



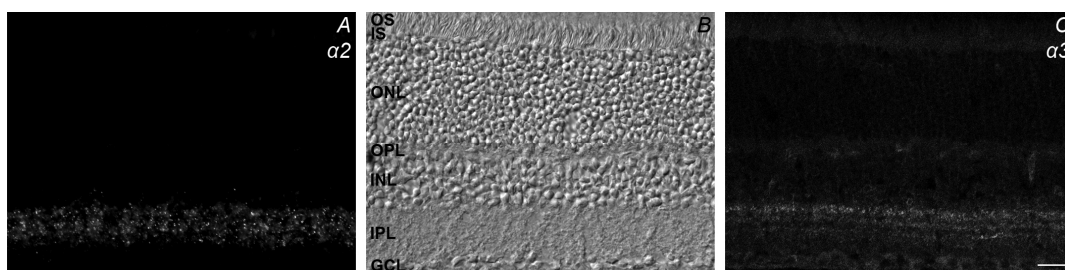
Obr. 18. *Expresse $\alpha 1$ podjednotek GlyR na výběžcích MNTB hlavních neuronů.* A, Snímek PC s dvojitým značením proti Ga1 (červeně) a postsynaptickému proteinu calbindinu (CaBP, zeleně). Šipka ukazuje na dendritickou lokalizaci Ga1. B, Projekce 4 snímků v z-ose (4 μm) ukazuje PC retrogradně značený BDA injektovaným do ipsilaterálního LSO. Snímek dokládá přítomnost

shluků *Ga1* (červeně) na dendritech a na postsynaptickém axonu (šipka) v oblasti iniciálního segmentu. **C**, Imunoelektronový snímek, který znázorňuje příčný řez dendritem (*d*) PC. Dendrit nese axodendritické synapse, excitačního (*vGluT/*peroxidáza, *exc.*) a inhibičního (*inh.*) typu. Subsýnaptické membrány *vGluT* negativních boutonů obsahují shluky *Ga1* imunopozitivních zlatých částic (černé body). Měřítko: 4 μm (**A**, **B**), 1 μm (**C**)

Přítomnost dalších podjednotek GlyR v dospělém MNTB byla testována pomocí protilátek namířených proti podjednotkám $\alpha 2$ nebo $\alpha 3$ GlyR. Ani jedna z protilátek však neposkytla pozitivní značení neuronů v MNTB (obr. 19). Jako pozitivní kontrolu kvality protilátek jsme použili myší retinu známou specifickou expresí podjednotek $\alpha 2$ a $\alpha 3$ (Haverkamp et al., 2004). Výsledky těchto pokusů jsou znázorněny na obr. 20A, B. Specifické imunofluorescenční signály byly detekovány ve vnitřní plexiformní vrstvě retiny. Tento výsledek je v souladu s očekávanou expresí podjednotek $\alpha 2$ a $\alpha 3$ v této oblasti a dokazuje funkčnost námi používaných protilátek.



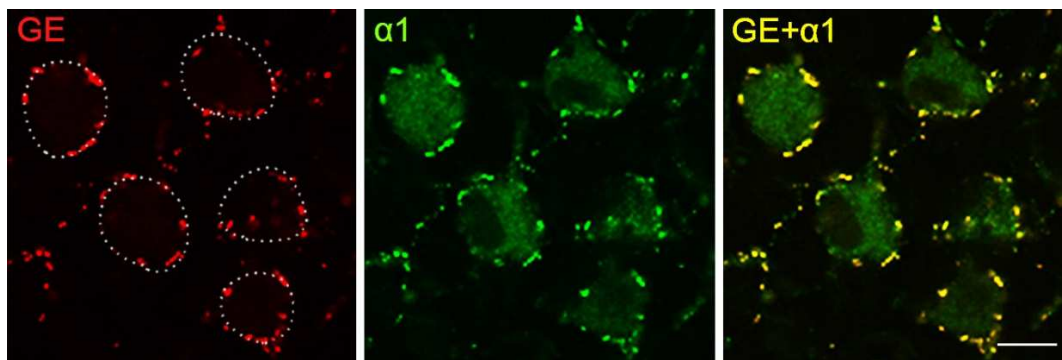
Obr. 19. *Podjednotky $\alpha 2$ a $\alpha 3$ GlyR nejsou součástí GlyR v MNTB. A, B, Konfokální snímky jedné roviny řezu MNTB značeného dvojím barvením proti Rab3a (červeně) a proti $\alpha 2$ a $\alpha 3$ podjednotkám GlyR (zeleně). Ze snímků je patrné, že nebylo nalezeno žádné specifické značení $\alpha 2$ a $\alpha 3$ podjednotek GlyR. Měřítko: 20 μm (**A**, **B**)*



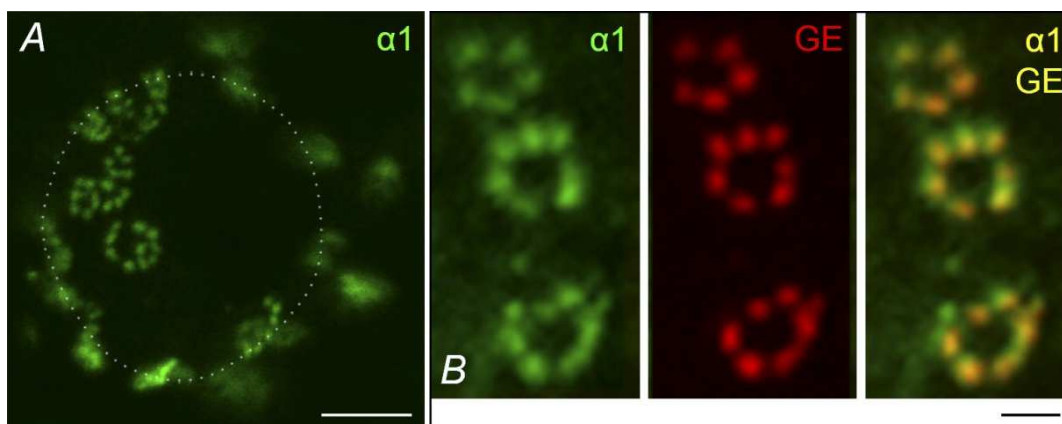
Obr. 20. **Kontrola funkčnosti protilátek podjednotek $\alpha 2$ a $\alpha 3$ GlyR v retině dospělé myši.** **A,** Snímek z konfokálního mikroskopu jednou rovinou vertikálního řezu retiny ukazuje rozložení $\alpha 2$ podjednotek GlyR ve vnitřní plexiformní vrstvě. **B,** Snímek stejné části řezu pořizovaný v procházejícím světle (DIC) ukazuje jednotlivé vrstvy retiny (OS fotoreceptorová vnější část, IS fotoreceptorová vnitřní část, ONL zevní nukleární vrstva, OPL zevní plexiformní vrstva, INL vnitřní nukleární vrstva, IPL vnitřní plexiformní vrstva, GCL vrstva gangliových buněk). **C,** Snímek zobrazuje $\alpha 3$ pozitivní fluorescenční signály ve vnitřní plexiformní vrstvě. Měřítko: 20 μm

V dalších experimentech jsme testovali přítomnost β podjednotky GlyR v MNTB pomocí monoklonální protilátky mAb7a namířené proti gephyrinu (GE), proteinu asociovanému s β podjednotkou GlyR (Kirsch et al., 1991). Obrázky 21 a 22 ukazují GE pozitivní shluky na tělech MNTB hlavních neuronů. Tyto shluky vykazovaly podobnou lokalizaci jako fluorescenční signály získané prostřednictvím protilátky mAb2b, která značí $\alpha 1$ podjednotky GlyR. To naznačilo, že GlyR v MNTB jsou tvořeny jako heteromery podjednotek $\alpha 1$ a β . Abychom zjistili stupeň kolokalizace GE pozitivních a $\alpha 1$ pozitivních shluků, provedli jsme dvojí značení řezů MNTB oběma protilátkami a kvantifikovali překryv výsledných fluorescenčních signálů. Do analýz bylo zahrnuto 192 těl hlavních neuronů z 11 náhodně vybraných oblastí MNTB. Ukázalo se, že kolokalizace $\alpha 1$ a GE imunofluorescenčních signálů byla z $96,4 \pm 7,9 \%$.

Naše experimenty tak ukázaly, že postsynaptické GlyR ve zralém MNTB jsou tvořeny heteromery složenými výhradně z $\alpha 1$ a β podjednotek.



Obr. 21. *Membránové shluky GlyR obsahují $\alpha 1$ a β podjednotky. Hlavní neurony MNTB značené protilátkami proti β podjednotku-vážečcímu proteinu gephyrinu (GE, červeně) a proti $\alpha 1$ podjednotce (zeleně). Oba fluorescenční signály vykazují vysoký stupeň překryvu (vpravo). Tento překryv naznačuje heteromerické složení postsynaptických GlyR. Přerušovaná bílá čára znázorňuje povrch těla PC. Měřítko: 10 μ m (1 rovina)*

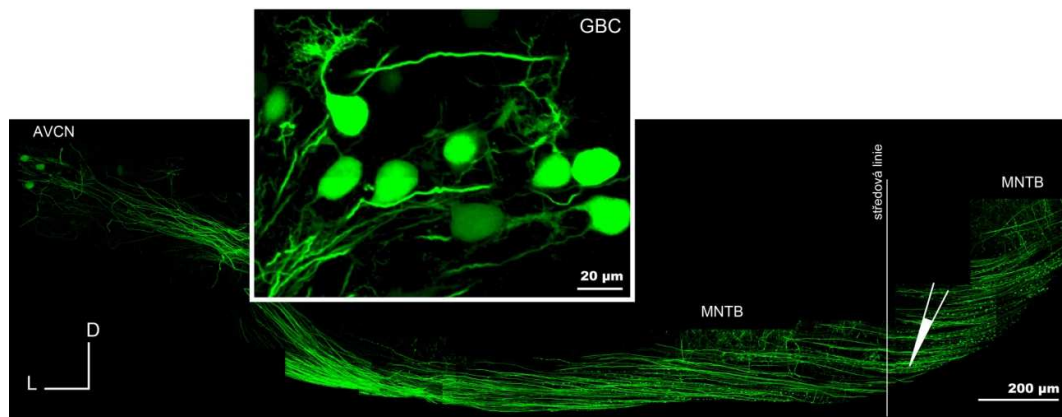


Obr. 22. *$\alpha 1$ a GE kolokalizují ve shlucích synaptických receptorů. A, Shluky $\alpha 1$ podjednotek uspořádaných do růžic na tělech (čárkovaně) PC. Organizace postsynaptických receptorů do růžic svědčí o jejich synaptické lokalizaci. B, Růžicovité shluky GlyR obarvené protilátkami proti $\alpha 1$ (zeleně) a gephyrinu (červeně). Překryv obou imunofluorescenčních signálů ukazuje na heteromerické složení synaptických GlyR (žlutě). Měřítko: 4 μ m (A), 1 μ m (B; 1 rovina)*

4.1.2. Presynaptické GlyR

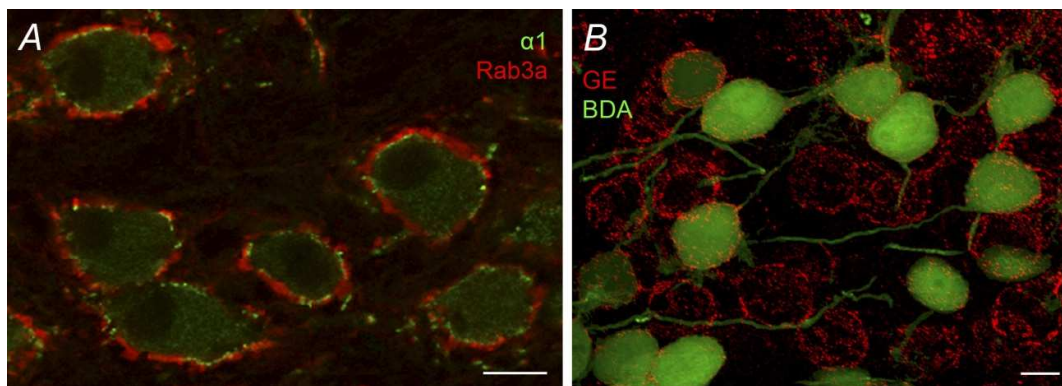
V další sadě experimentů jsme zjišťovali podjednotkové složení GlyR na tělech globulárních buněk (GBC) v anteroventrálním kochleárním jádře (AVCN) dospělého potkana pomocí konfokální mikroskopie.

Těla GBC byla retrográdně značena biotinylovaným dextran aminem (BDA, obr. 23, viz metody). Presynaptická zakončení v AVCN byla značena protilátkami proti CR nebo Rab3a.



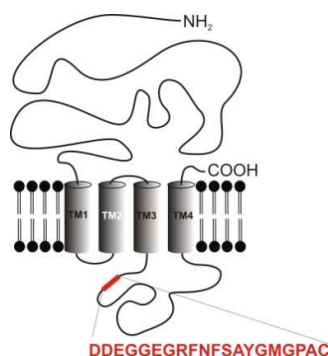
Obr. 23. **Identifikace těl GBC v AVCN.** Těla GBC byla retrográdně značena pomocí biotinylovaného dextran aminu (BDA). BDA byl injikován na ventrální straně mozkového kmene do svazku axonů laterálně od místa, kde dochází ke křížení vláken (viz znázorněná mikropipeta). Celá dráha AVCN-MNTB byla sestavena z jednotlivých snímků v jednu montáž (27 rovin v ose z). Vložený obrázek (5 rovin v ose z) s několika GBC byl pořizen v jiné sérii experimentů, než je znázorněno v tomto komplexním snímku. Na vloženém snímku jsou patrné keříčkovité dendrity typické pro GBC.

Dvojí značení řezů AVCN pomocí BDA a protilátek proti GlyR $\alpha 1$ ukázalo shlukovitou distribuci GlyR podobně jako u PC v MNTB. GlyR $\alpha 1$ signály nevykazovaly kolokalizaci s anti-Rab3a fluorescenčními signály, které tak naznačovaly somatickou lokalizaci GlyR (obr. 24A). Protilátky proti $\alpha 2$ a $\alpha 3$ podjednotkám GlyR neposkytly specifické značení na tělech GBC (snímky neukázány). Těla GBC však byla silně imunoreaktivní na gephyrin (obr. 24B). Fluorescenční signály GlyR $\alpha 1$ a GE kolokalizovaly podobným způsobem jako v případě postsynaptických GlyR v MNTB. Naše pokusy tak jasně ukázaly, že těla zralých GBC obsahují heteromerické receptory složené z podjednotek $\alpha 1$ a β .

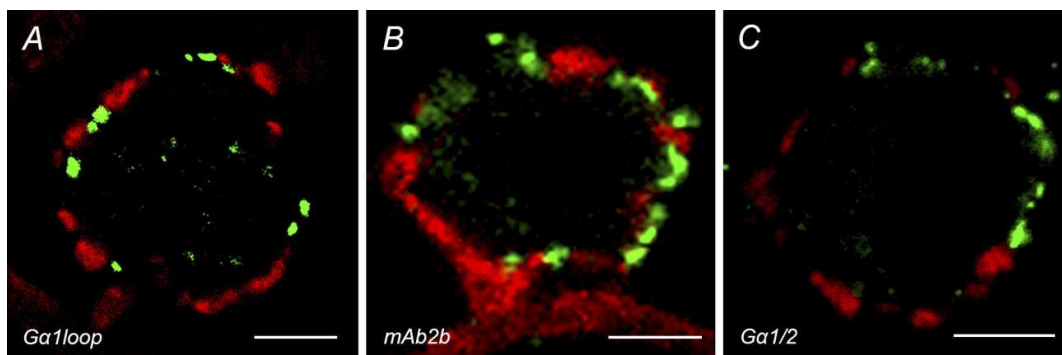


Obr. 24. **GlyR na tělech GBC obsahují podjednotky $\alpha 1$ a β .** A, Konfokální snímek jedné roviny řezu AVCN značeného dvojím barvením proti Rab3a (červeně) a Ga1 (zeleně), které se nepřekrývají. B, Projekce 8 konfokálních rovin řezů AVCN, která znázorňuje retrogradně značená těla GBC (BDA, zeleně) spolu se shluky GE (červeně). Měřítka: 10 μm (A, B)

V další části pokusů jsme analyzovali podjednotkové složení GlyR exprimovaných na nervových zakončeních GBC – Heldových kališích. Naše předcházející elektrofyziologické pokusy ukázaly, že proudové odpovědi GlyR na Heldově kalichu mají řádově 100x nižší amplitudy ve srovnání s odpověďmi somatických receptorů (Turecek and Trussell, 2002). Předpokládali jsme proto relativně nízkou hustotu presynaptických GlyR. Světelná mikroskopie zpravidla nevykazuje dostatečnou citlivost pro detekci receptorů o nízké hustotě. Rozhodli jsme se proto použít vysokorozlišovací imunoelektronovou mikroskopii (Triller et al., 1985; Kulik et al., 2003). GlyR byly značeny pomocí nové polyklonální protilátky namířené proti intracelulární části $\alpha 1$ podjednotky GlyR ($G\alpha_{1loop}$). Protilátka byla připravena ve spolupráci s firmou Synaptic Systems (SYSY, Německo) a rozeznává sekvenci 20 aminokyselin (DDEGGEGRFNFSAYGMGPAC) v 2. intracelulární smyčce Ga1 (obr. 25). V ověřovací sérii pokusů protilátka poskytovala stejný typ barvení postsynaptických GlyR jako široce používaná a vysoce specifická protilátka mAb2a, která se váže na extracelulární N-konec GlyR $\alpha 1$ (obr. 26) a jako další polyklonální protilátka $G\alpha_{1/2}$.

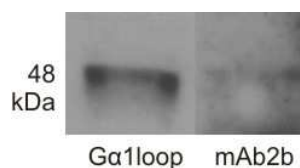


Obr. 25. **$\alpha 1$ podjednotka GlyR** s vyznačenou aminokyselinovou sekvencí 2. intracelulární smyčky, proti které byla namířena nová protilátka $G\alpha 1_{loop}$.



Obr. 26. **Porovnání značení postsynaptických GlyR novou intracelulární protilátkou.** Dvojitá barvení dospělých řezů MNTB protilátkami proti calretininu (CR, červeně) a proti $\alpha 1$ podjednotce GlyR (zeleně). **A**, Nová polyklonální králičí protilátka, která rozeznává intracelulární část $\alpha 1$ ($G\alpha 1_{loop}$). **B**, Monoklonální myší protilátka mAb2b a **C**, Polyklonální králičí protilátka $G\alpha 1/2$. Všechny tři protilátky značily podobným způsobem shluky postsynaptických GlyR na PC. Měřítka: 5 μm (A-C)

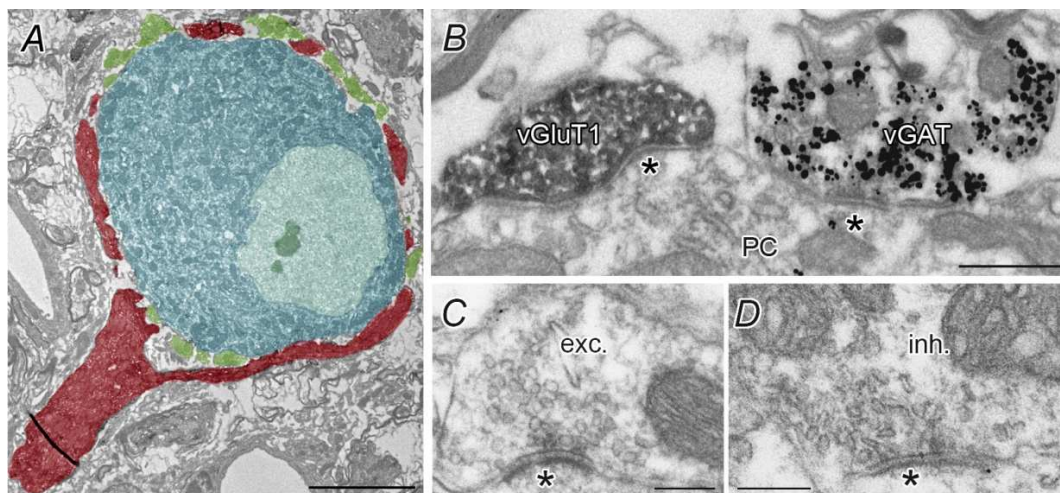
Specificita nové protilátky $G\alpha 1_{loop}$ byla rovněž ověřena imunoblotem s pozitivní kontrolní protilátkou mAb2b. Obě dvě protilátky (mAb2b a $G\alpha 1_{loop}$) ukázaly stejný motiv značení (obr. 27), a to detekovaný protein o molekulové hmotnosti 48 kDa, který odpovídá $\alpha 1$ podjednotce GlyR.



Obr. 27. **Imunoblot - $\alpha 1$ podjednotka GlyR.** Protein o velikosti zhruba 48 kDa, který odpovídá $\alpha 1$ podjednotce GlyR, byl detekován oběma protilátkami ($G\alpha_{1loop}$ a mAb2b) ve vzorcích MNTB dospělého potkana.

Při studiu presynaptických GlyR pre-embedding imunoelektronovou mikroskopií, byly komplexy primárních protilátek a receptoru detekovány pomocí sekundárních protilátek konjugovaných zlatými částicemi o průměru 20-25 nm. Obecně platí, že zlaté částice, které se nalézají ve vzdálenosti do 25 nm od plazmatické membrány (oběma směry v rovině kolmé na membránu), jsou zahrnuty do analýzy jako specifické značení (Triller et al., 1985; Nyiri et al., 2005). Naše průměrná vzdálenost mezi prostředkem zlaté částice a vnitřním okrajem presynaptické membrány činila $17 \pm 11-25$ nm (medián, dolní-horní kvartil). Naše pokusy proto poskytly první přímou demonstraci GlyR na nervovém zakončení.

Heldovy kalichy byly v našich pokusech identifikovány jako vGluT1 pozitivní struktury (obr. 28B), které obsahovaly kulaté synaptické váčky, obepínaly hlavní neurony MNTB a tvořily s nimi asymetrické synaptické kontakty (obr. 28C). vGluT1 negativní nervová zakončení, která obsahovala zploštělé synaptické váčky, byla považována za inhibiční GABA/glycinergní zakončení. Tyto struktury byly značeny protilátkami proti vezikulárnímu GABA/glycinový transporteru (vGAT) a vytvářely symetrické synaptické kontakty (obr. 28D).

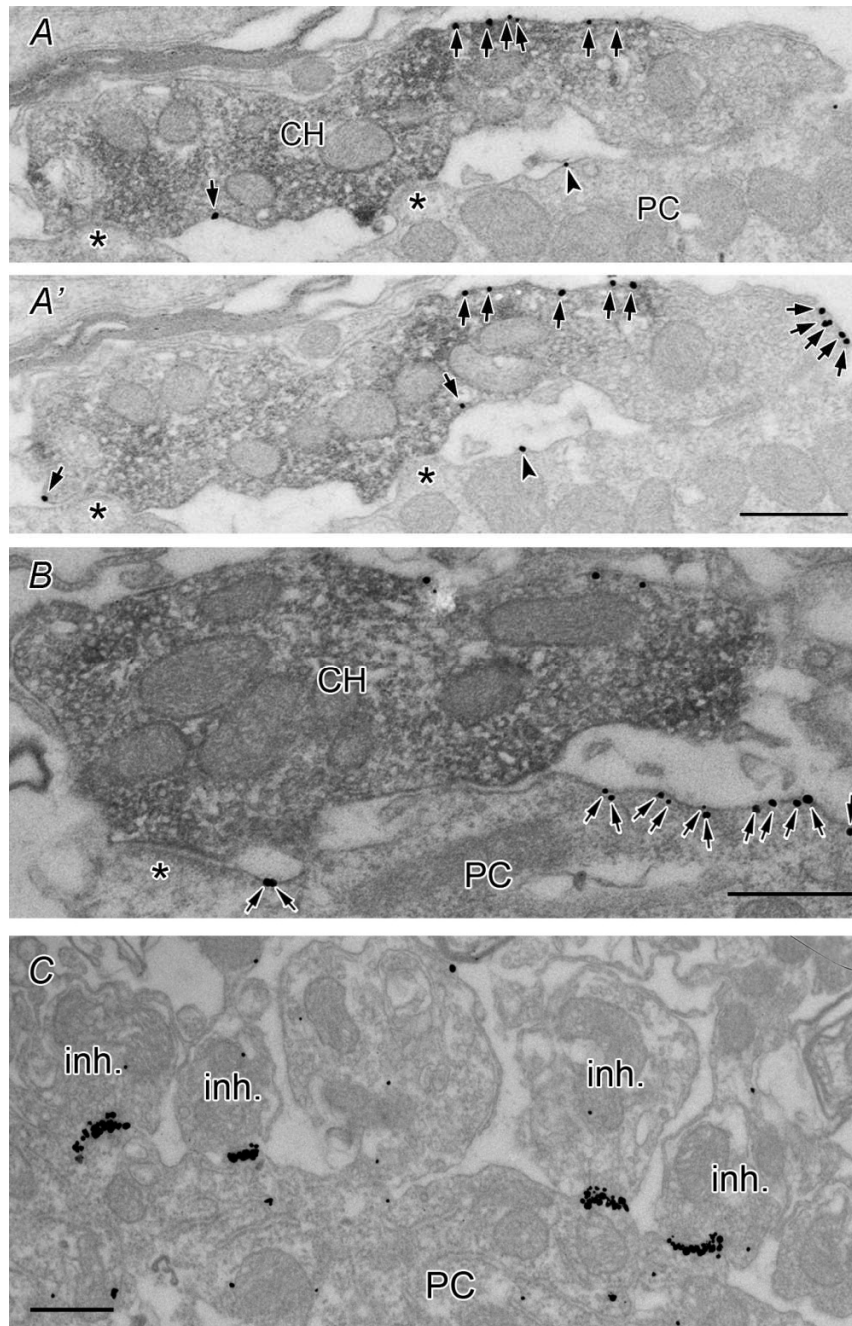


Obr. 28. **Ultrastrukturální identifikace neuronů v řezu MNTB.** *A*, Snímek z elektronového mikroskopu ukazuje tělo PC (modře) obklopené nervovými zakončeními Heldova kalichu (červeně) a inhibičními vlákny (zeleně). *B*, Heldův kalich vykazoval imunoreaktivitu s vGluT1 protilátkami konjugovanými s peroxidázou, obsahoval kulaté synaptické váčky a asymetrická axo-somatická spojení (*C*, *). GABA/glycinergní bouton byl vGAT pozitivní struktura (imunozlaté částice), který obsahoval oválné a zploštělé váčky a symetrická synaptická spojení s PC (*D*, *). Měřítka: 5 μm (*A*), 0,5 μm (*B*), 0,2 μm (*C*, *D*)

GlyR $\alpha 1$ na povrchu Heldova kalichu vykazovaly rozptýlenou distribuci bez zjevné akumulace v okolí aktivních zón (obr. 29A, A'). Zlaté částice byly přítomny také na postsynaptické membráně, kde vytvářely shluky v inhibičních subsynaptických místech (obr. 29C). Příležitostně byly zlaté částice pozorovány i v oblastech mimo synaptické spoje. Tento výsledek naznačuje přítomnost extrasynaptických GlyR na tělech hlavních neuronů (obr. 29B).

