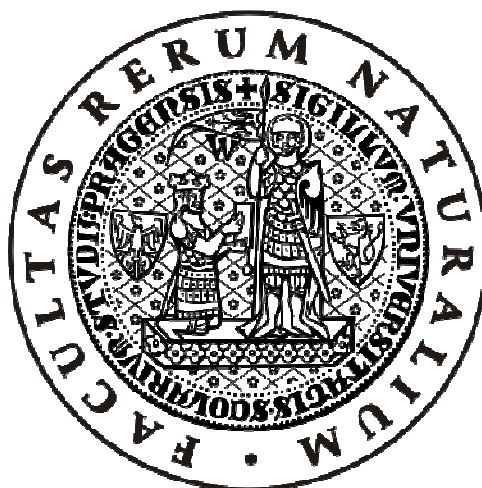


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



Diplomová práce

Mechanismus regulace transportu NMDA receptorů na buněčný povrch

Bc. Katarína Lichnerová

Praha 2013

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

(Konzultant: RNDr. Jiří Novotný, DrSc.)

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

V Praze dne:

Podpis:

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli Mgr. Martinovi Horákovi, Ph.D. za veškerou pomoc a trpělivost. Velice si vážím jeho pozornosti, kterou mi věnuje, díky níž mohu pracovat na velmi zajímavých projektech. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Kaniakové, Ph.D. a Mgr. Barboře Krausové za veškerou pomoc a odborné konzultace. Velké děkuji patří i naší skvělé laborantce Magdě Kuntošové za profesionální laboratorní servis. Na závěr bych chtěla moc poděkovat MUDr. Ladislavu Vyklickému, DrSc., vedoucímu oddělení Buněčné neurofyzologie, za podporu a odborné konzultace.

Abstrakt

N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory patří mezi ionotropní glutamátové receptory zapojené v excitačním synaptickém přenosu, synaptické plasticitě a excitotoxicitě. Vytvářejí heterotetramerní komplexy složené z GluN1, GluN2A-D a/nebo GluN3A-B podjednotek, které jsou aktivovány glutamátem a glycinem. Předchozí studie ukázaly, že jednotlivé podjednotky NMDA receptorů, speciálně GluN2 podjednotky, vykazují různé funkční a farmakologické vlastnosti. Cílem mé práce bylo objasnit mechanismy regulace transportu NMDA receptorů na buněčný povrch. V našich pokusech jsme používali metodu imunocytochemického značení receptorů na heterologních COS-7 buňkách a kulturách granulárních mozečkových neuronů (CGC) exprimujících rekombinantní NMDA receptory. Z výsledků mé práce vyplývá, že transport NMDA receptorů na buněčný povrch je regulován především přítomností GluN2 podjednotek. Naše další výsledky ukázaly, že transport GluN1/GluN2C receptorů je regulovaný třemi specifickými oblastmi GluN2C podjednotky: i.) oblastí A2 segmentu v amino-terminální doméně, ii.) M3 doménou a iii.) proximální částí C-konce obsahující sekvenci pěti aminokyselin, SLSP. Naše výsledky pomáhají objasnit mechanismy regulace funkce NMDA receptorů v savčím centrálním nervovém systému a přispívají tak k poznání mechanismů vzniku různých neurologických a psychiatrických onemocnění spojovaných s abnormální regulací NMDA receptorů jako je například Alzheimerova a Parkinsonova demence, Huntingtonova nemoc, epilepsie, deprese, schizofrenie, ischemie či závislost na kokainu.

Klíčová slova: NMDA receptor; GluN podjednotka; intracelulární transport; glutamátový receptor, iontový kanál, retenční motiv

Abstract

N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are a class of ionotropic glutamate receptors, involved in excitatory synaptic transmission, synaptic plasticity and excitotoxicity. They form heterotetrameric complexes composed of GluN1, GluN2A-D and/or GluN3A-B subunits that are activated by glutamate and glycine. Previous reports showed that different subunits of NMDA receptors, especially the GluN2 subunits, confer different functional and pharmacological properties on the receptor complexes. However, the subunit-dependent differences in the regulation of intracellular processing and transport of NMDA receptor subtypes has not been clearly elucidated. The aim of this work was to clarify the mechanisms of regulation of the NMDA receptor transport. In our experiments we performed immunocytochemistry of receptors on heterologous COS-7 cells and cultured cerebellar granule cells (CGC), both expressing recombinant NMDA receptors. The results of my work show that the transport of NMDA receptors is regulated by presence of GluN2A and GluN2B subunits. Our results further showed that transport of the GluN1/GluN2C receptors is regulated by three specific areas of the GluN2C subunit: i) the A2 segment within the amino-terminal domain, ii.) the M3 domain, and iii.) the proximal part of the C-terminus containing the sequence of five amino acids, SLPSP. Our results help clarify the mechanisms regulating the function of NMDA receptors in the mammalian central nervous system and thus contribute to our understanding of the mechanisms involved in various neurological and psychiatric disorders associated with abnormal regulation of NMDA receptors, such as Alzheimer's and Parkinson's dementia, schizophrenia, Huntington's disease, epilepsy, depression, schizophrenia, ischemia or cocaine addiction.

Key words: NMDA receptor; GluN subunit; intracellular transport; glutamate receptor, ion channel, retention motif

Obsah

1.	Seznam zkratek	8
2.	Úvod	9
3.	Literární přehled	10
3.1.	<i>NMDA receptory</i>	10
3.2.	<i>Význam NMDA receptorů</i>	10
3.3.	<i>Struktura NMDA receptorů</i>	11
3.4.	<i>Podjednotkové složení a lokalizace NMDA receptorů</i>	14
3.5.	<i>Biogeneze, formování a maturace NMDA receptorů v endoplazmatickém retikulu</i>	15
3.6.	<i>Zpracování NMDA receptorů v Golgiho aparátu a jejich transport na buněčný povrch</i>	18
3.7.	<i>Mechanismy regulace transportu GluN1/GluN2C receptorů</i>	21
4.	Cíle diplomové práce	23
5.	Materiál a metody	24
5.1.	<i>Příprava mutantních receptorů</i>	24
5.2.	<i>Použité chemikálie a roztoky</i>	25
5.3.	<i>Kultivace a transfekce COS-7 buněk</i>	27
5.4.	<i>Kultivace a transfekce CGC kultur</i>	28
5.5.	<i>Imunocytochemické značení protilátkami</i>	29
5.5.1.	<i>Povrchové značení GluN podjednotek v COS-7 buňkách</i>	29
5.5.2.	<i>Povrchové a celkové značení GluN podjednotek v granulárních mozečkových neuronech</i>	30
5.6.	<i>Zpracování dat a statistika</i>	31
6.	Výsledky	32
6.1.	<i>Vliv GluN2 podjednotek na povrchovou expresi NMDA receptorů</i>	32
6.2.	<i>Vliv delece oblasti za M1 doménou GluN2 podjednotky na povrchovou expresi NMDA receptorů</i>	34
6.3.	<i>Vliv vybraných deletovaných oblastí v N-terminální doméně na transport GluN2C podjednotek na buněčný povrch</i>	35

6.4.	<i>Vliv vybraných deletovaných oblastí v N-terminální doméně na transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch</i>	36
6.5.	<i>Vliv mutací v transmembránové doméně na transport GluN2C podjednotky na buněčný povrch</i>	37
6.6.	<i>Vliv mutací v intracelulární C-terminální doméně na transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch</i>	40
6.7.	<i>Vliv jednotlivých oblastí GluN2C podjednotky na transport NMDA receptorů v neuronech</i>	43
7.	Diskuze	46
7.1.	<i>Vliv GluN2 podjednotek na povrchovou expresi NMDA receptorů</i>	46
7.2.	<i>Vliv N-terminální domény GluN2 podjednotek na povrchovou expresi NMDA receptorů</i>	47
7.3.	<i>Vliv transmembránových domén na povrchovou expresi NMDA receptorů</i>	47
7.4.	<i>Vliv C-terminální domény na povrchovou expresi NMDA receptorů</i>	49
8.	Závěr	51
9.	Použitá literatura	53

1. Seznam zkratek

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát
BSA	bovinní sérový albumin (bovine serum albumine)
CGC	granulární mozečkové neurony (cerebellum granule cells)
CNS	centrální nervová soustava (central nervous system)
COS-7	opičí ledvinné fibroblasty (monkey kidney fibroblasts)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EMEM	z angl. Eagle's minimum essential medium
ER	endoplazmatické retikulum (endoplasmic reticulum)
GA	Golgiho aparát (Golgi apparatus)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
G _i	inhibiční G-protein
GluN	podjednotka glutamátových NMDA receptorů
HBS	hepesový pufr (HEPES buffered saline)
LTD	dlouhodobá deprese (long term depression)
LTP	dlouhodobá potenciace (long term potentiation)
M1-4	mebránové domény 1-4
MAGUK	z angl. membrane-associated guanylate kinase
mPINS	z angl. mammalian homologue of Drosophila melanogaster partner of inscuteable
NGS	kozí sérum (normal goat serum)
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PDZ	z angl. protein density zone
PKA	proteinkináza A (proteinkinase A)
PKC	proteinkináza C (proteinkinase C)
SAP	z angl. synapse association protein
TGN	trans-Golgiho síť (trans-Golgi network)

2. Úvod

Ještě předtím než byl L-glutamát uznán jako hlavní neuropřenašeč v savčí CNS, byl v 60. letech minulého století objeven syntetický agonista *N*-methyl-D-aspartát (Curtis and Watkins, 1961; Curtis and Watkins, 1963). Až o deset let později vedl rozvoj metody vazby radioligandů a objev specifických antagonistů k poznání, že v savčím mozku existují receptory aktivované právě NMDA (McLennan et al., 1981). V roce 1991 vedlo klonování GluN1 podjednotky NMDA receptoru (Moriyoshi et al., 1991) k objevu čtyř genů kódujících různé typy GluN2 podjednotek (Monyer et al., 1992). Tento objev pomohl rozlišit oddělené, ale přesto příbuzné genové rodiny NMDA i ostatních glutamátových receptorů. Rozmanitost podjednotek NMDA receptorů se neprojevuje jen v jejich unikátní vývojové a prostorové expresi, ale také v odlišných mechanismech regulace transportu na buněčný povrch.

V mé diplomové práci se zabývám intracelulárními mechanismy regulace transportu NMDA receptorů na buněčný povrch. Tato práce je důležitá především z hlediska objasnění mechanismu regulace funkce GluN1/GluN2C receptorů v savčí CNS a přispívá tak k poznání mechanismů vzniku různých neurologických a psychiatrických onemocnění, které jsou spojeny s abnormální regulací NMDA receptorů.

3. Literární přehled

3.1. NMDA receptory

Glutamát je hlavní excitační neuropřenašeč v savčí centrální nervové soustavě (CNS) (Traynelis et al., 2010). V 80. a 90. letech 20. století byla prokázána existence dvou typů specifických glutamátových receptorů, metabotropních a ionotropních (Curtis et al., 1960; Dingledine et al., 1999; Flores-Soto et al., 2012). V současné době se ionotropní glutamátové receptory dělí podle jejich specifických agonistů na kainátové, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátové (AMPA) a *N*-methyl-D-aspartátové (NMDA). Předmětem studia této diplomové práce jsou NMDA receptory, které hrají významnou úlohu v mnoha procesech savčí CNS (Petralia et al., 2009; Traynelis et al., 2010).

3.2. Význam NMDA receptorů

NMDA receptory jsou exprimovány téměř ve všech neuronech a v mnoha gliových buňkách v savčím CNS. Vyskytují se v excitačních synapsích presynapticky i postsynapticky, v extrasynaptických oblastech na buněčném povrchu a v intracelulárních kompartmentech (Petralia et al., 2005; Blanke and VanDongen, 2009).

Synaptické NMDA receptory hrají kritickou roli při excitačním synaptickém přenosu a při tzv. dlouhodobé potenciaci (LTP) a dlouhodobé depresi (LTD), které jsou považovány za molekulární podstatu učení a paměti (Lynch, 2004). Například, v nedávné době bylo zjištěno, že v oblasti hipokampu probíhá při procesu učení LTP (Whitlock et al., 2006). Předpokládá se, že k depolarizaci membrány a následné aktivaci NMDA receptorů dochází během vysokofrekvenční stimulace neuronů, kdy Ca^{2+} ionty vstupují do postsynaptického neuronu. Následné změny v intracelulární signalizaci pak vedou k zesílení synaptického přenosu mezi neurony (Lynch, 2004). Rovněž bylo ukázáno, že nadměrná aktivace NMDA receptorů, která zvyšuje intracelulární koncentraci Ca^{2+} iontů, může způsobit buněčnou smrt neuronů. Tento proces je nazýván excitotoxicita (Olney, 1990; Traynelis et al., 2010). Dřívější studie předpokládaly, že jakékoli zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů může způsobit excitotoxicitu a stát se příčinou vzniku mnoha závažných

neurodegenerativních onemocnění (Olney, 1990; Lang and Lozano, 1998). Pozdější studie ale ukázaly, že pouze aktivace extrasynaptických NMDA receptorů vede k excitotoxicitě, a že aktivace synaptických NMDA receptorů má naopak anti-apoptotický účinek (Sattler et al., 2000). Komplexní povaha funkce NMDA receptorů se v různých stádiích nemocí rozšířila nad rámec tradičního pohledu na excitotoxickou buněčnou smrt a zahrnuje i abnormální regulaci NMDA receptorů (Grossman et al., 2001; Small et al., 2001; Selkoe, 2002; Fan and Raymond, 2007). Předpokládá se, že abnormální regulace NMDA receptorů je příčinou mnoha neurologických a psychiatrických onemocnění jako Alzheimerova a Parkinsonova demence, Huntingtonova choroba, epilepsie, schizofrenie a mnoho dalších (Olney, 1990; Rothstein, 1995; Doraiswamy, 2003; Rotaru et al., 2011).

3.3. Struktura NMDA receptorů

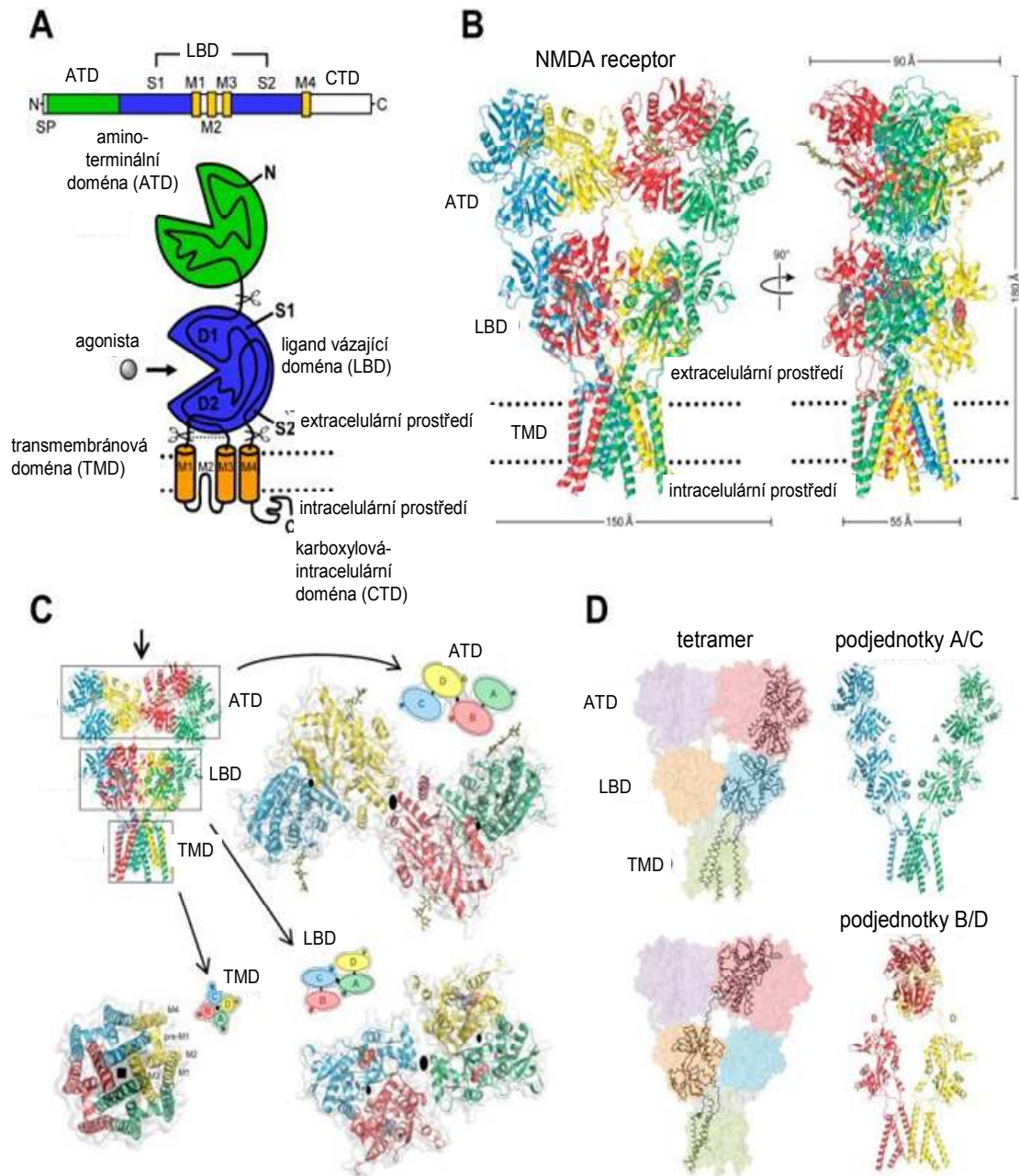
V současné době je známo, že funkční NMDA receptor je heterotetramer (Meddows et al., 2001; Schorge and Colquhoun, 2003; Papadakis et al., 2004; Qiu et al., 2005), tvořený dvěma GluN1 a dvěma GluN2 a/nebo GluN3 podjednotkami (Monyer et al., 1992; Schorge and Colquhoun, 2003; Atlason et al., 2007; Ulbrich and Isacoff, 2007; Ulbrich and Isacoff, 2008). Nativní NMDA receptory jsou nejčastěji složeny ze dvou GluN1 podjednotek (vzájících glycin) a dvou GluN2 podjednotek (vzájících glutamát) (Furukawa and Gouaux, 2003; Furukawa et al., 2005; Schuler et al., 2008; Yao et al., 2008). Bylo ukázáno, že GluN1/GluN2 receptory mohou být aktivovány pouze v přítomnosti agonistů glutamátového a glycinového místa (Johnson and Ascher, 1987; Kleckner and Dingledine, 1988; Lerma et al., 1990). V některých oblastech mozku jsou rovněž formovány triheteromerní GluN1/GluN2/GluN3 receptory (Ulbrich and Isacoff, 2008; Traynelis et al., 2010). Tyto specifické typy NMDA receptorů zde nebudou detailně popsány, jelikož jsme se v této diplomové práci soustředili na standardní typy GluN1/GluN2 receptorů.