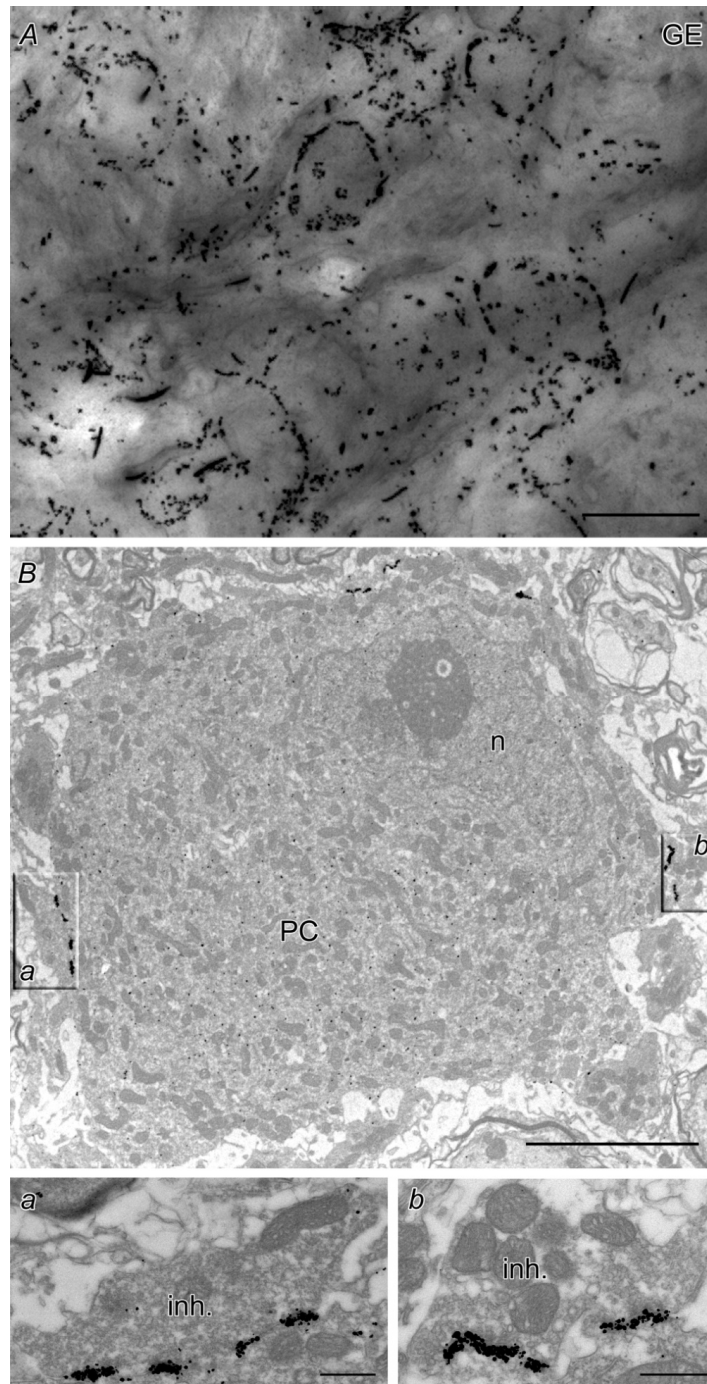
Rozptýlená distribuce presynaptických GlyR nasvědčuje absenci mechanismu zodpovědného za jejich shlukování. Závěrečnou sérii experimentů jsme proto věnovali analýze přítomnosti GE v Heldově kalichu. Pečlivé zkoumání řezů MNTB značených protilátkami proti GE neodhalilo žádné specifické značení na GE na presynaptických zakončeních (obr. 30). Naproti tomu postsynaptické PC na stejných řezech obsahovaly časté shluky gephyrinu na subsynaptické membráně (obr. 30). Je proto velmi pravděpodobné, že presynaptické receptory neobsahovaly podjednotku β . Naše pokusy tak jasně ukázaly, že GlyR v MNTB tvořily 2 odlišné populace. Somatodendritické části hlavních neuronů obsahovaly receptory tvořené heteromery $\alpha 1\beta$. Presynaptické neurony

exprimovaly GlyR, které se dělily na $\alpha 1\beta$ heteromery - na tělech GBC a na $\alpha 1$ homomery - na presynaptických zakončeních Heldova kalichu.



Obr. 29. *Difúzní vs. shlukovitá distribuce pre- a postsynaptických GlyR v MNTB. Snímky z elektronového mikroskopu představují dvojí značení MNTB řezů protilátkami namířenými proti GaI (zlaté částice, šípky) a vGluT1 (peroxidáza) podél plazmatické membrány. A, A', Dva po sobě jdoucí ultratenké řezy výběžku Heldova kalichu (CH) s asymetrickým synaptickým kontaktem (*) a tělem MNTB hlavního neuronu (PC). B, GaI (šípky) byly rovněž pozorovány*

na plazmatické membráně MNTB neuronu mimo inhibiční synaptický kontakt (*). C, MNTB hlavní neuron obklopen inhibičními boutony, pod kterými se nacházely Ga1 ve shlukcích v synaptických symetrických kontaktech. Měřítko: 0,5 μ m (A-C)



Obr. 30. Shlukovité uspořádání gephyrinu (GE) na postsynaptické membráně MNTB neuronů. A, Snímek ze světelné mikroskopie zachycuje PC značené protilátkami proti GE s navázanými

zlatými částicemi. **B**, Snímek z elektronového mikroskopu stejného preparátu jako na obrázku A, který zachycuje tělo PC obklopené Heldovým kalichem a inhibičními boutony (inh.). Na snímku jsou patrné inhibiční boutony, které obsahují intenzivní shlukovité uspořádání GE. **a, b**, zvětšené výřezy ze snímku B. Zlaté částice nebyly detekovány na presynaptické membráně. Měřítka: 10 μm (A), 5 μm (B), 0,5 μm (a, b)

4.2. Určení vývojové změny inhibičního glycinergního systému a morfologických změn Heldova kalichu v MNTB

GABA/glycinergní inhibiční systémy mozkového kmene savců prodělávají během časného postnatálního vývoje významné přestavby. Bylo např. ukázáno, že exprese pre- a postsynaptických GABA_A a GlyR se během prvních dvou postnatálních týdnů recipročně mění a dochází také k částečnému vývojovému přepnutí inhibičního přenašeče z GABA na glycin (Kotak et al., 1998; Korada and Schwartz, 1999; Turecek and Trussell, 2002; Nabekura et al., 2004). V dospělosti je tak hlavním inhibičním přenašečem v mozkovém kmeni savců glycin (Lynch, 2004). To, že nápadné změny inhibičního synaptického přenosu jsou pozorovány v období kolem nástupu slyšení (~P11) naznačuje, že některé z vývojových změn mohou být vyvolány přirozenou kochleární aktivitou.

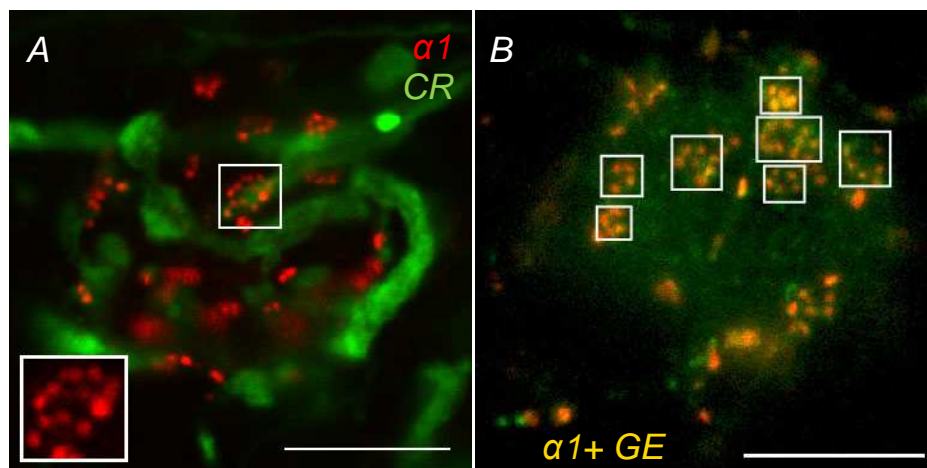
Ukázali jsme dříve, že oboustranná kochleotomie provedená u pětidenních potkanů zabránila vývojovému přepnutí ve složení presynaptických receptorů z GABA_A na glycinový typ (Turecek and Trussell, 2002), (nepublikovaná data Hrušková, Trojanová a Tureček 2013). Tento vliv byl provázen výrazným snížením amplitudy inhibičních postsynaptických proudů a také odpovědí vyvolaných aplikací GABA a glycinu na tělech hlavních neuronů v MNTB řezech izolovaných z 3 týdenních potkanů (~2 týdny po kochleotomii).

Tyto výsledky naznačily, že sensorické signály by mohly hrát důležitou roli v regulaci exprese pre- a postsynaptických inhibičních receptorů, ale i typů inhibičního přenašeče. Změny v elektrofyziologických parametrech GABA/glycinových odpovědí mohou kromě počtu receptorů odrážet i změny ve funkčních vlastnostech iontových kanálů spojených s GABA_A a GlyR. Rozhodli jsme se proto provést imunohistochemické pokusy, které byly zaměřeny na kvantitativní analýzu případných změn ve složkách inhibičního synaptického přenosu.

4.2.1. Kvantitativní analýza GlyR u kochleotomizovaných v MNTB

Pokusy byly provedeny na 3 kontrolních a 3 kochleotomizovaných potkanech. Bilaterální kochleární ablace spolu s aplikací ototoxických látek (viz metody) byly provedeny u potkanů ve věku P5 nebo P6. K imunohistochemickým pokusům byly použity řezy MNTB izolované ze zvířat ve věku 2 týdnů po kochleotomii (stejný věk jako v elektrofyziologických experimentech) a 2 měsíce po kochleotomii.

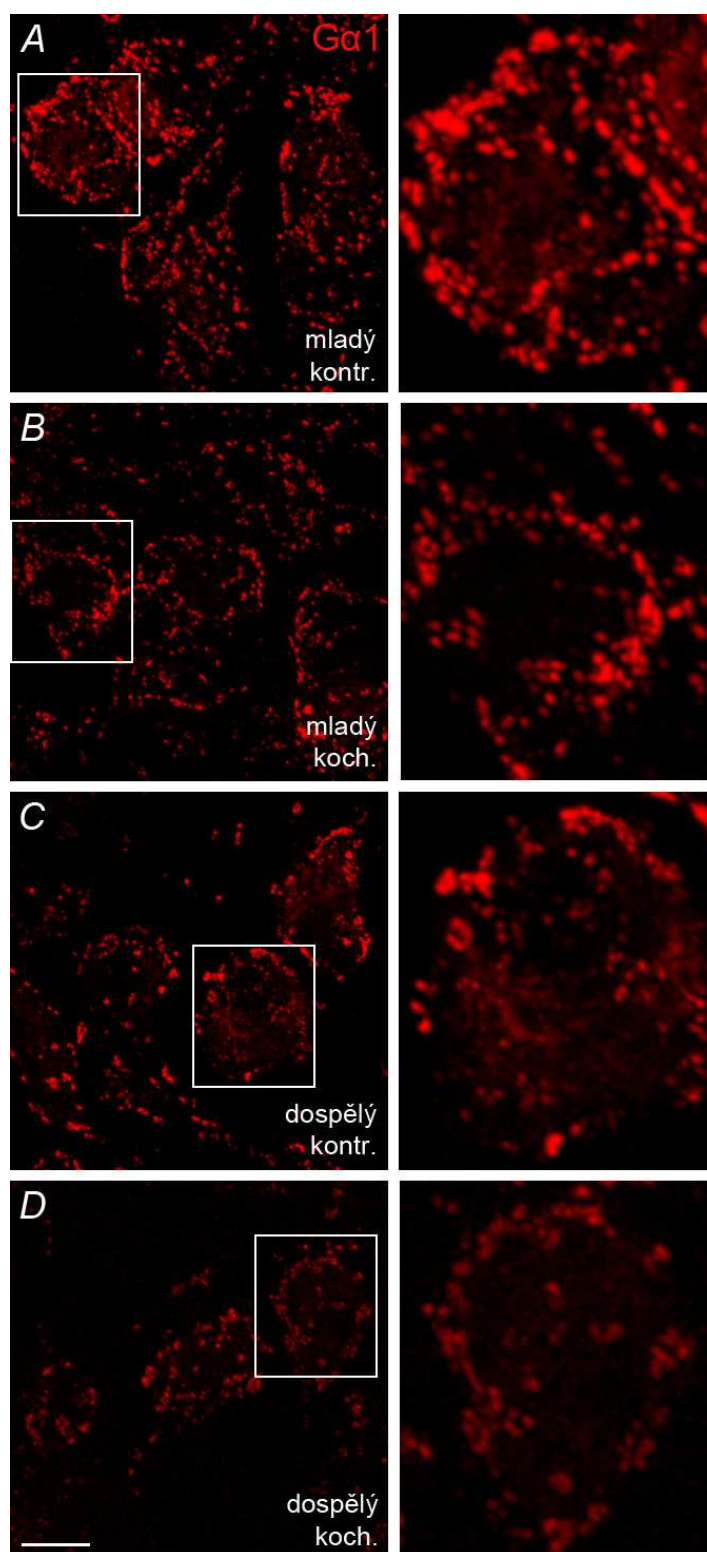
GlyR na řezech byly značeny protilátkami rozeznávajícími $\alpha 1$ podjednotku a s β podjednotkou spojený protein gephyrin. Z obr. 31 je patrné, že postsynaptické GlyR v kontrolních řezech i v řezech z kochleotomizovaných zvířat tvořily shluky, často uspořádané do růžic (obr. 31A). U obou skupin vykazovaly $\alpha 1$ fluorescenční signály překryv s GE signály (obr. 31B). To naznačilo, že postsynaptické receptory byly exprimovány jako $\alpha 1\beta$ heteromery a jejich podjednotkové složení nebylo kochleotomií ovlivněno.



Obr. 31. **Podjednotkové složení postsynaptických GlyR není ovlivněno kochleotomií.** A, Konfokální snímek řezu MNTB izolovaného z 18 denního potkana, 13 dní po oboustranné kochleotomii. Řezy byly podrobeny dvojímu značení protilátkami proti podjednotce $\alpha 1$ GlyR (červeně) a proti calretininu (CR, zeleně). B, Řez MNTB ze stejného zvířete jako v A. Řezy byly značeny protilátkami proti $\alpha 1$ GlyR (červeně) a proti GE (zeleně). Překryv obou signálů naznačuje $\alpha 1/\beta$ heteromerní receptory. $\alpha 1/\beta$ pozitivní shluky byly často uspořádány do růžic, což naznačuje synaptickou lokalizaci GlyR. Měřítka: 8 μ m

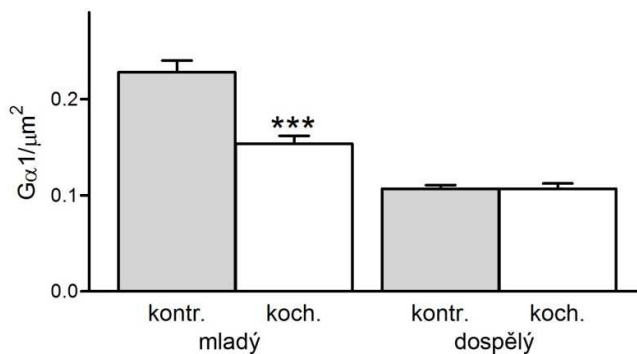
Odhad počtu postsynaptických GlyR byl proveden počítáním $\alpha 1$ -pozitivních shluků na PC v řezech vedených středem MNTB získaných z 6 zvířat. Řezy MNTB byly v tonotopické ose (mediolaterálně) rozděleny na 3 oblasti. V rámci každé oblasti bylo nasnímano několik konfokálních snímků o 8 rovinách v ose z po 1 μm pomocí PlanApochromat objektivu 63x/NA 1,32-0,6 (Leica) s 2x optickým zvětšením. Optické snímky byly použity k analýze programem ImageJ. Prahová hodnota pro intenzitu imunoznačení byla nastavena na definovaný vGAT anebo Ga1 pozitivní objekt. Na snímcích jsme měřili velikost jednotlivých buněčných těl a počítali jsme Ga1 pozitivní shluky (obr. 31).

Ukázalo se, že u zvířat 2 týdny po kochleární ablaci obsahují PC průměrně nižší počet Ga1 pozitivních shluků ($n = 25$) než PC z kontrolních zvířat ($n = 40$, $P < 0,001$; Mann-Whitney test; obr. 32A, 32B, 33). Tento rozdíl však nebyl pozorován v řezech MNTB izolovaných z kontrolních a kochleotomizovaných potkanů věku 2 měsíců (obr. 32C, 32D, 33). To ukazuje na reverzibilitu účinku kochleotomie a naznačuje, že sensorická aktivita není absolutně nutná pro expresi normálního počtu postsynaptických GlyR.



Obr. 32. *Oboustranná kochleotomie vede ke snížení počtu Ga1 pozitivních shluků na tělech PC. A – D, Konfokální mikrofotografie znázorňují těla PC na MNTB řezech značených protilátkami proti Ga1 GlyR (červeně). Řezy byly izolovány z kontrolních (A, C) a kochleotomizovaných (B, D) zvířat ve věku 2 týdnů (A, B) nebo 2 měsíců (C, D). Snímky vpravo znázorňují výseky z fotografií*

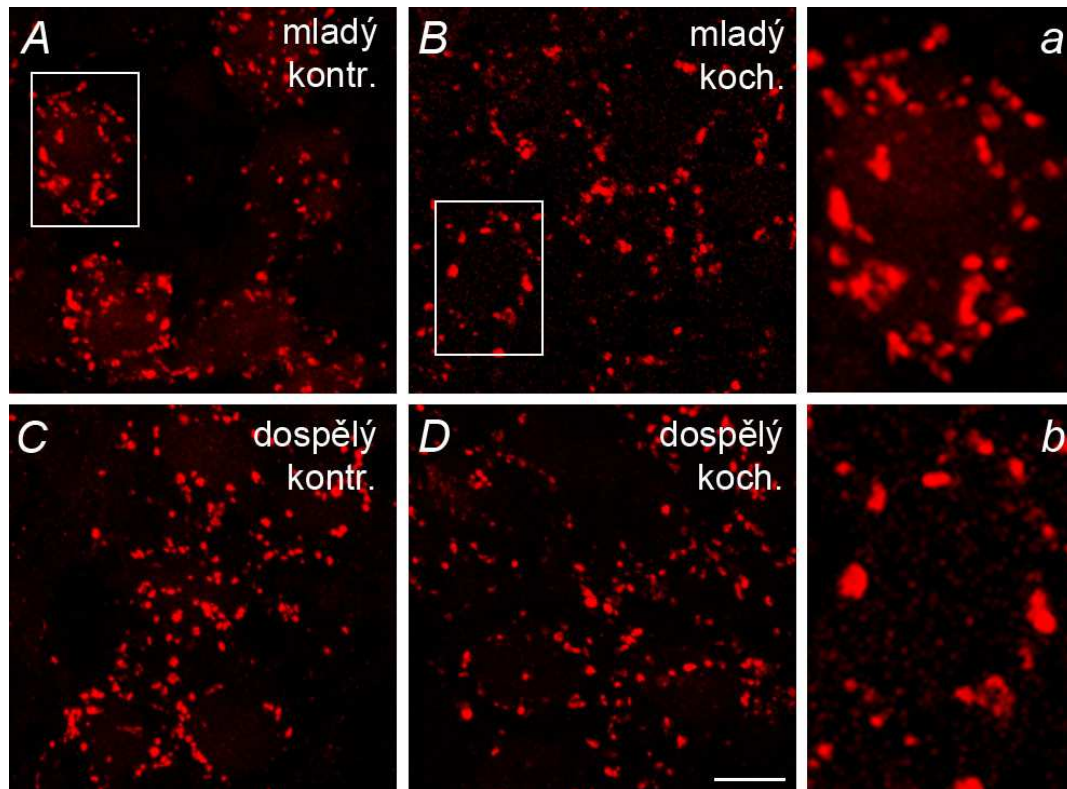
v levém panelu s větším zvětšením. Všechny snímky byly pořízeny jako projekce 9 rovin v ose z ($9\ \mu\text{m}$). Měřítko: $10\ \mu\text{m}$ (A-D); kontrolní (kontr.), kochleotomizovaný (koch.)



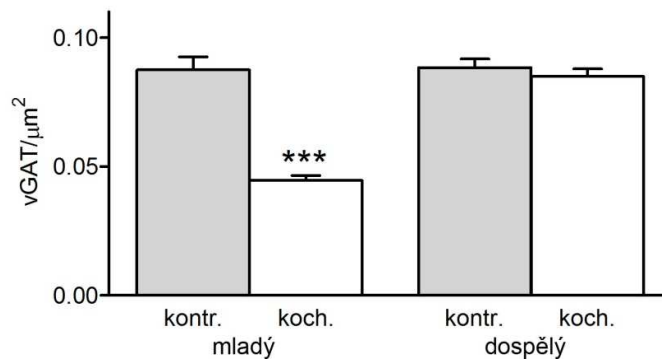
Obr. 33. **Vliv kochleotomie na počet postsynaptických GlyR.** Sloupcový graf ukazuje průměrné hustoty $\text{Ga}1$ -pozitivních shluků na povrchu PC v MNTB řezech kontrolních (kontr.) a kochleotomizovaných (koch.) zvířat ve věku 2 týdny (mladý) a 2 měsíce (dospělý). Statisticky významný rozdíl v počtu $\text{Ga}1$ shluků na plochu byl shledán u mladých zvířat ($P < 0,001$; Mann-Whitney test). U dospělých jsme nenašli žádnou statistickou významnost.

4.2.2. Kvantitativní analýza inhibičních zakončení u kochleotomizovaných v MNTB

U GABA/glycinergních nervových zakončení inervující PC v MNTB ze zvířat po oboustranné kochleotomii byly řezy podrobeny dvojímu značení pomocí protilátek proti vGAT pozitivním nervovým zakončením a proti calbindin pozitivním PC (nebo retrogradně značeným). Počty vGAT pozitivních zakončení v řezech z centrální části MNTB jsme zjišťovali prostřednictvím konfokální mikroskopie. Ukázalo se, že počty vGAT pozitivních boutonů na 80 neuronech v MNTB řezech izolovaných z potkanů do 2 týdnů po kochleotomii byl významně nižší než u 62 kontrolních neuronů (obr. 34A, 34B a 35). Tento rozdíl nebyl pozorován u řezů izolovaných z potkanů ve věku 2 měsíce po kochleotomii (obr. 34C, 34D a 35). Naše data jsou tak v souladu s elektrofyziologickými pokusy, které naznačily inhibiční vliv kochleotomie na intenzitu glycinergního synaptického přenosu v MNTB. Výsledky také potvrzují úlohu sensorických signálů ve vývoji GABA/glycinergních systémů sluchových jader mozkového kmene.