Dosud bylo identifikováno osm různých sestřihových variant GluN1 podjednotky (Zukin and Bennett, 1995), čtyři GluN2 podjednotky (GluN2A, 2B, 2C, 2D) a dvě GluN3 podjednotky (GluN3A, 3B). Každá z těchto zmíněných podjednotek je kódována vlastním genem (Dingledine et al., 1999; Traynelis et al., 2010). Nomenklatura pro tyto receptory byla zavedena podle Collingridge et al., 2009. Sestřihové varianty GluN1 podjednotky se liší přítomností nebo nepřítomností exonu

5 v N-terminální doméně či exony 21 a 22 v C-terminální doméně (Hollmann et al., 1993; Zukin and Bennett, 1995). Například, na základě přítomnosti či nepřítomnosti exonu 5 v N-terminální doméně rozlišujeme dva podtypy sestřihových variant, 1a a 1b (Moriyoshi et al., 1991). Jednotlivé sestřihové varianty GluN1 podjednotky i podtypy GluN2 podjednotek mají různé funkční i farmakologické vlastnosti (Vicini et al., 1998). Pro správnou funkci a regulaci NMDA receptorů jsou důležité také posttranslační modifikace jednotlivých podjednotek včetně jejich fosforylace (Crump et al., 2001; Lan et al., 2001; Wenthold et al., 2003), glykosylace (Dingledine et al., 1999; Storey et al., 2011) a palmitoylace (Hayashi et al., 2009).

Všechny podjednotky ionotropních glutamátových receptorů včetně NMDA receptorů jsou integrální membránové proteiny obsahující čtyři semiautonomní domény: extracelulární N-terminální doménu tvořenou amino-terminální a ligand-vázající doménou, transmembránovou doménu a intracelulární C-terminální doménu. Každá podjednotka je složena ze tří transmembránových domén, M1, M3 a M4. Mezi M1 a M3 doménou je umístěna vratná smyčka M2, tvořící pár iontového kanálu (Chen and Lipton, 2006; Sobolevsky et al., 2009). Vazebné místo pro glutamát je lokalizováno na GluN2 podjednotce a je tvořeno segmentem S1, ležícím před doménou M1 a segmentem S2, který se nachází mezi M3 a M4 doménou. Glycinové vazebné místo, které se nachází na GluN1 podjednotce, je rovněž lokalizováno na S1 a S2 segmentech (viz Obr. 1).

Iontový kanál NMDA receptorů je zúžením rozdělený na extracelulární a intracelulární vestibul (Kuner et al., 1996). Extracelulární vestibul je tvořen povrchovými částmi aminokyselinových zbytků N-terminální části M1 domény, C-terminální části M3 domény a N-terminální části M4 domény. Jádro vestibulu tvoří M3 domény (Beck et al., 1999; Sobolevsky et al., 2002).



Obr. 1: Struktura a doménová organizace NMDA receptorů podle AMPA receptorů. (A) Lineární reprezentace podjednotek v polyptidovém řetězci a schematická ilustrace podjednotkové topologie. M1, M3, M4 domény a smyčka M2 jsou lokalizovány v membráně a vytvářejí pór iontového kanálu. Segmenty S1 a S2 tvoří vazebné místo pro agonisty. (B) Krystalová struktura membránového uspořádání tetrameru. (C) Amino-terminální doména (ATD) se podílí na formování funkčních receptorů, jejich farmakologické modulaci a transportu na povrch. Pro vazbu agonistů, kompetitivních antagonistů a aktivaci receptoru je důležitá ligand vázající doména (LBD). Na tvorbě iontového kanálu se podílí TMD. (D) Symetrická nesourodost mezi TMD, ATD a LBD vede ke dvěma odlišným typům podjednotek s dvěma odlišnými konformacemi. Podjednotky jsou označeny A/C a B/D (Traynelis et al., 2010).

3.4. Podjednotkové složení a lokalizace NMDA receptorů

Podjednotkové složení NMDA receptorů v savčím mozku je v průběhu ontogenetického vývoje specificky regulováno. Expres jednotlivých podjednotek NMDA receptorů se liší v závislosti na stádiu vývoje jedince a oblasti mozku, kde k expresi dochází. Například, GluN2B a GluN2D podjednotky jsou přednostně exprimovány v neonatálním období vývoje mozku. Během stárnutí CNS exprese těchto podjednotek postupně klesá a dochází k přednostní expresi GluN2A podjednotek. GluN2C podjednotka se vyskytuje pouze v některých specifických oblastech mozku, např. v mozečku (Watanabe et al., 1992; Wenzel et al., 1997; Sans et al., 2000; Cull-Candy et al., 2001; Paoletti, 2011).

NMDA receptory jsou na synapsích lokalizované spolu s dalšími metabotropními a ionotropními glutamátovými receptory. Přesně regulovaný počet a lokalizace NMDA receptorů v synapsích jsou kritické pro normální glutamatergní neurotransmisi a synaptickou plasticitu (Traynelis et al., 2010). Rozmanitost odpovědí NMDA receptorů vyplývá z komplexnosti složení jednotlivých receptorů a z variací v jejich lokalizaci. U dospělých jedinců jsou receptory obsahující GluN2A podjednotky lokalizované především na synapsích, zatímco receptory obsahující GluN2B podjednotku jsou lokalizované spíše extrasynapticky (Stocca and Vicini, 1998; Tovar and Westbrook, 1999; Li et al., 2002; Kohr, 2006). V každém triheteromerním komplexu GluN1/GluN2X/GluN2Y se začleňuje více než jeden druh GluN2 podjednotky. Na excitačních synapsích v hipokampu se pravděpodobně nachází GluN1/GluN2A/GluN2B receptory, na synapsích granulárních mozečkových neuronů GluN1/GluN2A/GluN2C receptory a na dopaminergních neuronech v substantia nigra se nacházejí GluN1/GluN2B/GluN2D receptory (Cull-Candy et al., 2001). Předpokládá se, že mechanismy transportu jednotlivých typů NMDA receptorů jsou specificky regulovány, aby vyhovovaly aktuálním potřebám jednotlivých neuronů v CNS.

3.5. Biogeneze, formování a maturace NMDA receptorů v endoplazmatickém retikulu

Membránové receptory jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu (ER), kde následně dochází i k různým druhům kontroly kvality těchto proteinů. Dochází zde k odstranění nesprávně zformovaných proteinů nebo jinak nedokonalých molekul.

Mechanismy regulace transportu NMDA receptorů z ER zatím nejsou plně objasněny. Delece GluN1 podjednotky v myších CA1 pyramidálních neuronech způsobuje agregaci GluN2 podjednotek v intracisternálních granulích ER (Fukaya et al., 2003). To podporuje další studii, která ukazuje, že GluN2 podjednotky jsou lokalizovány v ER v nepřítomnosti GluN1 podjednotky (McIlhinney et al., 1998). V heterologních buňkách jsou homomerické GluN3A komplexy a komplexy GluN2A/GluN3A lokalizovány v ER. Pouze heteromerické komplexy, které obsahují GluN1 podjednotku, byly nalezeny na buněčném povrchu (Perez-Otano et al., 2001). Interakce mezi GluN3B podjednotkou a jinými podjednotkami NMDA receptorů jsou podobné (Matsuda et al., 2003). Lze předpokládat, že jednotlivé ER retenční motivy jsou maskovány v kvartérní struktuře funkčního NMDA receptoru a za pomoci regulačních mechanismů je kontrolováno uvolnění správně složených receptorů z ER.

Pomocí imunologického značení, biochemických a funkčních analýz bylo zjištěno, že amino-terminální doména v GluN2A podjednotce obsahuje ER retenční signál v jejím A2 segmentu. Tento signál je specificky maskovaný přítomností amino-terminální domény GluN1 podjednotky. Je zajímavé, že amino-terminální doména GluN2B podjednotky pravděpodobně neobsahuje ER retenční signál. NMDA receptory obsahující GluN2A podjednotku mají pravděpodobně jiný způsob kontroly kvality v ER oproti receptorům obsahujícím GluN2B podjednotku (Qiu et al., 2009).

Podobně jako v amino-terminální doméně GluN2A podjednotky, i v oblasti M3 domén byly identifikovány kritické strukturní determinanty důležité pro formování a transport NMDA receptorů na buněčný povrch (Horak et al., 2008). Předpokládá se, že specifická konformace M3 domén GluN1 i GluN2 podjednotek zadržuje samostatně exprimované podjednotky v ER, dokud nevytvoří funkční heterotetramer. Maskování ER retenčních motivů je pravděpodobně způsobeno interakcí M3 domén spolu s M4 doménou GluN1 podjednotky. Naše studie ukázala, že přítomnost klíčových zbytků aminokyselin v M3 doménách GluN1 i GluN2 podjednotek je kritická pro povrchovou expresi NMDA receptorů. Tyto klíčové aminokyselinové

zbytky v rámci M3 domény nejsou nezbytné pro formování funkčních receptorů, ale spíše regulují uvolňování NMDA receptorů z ER (Kaniakova et al., 2012a). Další naše studie ukázala, že i M4 doména v GluN1 podjednotce je kritická pro uvolnění NMDA receptorů z ER (Kaniakova et al., 2012b). Použitím četných mutovaných GluN1 podjednotek exprimovaných v heterologních buňkách jsme identifikovali jeden aminokyselinový zbytek (L830) v druhé polovině M4 domény GluN1 podjednotky, který reguluje transport NMDA receptorů na buněčný povrch. Přítomnost L830 není pravděpodobně rozhodující pro fyzickou interakci GluN1/GluN2 podjednotek nebo pro formování funkčních receptorů, ale podílí se na maskování ER retenčních signálů v ER a/nebo na následném transportu funkčních NMDA receptorů (Kaniakova et al., 2012b).

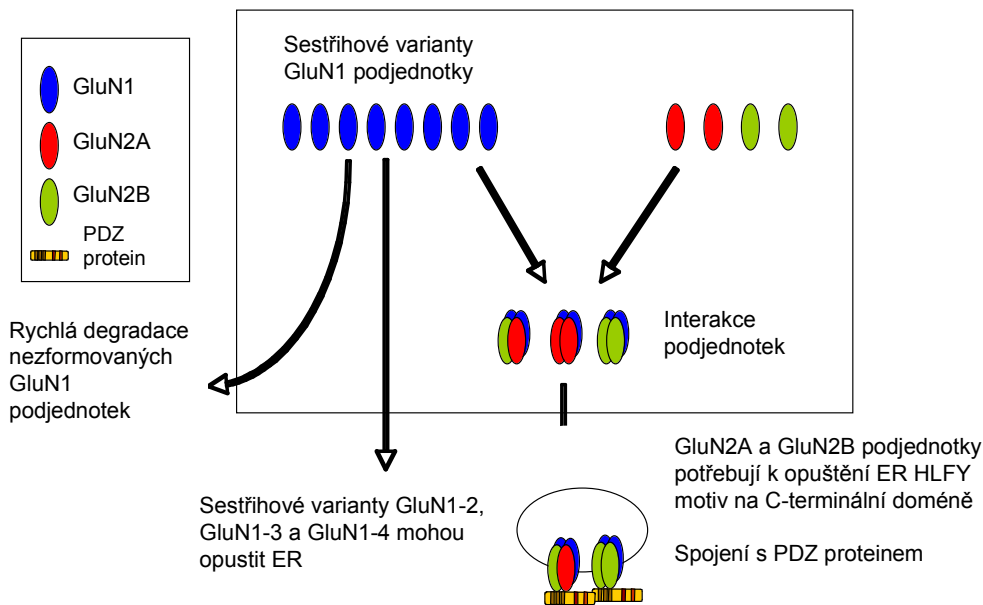
Na intracelulárním C-konci GluN1 podjednotky v C1 kazetě byly objeveny dva krátké motivy (KKK a RRR) zadržující podjednotky v ER (tzv. ER retenční motivy) (Standley et al., 2000; Scott et al., 2001; Xia et al., 2001; Horak and Wenthold, 2009). Když jednotlivé podjednotky vytvoří komplex, tyto ER retenční motivy jsou pravděpodobně specifickým mechanismem negovány. Je zajímavé, že když se GluN1-1 podjednotka obsahující C1 kazetu exprimuje v heterologních buňkách (COS-7), je zadržena v ER a není transportována na buněčný povrch (Standley et al., 2000). Dvě další GluN podjednotky, GluN1-2 a GluN1-4, které postrádají C1 kazety s ER retenčními motivy, jsou transportovány na povrch buňky i v nepřítomnosti GluN2 podjednotek. GluN1-3 podjednotka je rovněž transportována na buněčný povrch, přestože obsahuje C1 kazetu. To je způsobeno přítomností C2' kazety, která obsahuje specifický exportní signál, PDZ-vazebnou doménu. Toto pozorování naznačuje, že protein obsahující PDZ doménu interaguje s C2' kazetou GluN1 podjednotek již při uvolnění z ER (viz Obr. 2) (Holmes et al., 2002). Bylo ukázáno, že existují i další faktory, které mohou ovlivnit uvolňování GluN1 podjednotek z ER. Například, fosforylace proteinkinázou C (PKC) i proteinkinázou A (PKA) serinových zbytků v okolí ER retenčního motivu RRR na C1 kazetě inhibuje retenci GluN1 podjednotek v ER (Scott et al., 2003). Nicméně, inhibice retence v ER vyvolaná C2' kazetou nemusí být způsobena pouze vazbou PDZ-vazebných domén, ale také interakcí s COPII proteiny, které jsou k dispozici na výstupních místech ER (viz Obr. 2) (Mu et al., 2003).

Další z kontrolních mechanismů pro uvolnění GluN1/GluN2 komplexů z ER zahrnuje i HLFY motiv v proximální oblasti C-terminální domény GluN2 podjednotky

(viz Obr. 2). Tento motiv pravděpodobně zprostředkovává transport správně složených funkčních NMDA receptorů z ER (Hawkins et al., 2004). Je zajímavé, že mutovaný HLFY motiv nebrání sestavení funkčního heterotetrameru, ale brání jeho transportu z ER na povrch buňky. Rovněž je ale možné, že HLFY motiv plní pouze strukturální úlohu při zajištění správné orientace C-terminální domény a nikoli úlohu motivu potřebného pro uvolnění z ER (Yang et al., 2007).

Mezi důležitá místa účastnící se regulace povrchové exprese NMDA receptorů patří jejich glycinová a glutamátová vazebná místa. Bylo například ukázáno, že bodová mutace v glycinovém místě GluN1-1a podjednotky (D732A), která způsobuje výrazné snížení afinity receptoru ke glycinu, výrazně inhibuje povrchovou expresi GluN1/GluN2A receptorů. Jelikož jsou mutované receptory GluN1-1a(D732A)/GluN2A zadržované v ER, předpokládá se, že glycin vázající místo je důležitým kontrolním bodem v časném procesu třídění receptorů v ER (Kenny et al., 2009).

Koexprimováním GluN1 podjednotky s GluN2B podjednotkou s mutacemi v glutamátovém vazebném místě bylo zjištěno, že povrchová exprese NMDA receptorů koreluje s afinitou ke glutamátu. Koexprese s nemutovanou GluN2B podjednotkou nezvyšuje povrchovou expresi mutovaných receptorů, což naznačuje, že povrchová exprese je závislá na obou funkčních glutamátových vazebných místech. To vede k myšlence, že NMDA receptory mohou být funkční již intracelulárně (She et al., 2012).



Obr. 2: Interakce podjednotek NMDA receptorů v ER. Všechny typy GluN2 podjednotek a GluN1-1 sestřihových variant jsou zadržovány v ER, dokud nedojde k správnému zformování NMDA receptorů. GluN1 podjednotek je syntetizováno větší množství než GluN2 podjednotek a většina z nich je pak zadržována v ER a rychle degradována. Některé sestřihové varianty GluN1 podjednotek neobsahují ER retenční motiv v C1 kazetě, ale obsahují C2' kazetu, která jim umožňuje výstup z ER i v přítomnosti C1 kazety. Interakce podjednotek může vést k vytvoření komplexu s dvěma identickými nebo různými GluN2 podjednotkami. NMDA receptory se mohou spojovat a být funkční již v ER. Transport receptorů z ER je pravděpodobně závislý na motivu HLFY (GluN2A a GluN2B), umístěném za M4 doménou (Malenka, 2009).

3.6. Zpracování NMDA receptorů v Golgiho aparátu a jejich transport na buněčný povrch

NMDA receptory jsou po opuštění ER pravděpodobně transportovány do GA (Golgiho aparát), kde jsou seskupeny v TGN (trans-Golgiho síť) a baleny do různých druhů vezikulárních nebo tubulovezikulárních váčků. Odtud jsou receptory přepravovány přímo do plazmatické membrány nebo vstupují do endozomů. Nově vzniklé NMDA receptory se v endozomech mohou mísit s recyklovanými NMDA receptory, přicházejícími z buněčného povrchu. Předpokládá se, že k třídění NMDA receptorů dochází v TGN. NMDA receptory jsou transportovány na neuronální buněčný povrch v závěrečné fázi, kdy se jejich transportu účastní myosiny pohybující

se podél aktinových vláken. Nově vznikající NMDA receptory mohou nejdříve vstoupit do extrasynaptické membrány a dále pokračovat do excitačních synapsí, nebo mohou vstoupit přímo do postsynaptické membrány (Petralia et al., 2009).

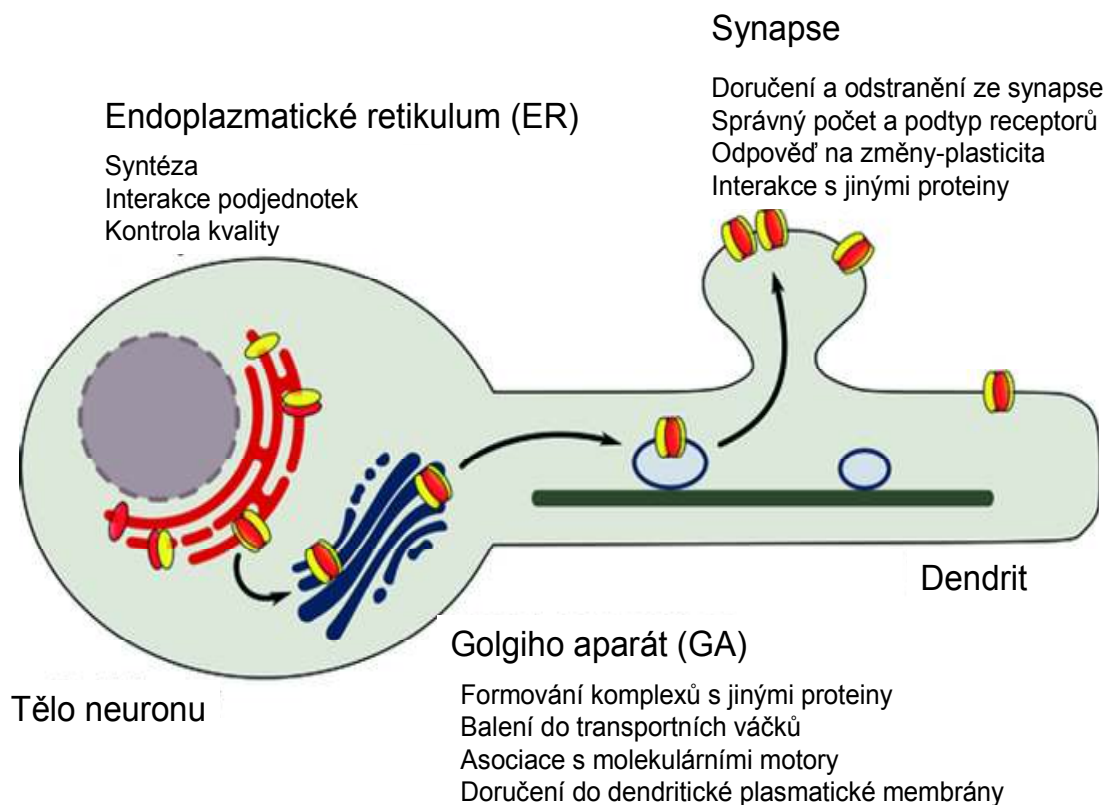
Předchozí studie na mladých kulturách kortikálních neuronů objasnily mnohé z dílčích kroků v transportu NMDA receptorů na buněčný povrch (Washbourne et al., 2002; Washbourne et al., 2004; Bressloff, 2006). NMDA i AMPA receptory jsou v neuronech přepravovány pomocí různých vezikulárních nebo tubulovezikulárních struktur před i během synaptogeneze. Existují nejméně dva druhy transportních vezikulů nebo tubulovezikulárních organel. Transportní vezikuly pro NMDA receptory neobsahují AMPA receptory a pohybují se mnohem rychleji ve srovnání s těmi, které slouží pro transport AMPA receptorů (Washbourne et al., 2004). Transport v dendritech je uskutečňován pomocí velkých tubulovezikulárních organel, které se pohybují podél mikrotubulů a obsahují časný endozomální antigen (EEA1). Je tedy pravděpodobné, že k třídění NMDA a AMPA receptorů dochází nejen v TGN, ale možná i na úrovni specifických endozomů. Je zajímavé, že některé recyklační endozomy obsahují AMPA receptory spolu se svými přidruženými proteiny, ale neobsahují NMDA receptory. Tato zjištění jsou rovněž podporována imunoelektronovými studiemi na savčích hipokampech (Lee et al., 2001).

Transport NMDA receptorů na povrch buněk a poté do synapse zaměstnává velké množství proteinů (Sans et al., 2003; Sans et al., 2005). Jedním z těchto proteinů je i SAP102 (z ang. synapse associated protein 102) patřící do rodiny MAGUK (z ang. membrane-associated guanylate kinase) proteinů. SAP102 asociuje s GluN1/GluN2B receptory, které jsou přítomny především v časném postnatálním savčím mozku. NMDA receptory jsou přepravovány v dendritech ve velkých tubulovezikulárních organelách, pravděpodobně časných endozomech, obsahujících protein SAP102 (Washbourne et al., 2004). Protein SAP102 váže i protein Sec8 a osm dalších proteinů. Vytvářejí tak komplex, Sec6/8, který byl nalezen v kvasinkách i savčích buňkách a zprostředkovává fúzi intracelulárních membránových váčků a plazmatické membrány. Sec8 i GluN2 podjednotky NMDA receptorů se váží na SAP102 protein do stejného místa, PDZ domény (Sans et al., 2003). Protein Sec8, který postrádá PDZ vazebnou doménu, inhibuje transport NMDA receptorů na buněčný povrch. Transport NMDA receptorů tedy vyžaduje jak SAP102, tak i Sec8 protein. Nicméně, když je GluN2B podjednotce odstraněna PDZ-vazebná doména, NMDA receptory jsou transportovány na buněčný povrch mechanismem nezávislým na Sec6/8 komplexu a

MAGUK proteinech (Prybylowski et al., 2002; Sans et al., 2003).

Protein SAP102 také interaguje s proteinem mPins (z angl. Mammalian homologue of *Drosophila melanogaster* partner of inscuteable). mPins je savčí forma proteinu identifikovaného u octomilky, který se spolupodílí na regulaci buněčného dělení a polarity buňky a interaguje s SH3 (z angl. Src-homology-3) a GK (z angl. guanylate kinase) doménami SAP102 proteinu. mPins protein se váže i na α -podjednotku G_i proteinu a spolu s komplexem proteinu SAP102 a GluN2B podjednotky reguluje transport NMDA receptorů (Sans et al., 2003; Sans et al., 2005). Je pravděpodobné, že komplex proteinů složený z GluN1 a GluN2B podjednotek, proteinů SAP102, Sec8, mPins, a možná i α -podjednotky G_i proteinu se tvoří v časných stádiích transportní dráhy v ER, GA nebo TGN.

Proteinový komplex obsahující GluN1, GluN2B, SAP102, Sec8 a mPins je asociován i s kinesinovými motory a pravděpodobně zprostředkovává transport NMDA receptorů vázaných v membránách váčků nebo tubulovezikulárních organelách podél dendritu (Yuen et al., 2005). Transport nově zformovaných NMDA receptorů obvykle začíná v buněčných tělech neuronů, odkud pokračuje podél dendritů do excitačních synapsí (viz Obr. 3). Některé NMDA receptory jsou pravděpodobně uvolněny z exportních míst ER přímo do dendritů (Aridor et al., 2004; Horton and Ehlers, 2004). NMDA receptory mohou být také syntetizovány lokálně v blízkosti synapse z mRNA umístěné v dendritech (Steward and Schuman, 2001). Některé cytoplazmatické bílkoviny jako CaMKII (z angl. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases II) nebo Arc (z angl. activity-regulated cytoskeleton-associated protein), které regulují NMDA receptory, mohou být také syntetizovány lokálně v dendritech a dosáhnout tak přesnější kontroly transportu glutamátových receptorů do jednotlivých synapsí (Steward and Schuman, 2001).



Obr. 3: Schéma transportu NMDA receptorů. V ER (červená barva) jsou NMDA receptory syntetizovány a sestaveny do funkčních GluN1/GluN2 tetramerů. Po kontrole kvality v ER jsou receptory transportovány do GA (modrá barva), odkud jsou následně funkční receptory ve váčcích transportovány do excitačních synapsí nebo extrasynaptických oblastí neuronů. Správný počet i typy NMDA receptorů na buněčném povrchu neuronů jsou regulované v uvedených krocích (Kaniakova et al., 2012b).

3.7. Mechanizmy regulace transportu GluN1/GluN2C receptorů

Jak již bylo zmíněno, GluN2C podjednotky NMDA receptorů se exprimují převážně v granulárních mozečkových neuronech (CGC) a objevují se až v pozdějších vývojových stádiích CNS. GluN2B podjednotka, která se v časném stádiu vývoje nachází na excitačních synapsích CGC, je postupně nahrazována GluN2C podjednotkou (Lu et al., 2006; Paoletti, 2011). Myši exprimující GluN2C a GluN2A podjednotku s deletovanou C-terminální doménou mají poškozenou mozečkovou synaptickou plasticitu (Rossi et al., 2002). Myši s nedostatkem GluN2A a/nebo GluN2C podjednotek mají poškozenou motorickou koordinaci (Kadotani et al., 1996) a myši s chybějící GluN2C podjednotkou vykazují nedostatky v nabývání strachu a pracovní paměti (Hillman et al., 2011). To naznačuje, že přítomnost GluN2C podjednotky je pro jednotlivé funkce mozečku kritická.

Fosforylace GluN2C podjednotky má významný vliv na regulaci transportu a na vlastnosti GluN1/GluN2C receptorů. GluN2C podjednotka je na serinu 1096 (S1096) přímo fosforylována PKB/Akt (aktivovaná proteinkináza B). Aktivita NMDA receptorů a stimulace IGF-I (z angl. insulin like growth factor) vede k robustnímu zvyšování fosforylace GluN2C podjednotky na S1096 což vede ke zvýšení povrchové exprese mozečkových NMDA receptorů obsahujících GluN2C podjednotky, které v místě této fosforylace vážou i 14-3-3 ϵ protein (Chen and Roche, 2009).

Další fosforylační místo, serin 1244 (S1244) identifikované na C-terminální doméně GluN2C podjednotky, je fosforylováno PKA i PKC. Toto místo se nachází blízko PDZ-vazebné domény, která reguluje proteinovou interakci a transport receptorů obsahujících GluN2A a GluN2B podjednotku na buněčný povrch (Bard et al., 2010; Standley et al., 2012). Bylo ukázáno, že fosforylace S1244 nereguluje transport GluN1/GluN2C receptorů, ale kinetiku funkčních iontových kanálů. (Chen et al., 2006).

4. Cíle diplomové práce

- **Pomocí molekulárně biologických a imunocytochemických metod porovnat rozdíly v povrchové expresi GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B i GluN1/GluN2C receptorů.**
- **Pomocí molekulárně biologických a imunocytochemických metod objasnit mechanismy regulace transportu GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch.**

5. Materiál a metody

Jednotlivé mutace v GluN2A, GluN2B a GluN2C podjednotkách NMDA receptoru jsme připravili metodou PCR (polymerázová řetězová reakce). Nemutované i mutované formy podjednotek NMDA receptorů jsme transfekovali do savčích heterologních COS-7 buněk a kultivovaných potkaních granulárních mozečkových neuronů. Jako metodu detekce povrchové exprese jsme zvolili metodu imunocytochemického značení protilátkami. Pro získání mikroskopických dat jsme pro COS-7 buňky použili fluorescenční mikroskop, Cell[^]R (Olympus, Tokyo, Japan). Granulární mozečkové neurony jsme snímali pomocí přímého fluorescenčního konfokálního mikroskopu Leica DM 2500 CSQ V-VIS (Leica, Wetzlar, Germany). Pro analýzu mikroskopických dat jsme používali program ImageJ (NIH, MD, USA). Ke statistickému vyhodnocování jsme využívali programy Sigma Plot a Sigma Stat (Jandel Scientific, CA, USA).

5.1. Příprava mutantních receptorů

V našich pokusech jsme používali nemutované potkaní podjednotky NMDA receptorů GluN2A, GluN2B, GluN2C a GluN1-1a. GluN1-1a a GluN2 podjednotky byly značeny na N-koncové části zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) (Marshall et al., 1995; Luo et al., 2002; Chen and Roche, 2009).

Hlavní náplní této diplomové práce bylo identifikovat klíčové oblasti v GluN2C podjednotce, které regulují transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Proto jsme vytvořili sérii mutovaných konstruktů GFP-GluN2C podjednotky. Na N-terminální doméně, v oblasti membránových domén i na C-terminální doméně. Pomocí inserce stop kodonů jsme vyrobili GFP-GluN2A a GFP-GluN2B podjednotky deletované za M1 doménou (Horak et al., 2008; Qiu et al., 2009). Na N-koncové části GluN2C podjednotky jsme pak vytvořili specifické delece a to jak ve zkrácené formě GFP-GluN2C podjednotky (GFP-GluN2C-M1stop), tak i v GFP-GluN2C konstruktu: GFP-GluN2C-M1stop- Δ 159-292, GFP-GluN2C-M1stop- Δ 293-556 a GFP-GluN2C- Δ 159-292. Na N-koncové části GluN1-1a podjednotky jsme vytvořili delecí oblasti aminokyselin 32-386 (GFP-GluN1-1a- Δ 32-386). V oblasti M3 domény konzervovaného VWAFFAVIFLASYTANLAAF motivu jsme vytvořili konstrukty s třemi bodovými záměnami aminokyselin za alanin, GFP-GluN2C-W645A, GFP-GluN2C-Y656A a GFP-GluN2C-T657A. V oblasti C-terminální domény jsme

vytvořili sérii mutací začínající stop kodonem za M4 doménou, GFP-GluN2C-855stop a delecí posledních deseti aminokyselin, GFP-GluN2C-1241stop. Dále jsme vytvořili konstrukty se stop kodony GFP-GluN2C-872stop, GFP-GluN2C-884stop, GFP-GluN2C-885stop, GFP-GluN2C-886stop, GFP-GluN2C-887stop, GFP-GluN2C-888stop, GFP-GluN2C-889stop, GFP-GluN2C-890stop, GFP-GluN2C-948stop, GFP-GluN2C-1048stop a GFP-GluN2C-1148stop.

Komplementární primery o délce minimálně 30 oligonukleotidů jsme navrhovali tak, aby konkrétní mutace byla umístěna přibližně uprostřed oligonukleotidů.

Pomocí PCR reakce v Thermo-cycleru (Eppendorf, Hamburg, Germany) a DNA oligonukleotidů (Sigma Aldrich, MO, USA) byly připraveny jednotlivé záměny aminokyselin podjednotek NMDA receptorů. Pro PCR reakci byl použit QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, CA, USA) a postup doporučený výrobcem. Templátová DNA byla po skončení PCR reakce štěpena enzymem DpnI po dobu 1 hodiny. Pro transformaci jsme zvolili kmen kompetitivních bakterií XL10-Gold. Smíchali jsme 100 μ l bakterií s 5 μ l PCR směsí, inkubovali 1 hodinu na ledu a transformovali metodou teplotního šoku (45 s při 42°C), poté 2 minuty na ledu. Bezprostředně po teplotním šoku jsme k buněčné suspenzi přidali 0,5 ml LB média bez antibiotika a nechali směs třepat 1 hodinu na třepačce (200 rpm a 37°C). Následně byla tato buněčná suspenze nanášena na Petriho misky s agarem obsahujícím ampicilin (100 μ g/ml) a přes noc ponechána v termostatu (37°C). Dostatečně narostlé monokolonie jsme naočkovali do LB média obsahujícího ampicilin (100 μ g/ml) a za stálého třepání kultivovali 14-16 hodin. Takto připravené bakteriální kultury jsme použili k izolaci plazmidové DNA. K izolaci byl používán High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, New Taipei City, Taiwan), postup dle protokolu výrobce, a centrifuga (Hettich Instruments, Tuttlingen, Germany). Přítomnost mutace byla zkontrolována DNA sekvenací ve společnosti Macrogen, (Seoul, Korea). Následně jsme koncentrace získané DNA měřili na přístroji Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA).

5.2. Použité chemikálie a roztoky

Roztoky pro molekulární biologii

Agarové plotny – 6 g agaru (Serva) na 300 ml destilované vody; autoklávovali jsme 15 minut při teplotě 105°C; po zchladnutí na 50°C ve vodní lázni jsme přidali ampicilin (100 μ g/1 ml agaru) a nalili na Petriho misky

LB médium – 3 g NaCl; 3 g peptonu (Serva, Heidelberg, Germany); 1,5 g kvasničného extraktu (Serva) doplnené do 300 ml destilované vody; autoklávovali jsme 15 minut při teplotě 105°C; před použitím jsme přidali ampicilin (100 µg na 1 ml média)

Roztoky pro práci s buněčnými kulturami

DMEM (Dulbecco's modified eagle medium; Life Technologies, CA, USA)

10% FTS (fetální telecí sérum; Kysilka Michal, Brno)

Optimem I (Life Technologies)

PBS (fosfátový pufr) – 5,4 mM KCl; 138 mM NaCl; 7,8 mM Na₂HPO₄·12H₂O; 1,4 mM KH₂PO₄ (pH 7,3)

Trypsin – 0,05% trypsin v PBS (pH 7,3)

Disekční roztok – 89 ml sterilní vody, 10 ml 10× HBSS, 1 ml 1M HEPESu

Kultivační roztok – EMEM (Eagle's minimal essential medium; Life Technologies) 500 ml; 825 mg KCl jsme rozpustili a zfiltrovali, sterilně přidali 10 mg gentamycinu (Life Technologies), 5 ml 200 mM L-glutaminu (Life Technologies), FTS (10 ml séra/100 ml média) a neuronální suplement B27 (Life Technologies, 2 ml/100 ml média)

Látky používané při imunocytochemickém barvení

Protilátka anti-green fluorescent protein (Millipore, MA, USA), 1:1000

Protilátka Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies), 1:1000

Protilátka Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies), 1:1000

Protilátka Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies), 1:1000

Paraformaldehyd – 4% paraformaldehyd rozpuštěný v PBS

BSA (bovine serum albumin, MP medicals, CA, USA) - 0,02 g na 10 ml PBS

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

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

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

Není-li uvedeno jinak, použité chemické látky a roztoky byly získány od firmy Sigma Aldrich.