Obr. 34. **Oboustranná kochleotomie vede ke snížení počtu inhibičních zakončení na tělech PC.** A – D, Konfokální mikrofotografie znázorňují těla PC na MNTB řezech značených protilátkami proti vGAT (červeně). Řezy byly izolovány z kontrolních (A, C) a kochleotomizovaných (B, D) zvířat ve věku 2 týdnů (A, B) nebo 2 měsíců (C, D). Snímky vpravo (a, b) znázorňují výseky z fotografií v levém panelu s větším zvětšením. Snímky byly pořízeny jako projekce 9 rovin v ose z ($9\ \mu\text{m}$). Měřítka: $10\ \mu\text{m}$ (A-D)



Obr. 35. **Reverzibilita vlivu kochleotomie na počet inhibičních zakončení.** Sloupcový graf ukazuje průměrné hustoty vGAT-pozitivních boutonů na povrchu PC v MNTB řezech kontrolních

a kochleotomizovaných zvířat ve věku 2 týdny (mladý) a 2 měsíce (dospělý). Počet vGAT pozitivních inhibičních zakončeních byl signifikantně nižší u mladých kochleotomizovaných zvířat ($P < 0,001$; Mann-Whitney test).

4.3. Kvantitativní analýza povrchové distribuce GlyR na Heldově kalichu

Ionotropní membránové receptory, které řadíme do Cys-loop rodiny a jejichž zástupcem jsou také GlyR (Lester et al., 2004), se vyskytují jak v synapsích, kde generují rychlé a fáziké odpovědi, tak extrasynapticky, kde zprostředkovávají pomalou a tonickou modulaci neuronální aktivity (Farrant and Nusser, 2005; Muller et al., 2008; Hardingham and Bading, 2010; Vizi et al., 2010; Brickley and Mody, 2012; Kopach and Voitenko, 2013). Imunohistochemické metody ukázaly, že synaptické receptory se vyskytují ve shlucích, zatímco extrasynaptické receptory jsou většinou rozmístěny disperzně (Bernard et al., 1997; Caruncho et al., 1997; Kharazia and Weinberg, 1997; Nusser et al., 1998a; Walmsley et al., 1998; Zarei et al., 1999; Kieval et al., 2001; Rubio and Soto, 2001; Geiman et al., 2002; Wei et al., 2003; Masugi-Tokita et al., 2007; Petralia, 2012).

Zatím není příliš jasné, jak jsou ionotropní receptory rozmístěny na povrchu nervových zakončení. Zde tyto receptory zprostředkovávají relativně pomalou modulaci presynaptické exocytózy a plasticity. Vedle receptorů ve specializovaných axo-axonových synapsích (MacDermott et al., 1999; Kullmann et al., 2005) je zpravidla jejich fyziologická aktivace výsledkem tzv. objemového přenosu endogenních agonistů (Danbolt, 2001; Kullmann, 2001; Boehm and Kubista, 2002; Engelman and MacDermott, 2004; Pinheiro and Mulle, 2008; Sykova and Nicholson, 2008; Trigo et al., 2008; Verhoog and Mansvelder, 2011).

Povrchová distribuce receptorů na nervových zakončeních proto může být podobná té u extrasynaptických receptorů na somatodentritických částech (Kieval et al., 2001; Belenky et al., 2003; Ruiz et al., 2003; Jourdain et al., 2007).

Presynaptické GlyR jsou formovány jako $\alpha 1$ homomery a vykazují difúzní rozmístění v presynaptické plazmatické membráně (Turecek and Trussell, 2002; Jeong et al., 2003; Deleuze et al., 2005; Morkve and Hartveit, 2009; Kubota et al., 2010; Hruskova et al., 2012). Jejich funkce spočívá ve zprostředkování pomalé modulace uvolnění presynaptických neuropřenašečů (Turecek and Trussell, 2001; Jeong et al.,

2003; Hruskova et al., 2012; Chu et al., 2012). V Heldově kalichu zesilují exocytózu glutamátu. Byla navržena hypotéza, že fyziologická aktivace GlyR na Heldově kalichu vzniká heterosynapticky glycinem z glycinergních nervových zakončení nebo z okolních gliových buněk (Turecek and Trussell, 2001; Kopp-Scheinpflug et al., 2008).

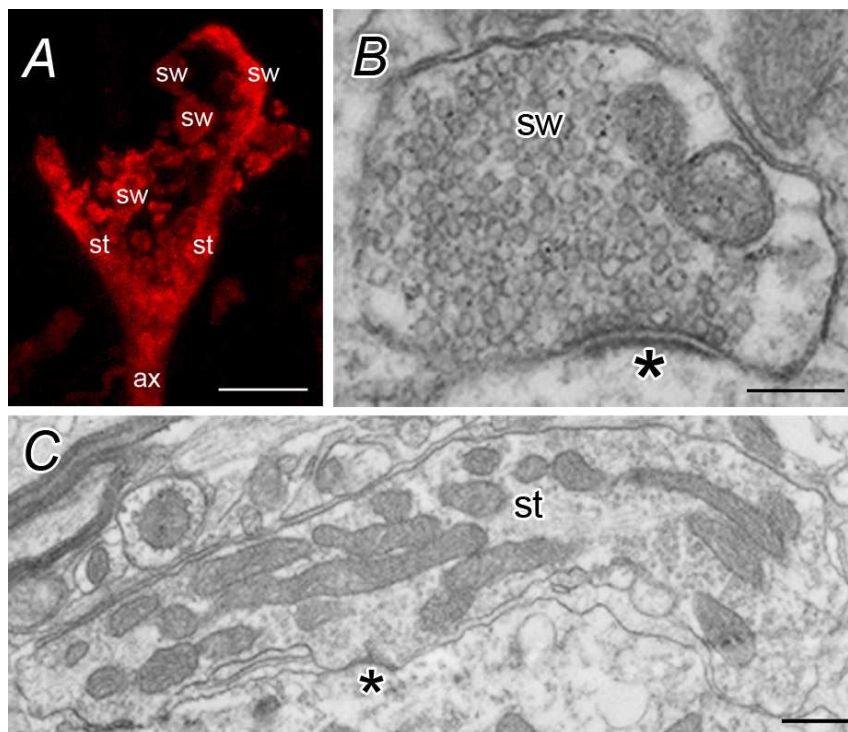
Cílem této části práce bylo zjistit subcelulární distribuci presynaptických GlyR pomocí vysokorozlišovací imunoelektronové mikroskopie na trojrozměrně rekonstruovaných částech Heldova kalichu.

4.3.1. Morfologie dospělého Heldova kalichu v MNTB

Heldův kalich se skládá z velkého preterminálního axonu, který se opakovaně větví do stonků (*angl.* stalks; st), které vybíhají do terminálních zduřenin (*angl.* swellings; sw) přes tenké krčky (Rowland et al., 2000; Spirou et al., 2008).

Pro naši analýzu distribuce presynaptických GlyR jsme vybrali dva hlavní ultrastrukturální segmenty kalichu, stonky a zduřeniny (obr. 36).

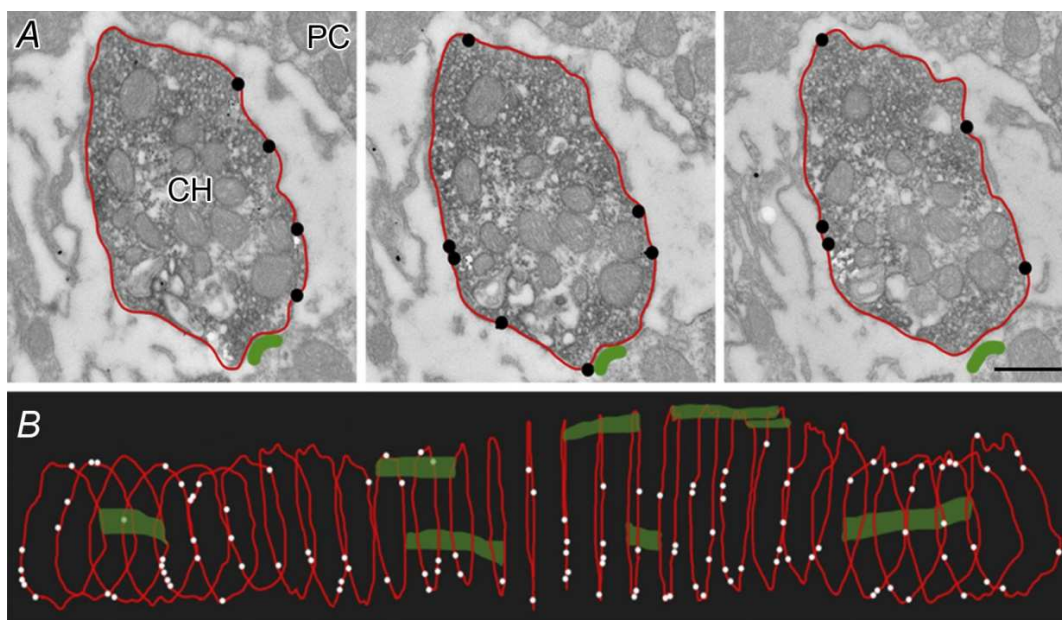
Zduřeniny (obr. 36B) se v elektronovém mikroskopu jeví převážně jako zakulacené a relativně malé výběžky Heldova kalichu s četnými synaptickými váčky a několika aktivními zónami (Wimmer et al., 2006). Stonky (obr. 36C) byly identifikovány jako velké výběžky kalichu v blízkosti preterminálního axonu. Tyto segmenty rovněž obsahovaly kulaté synaptické váčky, četné neurofilamenty, mitochondrie a řadu asymetrických synaptických spojení.



Obr. 36. **Kompartimentalizace a ultrastrukturální segmenty Heldova kalichu.** *A*, Konfokální projekce 11 rovin v ose z (11 μm) vyžralého Heldova kalichu značeného protilátkami proti calretininu. Heldův kalich je organizován do různých segmentů. Je tvořen axonem (*ax*) o velkém průměru, který se větví opakovaně do výběžků připomínajících okvětní lístky, tzv. stonky (*st*), které dále vedou do malých větví, někdy přes tenké krčky do jednotlivých zduřenin (*sw*), nebo sérií zduřenin různých velikostí. *B*, Elektron-mikroskopické fotografie ultratenkého řezu zduřeninou, která má oblý tvar a obsahuje četné synaptické váčky, nahromaděné kolem ústředních jader mitochondrií. *C*, Snímek řezu stonkem, velkým výběžkem preterminálního axonu. Obrázek ukazuje pro stonky typická neurofilamenta a velké množství mitochondrií. Měřítka: 8 μm (*A*), 0,2 μm (*B*), 0,5 μm (*C*)

4.3.2. Různá hustota $G\alpha 1$ na Heldově kalichu

Abychom odhalili povrchové rozložení presynaptických GlyR, provedli jsme jejich kvantitativní analýzu ve 3D zrekonstruovaných segmentech Heldova kalichu (obr. 37). Dohromady bylo analyzováno 72 dospělých segmentů Heldova kalichu v řezech MNTB získaných ze tří zvířat. Jednotlivé segmenty byly tvořeny 13 – 30 sériovými řezy výběžkem Heldova kalichu (průměrně 24 řezů na segment, který odpovídá tloušťce tkáně o 1,68 μm). Obvod každého příčného řezu byl digitálně zrekonstruován a sloužil ke stanovení pozic IG částic na konturovaném povrchu segmentu kalichu (obr. 37).



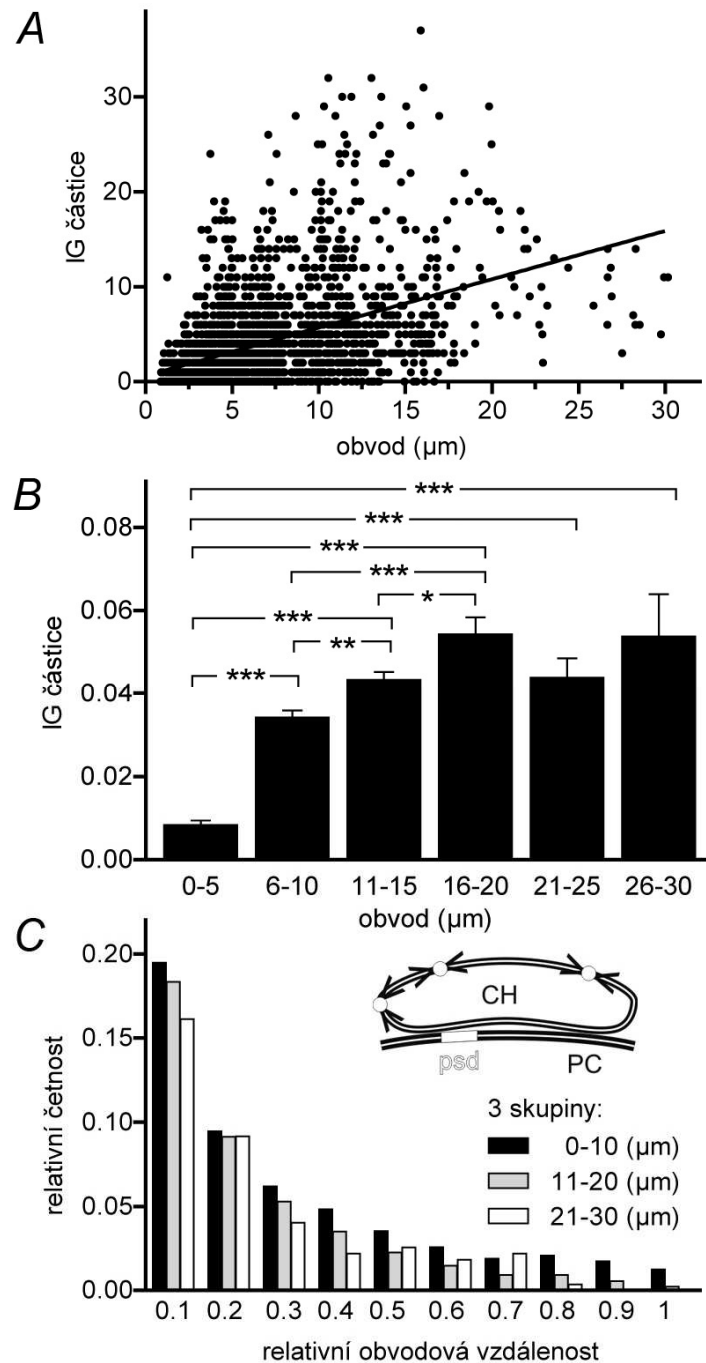
Obr. 37. **Příklad trojrozměrné rekonstrukce části Heldova kalichu sestaveného ze série ultratenkých řezů.** **A,** Snímky z elektronového mikroskopu ukazují tři sériové řezy výběžkem Heldova kalichu (CH), který byl značen pomocí protilátek proti vGluT1 (peroxidáza) a proti Gal (imunozlaté částice, černé body). Červená čára označuje zdigitalizovaný obvod příčného řezu. Zeleně jsou znázorněny postsynaptické denzity (PSDs), které přiléhají ke glutamatergním aktivním zónám. **B,** Příklad 3D rekonstruovaného segmentu Heldova kalichu, který byl sestaven z 29 sériových řezů podobných jako ve snímku A. Bílé body označují membránově lokalizované IG částice, zeleně jsou vyznačeny PSD a červeně digitalizované obvody jednotlivých příčných řezů. Měřítko: 0,5 μm (A)

IG částice jevíly na povrchu segmentů disperzní rozmístění a dosahovaly průměrné povrchové hustoty 5,74, 3,29-10,83 IG částic/ μm^2 (medián, dolní-horní kvartil; $n = 72$ segmentů) s minimem 0 IG částic/ μm^2 a maximem 37,86 IG částic/ μm^2 .

Zajímalo nás, jestli jsou receptory na povrchu segmentů rozmístěny náhodně nebo jestli existují oblasti se zvýšenou koncentrací receptorů. Analyzovali jsme proto všech 2304 získaných příčných řezů a počítali jsme IG částice na obvodu každého řezu. Data sloužila k sestavení grafů znázorňující počet receptorů jako funkci délky obvodu příčného řezu. Ukázalo se, že počet IG částic se zvyšoval s velikostí příčného řezu ($r = 0,46$, $P < 0,0001$; r – Pearsonův korelační koeficient; obr. 38A). To naznačovalo podobnou hustotu IG částic u různě velkých výběžků. Abychom ověřili tuto představu, seřadili jsme řezy do šesti skupin podle velikosti jejich povrchového obvodu

(od 0 do 30 μm po 5 μm). Zjistili jsme, že počet IG částic roste pouze do velikosti obvodu v rozmezí 16 – 20 μm (obr. 38B) a dále se nemění. To naznačilo nižší hustoty IG částic ve výbězcích o větším průměru.

Další analýzy byly zaměřeny na srovnání obvodových vzdáleností mezi IG částicemi (inter-IG vzdálenosti) u řezů s různě velkými výběžky Heldova kalichu. Řezy byly rozděleny do tří skupin podle velikosti jejich obvodů (0 – 10, 11 – 20, 21 – >30 μm). Jednotlivé inter-IG vzdálenosti byly normalizovány k délce obvodu daného řezu. Obrázek 38C ukazuje rozdělení četnosti těchto inter-IG vzdáleností podle jejich velikosti. Z histogramu je patrné, že nejkratší inter-IG vzdálenosti dominují u všech řezů bez ohledu na velikosti výběžků kalichu. Tyto výsledky potvrzují nehomogenní rozložení GlyR na povrchu Heldova kalichu a naznačují existenci míst s vyšší hustotou IG částic. Tato místa by hromadila GlyR z důvodu preferenční lokalizace receptorů v některých oblastech kalichu.

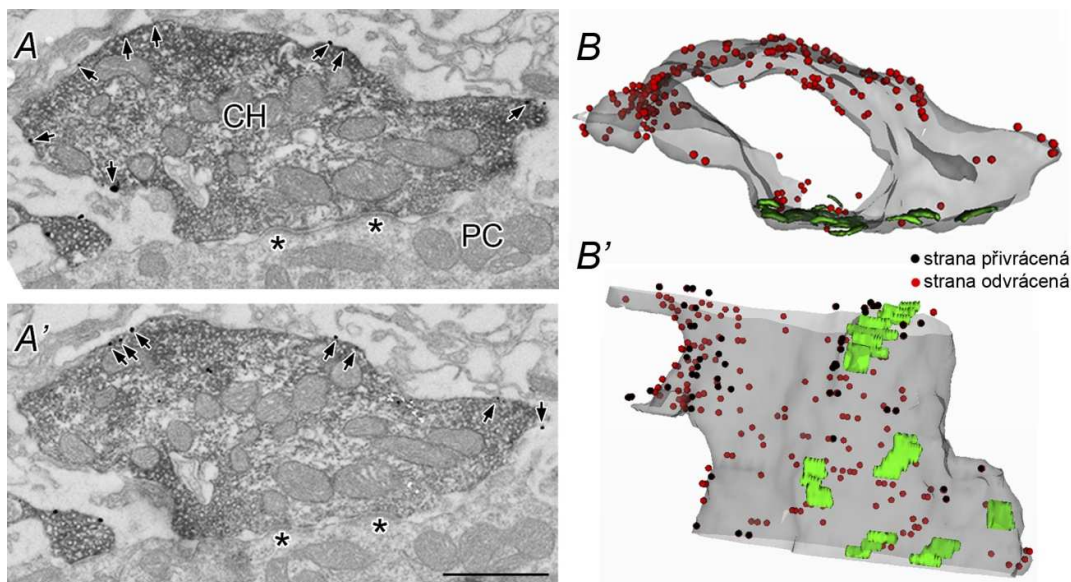


Obr. 38. *Nehomogenní distribuce Ga1 na povrchu Heldova kalichu. A, Distribuce četnosti IG částic na příčných řezech výběžky Heldova kalichu různé velikosti. Proložena přímkou znázorňuje průběh lineární regrese dat pomocí funkce $y = 0,5095x + 0,6069$. B, Graf ukazuje průměrné četnosti IG částic v řezech rozdělených na základě délky jejich obvodu do šesti skupin od 0 do 30 μm s přírůstkem 5 μm . Rozdíly mezi skupinami byly testovány jednosměrnou ANOVA analýzou spolu s Bonferroni mnohonásobným srovnávacím testem ($P < 0,001$). C, Histogram četností normalizovaných obvodových inter-IG vzdáleností na řezech rozdělených do tří skupin podle jejich velikosti.*

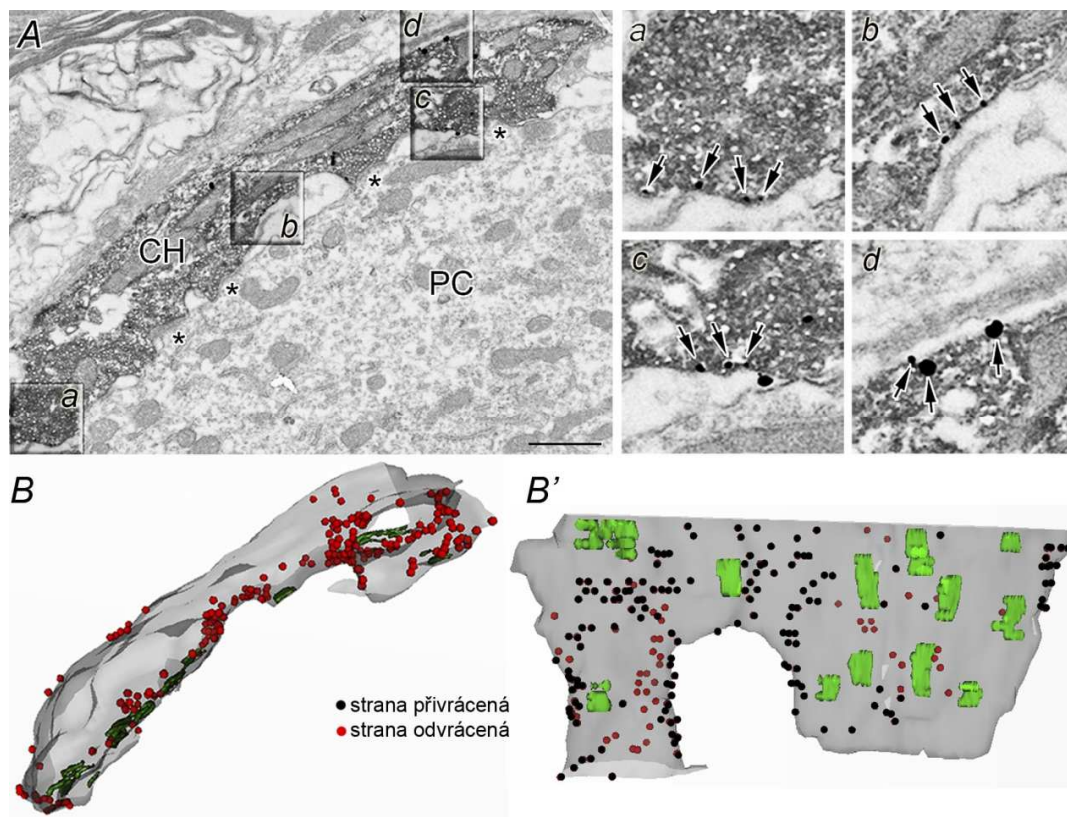
4.3.3. Kvantitativní distribuce $G\alpha 1$ mezi morfologicky odlišnými segmenty Heldova kalichu

Analýzy v předcházející části naznačily nehomogenní rozložení GlyR na presynaptickém zakončení. Heldův kalich je komplexní struktura, která se skládá z morfologicky a funkčně odlišných částí (Morest, 1968a; Rowland et al., 2000; Spirou et al., 2008). Je proto možné, že rozložení GlyR na kalichu sleduje nějakou závislost na jejich zapojení do procesů zajišťujících presynaptické funkce. Rozhodli jsme se proto nejprve testovat, zda se hustota GlyR liší u dvou převládajících morfologických typů výběžků kalichu odpovědných za uvolňování glutamátu – zduřenin (obr. 39) a stonků (obr. 40). Zduřeniny byly odlišeny od stonků na základě jejich struktury, jak bylo popsáno výše (Wimmer et al., 2006). Dalším rozlišovacími znaky bylo rozdílné rozložení vGluT1 pozitivních synaptických váček a přítomnost axonálního cytoskeletu.

Analýza hustoty GlyR na povrchu morfologicky odlišných výběžků byla provedena tak, že jsme počítali membránově lokalizované IG částice na každém řezu příslušného 3D rekonstruovaného segmentu (v průměru 24 řezů na segment) a normalizovali sumu IG částic pro daný segment k velikosti jeho povrchu. Ukázalo se, že se zduřeniny vyznačují vyšší povrchovou hustotou GlyR než stonky. Průměrná povrchová hustota IG částic byla na segmentech typu zduřenina $10,94 \pm 1,07$ na μm^2 ($n = 50$) a na segmentech typu stoněk $5,97 \pm 0,82$ na μm^2 ($n = 11$, $P < 0,05$).