5.3. Kultivace a transfekce COS-7 buněk

Kultivace

V našich pokusech jsme používali heterologní buněčnou linii COS-7, která pochází z opičích ledvinných fibroblastů. Tyto buňky jsou obecně používány v mnoha laboratořích studujících transport glutamátových receptorů, jelikož přirozeně neexprimují glutamátové receptory (na rozdíl od neuronů).

COS-7 buňky jsme pravidelně pasážovali (odsátí média, opláchnutí roztokem PBS, 2 minuty inkubace s trypsinem, disociace v novém médiu a nasazení na nové misky). Buňky jsme pěstovali na Petriho miskách o průměru 35 mm a 1-2 dny před transfekcí jsme je nasazovali na 12-jamkové kultivační destičky. COS-7 buňky jsme kultivovali v inkubátoru SANYO MCO-18AIC (SANYO E&E Europe BV) při absolutní vlhkosti, teplotě 37°C a 5% koncentraci CO₂.

Transfekce

Pomocí transfekčního činidla LipofectaminTM2000 (Life Technologies) jsme do COS-7 buněk narostlých na kultivačních 12-jamkových destičkách se sklíčkem vnášeli plazmidy jednotlivých GluN podjednotek.

Na začátku transfekce jsme buňkám vyměnili původní médium za 1 ml Optimem média (37°C). Do jedné mikrozkušavky jsme si připravili transfekční směs obsahující 0,45 µg DNA a 25 µl Optimemu. Do druhé jsme připravili 25 µl Optimemu, 1 µl Lipofectaminu a inkubovali při pokojové teplotě 5 minut. Poté jsme obsah mikrozkušavek smíchali a inkubovali ještě 20 minut při pokojové teplotě. Po 20 minutách jsme transfekční směs za mírného třepání nanесли na buňky a nechali inkubovat 5 hodin v inkubátoru (5% CO₂ a 37°C). Mezitím jsme si připravili kultivační médium podle počtu transfekovaných jamiček (2 ml/jamičku). Na 1 ml média jsme použili 1 µg ketaminu, 197 µg APV, 567 µg kyseliny kynurenové, 20 µl 1M MgCl₂ a antibiotikum (100 U penicilinu a 100 µg streptomycinu). Po 5-ti hodinách inkubace jsme transfekční směs odsáli a vyměnili za předem namíchané kultivační médium. Poté jsme COS-7 buňky nechali 24 hodin inkubovat v inkubátoru (5% CO₂ a 37°C).

5.4. Kultivace a transfekce CGC kultur

Kultivace

Nejdříve jsme si připravili malé Petriho misky s průměrem 4 mm se 4 ml disekčního roztoku (na ledu). V Petriho misce jsme ze 7 dní starých potkanů kmene WISTAR vypreparovali mozečky a očistili je od mozkových plen a cév. V laminárním boxu jsme lihem očistili žiletku, mozečky jsme přemístili na Petriho misku s průměrem 35 mm bez roztoku a v různých úhlech je nasekali. Na ledu jsme k mozečkům přidali disekční roztok (10 ml), vše jsme odebrali do 50 ml plastové zkumavky a následně centrifugovali 1 minutu při 4°C a otáčkách 200 RCF. K peletě jsme přidali 5 ml roztoku obsahujícího 4,5 ml disekčního roztoku a 0,5 ml trypsinu (Sigma). Za občasného míchání jsme buňky resuspendovali a inkubovali 15 minut při 37°C. Přidali jsme 15 ml vychlazeného kultivačního média a 7 minut centrifugovali při 4°C a otáčkách 1500 RCF. Opatrně jsme odsáli supernatant a opět přidali 2 ml vychlazeného kultivačního média. Postupně jsme buňky resuspendovali sadou pipet se zmenšujícím se otvorem. Poté jsme suspenzi 5 minut centrifugovali při 4°C a otáčkách 300 RCF. Supernatant jsme odsáli, k buňkám přidali 4 ml ohřátého (37°C) kultivačního média a resuspendovali. Do počítací komůrky jsme odebrali 15 µl média s buňkami a počítali kolik buněk je v každém z pěti čtverečků (obvykle kolem 50-100). Spočítali jsme průměr buněk na čtvereček, toto číslo vynásobili 1 000 000 krát, čímž jsme získali celkový počet buněk ve 4 ml média. Na sklíčko o velikosti 12 mm s 1 ml kultivačního média jsme nasadili 2 miliony buněk a nechali v inkubátoru (5% CO₂ a 37°C) 24 hodin. Další den jsme buňky omyli 1 ml kultivačního média a přidali 1 ml nového kultivačního média.

Transfekce

V našich pokusech jsme transfekovali 5-6 dní staré kultivované mozečkové granulární neurony. Na začátku transfekce jsme si připravili sterilní vodu, 2M roztok CalPhosu, HBS, DNA a nechali 1 hodinu temperovat při pokojové teplotě. Poté jsme nechali předeřhřát EMEM médium (přibližně 2 ml na sklíčko) do inkubátoru s 5% koncentrací CO₂ (37°C) a 0,5 ml na sklíčko do inkubátoru s 10% koncentrací CO₂ (37°C). Připravili jsme transfekční směs obsahující 3 µg DNA, 1,8 µl 2M roztoku CalPhosu a doplnili do 15 µl vodou. Pro každé sklíčko jsme si připravili 15 µl HBS. V dalším kroku jsme směs CalPhos/DNA pomalu a za stálého vortexování (1400 otáček) prikapávali k roztoku HBS. Poté jsme směs nechali 25 minut inkubovat

potmě v boxu. Mezitím jsme z neuronů odsáli kultivační médium a odložili do inkubátoru (5% CO₂). Neurony jsme opláchli 0,5 ml inkubovaného EMEM média (5% CO₂) a následně jsme ho nahradili 0,5 ml nového média. Během třesení destičkou s neurony jsme transfekční směs pomalu přikapávali a nechali inkubovat 1 hodinu v inkubátoru (5% CO₂). Poté jsme zkontrolovali, jestli na buňkách vznikla sraženina v podobě písku. Následně jsme médium odsáli, přidali 0,5 ml média (10% CO₂) a nechali inkubovat 20 minut v inkubátoru (5% CO₂) aby se vzniklá sraženina rozpustila. Nakonec jsme neurony dvakrát opláchli EMEM médiem (5% CO₂) a vrátili jim původní kultivační médium.

5.5. Imunocytochemické značení protilátkami

Pro studium exprese NMDA receptorů na buněčný povrch jsme použili metodu imunocytochemického značení protilátkami. Pro COS-7 buňky jsme zvolili metodu povrchového značení, pro mozečkové neurony metodu kombinovaného (povrchového i celkového) značení, protože nativní GFP signál je v neuronech na rozdíl od COS-7 buněk slabý.

5.5.1. Povrchové značení GluN podjednotek v COS-7 buňkách

V našich pokusech jsme značili povrchové NMDA receptory 22-24 hodin po skončení transfekce. Připravili jsme roztok BSA (0,02 g BSA v 10 ml PBS). Dále jsme připravili roztok BSA s primární protilátkou anti-GFP (1:1000) a roztok BSA se sekundární protilátkou Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (1:1000). Nejdříve jsme sklíčka s transfekovanými COS-7 buňkami přemístili do kapiček vychlazeného PBS roztoku na plochu potaženou parafilmem. Následně jsme PBS odsáli, přidali vychlazený roztok BSA a nechali buňky 10 minut inkubovat. Po odsátí roztoku jsme přidali vychlazený roztok primární protilátky (200 µl/sklíčko) a nechali inkubovat 30 minut. Buňky jsme poté dvakrát po dobu 2 minut omyli vychlazeným roztokem BSA, přidali roztok sekundární protilátky (200 µl/sklíčko) a nechali 30 minut inkubovat. Po této inkubaci jsme buňky 3-krát po dobu 2 minut omyli vychlazeným roztokem PBS. Buňky jsme fixovali 4% roztokem paraformaldehydu v PBS po dobu 20 minut. Poté jsme buňky ještě 3-krát omyli PBS roztokem a vložili na podložní sklíčka s nakapaným zalévacím médiem ProLong Antifade (Life Technologies). Buňky jsme po celou dobu imunocytochemického značení udržovali na ledu,

abychom zabránili internalizaci značených receptorů. Desky s podložními sklíčky jsme skladovali v lednici.

K získání pokusných dat (obrázků a Z-stacků) jsme využívali systém Cell[^]R (Olympus), který obsahuje invertovaný mikroskop IX81 (Olympus), adaptér pro poměrové zobrazování ve dvou různých vlnových délkách DualView (Optical Insights, NM, USA), monochromátor Polychrome V (Till Photonics, Gräfelfing, Germany) a digitální kameru Hamamatsu Orca ER (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). Vzdálenost optických řezů jsme stanovili na 0,1 μ m. Receptory byly vizualizovány excitací zeleného signálu při vlnové délce 475 ± 10 nm (emise při vlnových délkách >510 nm) a excitací červeného signálu při vlnové délce 555 ± 10 nm (emise při vlnové délce >570 nm).

5.5.2. Povrchové a celkové značení GluN podjednotek v granulárních mozečkových neuronech

Sklíčka s neurony jsme z destičky přenesli na plochu potaženou parafilmem a 2-krát omyli roztokem PBS. Přidali jsme 10% roztok NGS a inkubovali 10 minut. Poté jsme roztok odsáli a přidali na 20 minut 3% roztok NGS s primární protilátkou anti-GFP (100 μ l/sklíčko). Roztok jsme odebrali zpátky do zkumavky a sklíčka 2-krát po dobu 2 minut omyli roztokem PBS. Přidali jsme na 20 minut roztok 3% NGS se sekundární protilátkou Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG. Sklíčka jsme 3-krát po dobu 2 minut omyli roztokem PBS a buňky 20 minut fixovali v roztoku 4% paraformaldehydu a 2% sacharózy v PBS. Poté jsme sklíčka omyli ještě 3-krát roztokem PBS a 5 minut nechali inkubovat s 0,25% roztokem tritonu (TX-100). Následně jsme roztok odsáli, přidali roztok 10% NGS a 0,1% TX-100 a inkubovali 30 minut. Po odsátí roztoku jsme na 1 hodinu přidali roztok 3% NGS, 0,1% TX-100 a primární protilátky. Poté jsme sklíčka omyli 3-krát po dobu 5 minut roztokem PBS a nechali 30 minut inkubovat v 3% roztoku NGS, 0,1% TX-100 a sekundární protilátky Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG. Nakonec jsme buňky omyli 3-krát po dobu 5 minut roztokem PBS a sklíčko jsme vložili do předem nakapaných kapek zalévacího média ProLong Antifade (Life Technologies). Všechny pokusy jsme prováděli za stejných experimentálních podmínek, při pokojové teplotě.

K získání pokusných dat (obrázků a Z-stacků) jsme používali konfokální mikroskop Leica DM 2500 CSQ V-VIS. Vzdálenost optických řezů jsme stanovili na

0,38 μm . Využívali jsme dva pevnolátkové lasery, s excitací 488 nm (emise 500-600 nm) a 635 nm (emise 650-700 nm).

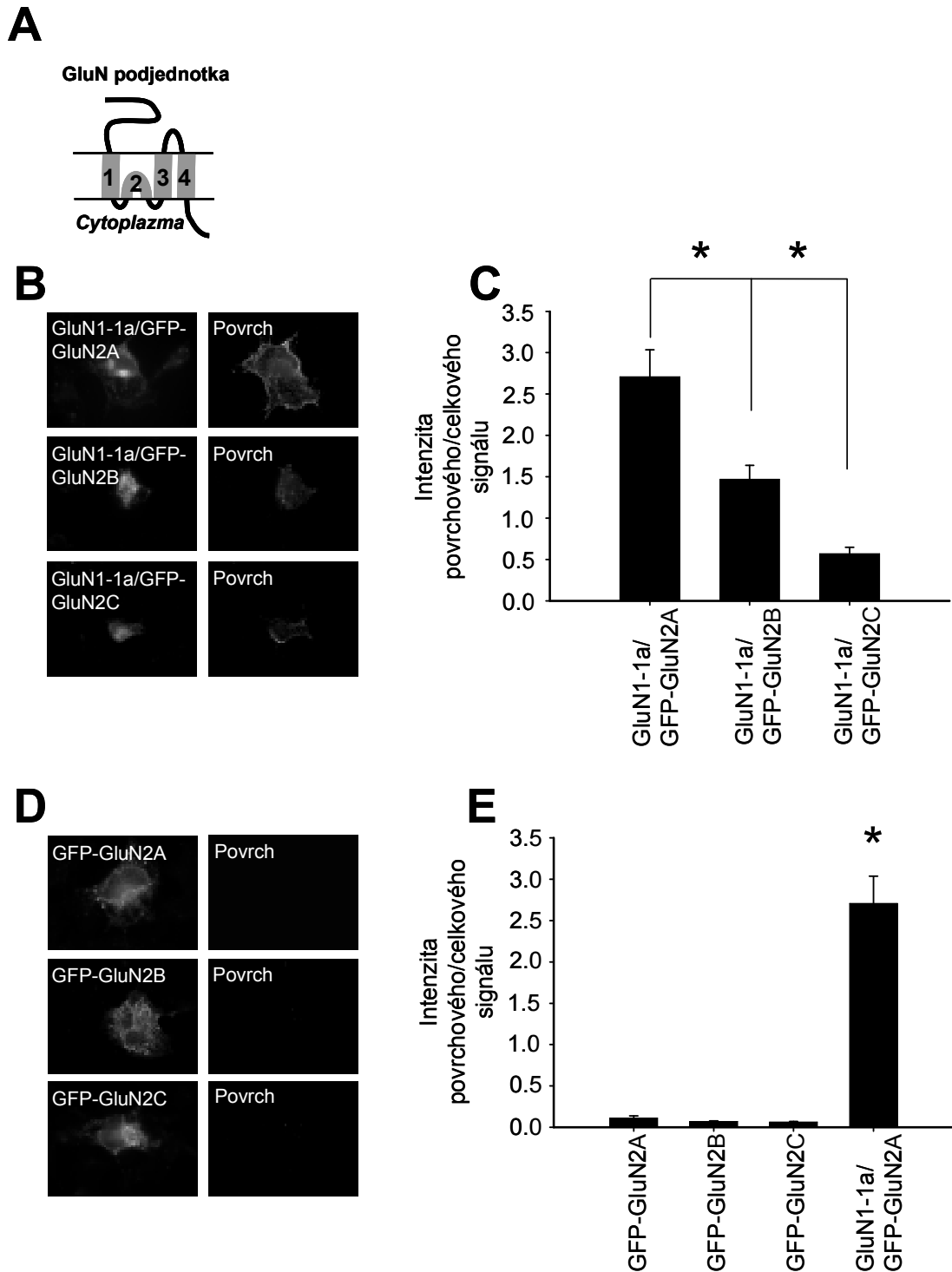
5.6. Zpracování dat a statistika

Získaná data jsme analyzovali pomocí programu ImageJ (NIH, MD, USA). Hodnoty intenzity fluorescenčních signálů povrchové a celkové exprese jsme získali z vybraných oblastí značených buněk. Od těchto hodnot jsme odečítali hodnoty pozadí. Tímto způsobem jsme získali průměrnou hodnotu celkového i povrchového signálu porovnatelnou s ostatními naměřenými buňkami. Analyzovali jsme 2×15 COS-7 buněk ve dvou nezávislých pokusech a 2×8 neuronů ve dvou nezávislých pokusech. Obdržená data jsme statisticky zpracovali a vyhodnotili pomocí programů Sigma Plot 10 a Sigma Stat 3.5 (t-test, ANOVA) (Jandel Scientific, CA, USA).

6. Výsledky

6.1. Vliv GluN2 podjednotek na povrchovou expresi NMDA receptorů

Abychom identifikovali specifické rozdíly v regulaci jednotlivých typů NMDA receptorů, vzájemně jsme porovnali povrchovou expresi GFP-GluN2A, GFP-GluN2B a GFP-GluN2C podjednotek, koexprimovaných s GluN1-1a podjednotkou, v heterologních savčích buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie. Zjistili jsme, že povrchová exprese GluN1-1a/GluN2C receptorů je výrazně nižší než u dalších dvou typů receptorů (viz Obr. 4B, C). Celková exprese samostatných GluN2 podjednotek (viz Obr. 4D, E) definovaná jako fluorescence GFP proteinu, nebyla mezi jednotlivými GluN2 podjednotkami statisticky významná (ANOVA, $p > 0,05$). V souladu s předchozími pokusy byly samostatně exprimované GluN2A a GluN2B podjednotky lokalizovány pouze intracelulárně a ne na buněčném povrchu (McIlhinney et al., 1998; Horak et al., 2008). Podobný výsledek jsme obdrželi i se samostatně exprimovanou GluN2C podjednotkou (viz Obr. 4D, E). Tyto pokusy ukazují, že přestože GluN2C podjednotka potřebuje k transportu na buněčný povrch přítomnost GluN1 podjednotky podobně jako GluN2A a GluN2B podjednotky, její specifické sekvenční motivy pravděpodobně regulují transport GluN1/GluN2C receptorů odlišným způsobem od GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů.



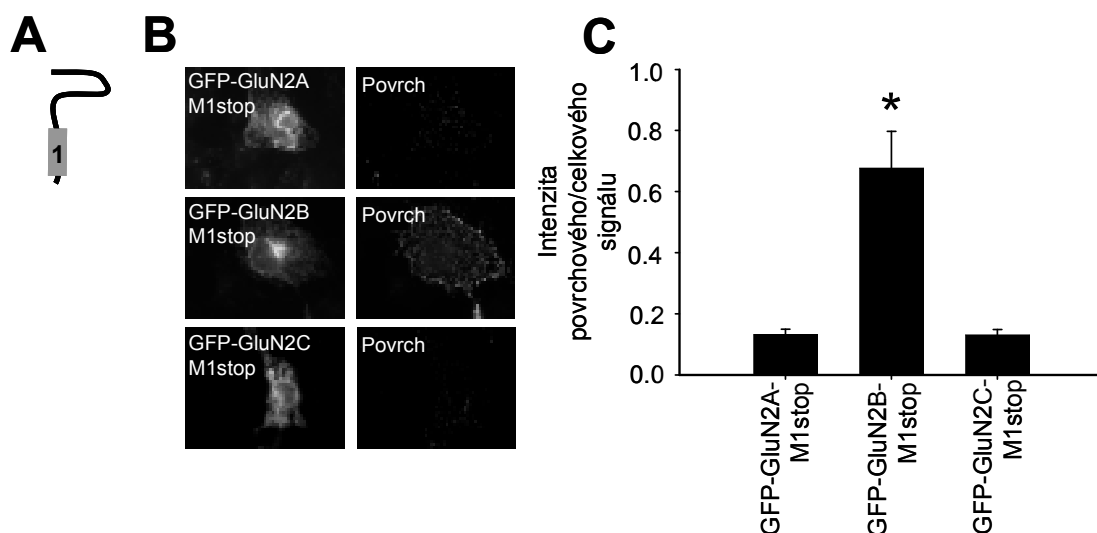
Obr. 4: Vliv GluN2 podjednotek na povrchovou expresi NMDA receptorů.

(A) Schematický náčrt membránové topologie podjednotek NMDA receptoru. (B) Heterologní COS-7 buňky; GluN1-1a podjednotka koexprimovaná s GFP-GluN2A, GFP-GluN2B a GFP-GluN2C podjednotkou. Receptory byly detekovány metodou imunocytochemického značení protilátkami. Na mikroskopu byly na fixovaných buňkách pořízeny jednotlivé snímky. Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál a pravá část povrchový signál. (C) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu; GluN1-1a/GFP-GluN2A, GluN1-1a/GFP-GluN2B, GluN1-1a/GFP-GluN2C,

mezi jednotlivými podjednotkami je statisticky významný rozdíl (*; $p < 0,05$; ANOVA) (D) COS-7 buňky transfekované samostatnými podjednotkami (GluN2A, GluN2B, GluN2C) NMDA receptorů. Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál, pravá část povrchový signál. (E) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu těchto podjednotek v porovnání s kontrolou (GluN1-1a/GFP-GluN2A). Statistická analýza neukázala významný rozdíl v povrchové expresi mezi jednotlivými samostatně exprimovanými GluN2 podjednotkami, na rozdíl od funkčních GluN1-1a/GFP-GluN2A receptorů (*; $p < 0,05$, ANOVA).

6.2. Vliv delece oblasti za M1 doménou GluN2 podjednotky na povrchovou expresi NMDA receptorů

Abychom zjistili, která část GluN2C podjednotky reguluje transport NMDA receptorů na buněčný povrch, vzájemně jsme porovnali jednotlivé mutované podjednotky (GluN2A, GluN2B, GluN2C) NMDA receptorů s delecemi za M1 doménami (viz Obr. 5A). V souladu s předchozími pokusy jsme zjistili, že deletované GluN2A podjednotky nejsou lokalizovány na buněčném povrchu na rozdíl od GluN2B podjednotek (Horak et al., 2008; Qiu et al., 2009). Překvapivě, deletovaná GluN2C podjednotka nebyla exprimovaná na buněčném povrchu podobně jako GluN2A podjednotka (Obr. 5B, C), přestože GluN1-1a/GluN2A receptory vykazují výrazně vyšší povrchovou expresi v porovnání s GluN1-1a/GluN2C receptory (viz Obr. 4B, C). Celková exprese deletovaných GluN2 podjednotek nebyla statisticky rozdílná (ANOVA, $p > 0,05$).

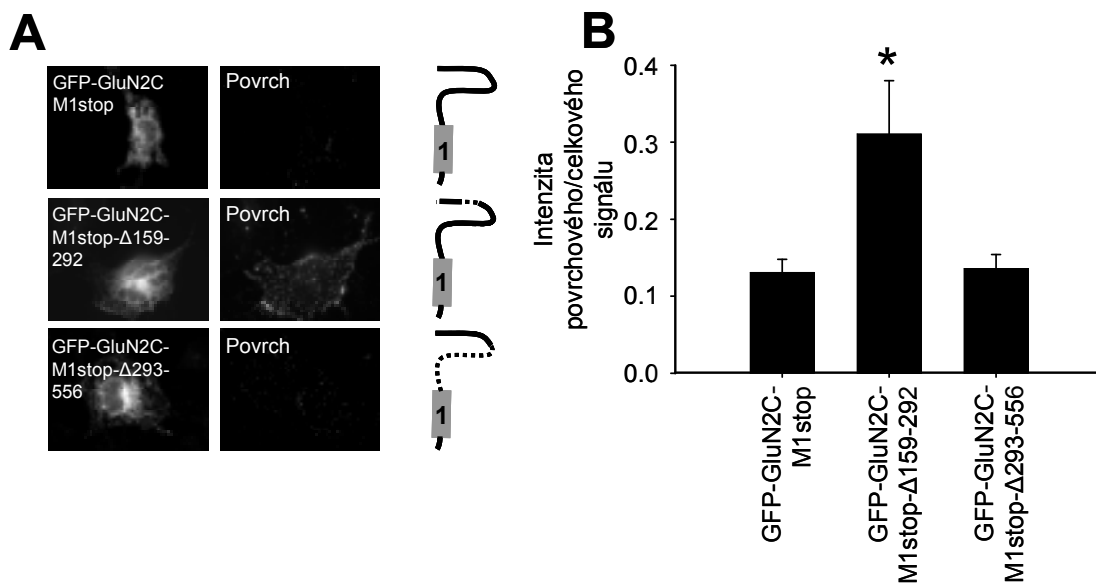


Obr. 5: Vliv delece oblasti za M1 doménou GluN2 podjednotek na povrchovou expresi NMDA receptorů. (A) Schematický náčrt membránové topologie podjednotky NMDA receptoru deletované za M1 doménou. (B) Heterologní COS-7

buňky exprimující GFP-GluN2A-M1stop, GFP-GluN2B-M1stop a GFP-GluN2C-M1stop konstrukty. Buňky byly detekovány metodou imunocytochemického značení protilátkami. Na mikroskopu byly na fixovaných buňkách pořízeny jednotlivé snímky. Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál a pravá část povrchový signál. (C) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu nám ukazuje významný statistický rozdíl v povrchové expresi mutované GluN2B podjednotky (*; $p < 0,05$; ANOVA).

6.3. Vliv vybraných deletovaných oblastí v N-terminální doméně na transport GluN2C podjednotek na buněčný povrch

V našich pokusech jsme zjistili, že N-terminální doména a/nebo M1 doména GluN2C podjednotky obsahuje regulační (pravděpodobně retenční) motiv, který by mohl regulovat transport funkčních NMDA receptorů. Předchozí studie na GluN2A a GluN2B podjednotkách ukázaly, že A2 segment na N-koncové části GluN2A podjednotky obsahuje ER retenční motiv, na rozdíl od GluN2B podjednotky (Qiu et al., 2009). V dalších pokusech jsme se zaměřili na delece v extracelulární N-koncové části GluN2C podjednotky (viz Obr. 6A, B). V porovnání s kontrolou (GluN2C-M1stop) jsme zjistili, že delece aminokyselin 159-292 (A2 segment) na GluN2C podjednotce je kritická pro regulaci transportu deletovaných podjednotek. Naopak delece jiné části N-konce (aminokyseliny 293-556) neovlivnila transport deletovaných GluN2C podjednotek (viz Obr. 6B). Celková exprese deletovaných GluN2 podjednotek nebyla statisticky rozdílná (ANOVA, $p > 0,05$).

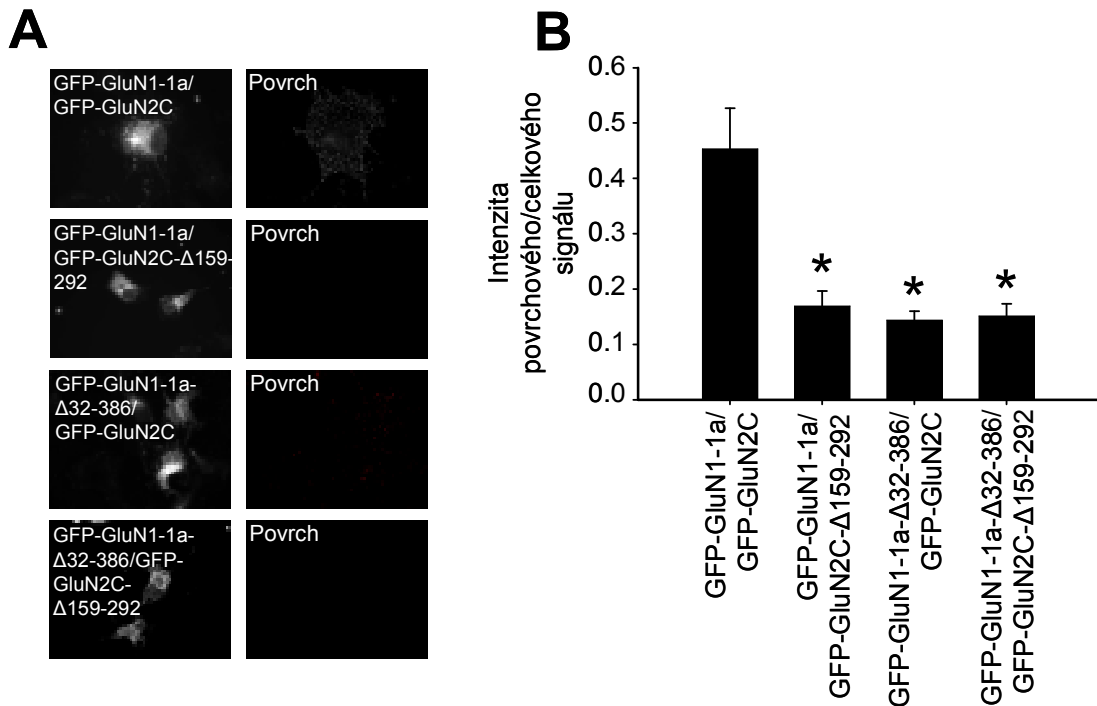


Obr. 6: Vliv delecí N-terminální domény na transport GluN2C podjednotek. (A) Schematické znázornění mutovaných podjednotek NMDA receptorů a snímky fixovaných COS-7 buněk vytvořených na mikroskopu. První dvojice snímků reprezentuje kontrolu (GFP-GluN2C-M1stop). Druhá dvojice demonstruje delecí aminokyselin 159-292 (GFP-GluN2C-M1stop-Δ159-292) a třetí dvojice zobrazuje delecí větší části N-konce, 293-556 (GFP-GluN2C-M1stop-Δ293-556). Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál a pravá část povrchový signál. (B) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu, kde jsme identifikovali statisticky významný rozdíl v povrchové expresi GFP-GluN2C-M1stop-Δ159-292 v porovnání s GFP-GluN2C-M1stop (*; $p < 0,05$; ANOVA).

6.4. Vliv vybraných deletovaných oblastí v N-terminální doméně na transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch

Předchozí studie ukázaly, že A2 segment na N-koncové části GluN2A podjednotky obsahuje ER retenční motiv, na rozdíl od GluN2B podjednotky (Qiu et al., 2009). V předchozím pokusu jsme si ověřili, že N-konec GluN2C podjednotky, konkrétně delece aminokyselin 159-292 podobně jako u GluN2A podjednotky, obsahuje ER retenční motiv, který je důležitý pro transport deletovaných GluN2C podjednotek na buněčný povrch. Dále jsme se zaměřili na studium role N-terminální domény na transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Vytvořili jsme sérii delecí na GluN1-1a a GluN2C podjednotkách. Delece aminokyselin 159-292 v GluN2C podjednotce (GFP-GluN2C-Δ159-292) a delece aminokyselin 32-386 v GluN1 podjednotce (GFP-GluN1-1a-Δ32-386) významně snížila povrchovou expresi GluN1/GluN2C receptorů (ANOVA, $p < 0,05$). K podobnému snížení povrchové exprese

došlo i v případě koexprese obou deletovaných podjednotek (GFP-GluN1-1a- Δ 32-386/GFP-GluN2C- Δ 159-292, viz Obr. 7). Celková exprese kontroly a všech mutovaných konstruktů nevykazovala statisticky významný rozdíl (ANOVA, $p > 0,05$).



Obr. 7: Vliv vybraných deletovaných oblastí v N-terminální doméně na transport GluN1-1a/GluN2C receptorů na buněčný povrch. A) Snímky fixovaných buněk pořízených mikroskopem. Na první dvojici snímků je zobrazena kontrola (GFP-GluN1-1a/GFP-GluN2C), druhá dvojice snímků ukazuje kombinaci nemutované podjednotky a konstruktů s delecí aminokyselin 159-292 v GFP-GluN2C podjednotce (GFP-GluN1-1a/GFP-GluN2C- Δ 159-292), třetí dvojice snímků ukazuje kombinaci konstruktů s delecí aminokyselin 32-386 v GFP-GluN1-1a podjednotce a nemutované GluN2C podjednotky (GFP-GluN1-1a- Δ 32-386/GFP-GluN2C) a čtvrtá dvojice snímků demonstruje kombinaci obou konstruktů s delecí (GFP-GluN1-1a- Δ 32-386/GFP-GluN2C- Δ 159-292). Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál a pravá část povrchový signál. (B) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu se statisticky významným rozdílem v případě všech kombinací konstruktů s delecí v porovnání s kontrolou (*; $p < 0,05$; ANOVA).

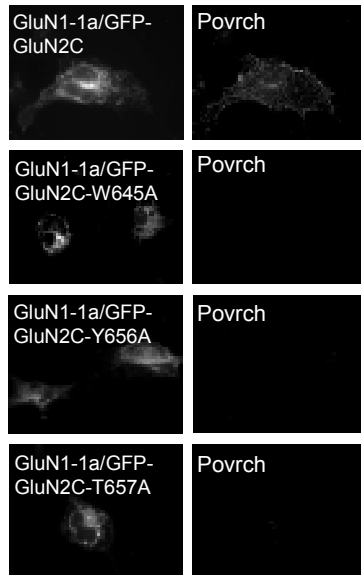
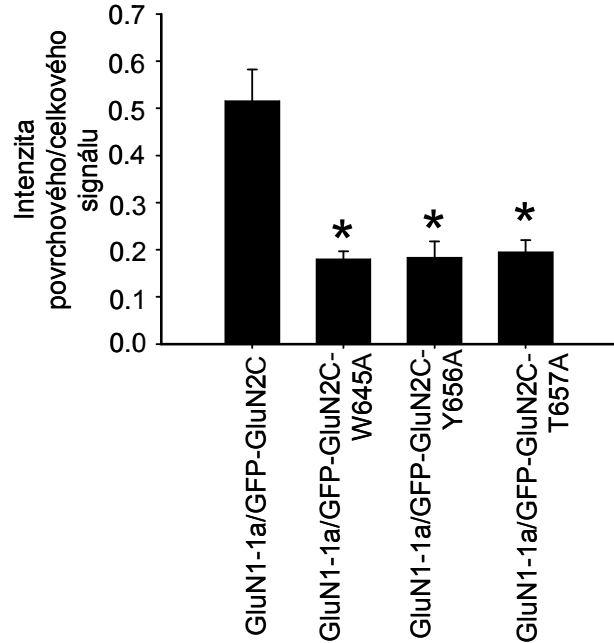
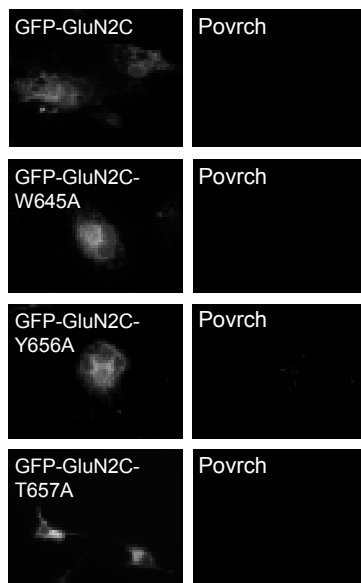
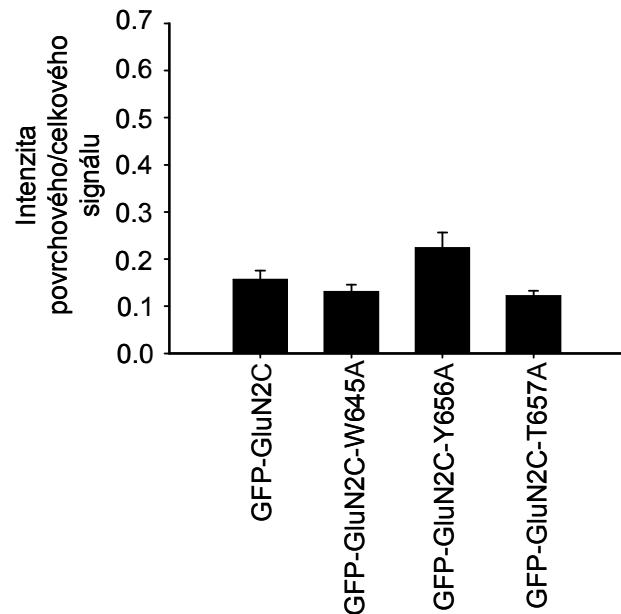
6.5. Vliv mutací v transmembránové doméně na transport GluN2C podjednotky na buněčný povrch

Transmembránové domény hrají v transportu NMDA receptorů důležitou roli. Například bylo ukázáno, že M3 domény GluN1 a GluN2A-B podjednotek se účastní formování funkčních receptorů a regulují uvolňování NMDA receptorů z ER (Kaniakova et al., 2012a). Pro uvolnění NMDA receptorů z ER je kritická i M4 doména na GluN1 podjednotce. V této doméně byl identifikován aminokyselinový zbytek,

L830, odpovědný za transport NMDA receptorů na buněčný povrch (Kaniakova et al., 2012b). V GluN2C podjednotce jsme v oblasti konzervovaného VWAFFAVIFLASYTANLAAF motivu vyrobili tři bodové záměny a koexprimovali je s GluN1-1a podjednotkou. V konstruktu GluN2C-W645A jsme aminokyselinu tryptofan v pozici 645 nahradili alaninem, v konstruktu GluN2C-Y656A jsme tyrosin v pozici 656 nahradili alaninem a v konstruktu GluN2C-T657A jsme threonin 657 nahradili také alaninem (viz Obr. 8A). V našem pokusu jsme zjistili, že všechny tři bodové záměny v M3 doméně způsobily statisticky významný rozdíl povrchové exprese GluN1/GluN2C receptorů (ANOVA, $p < 0,05$) (viz Obr. 8B, C). Následně jsme mutované GluN2C konstrukty exprimovali v heterologních buňkách samostatně, bez přítomnosti GluN1-1a podjednotky. Zjistili jsme, že GluN2C konstrukty s bodovými záměnami nevykazují v porovnání s kontrolou (GFP-GluN2C) statisticky významný rozdíl v povrchové expresi (ANOVA, $p > 0,05$) (viz Obr. 8D, E). Celková exprese všech mutovaných konstruktů i kontrol nebyla statisticky rozdílná (ANOVA, $p > 0,05$).