Obr. 39. **Rozmístění GlyR na výběžku typu zduřenina.** **A, A'**, Snímky z elektronového mikroskopu ukazují dva následné řezy (CH) výběžkem Heldva kalichu zduřeniny (Sw) značeným protilátkami proti vGluT1 (peroxidáza). Na snímku je patrný zhruba oválný tvar příčného řezu Sw a četné synaptické váčky nahromaděné kolem ústředních jader mitochondrií. Šipky ukazují polohy membránově situovaných IG částic označujících presynaptické GlyR. Glutamátergní aktivní zóny jsou vyznačeny hvězdičkou. **B, B'**, Představují konturovaný povrch 3D rekonstruovaného segmentu složeného z 29 sériových řezů ukázaných na panelu A. Černé body znázorňují receptory na straně přilehlé k membráně PC a červené body receptory na straně odvrácené. PSD jsou znázorněny zeleně. Měřítko: 1 μ m (A, A')

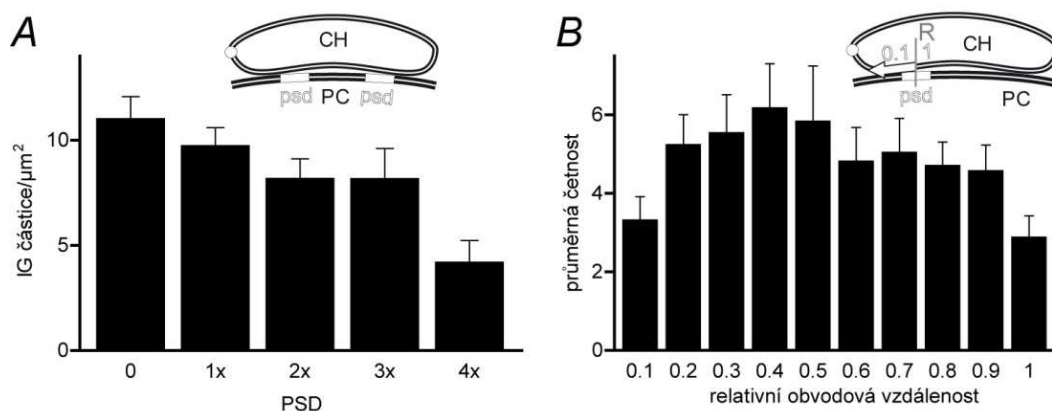


Obr. 40. **Rozmístění GlyR na výběžku typu stonk.** **A**, Snímek z elektronového mikroskopu zachycující výběžek typu stonk (St) značený dvojím barvením proti Ga1 (IG částice, šipky) a vGluT1 (peroxidáza). Na snímku je patrný zploštělý tvar a relativně nižší počet mitochondrií v tomto typu výběžku. Glutamátergní aktivní zóny jsou vyznačeny hvězdičkou. **B, B'**, Představují 3D rekonstrukci segmentu stonku složeného z 28 řezů. Černé body znázorňují receptory na straně přilehlé k membráně PC a červené body receptory na straně odvrácené. PSD jsou znázorněny zeleně. Měřítko: 1 μ m (A, výřezy a-d)

Předcházející práce zabývající se morfologií Heldova kalichu naznačily, že jeho výběžky typu zduřenina jsou metabolicky více aktivní a obsahují více glutamátových AZ než výběžky typu stonek (Hermida et al., 2010). Vzhledem k tomu, že presynaptické GlyR stimulují uvolňování glutamátu z presynaptických zakončení (Turecek and Trussell, 2001), je možné, že je jejich výskyt zesílen v okolí AZ a odpovídá tak za zvýšenou celkovou hustotu GlyR ve zduřeninách. Tuto hypotézu jsme testovali stanovením hustoty IG částic v segmentech Heldova kalichu s různým počtem AZ a analýzou obvodové vzdálenosti IG částic od AZ. V souladu s literaturou jsme našli rozdíly v relativním počtu AZ u výběžků typu zduřenina a stonek. Aktivní zóny, identifikované podle přítomnosti postsynaptické denzity (PSD), byly významně četnější u zduřenin ($0,37 \pm 0,02$ na μm^2) než u stonků ($0,27 \pm 0,04$ na μm^2 , $P < 0,05$). Délka PSD se ukázala kratší u zduřenin ($0,24 \pm 0,01$ μm) než u stonků ($0,31 \pm 0,01$ μm , $P < 0,001$), opět ve shodě s publikovanými údaji (Hermida et al., 2010). Abychom v analýze nezaměnili synaptická spojení s *puncta adherentia*, vyloučili jsme z hodnocení symetricky distribuované membránové hustoty bez přítomnosti synaptických váčků.

3D rekonstruované segmenty byly následně rozděleny do pěti skupin podle počtu AZ (0 – 4). Počet IG částic na daném segmentu byl normalizován k jeho povrchu. Výsledky jsou znázorněny na obr. 41A. Ukázalo se, že počty IG částic nevykazují vzrůstající hodnoty u segmentů s vyšším počtem AZ. To naznačilo, že výskyt GlyR nesleduje přítomnost AZ. Tuto hypotézu jsme dále testovali u řezů s jednou AZ měřením obvodových vzdáleností IG částic od středu AZ (obr. 41B). Jednotlivé vzdálenosti byly normalizovány k celkovému obvodu řezu. Celkový obvod byl rozdělen deseti kvantily a byl počítán počet IG částic v každém úseku mezi dvěma sousedními decily.

Ukázalo se, že četnost IG částic v úsecích přilehlých a vzdálených od AZ nebyla statisticky významně rozdílná. Z těchto pokusů vyplývá závěr, že GlyR nejsou přednostně umístěny v blízkosti AZ, a není proto možno takto vysvětlit relativně vyšší hustotu GlyR ve výběžcích Heldova kalichu typu zduřenina.



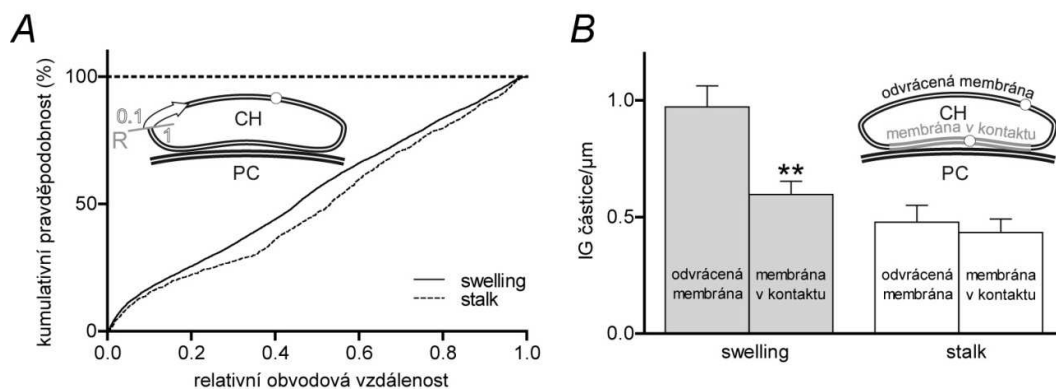
Obr. 41. *GaI* nejsou koncentrovány v blízkosti glutamatergických aktivních zón. **A**, Graf představuje hustoty IG částic v 3D rekonstruovaných segmentech Heldova kalichu s různými počty AZ (0 až 4). Významnost rozdílů hustot IG částic byla hodnocena jednosměrnou ANOVA analýzou spolu s Bonferroni mnohonásobným srovnávacím testem. **B**, Rozložení četnosti IG částic po obvodu řezu rozděleného deseti kvantily na stejně dlouhé úseky. Rozdíly mezi četnostmi IG částic v jednotlivých úsecích byly testovány jednosměrnou ANOVA analýzou spolu s Dunnett mnohonásobným srovnávacím testem. **Schéma** ukazuje měření obvodové vzdálenosti IG částic od středu AZ. Heldův kalich (CH) s vyznačeným referenčním bodem (R) uprostřed AZ identifikované podle přítomnosti PSD a jednou IG částicí (○).

4.3.4. Koncentrace presynaptických GlyR v částech přístupných pro okolní glycin

Presynaptické GlyR v MNTB jsou aktivovány glycinem uvolněným při opakované synaptické aktivitě z glycinergních zakončeních (Turecek and Trussell, 2001). Tato heterologní aktivace předpokládá tzv. objemový přenos glycinového mediátoru extracelulárním prostorem (Sykova and Nicholson, 2008). Extracelulární koncentrace glycinu je pod intenzivní kontrolou neuronálních a gliových glycinových přenašečů (Zafra and Gimenez, 2008). Aby byly GlyR exprimované na Heldově kalichu přístupné okolnímu glycinu a byly jím efektivně aktivovány, je tedy nutná jejich orientace na presynaptické membráně přivrácené do extracelulárního prostoru. Častější výskyt GlyR na vnějších membránách Heldova kalichu by proto mohl být příčinou vyšší hustoty GlyR u výběžků typu zduřenina.

Tuto hypotézu jsme testovali počítáním IG částic v presynaptických částech přivrácených a odvrácených od postsynaptické membrány PC. Z analýz byly vyloučeny řezy s nulovým počtem receptorů. Nejprve jsme studovali rozložení IG částic na obvodu

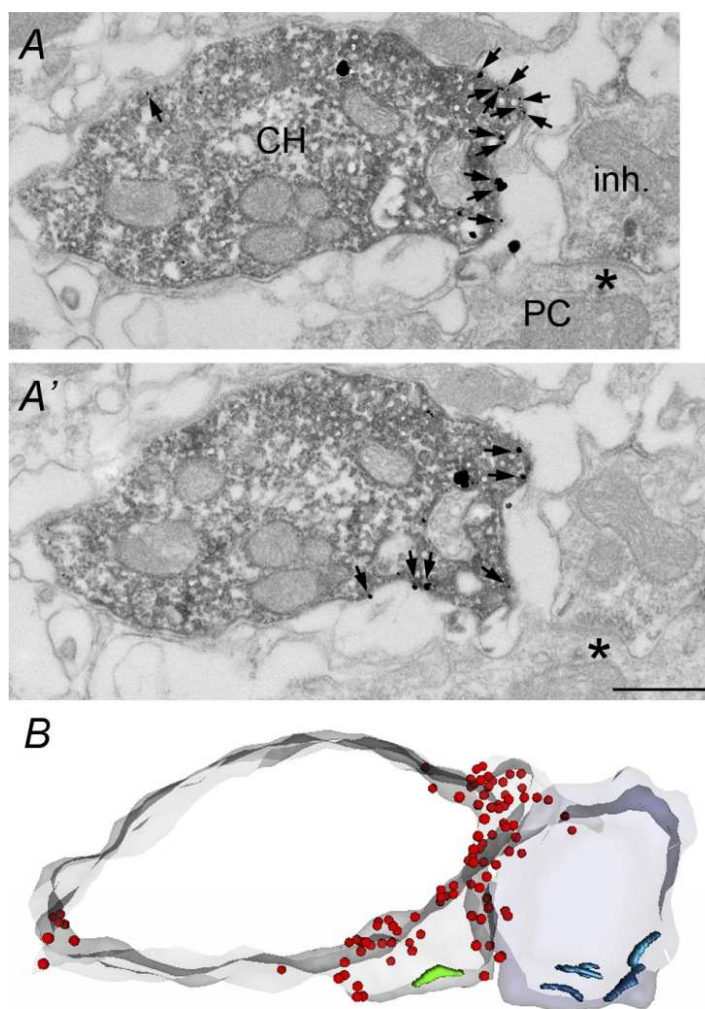
každého z řezů výběžku. Měřili jsme obvodové vzdálenosti každé IG částice od referenčního bodu, kterým byl arbitrárně stanoven horizontálně nejkrajnější bod presynaptické membrány (obr. 42A). Obvodové vzdálenosti byly normalizovány k obvodu příslušného řezu. Kumulativní histogram četností normalizovaných obvodových vzdáleností pro výběžky typu zduřenina a stonek je znázorněn na obr. 42A. Z grafu je patrné, že rozložení IG částic po obvodu řezů výběžků obou typů se liší. Výběžky typu zduřenina se ve srovnání s výběžky typu stonek vyznačují významně častějším výskytem IG částic v místech, která jsou odvrácená od postsynaptické buňky a potenciálně přístupná z volného extracelulárního prostoru. Dále jsme rozdělili obvod každého příčného řezu na dvě části: část odvrácenou a část přivrácenou k membráně postsynaptické PC (obr. 42B), a počítali jsme hustoty částic v obou částech. Vyloučili jsme řezy bez kontaktu presynaptické membrány s postsynaptickou membránou. Výsledky jsou znázorněny v sloupcovém grafu na obr. 42B. Ukázalo se, že u výběžků typu zduřenina byla hustota IG částic významně zvýšena v membráně exponované do volného extracelulárního prostoru. U výběžků typu stonek tato rozdílnost nebyla pozorována. Naše analýzy tak odhalily zvýšenou koncentraci GlyR v oblastech Heldova kalichu potenciálně přístupných pro endogenní glycin přítomný v extracelulárním mimosynaptickém prostoru. Zajímavé je, že tato zvýšení vykazují pouze výběžky typu zduřenina, které jsou odpovědné za většinu glutamatergního přenosu na Heldově kalichu. Výsledky tak pomáhají vysvětlit zvýšený počet GlyR u zduřenin oproti stonkům a jsou v souladu s facilitací uvolňování glutamátu presynaptickými GlyR.



Obr. 42. **Přednostní lokalizace presynaptických GlyR na membráně odvrácené od postsynaptické PC.**
A, Kumulativní histogramy četností normalizovaných obvodových vzdáleností membránových IG

*částic od arbitrárního referenčního bodu (R) u výběžku typu zduřenina (plná čára, n = 39) nebo typu stonek (přerušovaná čára, n = 11). Zduřeniny vykazují vyšší četnosti IG částic v části obvodu zhruba odpovídající membráně odvrácené od povrchu PC. Obvodové vzdálenosti byly měřeny ve směru hodinových ručiček. Rozdíly mezi histogramy byly testovány Kolmogorov-Smirnov testem ($P < 0,001$). **B**, Sloupcový graf ukazuje hustoty IG částic v presynaptické membráně rozdělené na část přivrácenou a odvrácenou od postsynaptického neuronu (viz schéma). IG částice se na výběžcích typu zduřenina, ale ne na stonecích, přednostně vyskytovaly na částech odvrácených od postsynaptického neuronu (Mann-Whitney test, $P < 0,01$). Schéma: Heldův kalich (CH), referenční bod (R), receptor (○).*

Skutečnost, že GlyR přednostně obsazují v presynaptické membráně pozice potenciálně přístupné pro jejich endogenní agonisty, naznačuje existenci na aktivitě závislého mechanismu redistribuce receptorů na buněčném povrchu. Takový mechanismus by byl v souladu s vysokou relativní mobilitou homomerických GlyR v buněčné membráně (Dumoulin et al., 2009). Abychom tuto hypotézu podpořili, analyzovali jsme vzdálenosti GlyR od dobře identifikovaných zdrojů endogenního glycinu (obr. 43) a testovali jsme náhodnost distribuce těchto vzdáleností.

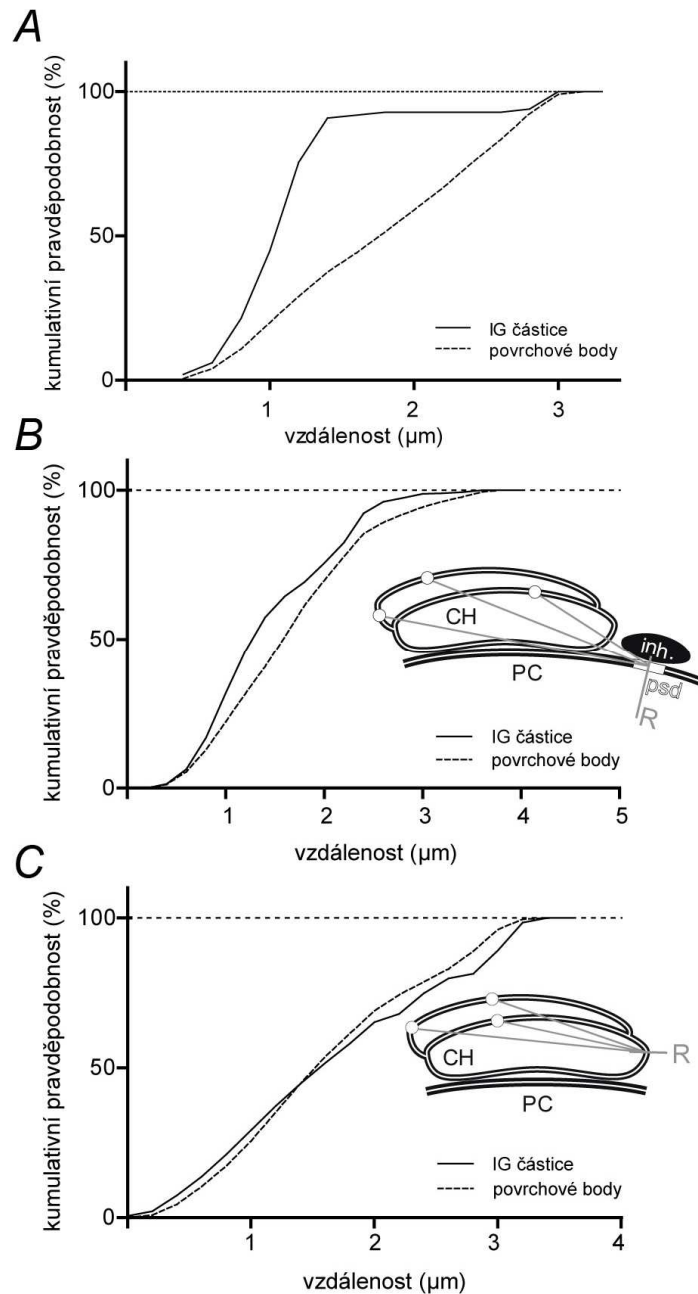


Obr. 43. *Nahromadění presynaptických GlyR v blízkosti inhibičního glycinergního zakončení. A, A'* dva následné řezy výběžku Heldova kalichu typu zduřenina (CH) a inhibičního botonu (inh.). Pozice membránových IG částic jsou označeny šipkami. *B*, Trojrozměrná rekonstrukce segmentu kalichu sestaveného ze 17 po sobě jdoucích řezů znázorněných na snímcích A a A' (IG částice – červené body, Heldův kalich – transparentní šedá, inhibiční bouton – transparentní modrá, glutamatergní aktivní zóna – zelená, glycinergní aktivní zóna – modrá). Měřítko: 0,5 μm (A, A')

Jednotlivé 3D rekonstruované segmenty Heldova kalichu byly rozděleny do dvou skupin, které se lišily přítomností glycinergních zakončení v jejich sousedství. Tyto boutony byly identifikovány jako struktury, které tvořily symetrická synaptická spojení s MNTB hlavním neuronem a byly naplněny synaptickými váčky zploštělého tvaru. Měřili jsme prostorové vzdálenosti mezi každou IG částicí na 3D segmentu a středem inhibiční AZ přilehlého glycinergního zakončení (obr. 44B) nebo

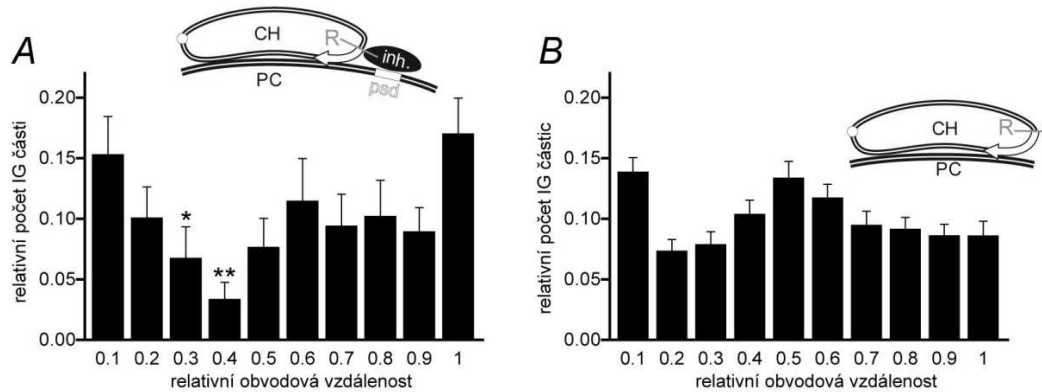
referenčního bodu (obr. 44C). Referenční bod byl zvolen jako horizontálně nejkrajnější bod povrchu segmentu. Příklad rozložení IG částic na segmentu sousedícím s glycinergním zakončením je znázorněn na obr. 44A. Kumulativní histogram četností absolutních vzdáleností IG částic od středu inhibiční AZ ukazuje hromadění GlyR v blízkosti glycinergního zakončení. Souborná distribuce vzdáleností IG částic od inhibičních AZ u 10 3D segmentů je na obr. 44B. Srovnání s distribucí povrchových bodů (body digitalizovaných kontur) ukazuje častější než pouze náhodný výskyt IG částic v oblastech přilehlých k inhibičním zakončením. Naše data proto výrazně naznačují, že distribuce presynaptických GlyR je ovlivněna přítomností zdroje endogenního glycinu.

Tato představa byla dále ověřována jiným typem analýzy, která spočívala ve srovnání normalizovaných obvodových vzdáleností IG částic od arbitrárního referenčního bodu (obr. 45A). Referenčním bodem byl zvolen průsečík membrány Heldova kalichu a spojnice středu příčných řezů výběžkem kalichu a inhibičním zakončením. U řezů bez přítomnosti inhibičních butonů (obr. 45B) byl referenčním bodem zvolen nejkrajnější bod membrány kalichu. Jednotlivé vzdálenosti IG částic byly normalizovány k celkovému obvodu řezu výběžkem kalichu a sloužily k výpočtu četností IG částic po obvodu řezu. Obvod každého příčného řezu byl rozdělen na stejné úseky pomocí deseti kvantilů a byl počítán počet IG částic v každém úseku. Histogramy na obr. 45 znázorňují výsledky těchto analýz. Ukázalo se, že u segmentů sousedících s inhibičním zakončením byly četnosti IG částic v úsecích přilehlých k referenčnímu bodu významně vyšší než v úsecích vzdálenějších. Naproti tomu u segmentů, které s inhibičním zakončením bezprostředně nesousedily, toto zvýšení pozorováno nebylo. Experimentální data tak potvrzují vliv endogenních zdrojů glycinu na subcelulární distribuci presynaptických GlyR. Tento vliv byl pozorován u výběžků typu zduřenina a je pravděpodobně odpovědný za celkově vyšší hustoty GlyR nalezených u těchto typů oproti morfologicky odlišným výběžkům typu stonek.



Obr. 44. **Analýza prostorových vzdáleností mezi GlyR a inhibiční AZ.** **A,** Kumulativní histogram absolutních prostorových vzdáleností jednotlivých GlyR od centra inhibiční AZ identifikované podle inhibiční PSD. Data jsou ze stejného segmentu jako na obr. 38, Kolmogorov-Smirnov test ($P < 0,001$). **B,** Kumulativní histogram absolutních vzdáleností IG částic a povrchových bodů od centra inhibiční AZ. Data jsou sdružena z 10 segmentů typu zduřenina, které se vyskytovaly v blízkosti inhibičního nervového zakončení. IG částice se vyskytovaly častěji v oblastech přilehlých k inhibičnímu zakončení. Rozdíly mezi distribucemi byly významné (Kolmogorov-Smirnov test ($P < 0,001$)). **Schéma,** Heldův kalich (CH) s vyznačenými IG částicemi (\circ) a nejkratšími vzdálenostmi, které byly měřeny mezi středem inhibiční AZ (R) a jednotlivými IG částicemi. **C,** Kumulativní histogram relativních vzdáleností IG částic a povrchových bodů

segmentů od referenčního bodu, kterým byl horizontálně nejkrajnější bod digitalizované kontury. Data jsou sdružena z 10 segmentů, v jejichž okolí nebyla nalezena inhibiční zakončení. Přestože rozdíly mezi distribucemi byly významné (Kolmogorov-Smirnov test ($P < 0,001$), IG částice měly odlišné rozdělení četnosti než v panelu B. **Schéma**, Vzdálenosti receptorů měřené od referenčního bodu (R).