A

GluN2A M3 633-VWAFFAVIFLASYTANLAAF-652
 GluN2B M3 634-VWAFFAVIFLASYTANLAAF-653
 GluN2C M3 644-VWAFFAVIFLASYTANLAAF-663

B**C****D****E**

Obr. 8: Vliv mutací v transmembránové doméně na transport GluN2C podjednotky na buněčný povrch. (A) Sekvence konzervativního VWAFFAVIFLASYTANLAAF motivu GluN2A, GluN2B a GluN2C podjednotky s podtrženými místy bodových mutací (B) Snímky fixovaných heterologních COS-7

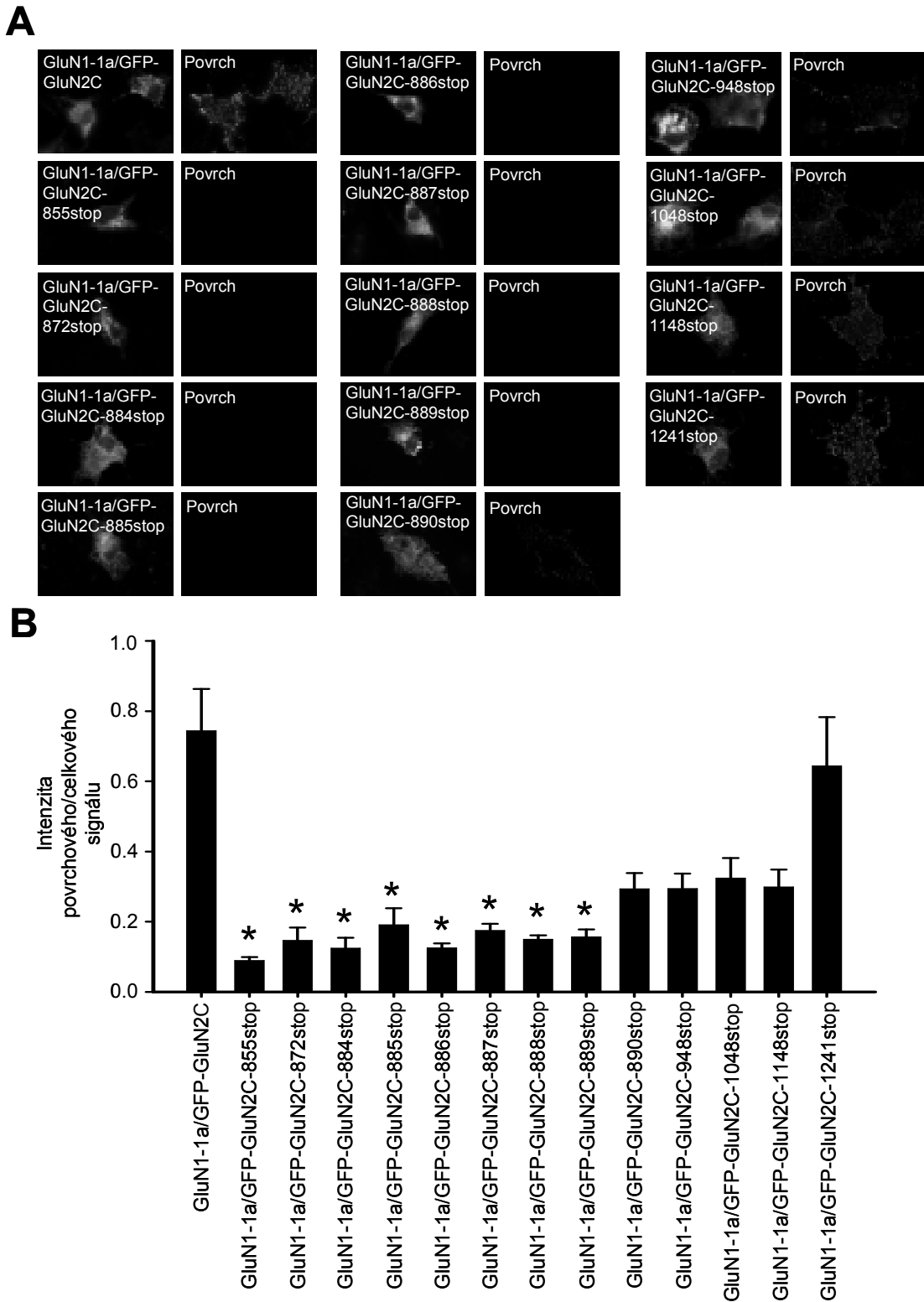
buněk snímaných mikroskopem. Kontrola GluN1-1a/GFP-GluN2C, první záměna v pozici GluN2C-W645A, druhá záměna v pozici GluN2C-Y656A a třetí záměna v pozici GluN2C-T657A. Všechny konstrukty byly koexprimované s nemutovanou GluN1-1a podjednotkou. Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál, pravá část povrchový signál. (C) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu se statisticky významným rozdílem ve všech bodových záměnách oproti kontrole (*; $p < 0,05$; ANOVA). (D) Snímky fixovaných heterologních COS-7 buněk snímaných mikroskopem. Kontrola, GFP-GluN2C a tři konstrukty s aminokyselinovými záměnami (GFP-GluN2C-W645A, GFP-GluN2C-Y656A a GFP-GluN2C-T657A). (E) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu neukázala statisticky významný rozdíl (*; $p > 0,05$; ANOVA).

6.6. Vliv mutací v intracelulární C-terminální doméně na transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch

Intracelulární C-terminální doména obsahuje v případě GluN1 podjednotky dva krátké (KKK a RRR) retenční motivy odpovědné za regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch (Horak and Wenthold, 2009). GluN2A i GluN2B podjednotky pravděpodobně také obsahují ER retenční motiv na C-terminální doméně (Hawkins et al., 2004; Yang et al., 2007). Tato zjištění nás vedla k pokusům objasnit funkci C-terminální domény v transportu GluN2C podjednotek.

Nejdříve jsme vyrobili GluN2C konstrukt s delecí za M4 doménou (GFP-GluN2C-855stop) a konstrukt s delecí posledních deseti aminokyselin (GFP-GluN2C-1241stop) na C-terminální doméně. Tyto konstrukty jsme koexprimovali v heterologních COS-7 buňkách s GluN1-1a podjednotkou. Zjistili jsme, že konstrukt GFP-GluN2C-855stop vykazoval statisticky významné snížení povrchové exprese v porovnání s kontrolou GluN1-1a/GFP-GluN2C, zatímco konstrukt GFP-GluN2C-1241stop statisticky významný rozdíl povrchové exprese proti kontrole nevykazoval. Následně jsme na základě předešlých výsledků vytvořili sérii konstruktů s delecemi na různých místech C-terminální domény (GFP-GluN2C-872stop, GFP-GluN2C-884stop, GFP-GluN2C-885stop, GFP-GluN2C-886stop, GFP-GluN2C-887stop, GFP-GluN2C-888stop, GFP-GluN2C-889stop, GFP-GluN2C-890stop, GFP-GluN2C-948stop, GFP-GluN2C-1048stop a GFP-GluN2C-1148stop) a koexprimovali je s GluN1-1a podjednotkou (viz Obr. 9). Analýza výsledků povrchové exprese takto deletovaných podjednotek NMDA receptorů ukázala, že konstrukty GFP-GluN2C-884stop až GFP-GluN2C-889stop vykazovaly statisticky významný rozdíl povrchové exprese NMDA receptorů, na rozdíl od konstruktů GFP-GluN2C-890stop až GFP-GluN2C-1148stop, které statistický rozdíl povrchové exprese nevykazovaly. Celková exprese kontroly

(GluN1-1a/GFP-GluN2C) a ostatních konstruktů s delecí nevykazovala statisticky významný rozdíl (ANOVA, $p > 0,05$).



Obr. 9: Vliv mutací v intracelulární C-terminální doméně na transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch. (A) Snímky byly pořízeny na fixovaných heterologních COS-7 buňkách kotransfekovaných GluN1-1a podjednotkou

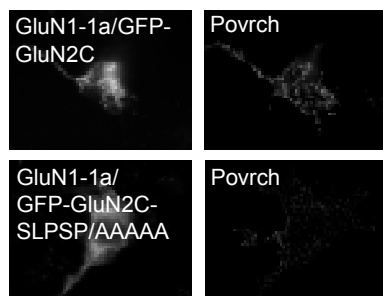
a sérií konstruktů s delecemi na různých místech C-terminální domény GluN2C podjednotky. Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál, pravá část reprezentuje povrchový signál. (B) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu v porovnání s kontrolou (GluN1-1a/GFP-GluN2C) ukázala snížení povrchové exprese (*; $p < 0,05$; ANOVA) u konstruktů GluN2C-855stop až GluN2C-889stop.

Předcházející pokusy nám pomohly zúžit pravděpodobnou lokalizaci regulačního signálu na C-terminální doméně GluN2C podjednotky. V dalších pokusech jsme v této kritické oblasti nahradili pět aminokyselin, SLPSP, za alaniny (GFP-GluN2C-SLPSP/AAAAA). Tento konstrukt jsme koexprimovali v heterologních COS-7 buňkách s GluN1-1a podjednotkou (viz Obr. 10) a stanovili jsme míru jeho povrchové exprese, která byla významně nižší v porovnání s kontrolou. Celková exprese kontroly i mutovaného konstruktů nevykazovala statisticky významný rozdíl (t-test, $p > 0,05$).

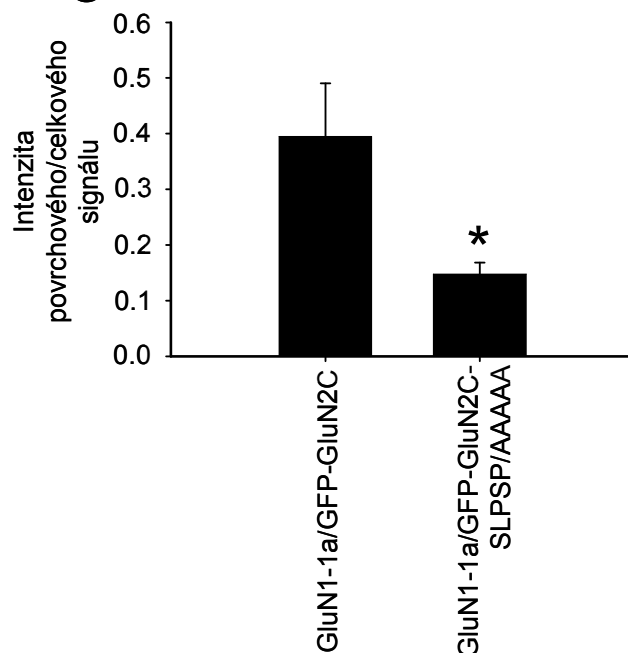
A

GluN2C 871 - AFSRGIYSCFNGVQSLPSPARPP - 893

B



C



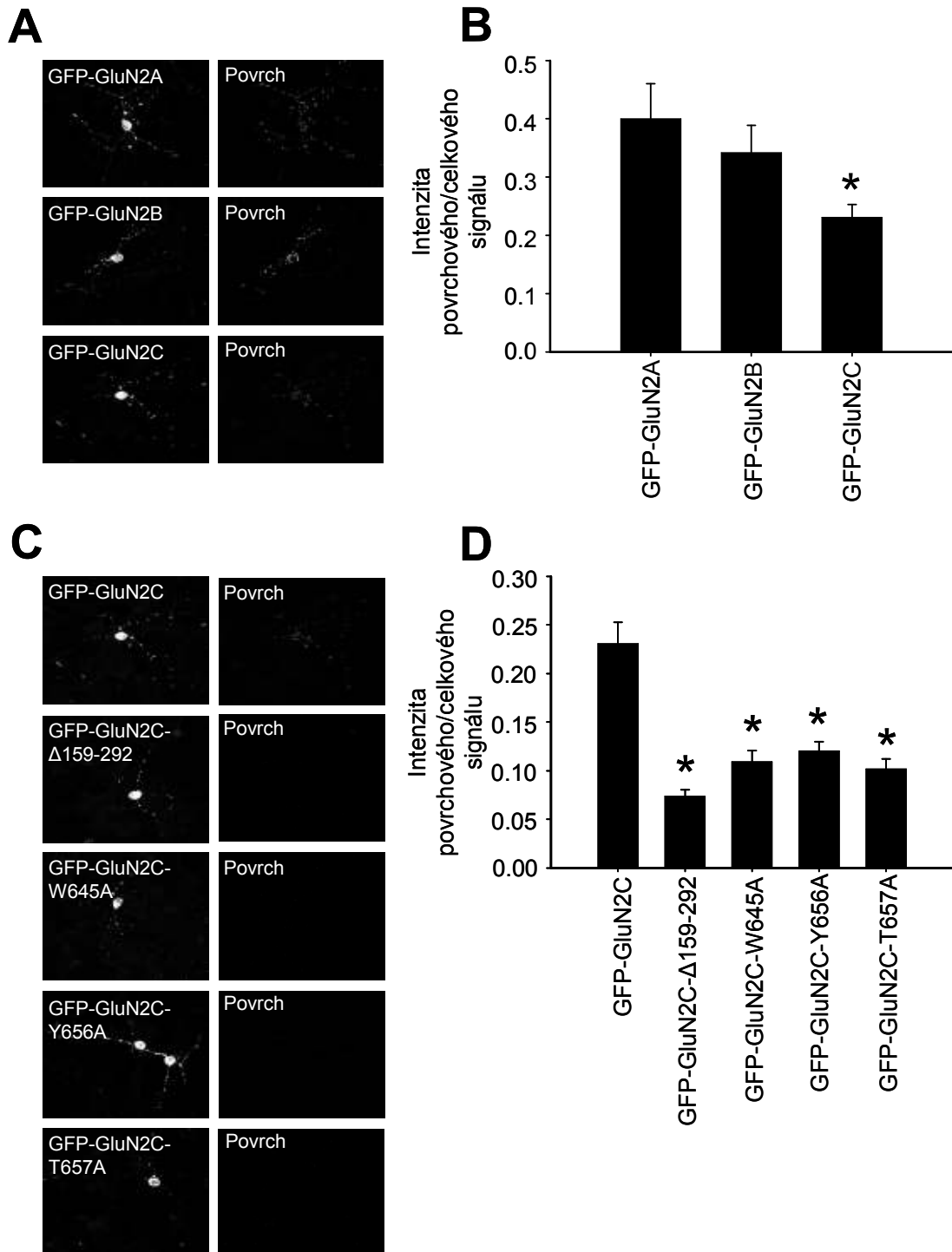
Obr. 10: Vliv vybrané sekvence SLPSP na transport GluN2C podjednotky na buněčný povrch. (A) Část sekvence GluN2C podjednotky. Aminokyseliny SLPSP zaměněné za alaniny jsou podtržené. (B) Snímky byly pořízeny na fixovaných heterologních COS-7 buňkách kotransfekovaných nemutovanou GluN1-1a a GFP-GluN2C podjednotkou a mutovaným konstruktem GFP-GluN2C-SLPSP/AAAAA. Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál a pravá část povrchový signál. (C) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu ukazuje statisticky významný rozdíl v povrchové expresi kontroly a mutovaného konstruktů (*; $p < 0,05$; t-test).

6.7. Vliv jednotlivých oblastí GluN2C podjednotky na transport NMDA receptorů v neuronech

Nakonec jsme chtěli zjistit, zda-li tři specifické oblasti GluN2C podjednotky, které jsme identifikovali použitím heterologních COS-7 buněk v předchozích pokusech, rovněž regulují transport GluN2C podjednotek v neuronech. Jako modelový neuron jsme zvolili granulární mozečkové neurony, neboť tyto buňky jsou relativně lehce identifikovatelné díky své typické morfologii (viz Obr. 11A, C).

Abychom identifikovali rozdíly v regulaci jednotlivých typů NMDA receptorů, vzájemně jsme nejdříve porovnali povrchovou expresi jednotlivých GluN2A, GluN2B a GluN2C podjednotek exprimovaných v CGC kulturách (viz Obr. 11A, B). Zjistili jsme, že GluN2C podjednotka vykazuje statisticky nižší povrchovou expresi v porovnání s GluN2A-B podjednotkami, což ukazuje, že GluN2C podjednotka má (na rozdíl od GluN2A a GluN2B podjednotek) odlišné regulační mechanismy transportu na buněčný povrch v obou typech buněk (COS-7 i CGC).

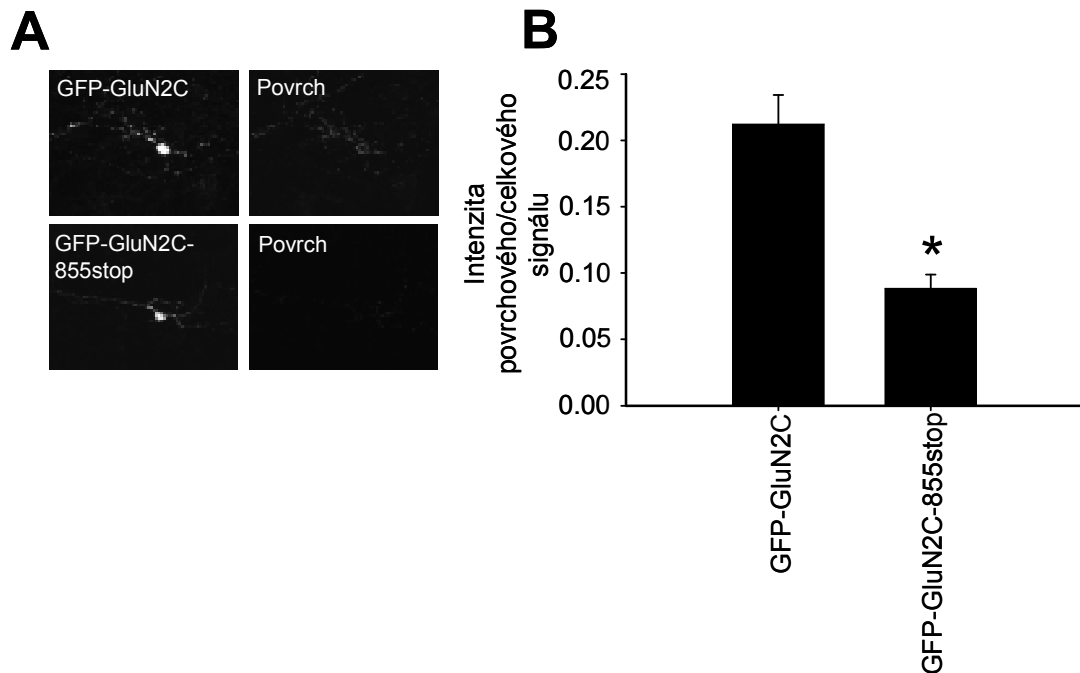
V dalším pokusu jsme CGC kultury transfekovali konstrukty GFP-GluN2C- Δ 159-292, GFP-GluN2C-W645A, GFP-GluN2C-Y656A a GFP-GluN2C-T657A (viz Obr. 11C, D). Naše analýza transfekovaných neuronů ukázala statisticky významné snížení povrchové exprese všech těchto GluN2C mutovaných konstruktů v porovnání s kontrolou (GFP-GluN2C). Celková exprese kontroly i mutovaných konstruktů nevykazovala statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$; ANOVA).



Obr. 11: Vliv vybraných mutací na transport NMDA receptorů na neuronální povrch. (A) Snímky pořízeny na fixovaných mozečkových granulárních neuronech transfekovaných GluN2A, GluN2B, GluN2C podjednotkami. Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál a pravá část povrchový signál. (B) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu ukázala statisticky významný rozdíl mezi povrchovou expresí GFP-GluN2A, GluN2B a GFP-GluN2C podjednotkou (*; $p < 0,05$; ANOVA). (C) Snímky fixovaných granulárních mozečkových neuronů exprimovaných kontrolou (GFP-GluN2C), konstruktem s delecí aminokyselin 159-292 (GFP-GluN2C- Δ 159-292) a konstrukty s bodovou záměnou GFP-GluN2C-W645A, GFP-GluN2C-Y656A a GFP-GluN2C-T657A. Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál a

pravá část povrchový signál. (D) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu ukazuje statisticky významný rozdíl povrchové exprese mezi kontrolou a ostatními konstrukty (*; $p < 0,05$; ANOVA).

V posledním pokusu jsme exprimovali v CGC kulturách konstrukty GFP-GluN2C a GFP-GluN2C-855stop (viz Obr. 12). Zjistili jsme statisticky významné snížení povrchové exprese konstruktu GFP-GluN2C-855stop. Celková exprese kontroly a mutovaného konstruktu nebyla statisticky významná (t-test, $p > 0,05$).



Obr. 12: Vliv delece za M4 doménou na transport GluN2C podjednotky na neuronální povrch. (A) Snímky pořízeny na fixovaných granulárních mozečkových neuronech transfekovaných nemutovanou GFP-GluN2C podjednotkou (kontrola) a mutovaným konstruktem GFP-GluN2C-855stop. Levá část snímků reprezentuje celkový GFP signál a pravá část povrchový signál. (B) Kvantifikace intenzity povrchového/celkového signálu ukazuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolou, GFP-GluN2C a konstruktem GFP-GluN2C-855stop (*; $p < 0,05$; t-test).

7. Diskuze

7.1. Vliv GluN2 podjednotek na povrchovou expresi NMDA receptorů

Předchozí studie ukázaly, že GluN2A a GluN2B podjednotky jsou v nepřítomnosti GluN1 podjednotky lokalizovány v ER (McIlhinney et al., 1998; Horak et al., 2008) a že na buněčném povrchu jsou exprimovány pouze správně zformované heteromerické GluN1/GluN2 receptory (Okabe et al., 1999; Perez-Otano et al., 2001; Fukaya et al., 2003). Podobný závěr vyplývá i z našich pokusů, kdy jsme samostatně exprimovali GluN2C podjednotku či funkční GluN1/GluN2C receptory (Obr. 4). Lze předpokládat, že ER retenční motivy kritické pro povrchovou expresi, umístěné jak na GluN1, tak i na GluN2A, GluN2B a GluN2C podjednotkách, jsou v kvartérní struktuře receptoru maskovány a zamezují tak exportu z ER nesprávně zformovaným receptorům.

V našich pokusech jsme nejdříve studovali podjednotkově vázané rozdíly v povrchové expresi jednotlivých typů NMDA receptorů (GluN1/GluN2A-C) exprimovaných v heterologních buňkách a neuronech (viz Obr. 4B, C a Obr. 11A, B). V předchozích studiích bylo ukázáno, že přítomnost GluN2A podjednotky zvyšuje povrchovou expresi NMDA receptorů v heterologních buňkách v porovnání s receptory obsahujícími GluN2B podjednotku (Chen et al., 1999). Toto pozorování je v souladu s našimi výsledky, které ukazují rozdíl v povrchové expresi GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů exprimovaných v COS-7 buňkách (Obr. 4A, B). Proč jsme podobný rozdíl v povrchové expresi GluN2A a GluN2B podjednotek nepozorovali i v neuronech (Obr. 11)? Nejpravděpodobnějším vysvětlením je přítomnost nativních GluN2A a GluN2B podjednotek, které mohou ovlivnit transport rekombinantních podjednotek (Xia et al., 2001). Rovněž nemůžeme vyloučit vliv různých nativních sestřihových variant GluN1 podjednotky (McIlhinney et al., 1998) či některého typu GluN3 podjednotky (Ulbrich and Isacoff, 2008) na biogenezi a transport rekombinantních podjednotek NMDA receptoru. Dále jsme zjistili, že NMDA receptory obsahující GluN2C podjednotky jsou v obou typech buněk (heterologních i neuronech) lokalizovány na buněčném povrchu ve výrazně nižším množství než receptory obsahující GluN2A a GluN2B podjednotky. Tento výsledek ukazuje, že GluN2C podjednotka specifickým způsobem reguluje povrchové množství funkčních NMDA receptorů v savčím CNS.

7.2. Vliv N-terminální domény GluN2 podjednotek na povrchovou expresi NMDA receptorů

Dále jsme studovali, která oblast GluN2C podjednotky je důležitá pro regulaci transportu GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Předchozí studie ukázala, že A2 segment na N-koncové části GluN2A podjednotky obsahuje ER retenční motiv, na rozdíl od GluN2B podjednotky (Qiu et al., 2009). Nejdříve jsme vzájemně porovnali jednotlivé GluN2A, GluN2B a GluN2C podjednotky s deletovanými oblastmi za M1 doménami (viz Obr. 5). V souladu s předchozími studiemi jsme zjistili, že deletované GluN2A podjednotky nejsou lokalizovány na buněčném povrchu na rozdíl od GluN2B podjednotek (Horak et al., 2008; Qiu et al., 2009). V našich pokusech jsme dále překvapivě zjistili, že podobně jako GluN2A podjednotka nebyla ani deletovaná GluN2C podjednotka exprimovaná na buněčném povrchu, přestože nemutované GluN1/GluN2A receptory vykazují výrazně vyšší povrchovou expresi v porovnání s GluN1/GluN2C receptory. Z toho vyplývá, že GluN2A i GluN2C podjednotka pravděpodobně obsahuje v N-terminální a/nebo M1 doméně specifický signál důležitý pro regulaci povrchové exprese NMDA receptorů.

Nakonec jsme se zaměřili na objasnění role N-terminální a M1 domény GluN2C podjednotky v regulaci transportu funkčních NMDA receptorů na buněčný povrch. Zjistili jsme, že oblast s delecí 159-292 aminokyselin v GluN2C podjednotce či oblast s delecí 32-386 aminokyselin v GluN1 podjednotce, se kterou GluN2C podjednotka interaguje (Sobolevsky et al., 2009), jsou v obou případech nezbytné pro normální transport NMDA receptorů na buněčný povrch v heterologních buňkách i neuronech (viz Obr. 6, 7 a Obr. 11C, D). Toto pozorování je v souladu s pokusy na GluN2A podjednotce (Qiu et al., 2009). Na základě těchto zjištění se domníváme, že specifické interakce mezi GluN1 a GluN2A a GluN1 a GluN2C podjednotkami kritickým způsobem regulují transport těchto typů NMDA receptorů na buněčný povrch.

7.3. Vliv transmembránových domén na povrchovou expresi NMDA receptorů

Nedávné studie prokázaly, že membránové domény hrají důležitou roli v regulaci transportu NMDA receptorů na povrch buňky. Například, M3 domény jsou kritické struktury důležité pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch (Horak et al., 2008). Tato studie dále prokázala, že specifické uspořádání M3 domén v GluN1 a

GluN2B podjednotkách je nezbytné k zadržení samostatně exprimovaných podjednotek v ER a maskování ER retenčních signálů je pravděpodobně způsobeno interakcí mezi M3 doménou GluN2A nebo GluN2B podjednotky a M4 doménou GluN1 podjednotky. Dále bylo zjištěno, že M3 doména GluN1 (W636, Y647 a T648) i GluN2B (W635, S645 a Y646) podjednotek obsahuje klíčové aminokyselinové zbytky, důležité pro regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch (Kaniakova et al., 2012a). Kromě těchto klíčových míst, existují i jiné oblasti důležité pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch, a to C1 kazeta na C-terminální doméně některých sestříhových variant GluN1 podjednotky (Standley et al., 2000; Horak and Wenthold, 2009) a signál na C-terminální doméně GluN2B podjednotky (Hawkins et al., 2004). Je pravděpodobné, že transportní signály v M3 doméně GluN1 i GluN2B podjednotek jsou nadřazené ER retenčním signálům v C-terminálních doménách. Tato teorie je podporována skutečností, že podjednotky NMDA receptorů s deletovanou C-terminální doménou mohou formovat funkční receptory, zatímco jiné oblasti C-terminální domény regulují interakci podjednotek a transport funkčních NMDA receptorů (Vissel et al., 2001; Horak et al., 2008).

Dále bylo zjištěno, že M4 doména GluN1 podjednotky obsahuje tři aminokyselinové zbytky, které jsou důležité pro povrchovou expresi NMDA receptorů s deletovanou C-terminální doménou. Pro povrchovou expresi nedeletovaných GluN1/GluN2A i GluN1/GluN2B receptorů se ukázala jako kritická přítomnost pouze jednoho z těchto aminokyselinových zbytků, L830, který se podílí na maskování ER retenčních motivů a/nebo regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch. Je zajímavé, že přítomnost nebo nepřítomnost C-terminální domény GluN1-1a podjednotky neovlivňuje snížení povrchové exprese NMDA receptorů s aminokyselinovou záměnou L830A. To naznačuje, že C-terminální doména a M4 doména GluN1 podjednotky regulují transport NMDA receptorů na buněčný povrch odlišným mechanismem (Kaniakova et al., 2012b).

Abychom ověřili, zda M3 doména reguluje i transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch, vytvořili jsme tři bodové záměny aminokyselin v konzervovaném VWAFFAVIFLASYTANLAAF motivu M3 domény v GluN2C podjednotce (viz Obr. 8A). Zjistili jsme, že tyto aminokyseliny jsou kritické pro regulaci transportu GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch, podobně jako u GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B receptorů. Tyto výsledky ukazují, že narušení integrity M3 domény, je pro regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch kritické (viz Obr. 8 a Obr.

11C, D).

7.4. Vliv C-terminální domény na povrchovou expresi NMDA receptorů

C-terminální doména GluN1 i GluN2 podjednotek obsahuje několik retenčních i exportních signálů. V předchozích studiích bylo zjištěno, že GluN1 podjednotka obsahuje na intracelulární C-terminální doméně dva krátké retenční motivy, RRR a KKK (Standley et al., 2000; Scott et al., 2001; Xia et al., 2001; Ryan et al., 2008; Horak and Wenthold, 2009). GluN2A a GluN2B podjednotky také ve své C-terminální doméně pravděpodobně obsahují ER retenční motivy (Hawkins et al., 2004; Yang et al., 2007). Studie na transgenních myších prokázaly, že C-terminální doména GluN2 podjednotek je kritická pro transport NMDA receptorů na buněčný povrch (Mori et al., 1998; Sprengel et al., 1998; Steigerwald et al., 2000). Tato zjištění nás proto vedla k pokusům objasnit funkci C-terminální domény v transportu i u GluN2C podjednotky. Podařilo se nám zjistit, že delece za M4 doménou (GFP-GluN2C-855stop) je pro transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch kritická a tato oblast pravděpodobně obsahuje ER retenční motiv a/nebo exportní signál. Sekvence posledních deseti aminokyselin C-terminální domény obsahuje PDZ vazebnou doménu, která je nesmírně důležitá pro interakci s ostatními proteiny včetně PSD-93, PSD-95 a SAP102 (Garner et al., 2000; Sheng, 2001; Tomita et al., 2001) a pro transport GluN1/GluN2A nebo GluN1/GluN2B receptorů na povrch buňky (Bard et al., 2010; Standley et al., 2012). Zjistili jsme, že delece PDZ vazebné domény v GluN2C podjednotce (GFP-GluN2C-1241stop) na rozdíl od GluN1-1a/GluN2A a GluN1-1a/GluN2B receptorů neovlivňuje transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch (viz Obr. 9).

Sérií dalších delecí se nám podařilo identifikovat sekvenci pěti aminokyselin (SLPSP), které v regulaci povrchové exprese GluN1/GluN2C receptorů hrají významnou roli (viz Obr. 9, 10). Jak již bylo zmíněno dříve, GluN1 podjednotka obsahuje na C-terminální doméně dva krátké ER retenční motivy (RRR a KKK), GluN2A i GluN2B podjednotky také obsahují ER retenční motivy. Tyto motivy se mohou vzájemně maskovat a regulovat tak zadržování receptorů v ER. GluN2A i GluN2B podjednotka má v oblasti výskytu sekvence SLPSP u GluN2C podjednotky odlišné sekvence aminokyselin (viz Obr. 13). To nasvědčuje tomu, že tato sekvence aminokyselin u GluN2C podjednotky specificky reguluje transport GluN1-1a/GluN2C

receptorů na buněčný povrch, což by mohlo vysvětlit odlišnou regulaci povrchové exprese GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B i GluN1/GluN2C receptorů.

GluN2A	872-HGVH	IEEKKK	----884
GluN2B	873-HGVA	IEERQS	SVMN-885
GluN2C	881-NGVQ	SLPSP	ARPP-893

Obr. 13: Sekvence vybraných oblastí GluN2A, GluN2B a GluN2C podjednotky. Oblast výskytu sekvence SLPSP u GluN2C podjednotky a stejné oblasti u GluN2A a GluN2B podjednotky jsou orámované (Ishii et al., 1993).

8. Závěr

✓ Podařilo se nám ukázat, že GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B a GluN1/GluN2C receptory vykazují rozdílnou povrchovou expresi v heterologních buňkách i neuronech. Předpokládáme, že GluN2 podjednotky mají klíčový význam v regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch.

✓ V dalších pokusech jsme objasnili význam delece aminokyselin 159-292 v N-koncové části GluN2C podjednotky, která je klíčová pro regulaci povrchové exprese NMDA receptorů. Nepřítomnost těchto aminokyselin nebo nepřítomnost komplementární oblasti v GluN1 podjednotce má pravděpodobně za následek nedostatečné maskování ER retenčního motivu na GluN2C podjednotce, což má přímý vliv na regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch.

✓ Pomocí bodových záměn tří aminokyselin v M3 doméně GluN2C podjednotky jsme prokázali, že narušení integrity M3 domény v GluN2C podjednotkách je pro regulaci transportu NMDA receptorů kritické, jelikož téměř nedochází k povrchové expresi takto mutovaných receptorů.

✓ Delece téměř celé C-terminální domény GluN2C podjednotky ukázala, že tato doména obsahuje motivy důležité pro regulaci transportu NMDA receptorů na buněčný povrch. Delece posledních deseti aminokyselin (tzv. PDZ vazebná doména) C-terminální domény neovlivnila transport GluN1/GluN2C receptorů na buněčný povrch. Zkoumáním úlohy C-terminální domény v GluN2C podjednotce se nám podařilo identifikovat specifické místo (SLPSP) důležité pro regulaci transportu GluN1/GluN2C receptorů. Tento motiv je výrazně odlišný od sekvence v GluN2A a GluN2B podjednotce, což může vysvětlit podjednotkově vázaný rozdíl v povrchové expresi jednotlivých typů NMDA receptorů.

Výsledky naší práce objasnily především mechanismy regulace povrchové exprese GluN1-1a/GluN2C receptorů v savčích neuronech a přispěli tak k možnému porozumění vzniku různých psychiatrických a neurologických onemocnění spojených s abnormální regulací NMDA receptorů, jako je Alzheimerova a Parkinsonova demence, Huntingtonova nemoc, epilepsie, deprese, schizofrenie, ischemie či závislost na kokainu.

Naše další pokusy budou zaměřeny na identifikování vazebných partnerů na jednotlivých regulačních motivech (ER retenčních i exportních) NMDA receptorů a na objasnění dalších důležitých mechanismů regulace transportu NMDA receptorů na buněčný povrch, jako je například *N*-glykosylace. Naše pilotní pokusy ukázaly, že existují významná *N*-glykosylační místa na GluN1 a GluN2 podjednotkách, která regulují povrchovou expresi NMDA receptorů. Znalost těchto mechanismů bude nepochybně velice užitečná při objasňování mechanismů vzniku zmíněných neurologických a psychiatrických onemocnění.