Obr. 45. **Rozložení glycinových receptorů na povrchu Heldova kalichu závisí na přítomnosti inhibičních nervových zakončení. A**, Vzdálenosti IG částic od referenčního bodu normalizované na délku obvodu řezu byly použity k určení četnosti IG částic v deseti obvodových úsecích. Významnost rozdílu mezi četnostmi v úsecích 0,2 – 0,9 a sdruženou četností z úseků 0,1 a 1 byla testována jednosměrnou ANOVA analýzou s Dunnettovým mnohočetným srovnávacím testem; $n = 12$ segmentů. **Schéma**, Měření obvodové vzdálenosti IG částic (○) od referenčního bodu (R) ve směru hodinových ručiček. **B**, Histogram četností IG částic v deseti obvodových úsecích řezů nesousedících s inhibičními zakončeními. Obvodové vzdálenosti IG částic byly měřeny od referenčního bodu (R), kterým byl horizontálně nejkrajnější bod řezu, ve směru hodinových ručiček (schéma). Rozdíly mezi jednotlivými úseky byly testovány jednosměrnou ANOVA analýzou spolu s Dunnett mnohonásobným srovnávacím testem; $n = 52$ segmentů.

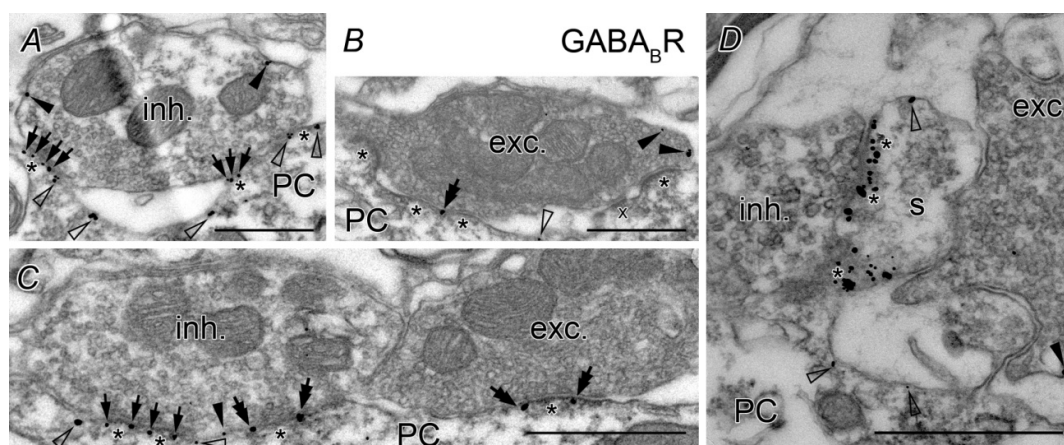
4.4. Buněčná distribuce GABA_B receptorů v MNTB

GABA_B receptory modulují excitační synaptický přenos v MNTB na presynaptické úrovni, regulací uvolňování glutamátu (Isaacson, 1998; Takahashi et al., 1998), ale i postsynapticky inhibicí postsynaptických Ca²⁺ kanálů N-typu (Hruskova et al., 2007). Zda tyto receptory v MNTB regulují i uvolňování inhibičních přenašečů GABA a glycinu, není známo. My jsme se rozhodli zkoumat lokalizaci GABA_B receptorů v řezech MNTB dospělého potkana pomocí vysokorozlišovací imunoelektronové mikroskopie s cílem odhadnout jejich úlohu v inhibičním synaptickém přenosu.

Pro naše experimenty jsme použili 3 dospělé potkany (samce) kmene Wistar. GABA_BR jsme značili polyklonálním králičím sérem, které jsme získali od dr. Ákose Kulika (Kulik et al., 2002). Toto purifikované sérum (B2T1) bylo namířeno proti GB2 podjednotce GABA_BR, přesně proti aminokyselinové sekvenci CVSPTASPRHRHVPPSFRVMVSGL na jejím C-konci a zviditelněno v tkáni IG částicemi. Řezy jsme současně značili protilátkami namířeny proti vGluT1 nebo vGAT, které nám pomohly identifikovat glutamátergní nebo inhibiční zakončení. Tyto protilátky byly zviditelněny imunoperoxidázovou reakcí. V kontrolních pokusech jsme testovali specificitu B2T1 na řezech MNTB izolovaných z myši s odstraněnými GB2 podjednotkami (GABA_{B2}^{-/-}), u kterých žádné imunoznačení nebylo patrné (snímky neuvedeny). Tyto deficientní myši byly získány z laboratoře prof. Bernharda Bettlera z Fyziologického ústavu (Basilej, Švýcarsko). Celkově bylo hodnoceno 33 inhibičních a 28 glutamátergních zakončení na řezech MNTB z 3 zvířat. Synaptické spoje byly identifikovány srovnáváním struktur na sériových řezech.

GABA_BR byly nalezeny na pre- i postsynaptických membránách jak inhibičních (obr. 46A), tak excitačních neuronů (obr. 46B, D). Presynaptické GABA_B receptory se na Heldově kalichu vyskytovaly extrasynapticky, přičemž část receptorů byla nalezena v blízkosti glutamátergní aktivní zóny (obr. 46B, D). Perisynaptická lokalizace GABA_B receptorů je v souladu s jejich funkcí při regulaci presynaptické pravděpodobnosti uvolňování glutamátu. GABA_B receptory byly rovněž nalezeny na inhibičních nervových zakončeních. Subcelulární distribuce GABA_B autoreceptorů byla podobná jako u heteroreceptorů na Heldově kalichu (obr. 46A). Je proto pravděpodobné, že GABA_B v MNTB regulují uvolňování inhibičních přenašečů GABA a glycinu, podobně jako v jiných oblastech CNS.

GABA_B receptory se v MNTB nacházely i na membránách somatodendritických částí PC (obr. 46D). Tyto postsynaptické receptory byly hojně detekovány jak v postsynaptické denzitě pod inhibičními nervovými zakončeními, tak i v její bezprostřední blízkosti pod inhibičními i excitačními boutony, často v podobě tetramerických shluků (obr. 46A). Naše pokusy tak naznačují, že GABA_B receptory jsou v MNTB aktivovány synapticky uvolněnou GABA a mohou tak zprostředkovat rychlou postsynaptickou inhibici prostřednictvím aktivace K_{ir3} kanálů (Andrade et al., 1986; Gladding and Raymond, 2011).



Obr. 46. **Subcelulární lokalizace GABA_BR v MNTB.** **A,** Snímek z elektronového mikroskopu ukazuje řez MNTB značený IG-konjugovanými protilátkami proti GABA_B receptoru. IG částice jsou lokalizovány na somatu PC v inhibičních subsynaptických místech (plné šipky) nebo extrasynapticky (prázdné hlavičky šipek), sdružené do tetramerických shluků. Na inhibičním nervovém zakončení (inh.) jsou IG částice na extrasynaptické membráně (plné hlavičky šipek). **B,** Peri- a extrasynaptická lokalizace IG částice na Heldově kalichu a na těle PC (dvojitá šipka). **C,** Umístění pre- a postsynaptických GABA_B receptorů v inhibičních a excitačních synapsích naznačuje jejich homologní a heterologní aktivaci synaptickou GABA. **D,** Elektronmikroskopický snímek dendritického trnu (s) PC, který nese shluky synaptických a izolované extrasynaptické GABA_BR (prázdné hlavičky šipek). Hvězdička označuje aktivní zónu s postsynaptickou denzitou, křížek v obr. B puncta adherentia, inhibiční zakončení (inh.), Heldův kalich (exc.). Měřítka: 0,5 μm (A-D)

4.5. Lokalizace tetramerizační domény draslíkového kanálu 12 (KCTD 12) v oblasti MNTB

Bylo zjištěno, že $GABA_B$ receptory exprimované v nativní mozkové tkáni, nesou pomocné podjednotky nazvané KCTD proteiny (tetramerizační domény draslíkových kanálů) (Schwenk et al., 2010; Gassmann and Bettler, 2012). Byly identifikovány 4 podtypy těchto proteinů, KCTD 8, 12, 12b a 16 a také jejich vazebné místo na C-konci podjednotky $GABA_{B2}$ (Y902; aminokyselina tyrozin na pozici 902) (Schwenk et al., 2010). Elektrofyziologické studie ukazují, že všechny 4 podtypy proteinů urychlují kinetiku $GABA_B$ odpovědí a zvyšují jejich zjevnou afinitu k endogenním agonistům. KCTD 12 navíc dramaticky zvyšuje desenzitizaci $GABA_{BR}$ aktivovaných K^+ kanálů, tzv. dovnitř usměřňujících K^+ kanálů (GIRK kanálů).

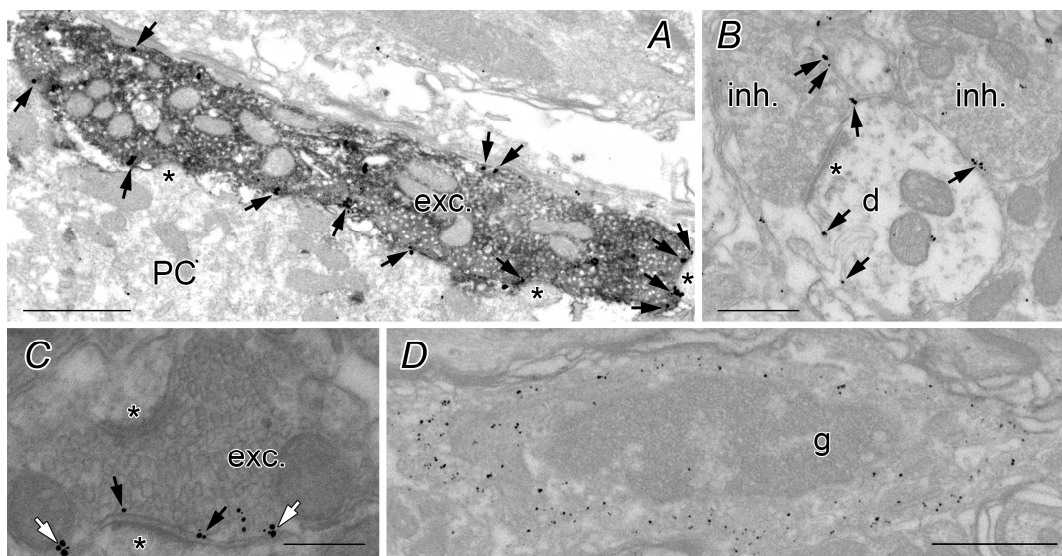
Naším úkolem bylo detekovat KCTD 12 doménu pomocí vysokorozlišovací imunoelektronové mikroskopie v MNTB, a to jak na pre-, tak i na postsynaptické membráně Heldovy synapse.

Řezy z MNTB dospělého potkana kmene Wistar ($n = 3$) byly zpracovány pro pre-embedding imunoelektronové značení s afinitně purifikovaným anti-KCTD 12 sérem, které bylo následně označeno sekundárními protilátkami s navázanými zlatými částicemi. Imunozačení bylo provedeno stejným způsobem jako v předchozích kapitolách (Téma III., Téma IV.). Afinitně purifikované sérum proti KCTD 12, které vykazovalo nejintenzivnější značení z testovaných sér, jež pocházelo z několika zvířat (králík), bylo získáno z laboratoře prof. Bernharda Bettlera z Fyziologického ústavu (Basilej, Švýcarsko). Byla testována i séra proti KCTD 16, KCTD 12b a KCTD 8, ale v dalším bádání v MNTB nebyla použita.

Podobně jako $GABA_B$ receptory byly proteiny KCTD 12 nalezeny na presynaptických i postsynaptických neuronech MNTB (obr. 47). Na Heldově kalichu se KCTD 12 vyskytovaly perisynapticky i v extrasynaptických místech (obr. 47A, C). To naznačilo, že KCTD 12 by mohly modulovat presynaptické funkce $GABA_B$ heteroreceptorů. Na inhibičních zakončeních (obr. 47B) převládala perisynaptická lokalizace, opět v souladu s distribucí presynaptických $GABA_B$ homoreceptorů. Naopak na postsynaptických PC se KCTD 12 vyskytovaly pouze na extrasynaptických místech nebo perisynaptických v blízkosti excitačních synapsí, což naznačuje, že tyto proteiny nemodulují fázické odpovědi subsynaptických $GABA_B$ receptorů. Postsynaptické KCTD 12 byly příležitostně sdruženy do tetramerických shluků (obr.

47C). KCTD 12 byly rovněž nalezeny v přesněji neidentifikovaných gliových buňkách (obr. 47D).

Naše pokusy tak naznačily, že $GABA_B$ receptory na neuronech MNTB tvoří dvě populace, které se liší přítomností přídatných podjednotek KCTD 12. Extrasynaptické receptory na nervových zakončeních a na somatodendritických částech PC vykazovaly podobnou lokalizaci jako KCTD 12, což je v souladu s jejich organizací do tetramerů. Odpovědi těchto receptorů pravděpodobně podléhají kontrole prostřednictvím KCTD 12 závislého mechanismu. Naopak nepřítomnost KCTD 12 na subsynaptické membráně naznačuje, že odpovědi $GABA_B$ receptorů na synaptických místech nejsou modulovány KCTD 12.



Obr. 47. **Subcelulární lokalizace KCTD 12 v MNTB.** **A,** Snímek z elektronového mikroskopu ukazuje řez MNTB značený IG-konjugovanými protilátkami proti KCTD 12. Šípky označují IG částice, které se vyskytují na presynaptické membráně Heldova kalichu po okrajích glutamatergních aktivních zón (*) a na extrasynaptických místech uvolňující glutamát. **B,** Pre- a postsynaptická lokalizace IG částic na inhibičních synapsích mimo synaptické spoje (d, dendrit; inh. inhibiční nervové zakončení). **C,** Příklad shlukovitého uspořádání extrasynaptických IG částic na těle PC (bílé šípky). **D,** Snímek, na kterém tělo gliové buňky (g) obsahuje množství cytoplazmatických IG částic. Měřítka: 1 μm (A, D), 0,5 μm (B), 0,25 μm (C)

5. Diskuze

5.1. Podjednotkové složení GlyR v MNTB

V předešlých pracích bylo ukázáno, že glycin uvolněný elektrickým drážděním inhibičních vláken moduluje excitační přenos v MNTB postsynaptickým a presynaptickým mechanismem (Turecek and Trussell, 2001; Awatramani et al., 2004). Postsynapticky glycin snižuje vstupní odpor a způsobuje hyperpolarizaci MNTB hlavních neuronů, která vede k inhibici amplitudy EPSP až pod práh vzniku akčního potenciálu. Presynaptický mechanismus spočívá v mírné depolarizaci Heldova kalichu vedoucí k aktivaci napěťově závislých Na^+ a Ca^{2+} kanálů a k nahromadění presynaptického vápníku (Turecek and Trussell, 2001; Huang and Trussell, 2008). Výsledkem presynaptické činnosti je zvýšené uvolňování glutamátu z Heldova kalichu, které se projevuje zesílením EPSC. Glycin má tedy v MNTB nejen klasické inhibiční, ale rovněž i excitační účinky.

Výsledky v této práci doplňují naše elektrofyziologické pokusy a ukazují, že glycin v MNTB působí na pre- a postsynaptických GlyR. Postsynaptické receptory na MNTB hlavních neuronech jsou tvořeny $\alpha 1\beta$ heteromery a zprostředkují rychlou a fázičnou postsynaptickou inhibici (Hruskova et al., 2012). Presynaptické receptory na Heldových kališích jsou tvořeny $\alpha 1$ homomery a umožňují pomalou presynaptickou facilitaci (Turecek and Trussell, 2002; Hruskova et al., 2012).

Rozdíly v podjednotkovém složení ovlivňují kinetické vlastnosti receptorových komplexů, avšak také způsob, jakým jsou rozmístěny na povrchu těla neuronů. Byly pozorovány v podstatě dva typy rozmístění GlyR v buněčných membránách, shlukovité a difuzní. Tato rozmístění funkčně odpovídají synaptickým a extrasynaptickým receptorům (Danglot et al., 2004; Muller et al., 2004). Shlukovité uspořádání synaptických GlyR je charakteristické pro $\alpha\beta$ heteromery, které je dáno vazbou β podjednotky na protein gephyrin, který ukotvuje celý receptor do cytoskeletálního lešení postsynaptické denzity (Kirsch and Betz, 1995; Meyer et al., 1995). Extrasynaptické receptory mohou být tvořeny jak α homomery, tak i $\alpha\beta$ heteromery disperzně rozmístěnými na povrchu neuronů. Důležitým faktorem, který ovlivňuje stupeň disperzity GlyR, je jejich laterální mobilita, která je snížena interakcí s gephyrinem (Meier and Grantyn, 2004; Calamai et al., 2009) a je tedy nejvyšší

u α homomerických receptorů. Mobilita GlyR v membráně je proces závislý na aktivitě neuronů a může vést k nahromadění receptorů v místech, kde se uvolňuje endogenní neuropřenašeč (Hanus et al., 2006; Levi et al., 2008).

Dále jsme zjistili, že somatodendritické $\alpha 1\beta$ heteromerní glycinové receptory, které se vyskytují pod vGAT pozitivními nervovými zakončeními, byly často uspořádány do růžice (Alvarez et al., 1997). Tyto formace byly dříve popsány u míšních motoneuronů a v retině (Walmsley et al., 1998; Haverkamp et al., 2004). Kromě těl a dendritů byly shluky GlyR též nalezeny v proximálních částech (iniciálním segmentu) axonů postsynaptických neuronů. Tento náleznaznačuje, že receptory, které se vyskytují v těchto místech, mohou hrát roli při modulaci vzniku postsynaptického akčního potenciálu.

Distribuce GlyR má zásadní vliv na jejich fyziologickou funkci. Shluky postsynaptických receptorů jsou synchronně aktivovány synapticky uvolněným glycinem a vyvolávají IPSC, který se vyznačuje vysokou amplitudou a rychlou kinetikou (Smith et al., 2000). Naopak rozptýlené extrasynaptické receptory zprostředkují tonické IPSC s malými amplitudami a velmi pomalou kinetikou (Flint et al., 1998; Balakrishnan et al., 2009). Vzhledem k tomu, že poloha extrasynaptických receptorů je vzdálená od synaptických zdrojů endogenních agonistů, musí být tyto receptory aktivovány zbytkovým glycinem (Ruiz and Kullmann, 2012). Úlohu účinných extrasynaptických receptorů mohou proto plnit především α homomerické GlyR díky jejich vysoké afinitě pro glycin.

Na rozdíl od presynaptických GlyR obsahují postsynaptické receptory β podjednotku, která vzájemně interaguje s gephyrinem (Kneussel et al., 1999; Schrader et al., 2004) a dohromady tvoří stabilizované seskupení, které vede k tvorbě shluků GyRs na subsynaptické membráně (Dumoulin et al., 2009). Gephyrin tak hraje klíčovou roli v synaptickém transportu a cílení heteromerních GlyR. Dále zprostředkovává interakci receptorů s KIF5 motorovými proteiny, stejně jako s proteinovou rodinou dyneinů (Dumoulin et al., 2009). Mechanismus regulace transportu a cílení presynaptických glycinových receptorů bez vlivu gephyrinu nebyl doposud popsán. Tvoření shluků heteromerních GlyR pomocí gephyrinu také ovlivňuje kinetické vlastnosti GlyR. Bylo prokázáno, že receptorová agregace vede k rychlejší desenzitizaci (Legendre et al., 2002). Tato zjištění by mohla vysvětlit rozdíly ve farmakologických vlastnostech presynaptických a postsynaptických receptorů.

5.2. Vývojové změny inhibičního glycinergního systému v MNTB

Je známo, že dozrávání inhibičních systémů mozkového kmene a míchy se vyznačuje přechodem z GABAergního na glycinergní systém, přičemž u potkana hlavní přestavba nastává během prvních dvou týdnů postnatálního vývoje (Gao and Ziskind-Conhaim, 1995; Gao et al., 1998; Kotak et al., 1998; Korada and Schwartz, 1999; Keller et al., 2001; Turecek and Trussell, 2002; Nabekura et al., 2004). U potkanů ve věku P5-P7 využívá inhibice především GABAergní přenos. U středních věkových kategorií (P9-P12) lze pozorovat smíšenou GABAergní a glycinergní inhibici. GABAergní systémy jsou postupem času nahrazeny glycinergními a proces je ukončen kolem 20-25. dne postnatálního vývoje (Awatramani et al., 2005a). V MNTB potkana se vývojové změny týkají jak inhibičních vstupů, tak i receptorů pro inhibiční aminokyseliny. U potkanů mladších 11 dnů, před nástupem sluchu, exprimují MNTB neurony vysokou hladinu ionotropních GABA_A receptorů, které jsou postupně nahrazovány GlyR (Turecek and Trussell, 2002; Awatramani et al., 2005a). Toto přepnutí vede ke zvýšení amplitudy a zrychlení kinetiky postsynaptických inhibičních proudů a ke změněné plasticitě uvolňování glutamátu.

To, že nápadné změny inhibičního synaptického přenosu nastávají v období, kdy potkani začínají slyšet (~P11), naznačuje, že některé z vývojových změn mohou být vyvolány přirozenou kochleární aktivitou. Tato hypotéza byla v minulosti testována pomocí experimentálního přístupu zahrnujícího uni- nebo bilaterální kochleární ablacii (Swearengen et al., 1993; Potashner et al., 2000; Martinez-Galan et al., 2007). V mnohých případech bylo ukázáno, že bilaterální kochleární ablace měla vliv na vývojové změny v zastoupení receptorů či dalších proteinů, které se účastnily zpracování akustických informací v sluchové dráze mozkového kmene a přispívaly k regulaci neuronální excitace. Dále bylo zjištěno, že při jednostranné kochleární ablacii u mladých morčat došlo k utlumení glycinergní inhibice ipsilaterálně ve ventrálních kochleárních jádrech (PVCN, AVCN) a v LSO nebo bilaterálně v dorzálním kochleárním jádře (DCN). Naopak k zesílení glycinergního inhibičního přenosu došlo v kontralaterálním LSO a bilaterálně v MSO. Soudí se, že množství glycinových receptorů může záviset na síle excitačního a glycinergního vstupu do sluchových neuronů (Suneja et al., 1998a; Suneja et al., 1998b; Yan et al., 2007). U fretek bylo rovněž popsáno, že následkem kochleotomie dochází ke změnám v expresi množství

calretinin-pozitivních neuronů a ke snížené synaptogenezi v AVCN a PVCN (Fuentes-Santamaria et al., 2005).

V našich pokusech bylo změnám na úrovni presynaptických receptorů Heldova kalichu experimentálně zabráněno pomocí bilaterální kochleární ablace (kochleotomie), provedené u jednotýdenních potkanů (nepublikovaná data Hrušková, Trojanová a Tureček 2013). Zjistili jsme, že zničení hlemýžďů vede především ke snížení exprese presynaptických GlyR. Na postsynaptické úrovni vedla oboustranná kochleární ablace k přechodnému potlačení množství somatických GlyR. To bylo provázeno sníženým množstvím vGAT pozitivních inhibičních zakončeních. V dospělém věku (2 měsíce po kochleotomii), rozdíly mezi kochleotomizovanými a kontrolními zvířaty zmizely. Z toho vyplývá, že sensorická aktivita hraje důležitou roli ve vývoji inhibičního systému MNTB, ale také že existují adaptační mechanismy, které ji mohou zastoupit.

Spontánní kochleární aferentní aktivita nastává již před nástupem sluchu a hraje důležitou roli v utváření vyvíjejícího se sluchového systému (Lippe, 1994; Jones et al., 2001; Lu et al., 2007; Tritsch et al., 2007). Bylo ukázáno, že odlišné frekvence spontánní aktivity mezi tonotopicky vyladěnými oblastmi mohou hrát roli ve vývoji ostatních složek podél sluchové dráhy mezi vnitřním uchem a MNTB (Ruben, 1967; Souter et al., 1995, 1997). U analogického ptačího sluchového systému bylo pozorováno, že vysokofrekvenční oblasti sluchových jader mozku začínají fungovat dříve než nízkofrekvenční oblasti stejných jader (Hackett et al., 1982; Jackson et al., 1982). Je proto možné, že vysokofrekvenční MNTB neurony přijímají elektrické vstupy z kochleárních jader dříve než nízkofrekvenční oblasti a tím může být ovlivněna exprese GlyR nebo vGAT pozitivních inhibičních boutonů, která později s vývojem zmizí.

Došli jsme k závěru, že utváření inhibičního systému v MNTB se účastní několik regulačních mechanismů. Zdá se, že kochleární aktivita hraje významnou úlohu při selektivní regulaci cíle glycinových receptorů na Heldově kalichu. Na druhé straně aferentní vstup nepředstavuje bezpodmínečnou potřebu při udržování exprese inhibičních receptorů.

5.3. Distribuce $\alpha 1$ podjednotky GlyR ve vyzrálých Heldových kališích

Výsledky prezentované v této práci představují první data, která demonstrují kvantitativní distribuci glycinových receptorů na presynaptických nervových zakončeních v centrálních synapsích. Analyzovali jsme rozmístění GlyR-asociovaných IG částic ve zralém Heldově kalichu dospělého potkana. Nově jsme použili specifickou protilátku namířenou proti intracelulární části $G\alpha 1$ podjednotky. Buněčná distribuce této podjednotky byla sledována pomocí elektronové mikroskopie.

V imunoelektronové mikroskopii jsme dali přednost technice pre-embedding před technikou post-embedding. Technika pre-embedding umožňuje mnohem vyšší záchyt IG částic na úkor zachování struktury tkáně, než můžeme zachytit druhou technikou (Nusser et al., 1997; Nusser et al., 1998b; Nusser et al., 1998c).

5.3.1. Mechanismus na aktivitě závislé redistribuce receptorů

Zjistili jsme, že presynaptické GlyR, které jsou tvořeny jako $\alpha 1$ homomery, byly rozptýleny v membráně Heldova kalichu. Rozptýlená distribuce homomerických GlyR je pravděpodobně způsobena tím, že receptory bez β podjednotky se neváží ke gephyrinu. Tento protein, který je typický pro postsynaptická místa, se váže k cytoskeletárním proteinům a způsobuje agregaci heteromerických receptorů (Kneussel et al., 1999; Schrader et al., 2004).

Skutečnost, že GlyR přednostně obsazují v presynaptické membráně pozice potenciálně přístupné pro jejich endogenní agonisty, naznačuje existenci na aktivitě závislého mechanismu redistribuce receptorů na buněčném povrchu. Takový mechanismus by byl v souladu s vysokou relativní mobilitou homomerických GlyR v buněčné membráně (Specht et al., 2013). Podobné chování vykazují i jiné typy receptorů (Gladding and Raymond, 2011). Například NMDA receptory vykazují laterální pohyby mezi synaptickými a extrasynaptickými místy (Groc et al., 2009). Podobné přesuny AMPA receptorů byly navozeny zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} (Bruneau and Akaaboune, 2006). V souladu s těmito nálezy bylo rovněž ukázáno, že mobilita receptorů v postsynaptické denzitě a extrasynaptických oblastech, se zvyšuje za současné stimulace aktivity neuronů (Tardin et al., 2003; Groc et al., 2004).

5.3.2. Vztah mezi distribucí presynaptických GlyR a jejich funkcí

Naše data ukazují, že existuje korelace mezi rozmístěním presynaptických GlyR a jejich funkcí a přístupností pro jejich endogenní agonisty. Nejintenzivnější značení bylo nalezeno v segmentech kalichu zduřeninách, neboli strukturách odpovědných za uvolňování glutamátu, které se vyznačují vysokou hustotou napěťově závislých Ca^{2+} kanálů (VGCC) (Spirou et al., 2008). To je v souladu s úlohou receptorů v glycinem-vyvolané a na Ca^{2+} -závislé facilitaci presynaptické pravděpodobnosti uvolnění (Turecek and Trussell, 2001; Awatramani et al., 2005b). GlyR na Heldově kalichu ovšem nevykazovaly přednostní lokalizaci v blízkosti glutamát-uvolňujících aktivních zón, které tvoří lokality typické pro presynaptické autoreceptory s analogickými funkcemi. Tyto receptory zahrnují ionotropní glutamátové receptory, jenž tvoří Ca^{2+} -propustné kanály schopné zesilovat exocytózu glutamátergních váčků dopravováním Ca^{2+} přímo do presynaptické aktivní zóny (Engelman and MacDermott, 2004; Pinheiro and Mulle, 2008; Ruiz and Kullmann, 2012). Naopak GlyR zvyšují presynaptickou koncentraci Ca^{2+} nepřímo, zprostředkováním výtoku Cl^- ze zakončení, což vede k jeho depolarizaci a následné aktivaci VGCC (Turecek and Trussell, 2001; Price and Trussell, 2006; Huang and Trussell, 2008). V této souvislosti je důležité, že nervová zakončení mají obecně vysoké vstupní odpory (Dodson et al., 2003; Alle and Geiger, 2006; Kim et al., 2010), takže umožňují účinné šíření lokálních potenciálů podél presynaptické plazmatické membrány. Navíc kaskáda událostí vedoucí k presynaptické facilitaci zahrnuje na Ca^{2+} -závislou stimulaci protein kinázy C, která vyvolává zvýšení počtu tzv. snadno uvolnitelných synaptických váčků s glutamátem (Chu et al., 2012). Synaptická lokalizace GlyR proto není nutná pro dosažení efektivní modulace uvolňování glutamátu. Podobně působící GABA_A heteroreceptory, vyskytující se na *mossy fibers* v CA3 oblasti hipokampu, jsou nespecificky rozptýleny mezi intra-, peri- a extrasynaptická místa (Ruiz et al., 2003).

Vzdálenost presynaptických glycinových heteroreceptorů od uvolňovacích míst a komplikovanost mechanismu jejich působení pravděpodobně přispívají k relativně pomalému časovému průběhu (minuty) jimi vyvolané presynaptické facilitace (Turecek and Trussell, 2001). To kontrastuje s mnohem rychlejší modulací (sekundy) uvolňování glycinu na spinálních neuronech pomocí presynaptických glycinových autoreceptorů (Jeong et al., 2003), pravděpodobně orientovaných do blízkosti glycinergních zón. To naznačuje existenci obecnějších zákonitostí v rozmístování presynaptických

receptorů. Autoreceptory, regulující uvolňování svých endogenních agonistů, se vyskytují především v blízkosti jejich uvolňovacích míst, zatímco heteroreceptory zprostředkující heterosynaptickou modulaci, se vyskytují převážně na extrasynaptických místech.

Extrasynaptický výskyt GlyR a jiných heteroreceptorů je v souladu s jejich aktivací neuropřenašeči, které se k receptorům dostávají difúzí ze sousedních synapsí. Zjistili jsme, že ve zduřeninách Heldova kalichu se GlyR přednostně vyskytovaly na částech exponovaných extracelulárnímu prostoru a měly tendenci akumulovat se v membráně, která sousedila s glycinergními nervovými zakončeními. Tato pozorování naznačují, že subcelulární distribuce presynaptických GlyR může sledovat zdroje endogenního glycinu a je v souladu s hypotézou, že presynaptické GlyR jsou aktivovány únikem glycinu ze štěrbinu inhibiční synapse extracelulárním prostorem (Turecek and Trussell, 2001). K tomu dochází během vysoké presynaptické činnosti inhibičních zakončeních (Ahmadi et al., 2003). Aktivace receptoru relativně nízkou koncentrací neuropřenašeče únikem ze štěrbinu inhibiční synapse je obzvláště pravděpodobná, mají-li receptory vysokou afinitu k neuropřenašeči, a to je právě případ GlyR (Rossi and Hamann, 1998).

Těchto procesů se také významně účastní glycinové přenašeče, které kontrolují extracelulární koncentraci glycinu (Aubrey et al., 2005). Rusakov a Kullman (1998) prokázali počítačovou simulací, že glutamát může difundovat mimo synaptickou štěrbinu a může aktivovat NMDA receptory v okruhu 0,5 μm od uvolněného místa. Pravděpodobnost by měla být ještě vyšší pro glycin, než pro glutamát díky velikosti glycinové molekuly. Glycin se vyznačuje nízkou molekulovou hmotností (75 g/mol) oproti glutamátu (147,13 g/mol), a tím i rychlou difúzí v extracelulárním prostoru. Další zdroj glycinu pak mohou představovat Heldův kalich obepínající gliové buňky (Suzuki et al., 2008), které nesou glycinové transportéry typu GlyT1 ektopicky uvolňujícím glycin pomocí reverzního transportu (pro přehled viz (Eulenburg and Gomez, 2010)). Kopp-Scheinpflug et al. navrhli, že glycin uvolněný z glie aktivuje v MNTB presynaptické GlyR a mění nástup sluchovým vjemem-vyvolané aktivity v MNTB (Smith et al., 1992; Zafra et al., 1995; Kopp-Scheinpflug et al., 2008; Zafra and Gimenez, 2008).

Naše zkoumání distribuce GlyR na Heldově kalichu bylo zaměřeno hl. na výběžky typu zduřenina a stonek, které jsou zodpovědné za sekreci glutamátu

(Ryugo and Spirou, 2009). Zduřeniny jsou odděleny od stonků tenkými krčky, které neobsahují glutamátové váčky. Z toho důvodu jsme je do našich analýz nezahrnuli. Pokud by ovšem GlyR byly na těchto částech přítomny, mohly by plnit významnou fyziologickou roli v regulaci vodivého spojení mezi zduřeninami a stonky, např. při šíření presynaptického akčního potenciálu. Tato role zatím nebyla prokázána a spíše bylo navrženo, že krčky nemají příliš velký vliv na elektrickou vodivost mezi zduřeninami a stonky, a že pravděpodobněji mezi nimi vytvářejí oddělené biochemické oddíly (Hayashi and Majewska, 2005).

5.4. Buněčná distribuce GABA_B receptorů a jejich úloha v MNTB

Uvolnění glutamátu z Heldova kalichu je modulováno počtem neuropřenašečů. Nejsilnějším modulátorem je GABA, který působí přes presynaptické GABA_B hojně exprimované v sluchových jádrech mozkového kmene (Grothe and Koch, 2011). Aktivace GABA_B receptorů může blokovat přinejmenším 80% uvolnění přenašeče, mimo jiné tím, že snižuje presynaptický Ca²⁺ proud (Isaacson, 1998; Takahashi et al., 1998; Wu et al., 1998) aktivací Gβγ podjednotek heterotrimerních G proteinů (Kajikawa et al., 2001). GABA_B regulují uvolňování glutamátu i několika dalšími na Ca²⁺ nezávislými mechanizmy, jako je např. přímé zpomalení recyklace synaptických váček (Scanziani et al., 1992; Parnas et al., 2000; Sakaba and Neher, 2003). Rovněž další metabotropní receptory jako jsou receptory pro adenosin, glutamát, noradrenalin nebo serotonin regulují uvolňování přenašečů v MNTB, ale jejich vliv je slabší (Elezgarai et al., 1999; Leao and Von Gersdorff, 2002; Kimura et al., 2003; Renden et al., 2005; Mizutani et al., 2006).

Výsledky uvedené v této práci přímo ukazují, že pre- i postsynaptické neurony v MNTB nesou GABA_BR a doplňují tak elektrofyziologická data z naší laboratoře (Hruskova et al., 2007). Presynaptické GABA_BR regulují uvolňování glutamátu. V souladu s touto funkcí byly presynaptické GABA_BR nalezeny v těsné blízkosti míst, kde se uvolňuje endogenní neuropřenašeč GABA. Dále byly GABA_BR pozorovány difúzně rozptýlené podél presynaptické plazmatické membrány jak inhibičních, tak excitačních boutonů. Extrasynaptické umístění GABA_BR na Heldově kalichu (glutamátergním zakončení) a inhibičním zakončení naznačuje, že tyto receptory nejsou přímo aktivovány synapticky uvolněným neuropřenašečem GABA, ale s největší

pravděpodobností jsou aktivovány GABA, která unikla do extracelulárního prostoru ze štěrbin inhibiční synapse (Scanziani, 2000). Pokusy dokázat tento způsob aktivace však byly doposud neúspěšné (Wang et al., 2013a). K efektivní aktivaci GABA_B receptorů na Heldově kalichu je zapotřebí zhruba 10 μM GABA (Takahashi et al., 1998), což je koncentrace nedosažitelná, díky vysoké hustotě GABA přenašečů exprimovaných na gliových buňkách.

Postsynaptické GABA_BR inhibují posthyperpolarizační fázi akčních potenciálů. Mechanismus inhibice zahrnuje regulaci Ca²⁺ kanálů N-typu odpovědných za aktivaci na vápníku závislých K⁺ kanálů s malou vodivostí typu 2 (SK2 nebo také KCNN2 či K_{Ca2.2}). Klasické inhibiční GABA_BR tak paradoxně zvyšují postsynaptickou excitabilitu hlavních neuronů. Jinými slovy, postsynaptické GABA_BR zvyšují spolehlivost opakovaného synaptického přenosu na MNTB excitačních synapsích. Pozorování těchto funkcí postsynaptických GABA_B jsou podporována výsledky uvedenými v této práci, které ukazují přítomnost GABA_B přímo v postsynaptické denzitě symetrického synaptického kontaktu. Receptory byly dále nalezeny difúzně rozptýlené po celé membráně hlavního neuronu, taktéž byly lokalizovány perisynapticky na okrajích asymetrického synaptického spojení na hlavním neuronu pod excitačním boutonem uvolňujícím glutamát.

Je známo, že GABA_BR jsou široce exprimovány v mozku jako autoreceptory a heteroreceptory podle toho, zdali kontrolují uvolňování GABA nebo uvolňování jiných neuropřenašečů (Wu and Saggau, 1997; Bettler et al., 2004). Funkční GABA_BR jsou heterodimery složené ze dvou homologních podjednotek, GB1 a GB2 (Jones et al., 1998b; Kaupmann et al., 1998a; White et al., 1998a; Kuner et al., 1999). Molekulární rozmanitost GABA_BR vychází ze dvou farmakologicky nerozlišitelných GB1 izoform, GB1a a GB1b (Bettler et al., 2004) a z pomocných KCTD podjednotek (Schwenk et al., 2010). Tyto shluky GABA_BR obsahující obě dvě podjednotky GB1 a GB2, tvoří v mozku oligomery vyššího řádu, jak popsala skupina prof. Jean-Philippe Pina v heterologních systémech (Maurel et al., 2008; Pin et al., 2009; Comps-Agrar et al., 2011). Transgenní myši s cílovou delecí specifických izoform naznačují, že receptory, které obsahují GB1a izoformu, jsou převážně lokalizovány na glutamátergních boutonech, kde zprostředkovávají presynaptickou inhibici uvolňovaného glutamátu (Vigot et al., 2006; Guetg et al., 2009). Aktivace presynaptických GABA_BR vyvolává inhibici uvolnění synaptických váčků, které je potlačováno vtokem Ca²⁺ přes vápníkové

kanály (Wu and Saggau, 1995; Takahashi et al., 1998; Laviv et al., 2010). Rovněž se uvádí několik dalších na Ca^{2+} nezávislých mechanismů, jako je např. přímá modulace navázání synaptických váčků (Scanziani et al., 1992; Parnas et al., 2000; Sakaba and Neher, 2003).

Jeden z možných zdrojů aktivující presynaptické GABA_BR heteroreceptory může být neuropřenašeč GABA uvolněný ze synaptické štěrbině inhibičního boutonu, který doputuje k těmto receptorům prostou difuzí (Moore and Moore, 1987; Adams and Mugnaini, 1990; Lu et al., 2008). Aby došlo k uvolnění dostatečného množství GABA, je třeba intenzivní neuronální aktivity (Scanziani, 2000). Tím se vysvětluje jeden z možných mechanismů aktivace těchto receptorů. Existují však i jiné zdroje, které mohou zvýšit hladinu okolní GABA, jako je např. na aktivitě závislé uvolnění GABA z dendritů anebo gliových buněk (Zilberter et al., 1999; Angulo et al., 2008; Velez-Fort et al., 2012). Alternativně může působit na GABA_B receptory taurin, který může být rovněž uvolněn v mozковém kmeni (Saransaari and Oja, 2006) a který se může chovat jako agonista GABA_B receptorů (Kontro and Oja, 1990) a aktivovat je. Nedávno bylo prokázáno, že bazální synaptická aktivita vytváří dostatečně vysokou koncentraci okolní GABA, aby tonicky indukovala nízkou hladinu presynaptické aktivity GABA_BR , jejímž následkem dochází ke kontrolovanému uvolňování neuropřenašeče (Laviv et al., 2010).

Pomocná podjednotka GABA_B receptorů, tetramerizační doména draslíkového kanálu (KCTD), která výrazně ovlivňuje jejich biofyzikální a farmakologické vlastnosti, se spolu s GB2 podjednotkou kompletuje jako tetramer (Metz et al., 2011). Elektrofyziologické studie ukazují, že všechny 4 podtypy proteinů KCTD určují farmakologii a kinetiku odpovědí receptorů tím, že urychlují kinetiku GABA_B odpovědí a zvyšují jejich zjevnou afinitu k endogenním agonistům, proto by GABA_B receptory mohly být tonicky aktivovány zbytkovou GABA. To může mít za následek tonickou inhibici presynaptických Ca^{2+} kanálů a tím uvolňování glutamátu a zároveň nízký postsynaptický vstupní odpor díky tonické aktivaci postsynaptických K^+ kanálů. To vše vede k potlačení spontánní aktivity v MNTB, která naopak může snižovat spolehlivost přenosu na Heldově synapsi (Wang et al., 2013b). KCTD 12 navíc dramaticky zvyšuje desenzitizaci odpovědí GABA_BR aktivovaných K^+ kanálů. Jejich další úloha může hrát například roli v regulování receptorů na buněčném povrchu, pravděpodobně snižováním internalizace receptorů a zvyšováním tak jejich intenzity receptorové signalizace na buněčném povrchu (Ivankova et al., 2013).

V této práci jsme ukázali, že doména KCTD 12 vykazovala v některých oblastech MNTB odlišné značení než GABA_BR. KCTD 12 se lišila rozdílným výskytem jak na inhibičním boutonu, tak na Heldově kalichu. GABA_BR jsou umístěny synapticky na PC pod uvolňujícím místem pro GABA/glycin v postsynaptické denzitě, kdežto KCTD 12 zde nalezeny nebyly. GABA_B receptory se vyskytují perisynapticky na PC vůči zakončení, které uvoňuje excitační neuropřenašeč glutamát. Doména KCTD 12 se nalézala na excitačním zakončení na okrajích aktivní zóny uvolňující glutamát. Shodným způsobem jako GABA_B receptory jsme doménu KCTD 12 našli rozmístěnou extrasynapticky na excitačním i inhibičním zakončení a rovněž postsynapticky na hlavním neuronu. KCTD 12 se rovněž vyskytovaly ve značném množství v určitém typu glií (studium naplánováno v dalších experimentech).

V současné době nejlépe prostudovanou oblastí, ve které se vyskytují pomocné podjednotky KCTD, je hipokampus. Jak bylo popsáno skupinou prof. Bernharda Bettlera, KCTD proteiny byly rovněž nalezeny v dalších oblastech mozku, v nízké hladině byly identifikovány i v gliích a v periferních tkáních (Metz et al., 2011). O své roli v MNTB je momentálně velice málo známo a je proto v našem dalším zájmu zjistit o této pomocné podjednotce GABA_B receptorů mnohem více prostřednictvím elektrofyziologického zkoumání.

Z našich výsledků vyplývá, že pomocná podjednotka KCTD 12, která se vyskytuje v úzkém kontaktu s GABA_B receptory může nejenom ovlivňovat jejich vlastnosti (Schwenk et al., 2010), působit na účinnost jejich agonistů a iontových Ca²⁺ kanálů (Schwenk et al., 2010; Ivankova et al., 2013), ale také jejich rozdílný výskyt oproti GABA_B receptorům může mít jinou doposud neprobádanou úlohu spojenou např. s internalizací receptorů (Ivankova et al., 2013).

6. Závěry

Presynaptické a postsynaptické glycinové receptory v Heldově synapsi mediálního jádra trapézovitého tělesa (MNTB) dospělého potkana se liší svým podjednotkovým složením. Nervová zakončení globulárních buněk (GBC) obsahují $\alpha 1$ homomerní glycinové receptory (G $\alpha 1$), zatímco postsynaptické hlavní neurony (PC) a těla GBC exprimují $\alpha 1\beta$ heteromerní glycinové receptory (GlyR).

Hustota postsynaptických GlyR na tělech PC a množství glycinergních nervových zakončení v MNTB je přechodně redukována vlivem oboustranné kochleární ablace. Výsledky tak naznačují úlohu přirozené sensorické aktivity v utváření inhibičních systémů MNTB.

Distribuce presynaptických GlyR na Heldově kalichu je v souladu s jejich funkcí a přístupností pro endogenní agonisty. Glycinové receptory byly nahromaděny na úsecích Heldova kalichu typu zduřeniny, které byly v bezprostřední blízkosti glycinergních inhibičních zakončení. Výsledky naznačují existenci na aktivitě závislého mechanismu redistribuce presynaptických GlyR.

GABA_BR se nacházejí v MNTB převážně v oblastech blízko místa uvolňování neuropřenašeče GABA na postsynaptické membráně hlavního neuronu. Receptory byly často detekovány jak v postsynaptické denzitě, tak v její bezprostřední blízkosti (perisynapticky na okrajích asymetrické synapse PC). GABA_BR se vyskytují hojně i extrasynapticky jak na presynaptické, tak i postsynaptické membráně.

Pomocná podjednotka GABA_B receptoru, tetramerizační doména draslíkového kanálu 12 (KCTD 12), která byla rovněž zkoumána v MNTB, se lišila částečně rozdílnou distribucí ve vztahu ke GABA_B receptoru. KCTD 12 nebyla nalezena perisynapticky a ani v postsynaptické denzitě pod inhibičním boutonem uvolňujícím GABA/glycin jako GABA_BR a dále perisynapticky pod zakončením, které uvolňuje glutamát. Na rozdíl od GABA_BR se vyskytovala presynapticky na okrajích aktivní zóny uvolňující glutamát. V ostatních pozorováních byla její distribuce shodná s distribucí

GABA_B receptorů. Zjistit její přesnou úlohu je úkolem dalších naplánovaných elektrofyziologických experimentů.

Abstrakt

Mediální jádro trapézovitého tělesa (MNTB) v mozkovém kmeni bylo použito k našemu studiu nejenom inhibičních, ale i excitačních vlastností glycinových (GlyR) a GABA_B receptorů (GABA_BR) spolu s její pomocnou podjednotkou, tj. tetramerizační doménou draslíkového kanálu (KCTD 12).

Hlavní neurony (PC) v MNTB přesně převádějí excitační signály přicházející z globulárních buněk (GBC), které se vyskytují v anteroventrálním kochleárním jádře (AVCN), na inhibiční signály směřující k dalším kontralaterálním kochleárním jádrům. Kromě excitačního vstupu (Heldův kalich) jsou PC inervovány drobnými glycinergními inhibičními vlákny.

Bylo zjištěno, že PC exprimují inhibiční pro chlorid propustné glycinové receptory, které zprostředkovávají extrémně rychlou postsynaptickou inhibici. Elektrofyziologickými metodami bylo prokázáno, že GlyR jsou lokalizovány i na presynaptické membráně Heldova kalichu a že jejich úloha je zde odlišná. Pre- a postsynaptické receptory v MNTB tedy plní různě odlišné funkce.

V MNTB můžeme rovněž nalézt GABA_BR, které tvoří komplexy s pomocnou podjednotkou GABA_B receptorů KCTD, které rovněž vykazují odlišné vlastnosti na pre- a postsynaptické membráně Heldovy synapse v MNTB.

Cílem těchto několika projektů bylo identifikovat podjednotkové složení GlyR v Heldově synapsi, analyzovat rozmístění presynaptických GlyR a stanovit jejich souvislost ke glutamát-uvolňujícímu presynaptickému aparátu a endogenním zdrojům glycinu, dále zjistit i vývojové změny glycinergního inhibičního systému pod vlivem nepřírozené kochleární aktivity a nakonec určit přesnou distribuci GABA_BR v Heldově synapsi spolu s jejich pomocnou podjednotkou KCTD.

V naší laboratoři bylo zjištěno, že imunohistochemické údaje jsou v souladu s elektrofyziologickými nálezy a naznačují, že nervová zakončení GBC obsahují $\alpha 1$ homomerní glycinové receptory (G $\alpha 1$), zatímco postsynaptické hlavní neurony a těla GBC exprimují $\alpha 1\beta$ heteromerní glycinové receptory. Presynaptické G $\alpha 1$ byly nahromaděny na úsecích Heldova kalichu typu zduřeniny, které byly v bezprostřední blízkosti ke glycinergním inhibičním zakončením, a podporují tak naši hypotézu, že presynaptické G $\alpha 1$ jsou aktivovány glycinem uvolněným z těchto zakončeních.

Zamezením přirozené kochleární aktivity bilaterální kochleární ablací před nástupem slyšení dochází k mírným změnám ve vývoji inhibičního neuropřenašečového systému, který se s pozdějším věkem opět vrací na přibližně stejnou hodnotu, která je zaznamenána u kontrolních zvířat.

Dále jsme objevili, že $GABA_B$ R v MNTB se nacházejí v blízkosti místa uvolňování svého endogenního neuropřenašeče v postsynaptické denzitě PC, kromě toho jsou lokalizovány perisynapticky na okrajích asymetrické synapse postsynaptické membrány a nakonec byly hojně identifikovány extrasynapticky jak na presynaptické, tak postsynaptické membráně excitačních a inhibičních boutonů.

V neposlední řadě, KCTD pomocné podjednotky $GABA_B$ receptoru (podjednotka KCTD 12) exprimuje v MNTB většina neuronů. Jejich distribuce se částečně lišila od $GABA_B$ receptorů. KCTD 12 nebyla nalezena perisynapticky a ani v postsynaptické denzitě pod inhibičním boutonem uvolňujícím GABA/glycin jako $GABA_B$ receptory a dále perisynapticky pod zakončením, které uvolňuje glutamát, avšak na rozdíl od $GABA_B$ receptorů se vyskytovala presynapticky na okrajích aktivní zóny uvolňující glutamát. V ostatních pozorováních byla její distribuce shodná s distribucí $GABA_B$ receptorů. Zjistit její přesnou úlohu je zahrnuto v dalších naplánovaných elektrofyziologických experimentech.