9. Použitá literatura

- Aridor, M., Guzik, A. K., Bielli, A. and Fish, K. N.** (2004): Endoplasmic reticulum export site formation and function in dendrites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 3770-6.
- Atlason, P. T., Garside, M. L., Meddows, E., Whiting, P. and McIlhinney, R. A.** (2007): N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor. *The Journal of biological chemistry* 282, 25299-307.
- Bard, L., Sainlos, M., Bouchet, D., Cousins, S., Mikasova, L., Breillat, C., Stephenson, F. A., Imperiali, B., Choquet, D. and Groc, L.** (2010): Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19561-6.
- Beck, C., Wollmuth, L. P., Seeburg, P. H., Sakmann, B. and Kuner, T.** (1999): NMDAR channel segments forming the extracellular vestibule inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 22, 559-70.
- Blanke, M. L. and VanDongen, A. M. J.** (2009): Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In *Biology of the NMDA Receptor* (Van Dongen, A. M., ed.), Boca Raton (FL).
- Bressloff, P. C.** (2006): Stochastic model of protein receptor trafficking prior to synaptogenesis. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* 74, 031910.
- Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J. and Spedding, M.** (2009): A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56, 2-5.
- Crump, F. T., Dillman, K. S. and Craig, A. M.** (2001): cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 5079-88.
- Cull-Candy, S., Brickley, S. and Farrant, M.** (2001): NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current opinion in neurobiology* 11, 327-35.
- Curtis, D. R., Phillis, J. W. and Watkins, J. C.** (1960): The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *The Journal of physiology* 150, 656-82.

- Curtis, D. R. and Watkins, J. C.** (1963): Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *The Journal of physiology* 166, 1-14.
- Curtis, D. R. and Watkins, J. C.** (1961): Analogues of glutamic and gamma-amino-n-butyric acids having potent actions on mammalian neurones. *Nature* 191, 1010-1.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. and Traynelis, S. F.** (1999): The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews* 51, 7-61.
- Doraiswamy, P. M.** (2003): The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in Alzheimer's disease: therapeutic potential. *Current neurology and neuroscience reports* 3, 373-8.
- Fan, M. M. and Raymond, L. A.** (2007): N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Progress in neurobiology* 81, 272-93.
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgado, M., Vazquez-Valls, E., Gonzalez-Castaneda, R. E. and Beas-Zarate, C.** (2012): [Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]. *Neurologia* 27, 301-10.
- Fukaya, M., Kato, A., Lovett, C., Tonegawa, S. and Watanabe, M.** (2003): Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4855-60.
- Furukawa, H. and Gouaux, E.** (2003): Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *The EMBO journal* 22, 2873-85.
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R. and Gouaux, E.** (2005): Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438, 185-92.
- Garner, C. C., Nash, J. and Haganir, R. L.** (2000): PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends in cell biology* 10, 274-80.
- Grossman, S. D., Rosenberg, L. J. and Wrathall, J. R.** (2001): Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Experimental neurology* 168, 273-82.
- Hawkins, L. M., Prybylowski, K., Chang, K., Moussan, C., Stephenson, F. A. and Wenthold, R. J.** (2004): Export from the endoplasmic reticulum of assembled N-methyl-d-aspartic acid receptors is controlled by a motif in the c terminus of the NR2 subunit. *The Journal of biological chemistry* 279, 28903-10.

- Hayashi, T., Thomas, G. M. and Huganir, R. L.** (2009): Dual palmitoylation of NR2 subunits regulates NMDA receptor trafficking. *Neuron* 64, 213-26.
- Hillman, B. G., Gupta, S. C., Stairs, D. J., Buonanno, A. and Dravid, S. M.** (2011): Behavioral analysis of NR2C knockout mouse reveals deficit in acquisition of conditioned fear and working memory. *Neurobiology of learning and memory* 95, 404-14.
- Hollmann, M., Boulter, J., Maron, C., Beasley, L., Sullivan, J., Pecht, G. and Heinemann, S.** (1993): Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10, 943-54.
- Holmes, K. D., Mattar, P. A., Marsh, D. R., Weaver, L. C. and Dekaban, G. A.** (2002): The N-methyl-D-aspartate receptor splice variant NR1-4 C-terminal domain. Deletion analysis and role in subcellular distribution. *The Journal of biological chemistry* 277, 1457-68.
- Horak, M., Chang, K. and Wenthold, R. J.** (2008): Masking of the endoplasmic reticulum retention signals during assembly of the NMDA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 3500-9.
- Horak, M. and Wenthold, R. J.** (2009): Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 284, 9683-91.
- Horton, A. C. and Ehlers, M. D.** (2004): Secretory trafficking in neuronal dendrites. *Nature cell biology* 6, 585-91.
- Chen, B. S., Braud, S., Badger, J. D., 2nd, Isaac, J. T. and Roche, K. W.** (2006): Regulation of NR1/NR2C N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 281, 16583-90.
- Chen, B. S. and Roche, K. W.** (2009): Growth factor-dependent trafficking of cerebellar NMDA receptors via protein kinase B/Akt phosphorylation of NR2C. *Neuron* 62, 471-8.
- Chen, H. S. and Lipton, S. A.** (2006): The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of neurochemistry* 97, 1611-26.
- Chen, N., Luo, T. and Raymond, L. A.** (1999): Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 6844-54.
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M. and et al.** (1993):

- Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *The Journal of biological chemistry* 268, 2836-43.
- Johnson, J. W. and Ascher, P.** (1987): Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529-31.
- Kadotani, H., Hirano, T., Masugi, M., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M. and Nakanishi, S.** (1996): Motor discoordination results from combined gene disruption of the NMDA receptor NR2A and NR2C subunits, but not from single disruption of the NR2A or NR2C subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 7859-67.
- Kaniakova, M., Krausova, B., Vyklicky, V., Korinek, M., Lichnerova, K., Vyklicky, L. and Horak, M.** (2012a): Key amino acid residues within the third membrane domains of NR1 and NR2 subunits contribute to the regulation of the surface delivery of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of biological chemistry* 287, 26423-34.
- Kaniakova, M., Lichnerova, K., Vyklicky, L. and Horak, M.** (2012b): Single amino acid residue in the M4 domain of GluN1 subunit regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Journal of neurochemistry* 123, 385-95.
- Kenny, A. V., Cousins, S. L., Pinho, L. and Stephenson, F. A.** (2009): The integrity of the glycine co-agonist binding site of N-methyl-D-aspartate receptors is a functional quality control checkpoint for cell surface delivery. *The Journal of biological chemistry* 284, 324-33.
- Kleckner, N. W. and Dingledine, R.** (1988): Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241, 835-7.
- Kohr, G.** (2006): NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell and tissue research* 326, 439-46.
- Kuner, T., Wollmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. H. and Sakmann, B.** (1996): Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17, 343-52.
- Lan, J. Y., Skeberdis, V. A., Jover, T., Grooms, S. Y., Lin, Y., Araneda, R. C., Zheng, X., Bennett, M. V. and Zukin, R. S.** (2001): Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nature neuroscience* 4, 382-90.
- Lang, A. E. and Lozano, A. M.** (1998): Parkinson's disease. First of two parts. *The New England journal of medicine* 339, 1044-53.

- Lee, S. H., Valtschanoff, J. G., Kharazia, V. N., Weinberg, R. and Sheng, M.** (2001): Biochemical and morphological characterization of an intracellular membrane compartment containing AMPA receptors. *Neuropharmacology* 41, 680-92.
- Lerma, J., Zukin, R. S. and Bennett, M. V.** (1990): Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2354-8.
- Li, B., Chen, N., Luo, T., Otsu, Y., Murphy, T. H. and Raymond, L. A.** (2002): Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors. *Nature neuroscience* 5, 833-4.
- Lu, C., Fu, Z., Karavanov, I., Yasuda, R. P., Wolfe, B. B., Buonanno, A. and Vicini, S.** (2006): NMDA receptor subtypes at autaptic synapses of cerebellar granule neurons. *Journal of neurophysiology* 96, 2282-94.
- Luo, J. H., Fu, Z. Y., Losi, G., Kim, B. G., Prybylowski, K., Vissel, B. and Vicini, S.** (2002): Functional expression of distinct NMDA channel subunits tagged with green fluorescent protein in hippocampal neurons in culture. *Neuropharmacology* 42, 306-18.
- Lynch, M. A.** (2004): Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews* 84, 87-136.
- Malenka, R. C.** (2009): *Intercellular communication in the nervous system*, Elsevier, Boston, MA.
- Marshall, J., Molloy, R., Moss, G. W., Howe, J. R. and Hughes, T. E.** (1995): The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 14, 211-5.
- Matsuda, K., Fletcher, M., Kamiya, Y. and Yuzaki, M.** (2003): Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 10064-73.
- McIlhinney, R. A., Le Bourdelles, B., Molnar, E., Tricaud, N., Streit, P. and Whiting, P. J.** (1998): Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. *Neuropharmacology* 37, 1355-67.

- McLennan, H., Hicks, T. P. and Hall, J. G.** (1981): Receptors for the excitatory amino acids. *Advances in biochemical psychopharmacology* 29, 213-21.
- Meddows, E., Le Bourdelles, B., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P. and McIlhinney, R. A.** (2001): Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of biological chemistry* 276, 18795-803.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. and Seeburg, P. H.** (1992): Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256, 1217-21.
- Mori, H., Manabe, T., Watanabe, M., Satoh, Y., Suzuki, N., Toki, S., Nakamura, K., Yagi, T., Kushiya, E., Takahashi, T., Inoue, Y., Sakimura, K. and Mishina, M.** (1998): Role of the carboxy-terminal region of the GluR epsilon2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel. *Neuron* 21, 571-80.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S.** (1991): Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354, 31-7.
- Mu, Y., Otsuka, T., Horton, A. C., Scott, D. B. and Ehlers, M. D.** (2003): Activity-dependent mRNA splicing controls ER export and synaptic delivery of NMDA receptors. *Neuron* 40, 581-94.
- Okabe, S., Miwa, A. and Okado, H.** (1999): Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 7781-92.
- Olney, J. W.** (1990): Excitotoxicity: an overview. *Canada diseases weekly report = Rapport hebdomadaire des maladies au Canada* 16 Suppl 1E, 47-57; discussion 57-8.
- Paoletti, P.** (2011): Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *The European journal of neuroscience* 33, 1351-65.
- Papadakis, M., Hawkins, L. M. and Stephenson, F. A.** (2004): Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. *The Journal of biological chemistry* 279, 14703-12.

- Perez-Otano, I., Schulteis, C. T., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J. S., Sucher, N. J. and Heinemann, S. F.** (2001): Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 1228-37.
- Petralia, R. S., Al-Hallaq, R. A. and Wenthold, R. J.** (2009): Trafficking and Targeting of NMDA Receptors. In *Biology of the NMDA Receptor* (Van Dongen, A. M., ed.), Boca Raton (FL).
- Petralia, R. S., Sans, N., Wang, Y. X. and Wenthold, R. J.** (2005): Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Molecular and cellular neurosciences* 29, 436-52.
- Prybylowski, K., Fu, Z., Losi, G., Hawkins, L. M., Luo, J., Chang, K., Wenthold, R. J. and Vicini, S.** (2002): Relationship between availability of NMDA receptor subunits and their expression at the synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 8902-10.
- Qiu, S., Hua, Y. L., Yang, F., Chen, Y. Z. and Luo, J. H.** (2005): Subunit assembly of N-methyl-d-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* 280, 24923-30.
- Qiu, S., Zhang, X. M., Cao, J. Y., Yang, W., Yan, Y. G., Shan, L., Zheng, J. and Luo, J. H.** (2009): An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-Methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of biological chemistry* 284, 20285-98.
- Rotaru, D. C., Yoshino, H., Lewis, D. A., Ermentrout, G. B. and Gonzalez-Burgos, G.** (2011): Glutamate receptor subtypes mediating synaptic activation of prefrontal cortex neurons: relevance for schizophrenia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 142-56.
- Rothstein, J. D.** (1995): Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neuroscience* 3, 348-59.
- Ryan, T. J., Emes, R. D., Grant, S. G. and Komiyama, N. H.** (2008): Evolution of NMDA receptor cytoplasmic interaction domains: implications for organisation of synaptic signalling complexes. *BMC neuroscience* 9, 6.
- Sans, N., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Blahos, J., 2nd, Hell, J. W. and Wenthold, R. J.** (2000): A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at

- hippocampal synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 1260-71.
- Sans, N., Prybylowski, K., Petralia, R. S., Chang, K., Wang, Y. X., Racca, C., Vicini, S. and Wenthold, R. J.** (2003): NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nature cell biology* 5, 520-30.
- Sans, N., Wang, P. Y., Du, Q., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Nakka, S., Blumer, J. B., Macara, I. G. and Wenthold, R. J.** (2005): mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nature cell biology* 7, 1179-90.
- Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W. Y., MacDonald, J. F. and Tymianski, M.** (2000): Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 22-33.
- Scott, D. B., Blanpied, T. A. and Ehlers, M. D.** (2003): Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology* 45, 755-67.
- Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C. and Ehlers, M. D.** (2001): An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 3063-72.
- Selkoe, D. J.** (2002): Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789-91.
- She, K., Ferreira, J. S., Carvalho, A. L. and Craig, A. M.** (2012): Glutamate binding to the GluN2B subunit controls surface trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *The Journal of biological chemistry* 287, 27432-45.
- Sheng, M.** (2001): Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7058-61.
- Schorge, S. and Colquhoun, D.** (2003): Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 1151-8.
- Schuler, T., Mesic, I., Madry, C., Bartholomaeus, I. and Laube, B.** (2008): Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-

- methyl-D-aspartate receptor assembly. *The Journal of biological chemistry* 283, 37-46.
- Small, D. H., Mok, S. S. and Bornstein, J. C.** (2001): Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nature reviews. Neuroscience* 2, 595-8.
- Sobolevsky, A. I., Beck, C. and Wollmuth, L. P.** (2002): Molecular rearrangements of the extracellular vestibule in NMDAR channels during gating. *Neuron* 33, 75-85.
- Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P. and Gouaux, E.** (2009): X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462, 745-56.
- Sprengel, R., Suchanek, B., Amico, C., Brusa, R., Burnashev, N., Rozov, A., Hvalby, O., Jensen, V., Paulsen, O., Andersen, P., Kim, J. J., Thompson, R. F., Sun, W., Webster, L. C., Grant, S. G., Eilers, J., Konnerth, A., Li, J., McNamara, J. O. and Seeburg, P. H.** (1998): Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* 92, 279-89.
- Standley, S., Petralia, R. S., Gravell, M., Hamilton, R., Wang, Y. X., Schubert, M. and Wenthold, R. J.** (2012): Trafficking of the NMDAR2B receptor subunit distal cytoplasmic tail from endoplasmic reticulum to the synapse. *PloS one* 7, e39585.
- Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N. and Wenthold, R. J.** (2000): PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28, 887-98.
- Steigerwald, F., Schulz, T. W., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., Seeburg, P. H. and Kohr, G.** (2000): C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 4573-81.
- Steward, O. and Schuman, E. M.** (2001): Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annual review of neuroscience* 24, 299-325.
- Stocca, G. and Vicini, S.** (1998): Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *The Journal of physiology* 507 (Pt 1), 13-24.
- Storey, G. P., Opitz-Araya, X. and Barria, A.** (2011): Molecular determinants controlling NMDA receptor synaptic incorporation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 6311-6.

- Tomita, S., Nicoll, R. A. and Brecht, D. S.** (2001): PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *The Journal of cell biology* 153, F19-24.
- Tovar, K. R. and Westbrook, G. L.** (1999): The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 4180-8.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J. and Dingledine, R.** (2010): Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62, 405-96.
- Ulbrich, M. H. and Isacoff, E. Y.** (2008): Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14163-8.
- Ulbrich, M. H. and Isacoff, E. Y.** (2007): Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nature methods* 4, 319-21.
- Vicini, S., Wang, J. F., Li, J. H., Zhu, W. J., Wang, Y. H., Luo, J. H., Wolfe, B. B. and Grayson, D. R.** (1998): Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of neurophysiology* 79, 555-66.
- Vissel, B., Krupp, J. J., Heinemann, S. F. and Westbrook, G. L.** (2001): A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nature neuroscience* 4, 587-96.
- Washbourne, P., Bennett, J. E. and McAllister, A. K.** (2002): Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nature neuroscience* 5, 751-9.
- Washbourne, P., Liu, X. B., Jones, E. G. and McAllister, A. K.** (2004): Cycling of NMDA receptors during trafficking in neurons before synapse formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 8253-64.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. and Mishina, M.** (1992): Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3, 1138-40.

- Wenthold, R. J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N. and Petralia, R. S. (2003):** Trafficking of NMDA receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 43, 335-58.
- Wenzel, A., Benke, D., Mohler, H. and Fritschy, J. M. (1997):** N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2D subunit in the retina are selectively expressed in rod bipolar cells. *Neuroscience* 78, 1105-12.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. and Bear, M. F. (2006):** Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093-7.
- Xia, H., Hornby, Z. D. and Malenka, R. C. (2001):** An ER retention signal explains differences in surface expression of NMDA and AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology* 41, 714-23.
- Yang, W., Zheng, C., Song, Q., Yang, X., Qiu, S., Liu, C., Chen, Z., Duan, S. and Luo, J. (2007):** A three amino acid tail following the TM4 region of the N-methyl-D-aspartate receptor (NR) 2 subunits is sufficient to overcome endoplasmic reticulum retention of NR1-1a subunit. *The Journal of biological chemistry* 282, 9269-78.
- Yao, Y., Harrison, C. B., Freddolino, P. L., Schulten, K. and Mayer, M. L. (2008):** Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. *The EMBO journal* 27, 2158-70.
- Yuen, E. Y., Jiang, Q., Chen, P., Gu, Z., Feng, J. and Yan, Z. (2005):** Serotonin 5-HT1A receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 5488-501.
- Zukin, R. S. and Bennett, M. V. (1995):** Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends in neurosciences* 18, 306-13.