Abstract

The Medial Nucleus of the Trapezoid body (MNTB) in the brainstem was used for our studies not only for inhibitory but also for excitatory properties of glycine (GlyR) and GABA_B receptors (GABA_BR) together with the auxiliary subunit KCTD 12 (potassium channel tetramerization domain).

Principal cells (PC) in the MNTB accurately convert excitatory signals from globular bushy cells (GBC), which occur in the anteroventral cochlear nucleus (AVCN) to inhibitory signals leading to further contralateral cochlear nuclei. In addition to the excitatory input (calyx of Held), PCs are innervated by small glycinergic inhibitory fibers.

It was found that the PC expresses the inhibitory glycine receptors permeable to chloride that mediate extremely rapid postsynaptic inhibition. Electrophysiological methods showed that the GlyR are located on the presynaptic membrane of the calyx of Held and that their role is different. Pre- and postsynaptic receptors in the MNTB perform various different functions.

In the MNTB we can also find GABA_BR that form complexes with auxiliary GABA_B receptor subunit KCTD, which also exhibit different properties in the pre- and postsynaptic membrane of the calyx of Held synapse.

The aim of these several projects was to identify a subunit composition of the GlyR in the synapse of Held, analyze the distribution of the presynaptic GlyR and establish their relationship to presynaptic glutamate-release apparatus and endogenous sources of glycine. Determine developmental changes of the glycinergic inhibitory system under the influence of an unnatural cochlear activity and figure out the exact distribution of the GABA_BR on the Held synapse and their auxiliary subunits KCTD.

In our laboratory was found that immunohistochemical data are consistent with electrophysiological findings and suggest that nerve endings of the GBC contain the $\alpha 1$ homomeric glycine receptors (G $\alpha 1$), while the postsynaptic principal cells and the body of the GBC express the $\alpha 1\beta$ heteromeric glycine receptors. The presynaptic G $\alpha 1$ were accumulated on calyx segments called swellings that were in the immediate proximity of the glycinergic inhibitory endings and thus support our hypothesis that the presynaptic G $\alpha 1$ are activated by a glycine spillover from these terminals.

Preventing the natural cochlear activity by a bilateral cochlear ablation before hearing onset, occurs slight changes in the development of an inhibitory neurotransmitter system that will with a later age return to approximately the same value, which is recorded in the control animals.

Furthermore, we discovered that the GABA_BR in the MNTB are located in the vicinity of its release of the endogenous neurotransmitters in the postsynaptic density of the PC, and that they are located perisynaptically on the edges of an asymmetric synapse of the postsynaptic membrane and finally were widely identified extrasynaptically both on the presynaptic and postsynaptic membrane of the excitatory and inhibitory terminals.

Finally, the auxiliary subunit KCTD 12 of GABA_B receptor is expressed by most of the neurons in the MNTB. Their distribution is partially different from GABA_B receptors. KCTD 12 was not found neither perisynaptically nor in the postsynaptic density under the inhibitory terminal releasing GABA/glycine as GABA_B receptors and perisynaptically under the terminal, which releases glutamate. KCTD 12 unlike the GABA_B receptors occurred presynaptically at the edges of the active zones releasing glutamate. In the other observations the distribution was the same as GABA_B receptors. To determine its exact role is included in the next scheduled electrophysiological experiments.

Seznam použité literatury

- Adams JC, Mugnaini E (1990) Immunocytochemical evidence for inhibitory and disinhibitory circuits in the superior olive. *Hear Res* 49:281-298.
- Ahmadi S, Kotalla C, Guhring H, Takeshima H, Pahl A, Zeilhofer HU (2001) Modulation of synaptic transmission by nociceptin/orphanin FQ and nocistatin in the spinal cord dorsal horn of mutant mice lacking the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Mol Pharmacol* 59:612-618.
- Ahmadi S, Muth-Selbach U, Lauterbach A, Lipfert P, Neuhuber WL, Zeilhofer HU (2003) Facilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine. *Science* 300:2094-2097.
- Alle H, Geiger JR (2006) Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. *Science* 311:1290-1293.
- Alvarez FJ, Dewey DE, Harrington DA, Fyffe RE (1997) Cell-type specific organization of glycine receptor clusters in the mammalian spinal cord. *J Comp Neurol* 379:150-170.
- Andrade R, Malenka RC, Nicoll RA (1986) A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 234:1261-1265.
- Angulo MC, Le Meur K, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2008) GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog Neurobiol* 86:297-303.
- Aubrey KR, Vandenberg RJ, Clements JD (2005) Dynamics of forward and reverse transport by the glial glycine transporter, glyt1b. *Biophys J* 89:1657-1668.
- Awatramani GB, Turecek R, Trussell LO (2004) Inhibitory control at a synaptic relay. *J Neurosci* 24:2643-2647.
- Awatramani GB, Turecek R, Trussell LO (2005a) Staggered development of GABAergic and glycinergic transmission in the MNTB. *J Neurophysiol* 93:819-828.

- Awatramani GB, Price GD, Trussell LO (2005b) Modulation of transmitter release by presynaptic resting potential and background calcium levels. *Neuron* 48:109-121.
- Balakrishnan V, Kuo SP, Roberts PD, Trussell LO (2009) Slow glycinergic transmission mediated by transmitter pooling. *Nat Neurosci* 12:286-294.
- Balakrishnan V, Becker M, Lohrke S, Nothwang HG, Guresir E, Friauf E (2003) Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *J Neurosci* 23:4134-4145.
- Banks MI, Smith PH (1992) Intracellular recordings from neurobiotin-labeled cells in brain slices of the rat medial nucleus of the trapezoid body. *J Neurosci* 12:2819-2837.
- Barral J, Toro S, Galarraga E, Bargas J (2000) GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca(2+) channels. *Neurosci Lett* 283:33-36.
- Becker R, Benes L, Sure U, Hellwig D, Bertalanffy H (2000) Intrathecal baclofen alleviates autonomic dysfunction in severe brain injury. *Journal of Clinical Neuroscience* 7:316-319.
- Beckstead MJ, Phelan R, Mihic SJ (2001) Antagonism of inhalant and volatile anesthetic enhancement of glycine receptor function. *J Biol Chem* 276:24959-24964.
- Beckstead MJ, Weiner JL, Eger EI, 2nd, Gong DH, Mihic SJ (2000) Glycine and gamma-aminobutyric acid(A) receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Mol Pharmacol* 57:1199-1205.
- Belenky MA, Sagiv N, Fritschy JM, Yarom Y (2003) Presynaptic and postsynaptic GABAA receptors in rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 118:909-923.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.

- Bernard V, Somogyi P, Bolam JP (1997) Cellular, subcellular, and subsynaptic distribution of AMPA-type glutamate receptor subunits in the neostriatum of the rat. *J Neurosci* 17:819-833.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* 84:835-867.
- Betz H, Laube B (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem* 97:1600-1610.
- Biermann B, Ivankova-Susankova K, Bradaia A, Abdel Aziz S, Besseyrias V, Kapfhammer JP, Missler M, Gassmann M, Bettler B (2010) The Sushi domains of GABAB receptors function as axonal targeting signals. *J Neurosci* 30:1385-1394.
- Blackburn TP (2010) GABA_B RECEPTOR PHARMACOLOGY: A Tribute to Norman Bowery: Elsevier.
- Boehm S, Kubista H (2002) Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev* 54:43-99.
- Bormann J, Hamill OP, Sakmann B (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385:243-286.
- Borst JG, Soria van Hoeve J (2012) The calyx of held synapse: from model synapse to auditory relay. *Annu Rev Physiol* 74:199-224.
- Bowery NG, Hudson AL, Price GW (1987) GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20:365-383.
- Bowery NG, Parry K, Boehrer A, Mathivet P, Marescaux C, Bernasconi R (1999) Pertussis toxin decreases absence seizures and GABA(B) receptor binding in thalamus of a genetically prone rat (GAERS). *Neuropharmacology* 38:1691-1697.

- Bowery NG, Hill DR, Hudson AL, Doble A, Middlemiss DN, Shaw J, Turnbull M (1980) (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* 283:92-94.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 54:247-264.
- Brickley SG, Mody I (2012) Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* 73:23-34.
- Brucato FH, Levin ED, Mott DD, Lewis DV, Wilson WA, Swartzwelder HS (1996) Hippocampal long-term potentiation and spatial learning in the rat: effects of GABAB receptor blockade. *Neuroscience* 74:331-339.
- Bruneau EG, Akaaboune M (2006) Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. *Mol Neurobiol* 34:137-151.
- Bussieres N, El Manira A (1999) GABA(B) receptor activation inhibits N- and P/Q-type calcium channels in cultured lamprey sensory neurons. *Brain Res* 847:175-185.
- Calamai M, Specht CG, Heller J, Alcor D, Machado P, Vannier C, Triller A (2009) Gephyrin oligomerization controls GlyR mobility and synaptic clustering. *J Neurosci* 29:7639-7648.
- Caruncho HJ, Guidotti A, Lindstrom J, Costa E, Pesold C (1997) Subcellular localization of the alpha 7 nicotinic receptor in rat cerebellar granule cell layer. *Neuroreport* 8:1431-1433.
- Comps-Agrar L, Kniazeff J, Norskov-Lauritsen L, Maurel D, Gassmann M, Gregor N, Prezeau L, Bettler B, Durroux T, Trinquet E, Pin JP (2011) The oligomeric state sets GABA(B) receptor signalling efficacy. *EMBO J* 30:2336-2349.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.

- Danglot L, Rostaing P, Triller A, Bessis A (2004) Morphologically identified glycinergic synapses in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 27:394-403.
- Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL (1991) GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature* 349:609-611.
- Deleuze C, Runquist M, Orcel H, Rabie A, Dayanithi G, Alonso G, Hussy N (2005) Structural difference between heteromeric somatic and homomeric axonal glycine receptors in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Neuroscience* 135:475-483.
- Delpire E (2000) Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* 15:309-312.
- Dodson PD, Billups B, Rusznak Z, Szucs G, Barker MC, Forsythe ID (2003) Presynaptic rat Kv1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion. *J Physiol* 550:27-33.
- Dumoulin A, Triller A, Kneussel M (2009) Cellular transport and membrane dynamics of the glycine receptor. *Front Mol Neurosci* 2:28.
- Dutar P, Nicoll RA (1988a) A physiological role for GABAB receptors in the central nervous system. *Nature* 332:156-158.
- Dutar P, Nicoll RA (1988b) Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1:585-591.
- Duthey B, Caudron S, Perroy J, Bettler B, Fagni L, Pin J-P, Prezeau L (2002) A Single Subunit (GB2) Is Required for G-protein Activation by the Heterodimeric GABAB Receptor. *J Biol Chem* 277:3236-3241.
- Ehret G, Romand R (1997) *The Central Auditory System*: Oxford University Press.
- Ehrlich I, Lohrke S, Friauf E (1999) Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine action in rat auditory neurones is due to age-dependent Cl⁻ regulation. *J Physiol* 520 Pt 1:121-137.

- Elezgarai I, Benitez R, Mateos JM, Lazaro E, Osorio A, Azkue JJ, Bilbao A, Lingenhoehl K, Van Der Putten H, Hampson DR, Kuhn R, Knopfel T, Grandes P (1999) Developmental expression of the group III metabotropic glutamate receptor mGluR4a in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Comp Neurol* 411:431-440.
- Engelman HS, MacDermott AB (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci* 5:135-145.
- Eulenburg V, Gomeza J (2010) Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Res Rev* 63:103-112.
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.
- Felmy F, Schneggenburger R (2004) Developmental expression of the Ca²⁺-binding proteins calretinin and parvalbumin at the calyx of Held of rats and mice. *Eur J Neurosci* 20:1473-1482.
- Ferragamo MJ, Golding NL, Oertel D (1998) Synaptic inputs to stellate cells in the ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 79:51-63.
- Fiala JC (2005) Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J Microscopy* 218:52-61.
- Flint AC, Liu X, Kriegstein AR (1998) Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20:43-53.
- Ford MC, Grothe B, Klug A (2009) Fenestration of the calyx of Held occurs sequentially along the tonotopic axis, is influenced by afferent activity, and facilitates glutamate clearance. *J Comp Neurol* 514:92-106.
- Fuentes-Santamaria V, Alvarado JC, Taylor AR, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (2005) Quantitative changes in calretinin immunostaining in the cochlear nuclei after unilateral cochlear removal in young ferrets. *J Comp Neurol* 483:458-475.

- Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prézeau L, Pin J-P (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABAB receptor function. *EMBO J* 20:2152-2159.
- Galvez T, Parmentier ML, Joly C, Malitschek B, Kaupmann K, Kuhn R, Bittiger H, Froestl W, Bettler B, Pin JP (1999) Mutagenesis and modeling of the GABAB receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *J Biol Chem* 274:13362-13369.
- Gao BX, Ziskind-Conhaim L (1995) Development of glycine- and GABA-gated currents in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 74:113-121.
- Gao BX, Cheng G, Ziskind-Conhaim L (1998) Development of spontaneous synaptic transmission in the rat spinal cord. *J Neurophysiol* 79:2277-2287.
- Gassmann M, Bettler B (2012) Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. *Nat Rev Neurosci* 13:380-394.
- Geiman EJ, Zheng W, Fritschy JM, Alvarez FJ (2002) Glycine and GABA(A) receptor subunits on Renshaw cells: relationship with presynaptic neurotransmitters and postsynaptic gephyrin clusters. *J Comp Neurol* 444:275-289.
- Getova D, Bowery NG, Spassov V (1997) Effects of GABAB receptor antagonists on learning and memory retention in a rat model of absence epilepsy. *Eur J Pharmacol* 320:9-13.
- Gladding CM, Raymond LA (2011) Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Mol Cell Neurosci* 48:308-320.
- Grenningloh G, Gundelfinger E, Schmitt B, Betz H, Darlison MG, Barnard EA, Schofield PR, Seeburg PH (1987) Glycine vs GABA receptors. *Nature* 330:25-26.
- Groc L, Bard L, Choquet D (2009) Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158:4-18.

- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7:695-696.
- Grothe B (2003) New roles for synaptic inhibition in sound localization. *Nat Rev Neurosci* 4:540-550.
- Grothe B, Koch U (2011) Dynamics of binaural processing in the mammalian sound localization pathway--the role of GABA(B) receptors. *Hear Res* 279:43-50.
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B (2005) The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45:727-739.
- Grunewald S, Schupp BJ, Ikeda SR, Kuner R, Steigerwald F, Kornau H-C, Kohr G (2002) Importance of the gamma -Aminobutyric AcidB Receptor C-Termini for G-Protein Coupling. *Mol Pharmacol* 61:1070-1080.
- Guetg N, Seddik R, Vigot R, Turecek R, Gassmann M, Vogt KE, Brauner-Osborne H, Shigemoto R, Kretz O, Frotscher M, Kulik A, Bettler B (2009) The GABAB1a isoform mediates heterosynaptic depression at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 29:1414-1423.
- Guinan JJJ, Norris BE, Guinan SS (1972) Single auditory units in the superior olive complex II: tonotopic organization and locations of unit categories. *Int J Neurosci* 4:147-166.
- Hackett JT, Jackson H, Rubel EW (1982) Synaptic excitation of the second and third order auditory neurons in the avian brain stem. *Neuroscience* 7:1455-1469.
- Hamann M, Billups B, Forsythe ID (2003) Non-calyceal excitatory inputs mediate low fidelity synaptic transmission in rat auditory brainstem slices. *Eur J Neurosci* 18:2899-2902.
- Hanus C, Ehrensperger MV, Triller A (2006) Activity-dependent movements of postsynaptic scaffolds at inhibitory synapses. *J Neurosci* 26:4586-4595.

- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11:682-696.
- Harrison NL, Kugler JL, Jones MV, Greenblatt EP, Pritchett DB (1993) Positive modulation of human gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors by the inhalation anesthetic isoflurane. *Mol Pharmacol* 44:628-632.
- Haverkamp S, Muller U, Zeilhofer HU, Harvey RJ, Wassle H (2004) Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha2 subunit. *J Comp Neurol* 477:399-411.
- Havlickova M, Prezeau L, Duthey B, Bettler B, Pin J-P, Blahos J (2002) The intracellular loops of the GB2 subunit are crucial for G-protein coupling of the heteromeric γ -aminobutyrate B receptor. *Mol Pharmacol* 62:343-350.
- Hawrot E, Xiao Y, Shi QL, Norman D, Kirkitadze M, Barlow PN (1998) Demonstration of a tandem pair of complement protein modules in GABA(B) receptor 1a. *FEBS Lett* 432:103-108.
- Hayashi Y, Majewska AK (2005) Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. *Neuron* 46:529-532.
- Heese K, Otten U, Mathivet P, Raiteri M, Marescaux C, Bernasconi R (2000) GABA(B) receptor antagonists elevate both mRNA and protein levels of the neurotrophins nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not neurotrophin-3 (NT-3) in brain and spinal cord of rats. *Neuropharmacology* 39:449-462.
- Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S, Wassle H (2007) Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha4 subunit. *J Comp Neurol* 500:693-707.
- Held H (1893) Die centrale Gehörleitung. *Arch Anat Physiol*:201-248.

- Hermida D, Mateos JM, Elezgarai I, Puente N, Bilbao A, Bueno-Lopez JL, Streit P, Grandes P (2010) Spatial compartmentalization of AMPA glutamate receptor subunits at the calyx of Held synapse. *J Comp Neurol* 518:163-174.
- Hill DR, Bowery NG (1981) 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* 290:149-152.
- Hoffpauir BK, Grimes JL, Mathers PH, Spirou GA (2006) Synaptogenesis of the calyx of Held: rapid onset of function and one-to-one morphological innervation. *J Neurosci* 26:5511-5523.
- Hoffpauir BK, Kolson DR, Mathers PH, Spirou GA (2010) Maturation of synaptic partners: functional phenotype and synaptic organization tuned in synchrony. *J Physiol* 588:4365-4385.
- Hruskova B, Trojanova J, Klug A, Gassmann M, Bettler B, Turecek R (2007) Modulation of excitatory synaptic transmission by GABAB receptors and SK channels in the medial nucleus of trapezoid body. In: *Neuroscience 2007*. San Diego.
- Hruskova B, Trojanova J, Kulik A, Kralikova M, Pysanenko K, Bures Z, Syka J, Trussell LO, Turecek R (2012) Differential distribution of glycine receptor subtypes at the rat calyx of held synapse. *J Neurosci* 32:17012-17024.
- Huang H, Trussell LO (2008) Control of presynaptic function by a persistent Na(+) current. *Neuron* 60:975-979.
- Charpier S, Leresche N, Deniau JM, Mahon S, Hughes SW, Crunelli V (1999) On the putative contribution of GABA(B) receptors to the electrical events occurring during spontaneous spike and wave discharges. *Neuropharmacology* 38:1699-1706.
- Chen G, van den Pol AN (1998) Presynaptic GABAB autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci* 18:1913-1922.

- Chesnoy-Marchais D (1996) Potentiation of chloride responses to glycine by three 5-HT₃ antagonists in rat spinal neurones. *Br J Pharmacol* 118:2115-2125.
- Chesnoy-Marchais D (1999) Mode of action of ICS 205,930, a novel type of potentiator of responses to glycine in rat spinal neurones. *Br J Pharmacol* 126:801-809.
- Chu Y, Fioravante D, Thanawala M, Leitges M, Regehr WG (2012) Calcium-dependent isoforms of protein kinase C mediate glycine-induced synaptic enhancement at the calyx of Held. *J Neurosci* 32:13796-13804.
- Chuang HH, Yu M, Jan YN, Jan LY (1998) Evidence that the nucleotide exchange and hydrolysis cycle of G proteins causes acute desensitization of G-protein gated inward rectifier K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11727-11732.
- Isaacson JS (1998) GABAB receptor-mediated modulation of presynaptic currents and excitatory transmission at a fast central synapse. *J Neurophysiol* 80:1571-1576.
- Ivankova K, Turecek R, Fritzius T, Seddik R, Prezeau L, Comps-Agrar L, Pin JP, Fakler B, Besseyrias V, Gassmann M, Bettler B (2013) Up-regulation of GABAB Receptor Signaling by Constitutive Assembly with the K⁺ Channel Tetramerization Domain-containing Protein 12 (KCTD12). *J Biol Chem* 288:24848-24856.
- Jackson H, Hackett JT, Rubel EW (1982) Organization and development of brain stem auditory nuclei in the chick: ontogeny of postsynaptic responses. *J Comp Neurol* 210:80-86.
- Jeong HJ, Jang IS, Moorhouse AJ, Akaike N (2003) Activation of presynaptic glycine receptors facilitates glycine release from presynaptic terminals synapsing onto rat spinal sacral dorsal commissural nucleus neurons. *J Physiol* 550:373-383.
- Johnston J, Forsythe ID, Kopp-Scheinflug C (2010) Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J Physiol* 588:3187-3200.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao W-J, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang L-Y, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C (1998a) GABA

- B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA B R1 and GABA B R2. *Nature* 396:674-679.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C (1998b) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396:674-679.
- Jones TA, Jones SM, Paggett KC (2001) Primordial rhythmic bursting in embryonic cochlear ganglion cells. *J Neurosci* 21:8129-8135.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10:331-339.
- Kajikawa Y, Saitoh N, Takahashi T (2001) GTP-binding protein beta gamma subunits mediate presynaptic calcium current inhibition by GABA(B) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8054-8058.
- Kandler K, Friauf E (1993) Pre- and postnatal development of efferent connections of the cochlear nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 328:161-184.
- Kandler K, Friauf E (1995) Development of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in the auditory brainstem of perinatal rats. *J Neurosci* 15:6890-6904.
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B (1997) Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:239-246.
- Kaupmann K, Schuler V, Mosbacher J, Bischoff S, Bittiger H, Heid J, Froestl W, Leonhard S, Pfaff T, Karschin A, Bettler B (1998a) Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14991-14996.

- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B (1998b) GABA B-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396:683-687.
- Keberle H, Faigle J, Wilhelm M (1968) Procedure for the preparation of new aminoacids. *Chem Abstr* 69.
- Keller AF, Coull JA, Chery N, Poisbeau P, De Koninck Y (2001) Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminae I-II of the rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 21:7871-7880.
- Kerr DI, Ong J, Prager RH, Gynther BD, Curtis DR (1987) Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain Res* 405:150-154.
- Kerr DI, Ong J, Johnston GA, Abbenante J, Prager RH (1988) 2-Hydroxy-saclofen: an improved antagonist at central and peripheral GABAB receptors. *Neurosci Lett* 92:92-96.
- Kerr DIB, Ong J (1995) GABA_B receptors. *Pharmacol Ther* 67:187-246.
- Kharazia VN, Weinberg RJ (1997) Tangential synaptic distribution of NMDA and AMPA receptors in rat neocortex. *Neurosci Lett* 238:41-44.
- Kieval JZ, Hubert GW, Charara A, Pare JF, Smith Y (2001) Subcellular and subsynaptic localization of presynaptic and postsynaptic kainate receptor subunits in the monkey striatum. *J Neurosci* 21:8746-8757.
- Kim JH, Kushmerick C, von Gersdorff H (2010) Presynaptic resurgent Na⁺ currents sculpt the action potential waveform and increase firing reliability at a CNS nerve terminal. *J Neurosci* 30:15479-15490.
- Kimura M, Saitoh N, Takahashi T (2003) Adenosine A(1) receptor-mediated presynaptic inhibition at the calyx of Held of immature rats. *J Physiol* 553:415-426.
- Kirsch J, Betz H (1993) Widespread expression of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein, in rat brain. *Brain Res* 621:301-310.

- Kirsch J, Betz H (1995) The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci* 15:4148-4156.
- Kirsch J, Betz H (1998) Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 392:717-720.
- Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H (1991) The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem* 266:22242-22245.
- Kneussel M, Betz H (2000) Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci* 23:429-435.
- Kneussel M, Hermann A, Kirsch J, Betz H (1999) Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor beta-subunit to gephyrin. *J Neurochem* 72:1323-1326.
- Kontro P, Oja SS (1990) Interactions of taurine with GABAB binding sites in mouse brain. *Neuropharmacology* 29:243-247.
- Kopach O, Voitenko N (2013) Extrasynaptic AMPA receptors in the dorsal horn: evidence and functional significance. *Brain Res Bull* 93:47-56.
- Kopp-Scheinflug C, Steinert JR, Forsythe ID (2011) Modulation and control of synaptic transmission across the MNTB. *Hear Res.*
- Kopp-Scheinflug C, Dehmel S, Tolnai S, Dietz B, Milenkovic I, Rubsamen R (2008) Glycine-mediated changes of onset reliability at a mammalian central synapse. *Neuroscience* 157:432-445.
- Korada S, Schwartz IR (1999) Development of GABA, glycine, and their receptors in the auditory brainstem of gerbil: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 409:664-681.
- Kotak VC, Korada S, Schwartz IR, Sanes DH (1998) A developmental shift from GABAergic to glycinergic transmission in the central auditory system. *J Neurosci* 18:4646-4655.

- Kubota H, Alle H, Betz H, Geiger JR (2010) Presynaptic glycine receptors on hippocampal mossy fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 393:587-591.
- Kuhse J, Kuryatov A, Maulet Y, Malosio ML, Schmieden V, Betz H (1991) Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Lett* 283:73-77.
- Kulik A, Nakadate K, Nyiri G, Notomi T, Malitschek B, Bettler B, Shigemoto R (2002) Distinct localization of GABA(B) receptors relative to synaptic sites in the rat cerebellum and ventrobasal thalamus. *Eur J Neurosci* 15:291-307.
- Kulik A, Vida I, Lujan R, Haas CA, Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Frotscher M (2003) Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus. *J Neurosci* 23:11026-11035.
- Kullmann DM (2001) Presynaptic kainate receptors in the hippocampus: slowly emerging from obscurity. *Neuron* 32:561-564.
- Kullmann DM, Ruiz A, Rusakov DM, Scott R, Semyanov A, Walker MC (2005) Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Prog Biophys Mol Biol* 87:33-46.
- Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC (1999) Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* 283:74-77.
- Kuwabara N, Zook JM (1991) Classification of the principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body. *J Comp Neurol* 314:707-720.
- Kuwabara N, DiCaprio RA, Zook JM (1991) Afferents to the medial nucleus of the trapezoid body and their collateral projections. *J Comp Neurol* 314:684-706.
- Lambert NA, Wilson WA (1993) Heterogeneity in presynaptic regulation of GABA release from hippocampal inhibitory neurons. *Neuron* 11:1057-1067.
- Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H (2002) Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci* 23:519-527.

- Laviv T, Riven I, Dolev I, Vertkin I, Balana B, Slesinger PA, Slutsky I (2010) Basal GABA regulates GABA(B)R conformation and release probability at single hippocampal synapses. *Neuron* 67:253-267.
- Leao RM, Von Gersdorff H (2002) Noradrenaline increases high-frequency firing at the calyx of held synapse during development by inhibiting glutamate release. *J Neurophysiol* 87:2297-2306.
- Legendre P (1998) A reluctant gating mode of glycine receptor channels determines the time course of inhibitory miniature synaptic events in zebrafish hindbrain neurons. *J Neurosci* 18:2856-2870.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58:760-793.
- Legendre P, Muller E, Badiu CI, Meier J, Vannier C, Triller A (2002) Desensitization of homomeric $\alpha 1$ glycine receptor increases with receptor density. *Mol Pharmacol* 62:817-827.
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA (2004) Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* 27:329-336.
- Levi S, Schweizer C, Bannai H, Pascual O, Charrier C, Triller A (2008) Homeostatic regulation of synaptic GlyR numbers driven by lateral diffusion. *Neuron* 59:261-273.
- Lim R, Alvarez FJ, Walmsley B (2000) GABA mediates presynaptic inhibition at glycinergic synapses in a rat auditory brainstem nucleus. *J Physiol* 525 Pt 2:447-459.
- Lippe WR (1994) Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J Neurosci* 14:1486-1495.
- Lohmann C, Friauf E (1996) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J Comp Neurol* 367:90-109.
- Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Vida I, Fairen A, Lujan R (2004) Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the rat

- hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus* 14:836-848.
- Lu T, Rubio ME, Trussell LO (2008) Glycinergic transmission shaped by the corelease of GABA in a mammalian auditory synapse. *Neuron* 57:524-535.
- Lu Y, Harris JA, Rubel EW (2007) Development of spontaneous miniature EPSCs in mouse AVCN neurons during a critical period of afferent-dependent neuron survival. *J Neurophysiol* 97:635-646.
- Luscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19:687-695.
- Lynch JW (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84:1051-1095.
- Lynch JW (2009) Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology* 56:303-309.
- Lynch JW, Rajendra S, Barry PH, Schofield PR (1995) Mutations affecting the glycine receptor agonist transduction mechanism convert the competitive antagonist, picrotoxin, into an allosteric potentiator. *J Biol Chem* 270:13799-13806.
- MacDermott AB, Role LW, Siegelbaum SA (1999) Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci* 22:443-485.
- Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H (1991a) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* 10:2401-2409.
- Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, Betz H (1991b) Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 266:2048-2053.
- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Y JL (2000) A Trafficking Checkpoint Controls GABAB Receptor Heterodimerization. *Neuron* 27:97-106.

- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY (2001) Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABA(B) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14649-14654.
- Martinez-Galan JR, Caminos E, Vale C, Juiz JM (2007) Auditory nerve input is not an absolute requirement for the expression, distribution and calcium permeability of AMPA receptors in the adult rat ventral cochlear nucleus. *Brain Res* 1138:21-29.
- Masugi-Tokita M, Tarusawa E, Watanabe M, Molnar E, Fujimoto K, Shigemoto R (2007) Number and density of AMPA receptors in individual synapses in the rat cerebellum as revealed by SDS-digested freeze-fracture replica labeling. *J Neurosci* 27:2135-2144.
- Maurel D, Comps-Agrar L, Brock C, Rives ML, Bourrier E, Ayoub MA, Bazin H, Tinel N, Durroux T, Prezeau L, Trinquet E, Pin JP (2008) Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods* 5:561-567.
- Meier J, Grantyn R (2004) A gephyrin-related mechanism restraining glycine receptor anchoring at GABAergic synapses. *J Neurosci* 24:1398-1405.
- Menon-Johansson AS, Berrow N, Dolphin AC (1993) G(o) transduces GABAB-receptor modulation of N-type calcium channels in cultured dorsal root ganglion neurons. *Pflugers Arch* 425:335-343.
- Metz M, Gassmann M, Fakler B, Schaeren-Wiemers N, Bettler B (2011) Distribution of the auxiliary GABAB receptor subunits KCTD8, 12, 12b, and 16 in the mouse brain. *J Comp Neurol* 519:1435-1454.
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D (1995) Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 15:563-572.
- Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W (1995) A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 46:423-462.

- Mizutani H, Hori T, Takahashi T (2006) 5-HT_{1B} receptor-mediated presynaptic inhibition at the calyx of Held of immature rats. *Eur J Neurosci* 24:1946-1954.
- Mody I, De Koninck Y, Otis TS, Soltesz I (1994) Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci* 17:517-525.
- Moore JK, Moore RY (1987) Glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in brainstem auditory nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 260:157-174.
- Morest DK (1968a) The collateral system of the medial nucleus of the trapezoid body of the cat, its neuronal architecture and relation to the olivo-cochlear bundle. *Brain Res* 9:288-311.
- Morest DK (1968b) The growth of synaptic endings in the mammalian brain: a study of the calyces of the trapezoid body. *Z Anat Entwicklungsgesch* 127:201-220.
- Morkve SH, Hartveit E (2009) Properties of glycine receptors underlying synaptic currents in presynaptic axon terminals of rod bipolar cells in the rat retina. *J Physiol* 587:3813-3830.
- Mott DD, Lewis DV (1991) Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABAB receptors. *Science* 252:1718-1720.
- Muller E, Triller A, Legendre P (2004) Glycine receptors and GABA receptor alpha 1 and gamma 2 subunits during the development of mouse hypoglossal nucleus. *Eur J Neurosci* 20:3286-3300.
- Muller E, Le-Corrone H, Legendre P (2008) Extrasynaptic and postsynaptic receptors in glycinergic and GABAergic neurotransmission: a division of labor? *Front Mol Neurosci* 1:3.
- Nabekura J, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Shibata S, Matsubara A, Jinno S, Mizoguchi Y, Sasaki A, Ishibashi H (2004) Developmental switch from GABA to glycine release in single central synaptic terminals. *Nat Neurosci* 7:17-23.
- Nakagawa Y, Sasaki A, Takashima T (1999) The GABA(B) receptor antagonist CGP36742 improves learned helplessness in rats. *Eur J Pharmacol* 381:1-7.

- Ng GY, Clark J, Coulombe N, Ethier N, Hebert TE, Sullivan R, Kargman S, Chateaufneuf A, Tsukamoto N, McDonald T, Whiting P, Mezey E, Johnson MP, Liu Q, Kolakowski LF, Jr., Evans JF, Bonner TI, O'Neill GP (1999) Identification of a GABA_B receptor subunit, gb2, required for functional GABA_B receptor activity. *J Biol Chem* 274:7607-7610.
- Nicoll RA (2004) My close encounter with GABA(B) receptors. *Biochem Pharmacol* 68:1667-1674.
- Nikolic Z, Laube B, Weber RG, Lichter P, Kioschis P, Poustka A, Mulhardt C, Becker CM (1998) The human glycine receptor subunit alpha3. Glra3 gene structure, chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts. *J Biol Chem* 273:19708-19714.
- Nusser Z, Cull-Candy S, Farrant M (1997) Differences in synaptic GABA(A) receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron* 19:697-709.
- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P (1998a) Segregation of different GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18:1693-1703.
- Nusser Z, Hajos N, Somogyi P, Mody I (1998b) Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* 395:172-177.
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998c) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21:545-559.
- Nyiri G, Cserep C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF (2005) CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* 136:811-822.
- Oertel J, Villmann C, Kettenmann H, Kirchhoff F, Becker CM (2007) A novel glycine receptor beta subunit splice variant predicts an unorthodox transmembrane topology. Assembly into heteromeric receptor complexes. *J Biol Chem* 282:2798-2807.

- Olpe HR, Worner W, Ferrat T (1993) Stimulation parameters determine role of GABAB receptors in long-term potentiation. *Experientia* 49:542-546.
- Orsnes G, Crone C, Krarup C, Petersen N, Nielsen J (2000) The effect of baclofen on the transmission in spinal pathways in spastic multiple sclerosis patients. *Clinical Neurophysiology* 111:1372-1379.
- Otis TS, De Koninck Y, Mody I (1993) Characterization of synaptically elicited GABAB responses using patch-clamp recordings in rat hippocampal slices. *J Physiol* 463:391-407.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715-727.
- Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Ristig D, Schuler V, Meigel I, Lampert C, Stein T, Prézeau L, Blahos J, Pin J-P, Froestl W, Kuhn R, Heid J, Kaupmann K, Bettler B (2001) C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA_B receptors. *J Neurosci* 21:1189–1202.
- Parnas H, Segel L, Dudel J, Parnas I (2000) Autoreceptors, membrane potential and the regulation of transmitter release. *Trends Neurosci* 23:60-68.
- Perkins GA, Tjong J, Brown JM, Poquiz PH, Scott RT, Kolson DR, Ellisman MH, Spirou GA (2010) The micro-architecture of mitochondria at active zones: electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism. *J Neurosci* 30:1015-1026.
- Petralia RS (2012) Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. *ScientificWorldJournal* 2012:267120.
- Pfeiffer F, Betz H (1981) Solubilization of the glycine receptor from rat spinal cord. *Brain Res* 226:273-279.
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 257:9389-9393.

- Pfeiffer F, Simler R, Grenningloh G, Betz H (1984) Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7224-7227.
- Pfriegeer FW, Gottmann K, Lux HD (1994) Kinetics of GABAB receptor-mediated inhibition of calcium currents and excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons in vitro. *Neuron* 12:97-107.
- Piechotta K, Weth F, Harvey RJ, Friauf E (2001) Localization of rat glycine receptor alpha1 and alpha2 subunit transcripts in the developing auditory brainstem. *J Comp Neurol* 438:336-352.
- Pin JP, Comps-Agrar L, Maurel D, Monnier C, Rives ML, Trinquet E, Kniazeff J, Rondard P, Prezeau L (2009) G-protein-coupled receptor oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors. *J Physiol* 587:5337-5344.
- Pinheiro PS, Mulle C (2008) Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci* 9:423-436.
- Poncer JC, McKinney RA, Gahwiler BH, Thompson SM (2000) Differential control of GABA release at synapses from distinct interneurons in rat hippocampus. *J Physiol* 528 Pt 1:123-130.
- Potashner SJ, Suneja SK, Benson CG (2000) Altered glycinergic synaptic activities in guinea pig brain stem auditory nuclei after unilateral cochlear ablation. *Hear Res* 147:125-136.
- Pourcho RG (1996) Neurotransmitters in the retina. *Curr Eye Res* 15:797-803.
- Price GD, Trussell LO (2006) Estimate of the chloride concentration in a central glutamatergic terminal: a gramicidin perforated-patch study on the calyx of Held. *J Neurosci* 26:11432-11436.
- Prior P, Schmitt B, Grenningloh G, Pribilla I, Multhaup G, Beyreuther K, Maulet Y, Werner P, Langosch D, Kirsch J, et al. (1992) Primary structure and alternative

- splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* 8:1161-1170.
- Rajendra S, Lynch JW, Schofield PR (1997) The glycine receptor. *Pharmacol Ther* 73:121-146.
- Renden R, Taschenberger H, Puente N, Rusakov DA, Duvoisin R, Wang LY, Lehre KP, von Gersdorff H (2005) Glutamate transporter studies reveal the pruning of metabotropic glutamate receptors and absence of AMPA receptor desensitization at mature calyx of held synapses. *J Neurosci* 25:8482-8497.
- Robbins MJ, Calver AR, Filippov AK, Hirst WD, Russell RB, Wood MD, Nasir S, Couve A, Brown DA, Moss SJ, Pangalos MN (2001) GABA_{B2} is essential for G-protein coupling of the GABA_B receptor heterodimer. *J Neurosci* 21:8043-8052.
- Rossi DJ, Hamann M (1998) Spillover-mediated transmission at inhibitory synapses promoted by high affinity alpha6 subunit GABA(A) receptors and glomerular geometry. *Neuron* 20:783-795.
- Rowland KC, Irby NK, Spirou GA (2000) Specialized synapse-associated structures within the calyx of Held. *J Neurosci* 20:9135-9144.
- Ruben RJ (1967) Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryngol:Suppl* 220:221-244.
- Rubio ME, Soto F (2001) Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21:641-653.
- Ruiz A, Fabian-Fine R, Scott R, Walker MC, Rusakov DA, Kullmann DM (2003) GABAA receptors at hippocampal mossy fibers. *Neuron* 39:961-973.
- Ruiz AJ, Kullmann DM (2012) Ionotropic receptors at hippocampal mossy fibers: roles in axonal excitability, synaptic transmission, and plasticity. *Front Neural Circuits* 6:112.

- Rundstrom N, Schmieden V, Betz H, Bormann J, Langosch D (1994) Cyanotriphenylborate: subtype-specific blocker of glycine receptor chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8950-8954.
- Ryugo D, Spirou GA (2009) Auditory System: Giant Synaptic Terminals, Endbulbs and Calyces. In: *New Encyclopedia of Neuroscience* (Squire LR, ed), pp 759-770: Academic Press, Oxford.
- Sakaba T, Neher E (2003) Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* 424:775-778.
- Saransaari P, Oja SS (2006) Characteristics of taurine release in slices from adult and developing mouse brain stem. *Amino Acids* 31:35-43.
- Sato K, Kiyama H, Tohyama M (1992) Regional distribution of cells expressing glycine receptor alpha 2 subunit mRNA in the rat brain. *Brain Res* 590:95-108.
- Scanziani M (2000) GABA spillover activates postsynaptic GABA(B) receptors to control rhythmic hippocampal activity. *Neuron* 25:673-681.
- Scanziani M, Capogna M, Gähwiler BH, Thompson SM (1992) Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* 9:919-927.
- Sherrington CS (1906) *The integrative action of the nervous system*. New York: Charles Scribner's Sons.
- Scholz KP, Miller RJ (1991) GABAB receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 444:669-686.
- Schrader N, Kim EY, Winking J, Paulukat J, Schindelin H, Schwarz G (2004) Biochemical characterization of the high affinity binding between the glycine receptor and gephyrin. *J Biol Chem* 279:18733-18741.
- Schwenk J, Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, Bildl W, Tarusawa E, Kulik A, Unger A, Ivankova K, Seddik R, Tiao JY, Rajalu M, Trojanova J, Rohde V,

- Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B (2010) Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* 465:231-235.
- Singer JH, Talley EM, Bayliss DA, Berger AJ (1998) Development of glycinergic synaptic transmission to rat brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 80:2608-2620.
- Smith AJ, Owens S, Forsythe ID (2000) Characterisation of inhibitory and excitatory postsynaptic currents of the rat medial superior olive. *J Physiol* 529 Pt 3:681-698.
- Smith KE, Borden LA, Hartig PR, Branchek T, Weinshank RL (1992) Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron* 8:927-935.
- Smith PH, Joris PX, Yin TC (1998) Anatomy and physiology of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) of the cat. *J Neurophysiol* 79:3127-3142.
- Smith PH, Joris PX, Carney LH, Yin TC (1991) Projections of physiologically characterized globular bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 304:387-407.
- Sodickson DL, Bean BP (1998) Neurotransmitter activation of inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons: interactions among multiple receptors. *J Neurosci* 18:8153-8162.
- Souter M, Nevill G, Forge A (1995) Postnatal development of membrane specialisations of gerbil outer hair cells. *Hear Res* 91:43-62.
- Souter M, Nevill G, Forge A (1997) Postnatal maturation of the organ of Corti in gerbils: morphology and physiological responses. *J Comp Neurol* 386:635-651.
- Specht CG, Izeddin I, Rodriguez PC, El Beheiry M, Rostaing P, Darzacq X, Dahan M, Triller A (2013) Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: counting gephyrin molecules and receptor binding sites. *Neuron* 79:308-321.

- Spirou GA, Brownell WE, Zidanic M (1990) Recordings from cat trapezoid body and HRP labeling of globular bushy cell axons. *J Neurophysiol* 63:1169-1190.
- Spirou GA, Chirila FV, von Gersdorff H, Manis PB (2008) Heterogeneous Ca²⁺ influx along the adult calyx of held: a structural and computational study. *Neuroscience* 154:171-185.
- Stein V, Nicoll RA (2003) GABA generates excitement. *Neuron* 37:375-378.
- Suneja SK, Benson CG, Potashner SJ (1998a) Glycine receptors in adult guinea pig brain stem auditory nuclei: regulation after unilateral cochlear ablation. *Exp Neurol* 154:473-488.
- Suneja SK, Potashner SJ, Benson CG (1998b) Plastic changes in glycine and GABA release and uptake in adult brain stem auditory nuclei after unilateral middle ear ossicle removal and cochlear ablation. *Exp Neurol* 151:273-288.
- Suzuki T, Kodama S, Hoshino C, Izumi T, Miyakawa H (2008) A plateau potential mediated by the activation of extrasynaptic NMDA receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 28:521-534.
- Swearengen JR, Kittell CL, Davis JA, Raslear TG, Beblo DA, Colleton CA (1993) A surgical technique for bilateral cochleotomy in the Long-Evans rat. *J Invest Surg* 6:431-437.
- Sykova E, Nicholson C (2008) Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev* 88:1277-1340.
- Takagi T, Pribilla I, Kirsch J, Betz H (1992) Coexpression of the receptor-associated protein gephyrin changes the ligand binding affinities of alpha 2 glycine receptors. *FEBS Lett* 303:178-180.
- Takahashi T (2005) Postsynaptic receptor mechanisms underlying developmental speeding of synaptic transmission. *Neurosci Res* 53:229-240.
- Takahashi T, Kajikawa Y, Tsujimoto T (1998) G-Protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABAB receptor. *J Neurosci* 18:3138-3146.

- Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D (2003) Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J* 22:4656-4665.
- Trigo FF, Marty A, Stell BM (2008) Axonal GABAA receptors. *Eur J Neurosci* 28:841-848.
- Triller A, Cluzaud F, Pfeiffer F, Betz H, Korn H (1985) Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J Cell Biol* 101:683-688.
- Tritsch NX, Yi E, Gale JE, Glowatzki E, Bergles DE (2007) The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature* 450:50-55.
- Turecek R, Trussell LO (2001) Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* 411:587-590.
- Turecek R, Trussell LO (2002) Reciprocal developmental regulation of presynaptic ionotropic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13884-13889.
- Turecek R, Schwenk J, Fritzius T, Ivankova K, Zolles G, Adelfinger L, Jacquier V, Baesseyrias V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B (2014) Auxiliary GABAB Receptor Subunits Uncouple G protein $\beta\gamma$ Subunits from Effector Channels to Induce Desensitization Neuron in press.
- Veenman CL, Reiner A, Honig MG (1992) Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J Neurosci Methods* 41:239-254.
- Velez-Fort M, Audinat E, Angulo MC (2012) Central Role of GABA in Neuron-Glia Interactions. *Neuroscientist* 18:237-250.
- Verhoog MB, Mansvelder HD (2011) Presynaptic ionotropic receptors controlling and modulating the rules for spike timing-dependent plasticity. *Neural Plast* 2011:870763.
- Vigot R, Barbieri S, Brauner-Osborne H, Turecek R, Shigemoto R, Zhang YP, Lujan R, Jacobson LH, Biermann B, Fritschy JM, Vacher CM, Muller M, Sansig G, Guetg N, Cryan JF, Kaupmann K, Gassmann M, Oertner TG, Bettler B (2006)

- Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron* 50:589-601.
- Vizi ES, Fekete A, Karoly R, Mike A (2010) Non-synaptic receptors and transporters involved in brain functions and targets of drug treatment. *Br J Pharmacol* 160:785-809.
- Walmsley B, Alvarez FJ, Fyffe RE (1998) Diversity of structure and function at mammalian central synapses. *Trends Neurosci* 21:81-88.
- Wang T, Rusu SI, Hruskova B, Turecek R, Borst JG (2013a) Modulation of synaptic depression of the calyx of Held synapse by GABAB receptors and spontaneous activity. *J Physiol*.
- Wang T, Rusu SI, Hruskova B, Turecek R, Borst JG (2013b) Modulation of synaptic depression of the calyx of Held synapse by GABA(B) receptors and spontaneous activity. *J Physiol* 591:4877-4894.
- Wassle H, Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* 71:447-480.
- Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I (2003) Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23:10650-10661.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH (1998a) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396:679-682.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH (1998b) Heterodimerisation is required for the formation of a functional GABA_B receptor. *Nature* 396:679-682.
- Wimmer VC, Horstmann H, Groh A, Kuner T (2006) Donut-like topology of synaptic vesicles with a central cluster of mitochondria wrapped into membrane protrusions: a novel structure-function module of the adult calyx of Held. *J Neurosci* 26:109-116.

- Witke W, Podtelejnikov AV, Di Nardo A, Sutherland JD, Gurniak CB, Dotti C, Mann M (1998) In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J* 17:967-976.
- Wu LG, Saggau P (1995) GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca²⁺ influx. *J Physiol* 485 (Pt 3):649-657.
- Wu LG, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 20:204-212.
- Wu LG, Borst JG, Sakmann B (1998) R-type Ca²⁺ currents evoke transmitter release at a rat central synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4720-4725.
- Yan L, Suneja SK, Potashner SJ (2007) Protein kinases regulate glycine receptor binding in brain stem auditory nuclei after unilateral cochlear ablation. *Brain Res* 1135:102-106.
- Zafra F, Gimenez C (2008) Glycine transporters and synaptic function. *IUBMB Life* 60:810-817.
- Zafra F, Aragon C, Olivares L, Danbolt NC, Gimenez C, Storm-Mathisen J (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci* 15:3952-3969.
- Zarei MM, Radcliffe KA, Chen D, Patrick JW, Dani JA (1999) Distributions of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta2 subunits on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 88:755-764.
- Zilberter Y, Kaiser KM, Sakmann B (1999) Dendritic GABA release depresses excitatory transmission between layer 2/3 pyramidal and bitufted neurons in rat neocortex. *Neuron* 24:979-988.

Přílohy

Blahoš J, Havlíčková M, Ziková A, **Trojanová J**, Hrušková B, Franková D, Hlaváčková V (2003) Aktivace G-proteinů metabotropními glutamátovými receptory a GABA_B receptory. *Chemické listy* 97:10-13.

Hlavackova V, Goudet C, Kniazeff J, Zikova A, Maurel D, Vol C, **Trojanova J**, Prezeau L, Pin JP, Blahos J (2005) Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR. *EMBO J* 24:499-509.

Hruskova B, **Trojanova J**, Turecek R (2007) Modulation of Excitatory synaptic transmission by KCa and GABAB receptors on central type synapses. *Physiol Res* 56:13P.

Schwenk J, Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, Bildl W, Tarusawa E, Kulik A, Unger A, Ivankova K, Seddik R, Tiao JY, Rajalu M, **Trojanova J**, Rohde V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B (2010) Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* 465:231-235.

Hruskova B*, **Trojanova J***, Kulik A, Kralikova M, Pysanenko K, Bures Z, Syka J, Trussell LO, Turecek R (2012) Differential distribution of glycine receptor subtypes at the rat calyx of held synapse. *J Neurosci* 32:17012-17024.

**B.H. a J.T. se podílely na práci stejnou měrou*

Trojanova J, Kulik A, Janacek J, Kralikova M, Syka J, Turecek R (*Frontiers in Neural Circuits, Inhibitory Function in Auditory Processing; Bude zasláno v průběhu dubna 2014*) Surface distribution of glycine receptors in the mature calyx of Held nerve terminal.